

Aktivierung des Wnt-Signalwegs und
der DNA-Reparatur durch Antigene der
Schistosoma mansoni-Ova

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

vorgelegt von Jakob Hermann Josef Weglage
aus Osnabrück
Berlin 2024

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: Herr PD Dr. Torsten Hain

Tag der Disputation: 10.02.2025

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	III
1 Einleitung und Zielsetzung.....	1
2 Literaturübersicht	2
2.1 Schistosomiasis mansoni.....	2
2.1.1 Morphologie und Lebenszyklus von <i>Schistosoma mansoni</i>	2
2.1.2 Pathophysiologie der Schistosomiasis	3
2.1.3 Epidemiologie der Schistosomiasis.....	4
2.1.4 Soluble Egg Antigen (SEA) und Interleukin-4-induzierendes Prinzip von <i>Schistosoma mansoni</i> Eiern (IPSE).....	5
2.2 Kolorektale Karzinome	6
2.2.1 Übersicht und Epidemiologie.....	6
2.2.2 Ätiologie und Pathogenese des kolorektalen Karzinoms.....	6
2.2.3 Der Wnt-Signalweg.....	8
2.2.3.1 Der kanonische Wnt-Signalweg.....	9
2.2.3.2 Der Wnt-Signalweg in der kolorektalen Karzinogenese.....	10
2.2.3.3 Experimentelle Hemmung des kanonischen Wnt-Signalwegs.....	11
2.2.4 c-Jun/AP1-Signalweg und Cyclin D1 in der Tumorentwicklung	11
2.2.4.1 Experimentelle Hemmung der c-Jun-Aktivierung	12
2.2.4.2 c-Jun Aktivierung und Cyclin D1-Induktion bei Schistosomiasis mansoni	12
2.2.5 DNA-Schädigung in der kolorektalen Karzinogenese	12
2.2.5.1 PARP-1.....	13
2.2.5.2 γ H2a.X.....	13
2.3 Fragestellung der vorliegenden Arbeit.....	14

3	Material und Methoden	14
3.1	Material	14
3.1.1	Geräte	14
3.1.2	<i>Software</i>	16
3.1.3	Zelllinien	16
3.1.3.1	Medien und Zusätze	17
3.1.3.2	<i>Schistosoma mansoni</i> -Ova Antigene als Zellkulturstimulanzen.....	17
3.1.3.3	Inhibitoren der JNK und des kanonischen Wnt-Signalwegs.....	17
3.1.4	Reagenzien und Chemikalien.....	18
3.1.4.1	Puffer und Lösungen	19
3.1.5	Antikörper	22
3.1.5.1	Primärantikörper <i>Western Blot</i>	22
3.1.5.2	Sekundärantikörper <i>Western Blot</i>	24
3.1.5.3	Primärantikörper Immunhistochemie.....	24
3.1.5.4	Detektionssystem Immunhistochemie.....	24
3.1.6	Verbrauchsmaterial	25
3.2	Methoden.....	26
3.2.1	Hamstermodell der <i>Schistosoma mansoni</i> -Infektion.....	26
3.2.2	Zellkultur.....	27
3.2.2.1	Auftauen, Kultivierung und Passage der Zellen.....	27
3.2.2.2	Aussaat bestimmter Zellzahlen für Stimulationsversuche	28
3.2.2.3	Stimulationsversuche der Zelllinien.....	28
3.2.2.4	Kombinierte Stimulations- und Inhibitionsversuche der Zelllinien....	29
3.2.2.5	Herstellung der Zelllysate der SW620-Zellen.....	30
3.2.3	<i>Western Blot</i> und <i>Phosphokinase Proteome Profiler™ Array</i>	30

3.2.3.1	<i>Western Blot</i> Analyse	30
3.2.3.2	<i>Phosphokinase Proteome Profiler™ Array</i>	33
3.2.4	Histologische Methoden.....	33
3.2.4.1	Paraffineinbettung	33
3.2.4.2	Immunhistochemie	33
3.2.4.3	Fotografietechnik der immunhistochemischen Färbungen.....	35
3.2.5	Statistische Auswertung und graphische Darstellung	35
4	Ergebnisteil.....	38
4.1	Induktion protoonkogener Faktoren in SEA-stimulierten SW620-Zellen	38
4.2	Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs und von <i>Downstream</i> -Faktoren durch Antigene der <i>Schistosoma mansoni</i> -Ova	39
4.2.1	Immunhistochemischer Nachweis zytoplasmatisch und nukleär erhöhter β -Cateninexpression in der Umgebung der <i>Schistosoma mansoni</i> -Ova im Kolon bisex-infizierter Hamster.....	40
4.2.2	Proteinbiochemischer Nachweis einer Induktion des kanonischen Wnt-Signalwegs im Kolon bisex-infizierter Hamster	44
4.2.2.1	β -Catenin im Kolongewebe bisex-infizierter Hamster tendenziell erhöht	44
4.2.2.2	Vergleichbare Induktion von p-GSK-3 β im Kolon bisex- und monosex-infizierter Hamster.....	45
4.2.3	In SW620-Zellkultur Induktion von Proteinen des kanonischen Wnt-Signalwegs nach Stimulation mit SEA und HEK-IPSE.....	46
4.2.3.1	Tendenzielle Induktion von β -Catenin in SW620-Zellen nach Stimulation mit HEK-IPSE	46
4.2.3.2	Induktion von p-GSK-3 β in SW620-Zellen durch Stimulation mit SEA	47

4.2.3.3	Induktion von Cyclin D1 in SW620-Zellen durch Stimulation mit SEA	48
4.2.4	p-β-Catenin tendenziell erhöht durch Wnt-Inhibition mit XAV939 und Inkubation mit PBS bei unverändertem Cyclin D1	50
4.3	c-Jun in SW620-Zellen durch Stimulation mit HEK-IPSE induziert und zu p-c-Jun aktiviert.....	52
4.3.1	Verringerung der durch HEK-IPSE vermittelten c-Jun-Aktivierung durch JNK-Inhibition	54
4.4	Induktion von Markerproteinen für DNA-Schädigung in Kolonproben infizierter Hamster sowie in Zellkultur	57
4.4.1	Induktion von PARP-1 und γH2a.X im Kolon bisex-infizierter Hamster	57
4.4.2	Induktion von PARP-1 und γH2a.X durch Stimulation mit HEK-IPSE und SEA	59
5	Diskussion	62
5.1	Ergebnisdiskussion.....	65
5.1.1	Wnt-Aktivierung durch Antigene der <i>S. mansoni</i> -Ova in Zellkultur und im Kolon bisex-infizierter Hamster	65
5.1.1.1	Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs durch Stimulation in Zellkultur	65
5.1.1.2	Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs im Kolon bisex-infizierter Hamster.....	67
5.1.2	Aktivierung von Protoonkogenen beziehungsweise Wnt-Downstream-Faktoren durch Antigene der <i>Schistosoma mansoni</i> -Ova in Zellkultur	69
5.1.3	Verminderung der HEK-IPSE-abhängigen c-Jun-Aktivierung unter JNK-Inhibition in Zellkultur	71
5.1.4	Veränderung der Stimulationsergebnisse unter Wnt-Inhibition.....	72

5.1.5	Erhöhung von DNA-Schädigungsmarkern durch Antigene der <i>Schistosoma mansoni</i> -Ova in Zellkultur und im Kolon bisex-infizierter Hamster	75
5.2	Methodendiskussion und Limitationen	76
5.2.1	Tierversuchsmodell bisex- und monosex-infizierter syrischer Goldhamster	76
5.2.2	Stimulations- und Inhibitionsversuche in Zellkultur	77
5.2.2.1	SEA und HEK-IPSE	78
5.2.3	Proteinbiochemische Auswertung	79
5.2.4	Statistische und testtheoretische Limitationen	80
5.3	Ausblick	80
6	Zusammenfassung	82
6.1	Zusammenfassung in deutscher Sprache	82
6.2	Zusammenfassung in englischer Sprache	84
7	Abkürzungs-, Abbildungs-, Tabellenverzeichnis	86
7.1	Abkürzungsverzeichnis	86
7.2	Abbildungsverzeichnis	88
7.3	Tabellenverzeichnis	88
8	Literatur- und Bildquellenverzeichnis	90
8.1	Literaturverzeichnis	90
8.2	Bildquellenverzeichnis	99
9	Anhang	100
10	Publikationsverzeichnis, Kongressbeitrag	101
11	Ehrenwörtliche Erklärung	102
12	Danksagung	103

1 Einleitung und Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich anhand von Zellkultur- und Tierversuchsmodellen mit der Frage, ob die durch den Parasiten *Schistosoma mansoni* (*S. mansoni*) hervorgerufene Erkrankung – die Schistosomiasis mansoni – die Entstehung von Darmkrebs begünstigen kann.

Dass die Entstehung einiger Malignome des Menschen mit Infektionserkrankungen assoziiert sein können, ist für bakterielle, virale und auch parasitäre Erreger bekannt. Weltweit waren im Jahr 2018 13% aller Krebsfälle mit einer Infektion assoziiert [96]. Unter den Parasiten, die die Entstehung maligner Erkrankungen begünstigen, sind die Leberegel *Opisthorchis viverrini* und *Clonorchis sinensis*. Diese zählen wie die Schistosomen zu den Trematoden und sind mit einem erhöhten Risiko für cholangiozelluläre Karzinome assoziiert [67, 134]. Für *S. mansoni* und *Schistosoma japonicum* ist ein Zusammenhang mit Leberzellkarzinomen bekannt [118, 142], während *Schistosoma haematobium* mit Blasenkarzinomen assoziiert ist [17, 151]. In unserer Arbeitsgruppe wurden in Leberpräparaten von Hamstern mit chronischer Schistosomiasis mansoni Aktivierungen definierter protoonkogener Signalwege nachgewiesen [118].

Die vorliegende Arbeit soll zur Klärung der Frage beitragen, ob durch die chronische Schistosomiasis mansoni eine kolorektale Karzinogenese begünstigt wird. Die wissenschaftliche Fachliteratur diskutiert diese Frage kontrovers. In einigen Veröffentlichungen wird ein Zusammenhang zwischen intestinaler Schistosomiasis mansoni und der Entstehung von Darmkrebs abgelehnt [44], während andere einen solchen Zusammenhang vermuten [60, 87]. Um der Forschungsfrage nach einem Zusammenhang zwischen Schistosomiasis mansoni und kolorektalen Karzinomen nachzugehen, wurden molekulare Marker und Signalwege untersucht, die vor allem das frühe Stadium der kolorektalen Karzinogenese kennzeichnen, sowie Marker für eine DNA-Schädigung.

2 Literaturübersicht

2.1 Schistosomiasis mansoni

2.1.1 Morphologie und Lebenszyklus von *Schistosoma mansoni*

Parasiten der Gattung *Schistosoma* sind zweigeschlechtliche Würmer, deren Endwirt der Mensch ist [88]. Je nach Spezies befällt der Wurm in der adulten Form die intestinalen oder paravesikulären Venolen, in denen sie sich vom Blut des Wirts ernähren, sich paaren und täglich einige hundert bis einige tausend Eier (Ova) ausscheiden [29]. Schistosomen werden auch als Pärchenegel bezeichnet, da in ihrer adulten Form die Männchen die Weibchen mit ihren Körperrändern umschließen und sich anschließend in Dauerkopula befinden [29, 89]. Die Ova werden vom Menschen entweder über den Urin oder den Stuhl ausgeschieden oder verbleiben im Gewebe, wo sich um diese Ova herum ein Immunprozess entwickelt, der die Pathologie der Erkrankung maßgeblich mitverursacht [29]. Aus ausgeschiedenen Ova, die ins Süßwasser gelangen, schlüpfen innerhalb von Minuten die Miracidien [88]. Diese haben anschließend ein Zeitfenster von einigen Stunden, um in den Zwischenwirt einzudringen [89]. Die Zwischenwirte sind Süßwasserschnecken, in denen die Miracidien sich zu Sporozysten entwickeln und sich asexuell vermehren [29]. Bei *S. mansoni* ist der Zwischenwirt die Süßwasserschneckengattung *Biomphalaria* (abgebildet in Abb. 1, unten rechts) [29]. Aus den durch asexuelle Vermehrung entstandenen Tochttersporozysten entwickeln sich die für den Menschen infektiösen Zerkarien [88]. Nachdem sie ausgereift sind, verlassen die Zerkarien die Schnecken und schwimmen frei im Wasser [88]. Zerkarien sind nur für wenige Stunden für den Menschen infektiös [88]. Eine Infektion erfolgt, indem die Zerkarien durch die Haut in den Körper eindringen, Blut- oder Lymphgefäße erreichen und sich in ein Schistosomulum transformieren [29, 43, 89]. Die Schistosomula migrieren innerhalb einiger Tage mit dem Blutstrom über die Venen ins rechte Herz und in den Lungenkreislauf [88, 105]. Dort nehmen sie für die Lungenpassage eine längliche Form an und durchwandern anschließend die Körperarterien bis zu der Vena portae hepatis, in der sie sich initial niederlassen [105]. Die Schistosomula ernähren sich von Blut, reifen zu adulten Würmern und paaren sich [105]. Die adulten Pärchenegel migrieren anschließend gegen den Blutfluss zu den Venolen, wo sie ihre Ova ablegen [105].

Adulte *S. mansoni*-Paare haben im Menschen ohne spezifische Therapie ein mittleres Überleben von 5-10 Jahren [149]. Bei der Art *S. mansoni* findet die Eiablage vornehmlich in den mesenterialen Venolen des Kolons und Dünndarms statt [105]. Seltener können aber auch Ova im Rektum, Magen, in der Gallenblase, der Milz und den Nebennieren nachgewiesen werden [53]. Auch in der Harnblase, die typischerweise eher von *Schistosoma haematobium* befallen wird, können in einigen Fällen *S. mansoni*-Ova nachgewiesen werden [30, 53].

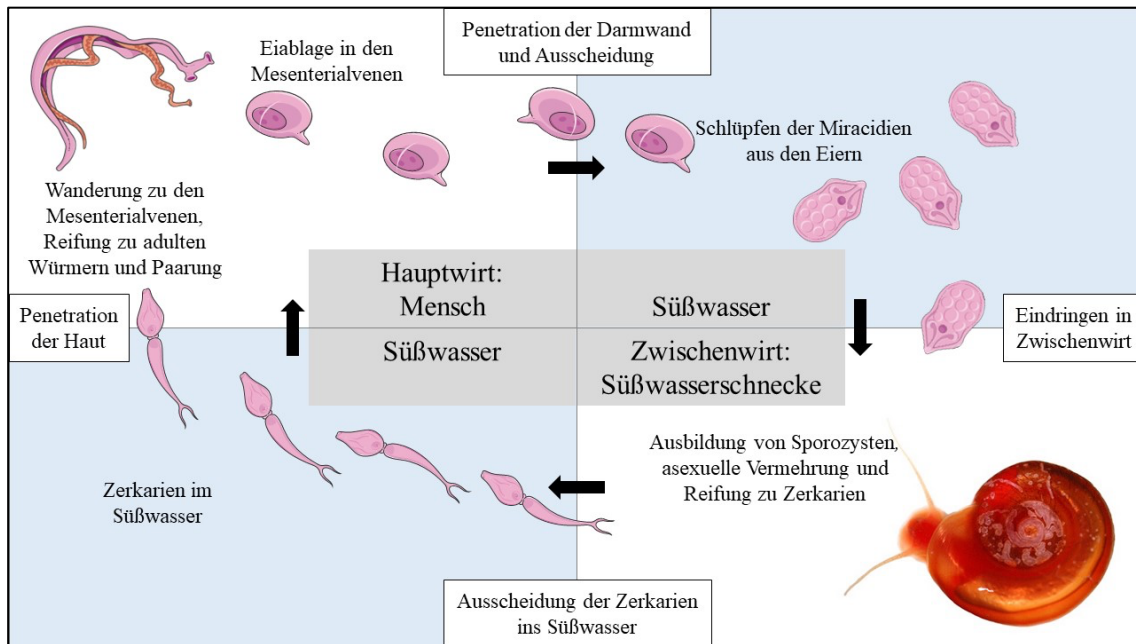


Abbildung 1: Schematischer Lebenszyklus der *Schistosoma mansoni*

Dargestellt ist eine vereinfachte Form des Lebenszyklus des Parasiten *S. mansoni*. Die Grafik stellt den Lebenszyklus als Abfolge von Infektion des Haupt- und Zwischenwirtes, asexueller und sexueller Vermehrung sowie Ausscheidung der infektiösen Formen des Parasiten ins Süßwasser im Uhrzeigersinn dar. Zwischen der Infektion des Hauptwirtes Mensch (links oben) und des Zwischenwirtes Süßwasserschnecke (unten rechts) befinden sich im Lebenszyklus von *S. mansoni* jeweils Entwicklungsstadien des Parasiten im Süßwasser. Das für den Menschen infektiöse Entwicklungsstadium der Schistosomen ist das der Zerkarien (links unten). Diese können durch die menschliche Haut bis in das Blut- oder Lymphsystem penetrieren. Nach der Wanderung zu den Mesenterialvenen, der Ausreifung zu adulten Würmern und der sexuellen Paarung werden Eier abgelegt (links oben). Diese penetrieren die Darmwand. Wenn sie ins Süßwasser gelangen, schlüpfen die Miracidien (rechts oben), die in die Süßwasserschnecken eindringen können (rechts unten). In diesen erfolgt eine weitere Transformation zu Sporozysten und eine asexuelle Vermehrung. Anschließend werden Schistosomen in der Entwicklungsform der Zerkarien ins Süßwasser freigesetzt (links unten), womit sich der Lebenszyklus schließt. Die Abbildung wurde mit Microsoft Power Point® 2019 erstellt. Anteile der Abbildung wurden verändert aus bestehenden Grafiken mit *Creative Commons*-Lizenzen von Lewis, Liang, Raghavan und Knight (*WIKIMEDIA COMMONS*) beziehungsweise *Servier Medical Art* übernommen. Die genauen Quellen der *Creative Commons*-Grafiken sind im Bildquellenverzeichnis einzusehen.

2.1.2 Pathophysiologie der Schistosomiasis

Die Schistosomiasis, historisch auch Bilharziose genannt, ist die Erkrankung, die sich auf Grundlage einer Infektion mit Schistosomen entwickeln kann [88]. Symptomarme oder

asymptomatische Verläufe sind bei Menschen aus Endemiegebieten häufig. Menschen aus anderen Regionen, die beispielsweise als Touristen Endemiegebiete besuchen, haben häufiger symptomatische Verläufe [121]. Die Symptome der Schistosomiasis entstehen aufgrund der lokalen und systemischen Immunantwort des Körpers gegen die Ova [8, 29]. Die Symptomatik der Infektionen mit den verschiedenen Schistosomenarten unterscheidet sich daher je nach den typischem Ablageorten der Ova [113].

Im Rahmen der akuten Reaktion kann sich innerhalb einiger Wochen nach der Infektion das Katayama-Syndrom entwickeln. Hierbei handelt es sich um eine Hypersensitivitätsreaktion des Körpers auf die Schistosomen-Antigene [121]. Die Symptome einer akuten Infektion werden über eine zelluläre Immunantwort durch T-Helferzellen vom Typ 1 (T_H1) vermittelt [24, 113]. Symptome sind nächtliches Fieber, Husten, abdominelle Beschwerden, Muskel- und Kopfschmerzen [121].

Bei der chronischen Schistosomiasis verbleiben Ova, die nicht ausgeschieden werden können, im Gewebe. Um diese bilden sich im Verlauf Granulome [29]. Dieser Prozess wird durch T-Helferzellen vom Typ 2 (T_H2) vermittelt [24]. Eine chronische Schistosomiasis mansoni betrifft vornehmlich die Leber und den Darm [120]. In der Leber können die kollagenreichen Granulome zu portaler Hypertension und Leberfibrose führen [22, 120, 152] und können zu der Entstehung von Leberzellkarzinomen beitragen [118]. Eine chronische Schistosomiasis im Kolon bewirkt eine chronische Entzündung und eine vor allem im Sigma auftretende Polyposis [44, 99, 106]. Inwiefern diese Form der Polyposis als Zwischenschritt in der Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms (CRC) gesehen werden kann, wird kontrovers diskutiert [60]. Die chronische Entzündung des Darms bei der chronischen Schistosomiasis ist ebenso eine T_H2 -gewichtete Immunreaktion [8, 24] wie die Entzündungsreaktion des Kolons bei einer Colitis ulcerosa (CU) [108], welche wie unten näher erläutert mit einem erhöhten Risiko für ein CRC einhergeht [40].

2.1.3 Epidemiologie der Schistosomiasis

Infektionen mit Schistosomen haben weltweit unter den parasitären Infektionen eine der höchsten Prävalenzen [146]. Im Jahr 2021 hätten mehr als 250 Millionen Menschen weltweit einer präventiven Chemoprophylaxe für die Schistosomiasis bedurft, nur etwa 30% dieses Therapiebedarfs wurde gedeckt [151]. Schistosomen sind vor allem in

subtropischen und tropischen Regionen prävalent [151]. Neben den klimatischen Bedingungen sind sozioökonomische Faktoren und der Zugang zu sauberem Wasser wichtige Faktoren [151]. 90% aller behandlungsbedürftigen Erkrankungsfälle entfallen auf den afrikanischen Kontinent [151]. Auch außerhalb dieser Regionen beschreiben Fallberichte Infektionsfälle. Die für den Lebenszyklus des Parasiten als Zwischenwirte notwendigen Süßwasserschneckenarten wurden auf Korsika, in Portugal und auf den Balearen entdeckt. Auf Korsika wurden bereits einzelne Infektionsfälle beschrieben [15]. Im Kontext der globalen Klimaerwärmung lässt sich dies als Frühzeichen einer Ausdehnung des für Schistosomen geeigneten Lebensraums in klimatisch gemäßigte Regionen interpretieren. Zusätzlich dürfte auch infolge der globalen Migrationsbewegungen die Schistosomiasis eine zunehmende Bedeutung in bisher nicht endemischen Regionen wie etwa Europa oder Nordamerika bekommen. Unter aus Subsaharaafrika immigrierten Menschen wurde eine Prävalenz von Schistosomeneiern im Stuhl von 5,1% nachgewiesen [7].

2.1.4 Soluble Egg Antigen (SEA) und Interleukin-4-induzierendes Prinzip von *Schistosoma mansoni* Eiern (IPSE)

Als *Soluble Egg Antigen* (SEA) bezeichnet man eine Mischung der wasserlöslichen Extrakte der *S. mansoni*-Ova [98]. SEA besteht vornehmlich aus den hydrophilen Bestandteilen der Ova, die erst beim Untergang und dem Zerfall der Ova ins Gewebe austreten. SEA beinhaltet aber auch die sekretorischen Proteine der Ova [98]. Experimentell ist SEA etabliert als ein Induktor für die Wirtsreaktion auf Ova [98].

Das „Interleukin-4-induzierende Prinzip von *S. mansoni* Eiern“ (IPSE) ist ein sekretorisches Glykoprotein der *S. mansoni*-Ova [124]. Unter den von den Ova sekretierten Proteinen macht IPSE einen Anteil von über 80% aus [97] und wird von *S. mansoni* ausschließlich im Reifungsstadium der Ova produziert und sezerniert [125]. Das Ausmaß der IPSE-Sekretion der Ova korreliert positiv mit der Größe der parasitär induzierten Granulomentwicklung [79]. IPSE interagiert mit dem Immunsystem des Wirtsorganismus, indem es beispielsweise eine Degranulation von basophilen Granulozyten bewirkt [124]. Namensgebend für das Protein ist die Anregung der Produktion und Freisetzung von Interleukin 4 (IL-4) durch IPSE in den basophilen Granulozyten [126]. Zusätzlich enthält IPSE ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS), sodass es nach Aufnahme in die Zelle nachweislich auch in den Nukleus menschlicher

Zellen transloziert [74]. Aufgrund dieser Erkenntnis werden Funktionen des Proteins IPSE vermutet, die über die beschriebenen Wirkungen hinausgehen [74].

2.2 Kolorektale Karzinome

2.2.1 Übersicht und Epidemiologie

Als kolorektales Karzinom (CRC) bezeichnet man das Karzinom, welches aus den Epithelzellen und insbesondere aus den kryptennahen Stammzellen des Kolons oder Rektums mittels einer Zusammenkunft aus epigenetischen Veränderungen und genetischen Mutationen entsteht [75, 133]. Weltweit war das CRC im Jahr 2022 mit fast zwei Millionen jährlich dokumentierten Fällen und damit etwa 18% aller bekannten Krebsfälle nach Brust- und Lungenkrebs die Krebsentität mit der dritthöchsten Inzidenz [50]. In der Mortalitätsstatistik stand das CRC nach dem Lungenkrebs mit etwa 900.000 Todesfällen im Jahr 2022 auf Rang zwei [50]. Die weltweite Verteilung der Inzidenz des CRC ist ungleichmäßig [49]. Überdurchschnittlich häufig kommt das CRC in Ländern mit einem hohen Lebensstandard wie in den europäischen Ländern, den USA, Australien und in Teilen Ostasiens vor. Menschen, die auf dem Kontinent Afrika leben, sind dagegen deutlich seltener betroffen [49]. Für die Zukunft werden je nach Weltregionen unterschiedliche Prognosen für die Entwicklung der CRC-Inzidenzen gestellt [5]. Insgesamt soll die jährliche Inzidenz bis zum Jahr 2040 nach Prognosen um ca. 1,3 Millionen auf 3,2 Millionen jährliche Fälle ansteigen, was weltweit einer Erhöhung von über 60% entspräche [102]. Allerdings ist die erwartete Zunahme global nicht gleich verteilt. In Ländern mit einem sehr niedrigen *Human Development Index* (HDI) wird bis zum Jahr 2040 relativ zum gegenwärtig niedrigen Status eine größere Zunahme von über 100% erwartet. In Ländern mit sehr hohem HDI wird die Inzidenz voraussichtlich ebenfalls steigen. Mit etwa 35% Inzidenzzuwachs relativ zum gegenwärtigen Stand dürfte diese Zunahme aber hinter dem weltweiten Trend zurückbleiben. In absoluten Zahlen werden auch 2040 die höchsten CRC-Inzidenzen in den Ländern mit einem hohen oder sehr hohen HDI erwartet [5, 102].

2.2.2 Ätiologie und Pathogenese des kolorektalen Karzinoms

Malignome werden dem Modell der *Hallmarks of cancer* von Hanahan und Weinberg zufolge durch einige *Hallmarks* gekennzeichnet [61]. Zu diesen zählt unter anderem das

Aufrechterhalten der Aktivität proliferationsfördernder Signalwege [61]. Als Basis der Entwicklung dieser *Hallmarks* bei der Karzinogenese werden zwei Ursachen genannt: 1. eine genomische Instabilität mit vermehrten Mutationen und 2. Entzündungen und Immunreaktionen [61]. Diese *Hallmarks* gelten für Malignome im Allgemeinen und somit auch für das CRC.

Die individuelle Wahrscheinlichkeit der Entstehung eines CRC wird durch das Zusammenwirken verschiedener Risikofaktoren moduliert. Diese lassen sich in beeinflussbare und nicht beeinflussbare Risikofaktoren unterteilen. Zu den beeinflussbaren Risikofaktoren gehören die Ernährung, der Alkoholkonsum und die regelmäßige Einnahme bestimmter Medikamentenklassen. Zu den nicht beeinflussbaren Risikofaktoren zählen genetische Ursachen, eine positive Familienanamnese im Hinblick auf CRC, das Alter und chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) [69]. Der Zusammenhang zwischen dem CRC und CED, welcher vor beinahe einem Jahrhundert erstmals beschrieben wurde [32], soll hier betont werden. In Übereinstimmung mit dem Modell nach Hanahan und Weinberg [61] beruht die Krebsentstehung im Zusammenhang mit CED auf einer chronischen Entzündung [108]. Für Patientinnen und Patienten mit Colitis ulcerosa (CU) steigt das Erkrankungsrisiko für ein CRC mit der Erkrankungsdauer der CU an und erreicht nach mehreren Jahrzehnten einen Wert im niedrigen zweistelligen Prozentbereich [40]. Die entzündliche Genese des CRC ist im Fall der CU vornehmlich T_H2-vermittelt [108].

CRC entstehen aus gesunden Epithelzellen durch eine Ansammlung von epigenetischen Veränderungen [48, 133] und DNA-Schäden beziehungsweise Mutationen [72]. Einige dieser zufälligen Veränderungen bewirken Aktivierungen von wachstums- und proliferationsfördernden Protoonkogenen zu Onkogenen oder Inaktivierungen von hemmenden Tumorsuppressorgenen. In der Summe können diese Veränderungen zur Entstehung von CRC führen [48, 138]. Die Entwicklung vom gesunden Epithel zum Karzinom wird mit dem Modell der Adenom-Karzinom-Sequenz des CRC beschrieben [48]. Dieses Modell besagt, dass einem CRC klassischerweise verschiedene Vorstufen vorausgehen [48, 138]. Diese Entwicklung beginnt mit einer epithelialen Hyperplasie, aus der Polypen beziehungsweise Adenome entstehen [138]. Für diese Entwicklung vom normalen Epithel zum CRC sind neben makro- und mikroskopischen Veränderungen bestimmte Mutationen kennzeichnend, die erstmalig von Fearon und Vogelstein

beschrieben wurden [48]. Unter den Mutationen, die oft früh in der Adenom-Karzinom-Sequenz auftreten, sind aktivierende Mutationen im Wnt-Signalweg [48] und Genom- beziehungsweise Chromosomeninstabilität [48, 130].

Aufgrund der Erkenntnis, dass hyperplastisches Epithel in Form von Polypen eine präkanzeröse Zwischenstufe in der kolorektalen Karzinogenese darstellen kann, wurden Präventionsstrategien entwickelt, die insbesondere auf Vorsorgekoloskopien beruhen [37]. Durch das frühzeitige Erkennen und Entfernen von Vorstufen des CRC kann eine signifikante Reduktion der Inzidenz des CRC bewirkt werden [27, 153].

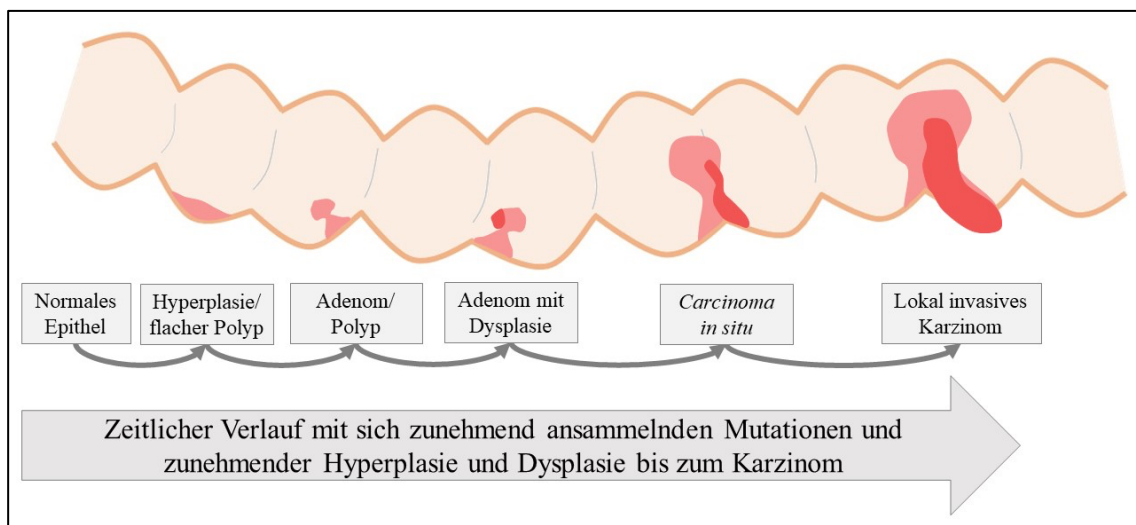


Abbildung 2: Adenom-Karzinom-Sequenz

Schematische Darstellung eines eröffneten Kolonabschnitts mit Blick auf die epithelbekleidete Innenseite. Von links nach rechts wird entlang des Kolonabschnitts der typische zeitliche Verlauf der kolorektalen Karzinogenese im Sinne der Adenom-Karzinom-Sequenz dargestellt. Ausgehend vom gesunden Epithel entwickelt sich eine lokale Hyperplasie. Die Hyperplasie kann in ein Adenom übergehen. Im weiteren Verlauf nimmt die Differenzierung des Epithels ab und an den Adenomen können Dysplasien auftreten. Am Ende der Entwicklung steht die Entwicklung eines Karzinoms. Bei lokaler Begrenzung spricht man von einem *Carcinoma in situ*, wenn die Basalmembran durchbrochen wurde von einem lokal invasiven Karzinom. Dem dargestellten phänotypischen Verlauf entspricht eine Ansammlung von (epi-)genetischen Veränderungen (modifiziert mit Microsoft Power Point® 2019 nach Palma 2019 [109]).

2.2.3 Der Wnt-Signalweg

Der Wnt-Signalweg ist eine Proteinsignalkaskade, die proliferationsfördernd wirkt. Während der Entwicklung des intestinalen Epithels in der Embryogenese spielt diese Kaskade eine entscheidende Rolle. Im intestinalen Epithel eines erwachsenen, gesunden Menschen hat sich eine Homöostase des Wnt-Signalwegs eingestellt [56]. Ein experimentelles Ausschalten des Signalwegs sorgt für Zellzyklusarrest [56], während eine Aktivierung desselbigen über verschiedene Signalwege den Zellmetabolismus zum Wachstum und zur Vermehrung anregt [127, 140].

Grundsätzlich werden drei Wnt-Signalwege unterschieden, die alle über membranständige Rezeptoren der *Frizzled*-Familie (FZD) aktiviert werden [127]. Erstens der kanonische Wnt-Signalweg, auch FZD/ β -Catenin-Signalweg, zweitens der FZD/ Ca^{2+} -Signalweg und drittens der FZD/*Planar cell polarity*-Signalweg [127]. Die beiden letztgenannten Signalwege werden auch als nichtkanonische Wnt-Signalwege bezeichnet und sind in ihrem Effekt unabhängig von β -Catenin [116, 127]. In dieser Arbeit wird der Fokus auf den zuerst genannten, kanonischen Wnt-Signalweg gelegt.

2.2.3.1 Der kanonische Wnt-Signalweg

Das Zielprotein des kanonischen Wnt-Signalwegs ist das β -Catenin. Im nichtaktivierten Grundzustand des kanonischen Wnt-Signalwegs bewirkt der β -Catenin *destruction complex* eine Phosphorylierung des β -Catenins. Dadurch wird das Protein für eine Ubiquitinylierung markiert und anschließend im Proteasom abgebaut [85, 86]. Somit wird die Konzentration des β -Catenins nicht durch Regulierung der Proteinsynthese und/oder -freisetzung reguliert. Vielmehr wird die β -Catenin-Konzentration durch den im nichtaktivierten Zustand effektiveren Abbau des Proteins in einem niedrigkonzentrierten Gleichgewicht gehalten [85]. Der hierfür verantwortliche β -Catenin *destruction complex* ist aus verschiedenen Proteinen zusammengesetzt. Dazu zählen das *Adenomatous-polyposis-coli*-Protein (APC), Axin und die Glykogensynthase-Kinase 3 β (GSK-3 β) [116, 123]. Das APC-Gen ist in der Karzinogenese eines CRC eine typische Lokalisation für Mutationen, welche den *destruction complex* deaktivieren [48, 103]. Die GSK-3 β ist eine Kinase des *destruction complex*, die β -Catenin durch Phosphorylierung zum Abbau markiert [18]. Um diese Funktion zu erfüllen, ist die GSK-3 β auf die Interaktion mit den weiteren Proteinen des Komplexes angewiesen [86, 104, 144].

Die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs wird durch einen FZD-Rezeptor initiiert. In der Folge führt dies mittels verschiedener posttranslationaler Proteinmodifikationen an den Proteinen des β -Catenin *destruction complex* zu dessen Inaktivierung [18, 85]. Eine dieser Proteinmodifikationen ist eine inaktivierende Phosphorylierung der GSK-3 β an Serin 9, welche daraufhin weniger effektiv β -Catenin phosphoryliert [63]. Infolge der geringeren Aktivität der phosphorylierten GSK-3 β (p-GSK-3 β) und somit des gesamten *destruction complex* wird der Abbau β -Catenins gehemmt, sodass es im Zytoplasma akkumuliert und in den Zellkern transloziert [127].

Dort wirkt es gemeinsam mit weiteren Proteinen als Koaktivator für Transkriptionsfaktoren der T-Zellfaktorgruppe (TCF) [18, 80, 145]. In der Folge werden zahlreiche Proteine vermehrt transkribiert und aktiviert. Zu diesen zählen unter anderem Cyclin D1 [140] sowie c-Jun, ein Anteil des AP1-Transkriptionsfaktors [94].

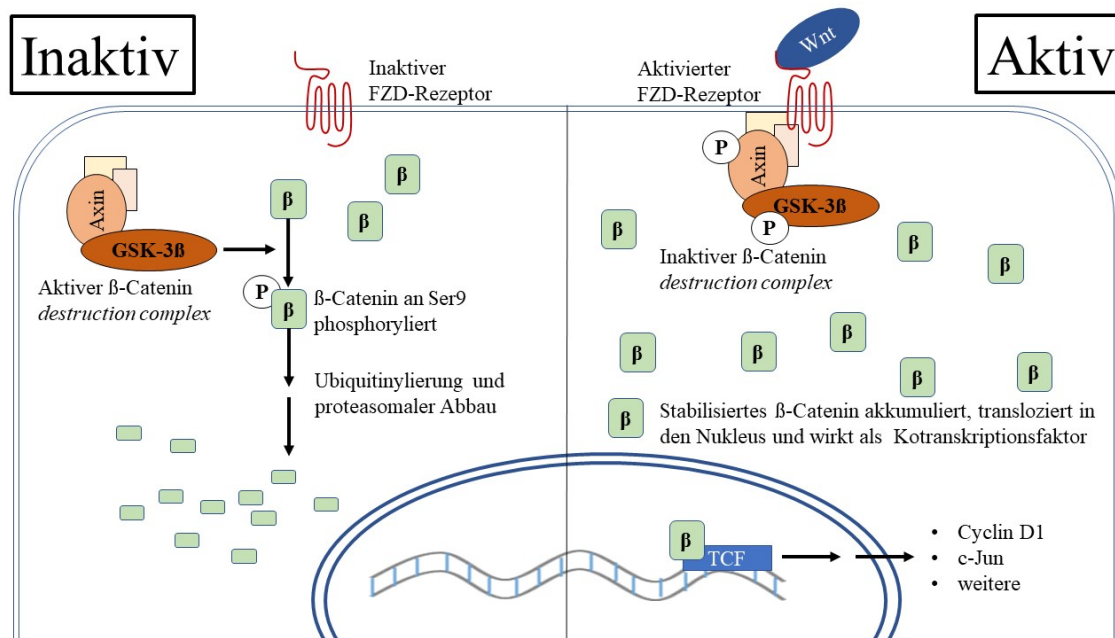


Abbildung 3: Der kanonische Wnt-Signalweg

Schematischer Aufbau einer Zelle mit Zytoplasma und Nucleus. Die linke Hälfte der Zelle zeigt den nichtaktivierten kanonischen Wnt-Signalweg. An dem membranständigen, G-Protein gekoppelten FZD-Rezeptor hat kein Ligand gebunden. In diesem Zustand ist der β -Catenin *destruction complex* aktiv und β -Catenin akkumuliert nicht. Die von β -Catenin abhängige Transkription ist somit unterbrochen. Die rechte Hälfte der Zelle zeigt den aktivierten kanonischen Wnt-Signalweg. Die Aktivierung erfolgt, indem der membranständige FZD-Rezeptor einen Liganden bindet. Infolgedessen lagert sich der *destruction complex* an die Zellmembran. Die Proteinbestandteile des *destruction complex* werden posttranslational modifiziert und hierdurch inaktiviert. Ein Beispiel hierfür ist die GSK-3 β , die phosphoryliert wird. Infolge dieser Inaktivierung akkumuliert β -Catenin im Zytoplasma, transloziert in den Nucleus und wirkt als Kofaktor für die Gentranskription (modifiziert mit Microsoft Power Point® 2019 nach Patel 2019 [111]).

2.2.3.2 Der Wnt-Signalweg in der kolorektalen Karzinogenese

Im Modell der Adenom-Karzinom-Sequenz sind unter den früh eintretenden Veränderungen typischerweise Mutationen im kanonischen Wnt-Signalweg [48, 68]. Diese Mutationen betreffen meist das APC-Gen, wodurch der β -Catenin *destruction complex* konstant inaktiviert oder ineffektiv wird [48]. Das führt zu einer konstitutiv höheren β -Catenin-Konzentration und zu einer verstärkten Wirkung des Signalwegs [48]. Ebenfalls bekannt sind Mutationen von β -Catenin, welche der Phosphorylierung entgegenwirken und β -Catenin so vor dem Abbau schützen [68, 103]. Neben den erworbenen Mutationen bei sporadischen CRC gibt es eine Anzahl hereditärer Syndrome,

in denen das APC-Gen mutiert ist [52]. Zu diesen zählt die autosomal-dominant vererbte familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) [52]. Die Bedeutung des kanonischen Wnt-Signalwegs für die kolorektale Karzinogenese wird dadurch unterstrichen, dass mit der FAP ein einhundertprozentiges Lebenszeitrisiko für ein CRC einhergeht [52].

2.2.3.3 Experimentelle Hemmung des kanonischen Wnt-Signalwegs

Der kanonische Wnt-Signalweg kann experimentell gehemmt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde dazu das Enzym Tankyrase inhibiert [66]. Die Tankyrase wirkt regulierend auf den kanonischen Wnt-Signalweg ein, indem sie das Protein Axin poly-ADP-ribosyliert (PARyliert). Dadurch wird Axin destabilisiert und vermehrt degradiert [95]. Da Axin Teil des *destruction complex* ist, führt diese Degradierung zu einer Steigerung der kanonischen Wnt-Aktivität [77, 111]. Zur Hemmung der Tankyrase wurde in der vorliegenden Arbeit das Molekül XAV939 genutzt [95].

2.2.4 c-Jun/AP1-Signalweg und Cyclin D1 in der Tumorentwicklung

In der vorliegenden Dissertationsschrift werden neben Auswertungen einiger Faktoren des kanonischen Wnt-Signalwegs auch Auswertungen für die protoonkogenen Proteine c-Jun und Cyclin D1 gezeigt. Diese sollen im Folgenden vorgestellt werden.

c-Jun ist ein Protein, welches einen Anteil des Transkriptionsfaktors *Activator Protein 1* (AP-1) bildet [42]. Die AP-1-Aktivität spielt eine wichtige Rolle bei Prozessen des Zellwachstums und -überlebens, der Apoptose und der Genregulation [129] und wird unter anderem durch posttranslationale Modifikationen reguliert [42]. Eine dieser Modifikationen ist die aktivierende, N-terminale Phosphorylierung c-Juns zu p-c-Jun durch die c-Jun-N-terminale Kinase (JNK) [10]. Das Protein c-Jun ist ein Protoonkogen [16, 42]. Verschiedene Tumorentitäten sind assoziiert mit übernormal aktivem c-Jun [41, 122]. Dies gilt auch für die CRC-Entstehung [62, 147].

Cyclin D1 ist ein Protein, das im Zellzyklus für die Progression der G1- in die S-Phase benötigt wird [35]. Cyclin D1 ist ein Protoonkogen und es ist in einer Reihe maligner Neubildungen [35] wie auch dem CRC [4] überexprimiert. Cyclin D1 wird durch eine Vielzahl an Signalwegen reguliert, zu denen auch der kanonische Wnt-Signalweg [131] und der c-Jun/AP-1-Signalweg [42] gehören.

2.2.4.1 Experimentelle Hemmung der c-Jun-Aktivierung

Die aktivierende Phosphorylierung von c-Jun durch die JNK kann experimentell inhibiert werden [12]. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete JNK-Inhibitor ist SP600125. Dieser inhibiert selektiv und reversibel die verschiedenen Isoformen von JNK und vermindert die JNK-abhängige Phosphorylierung von c-Jun [12].

2.2.4.2 c-Jun Aktivierung und Cyclin D1-Induktion bei Schistosomiasis mansoni

Durch unsere Arbeitsgruppe wurde in Leberbiopsien von mit *S. mansoni* infizierten Menschen eine Aktivierung c-Juns in räumlicher Nähe zu den Ova beobachtet [118]. Diese c-Jun-Aktivierung ließ sich auch in Zellkultur mit primären Leberzellen durch Stimulation mit SEA und IPSE reproduzieren [118]. Weiterhin wurde in unserer Arbeitsgruppe parallel zu den hier vorgestellten Ergebnissen an Kolonbiopsien von mit *S. mansoni* infizierten Hamstern gezeigt, dass in räumlicher Nähe zu den *S. mansoni*-Ova vermehrt (p-)c-Jun und Cyclin D1 induziert werden [150]. In der humanen Darmkrebszelllinie SW620 führte eine Stimulation mit SEA zu einer Induktion von c-Jun und p-c-Jun, die durch eine Hemmung der JNK vermindert werden konnte [150]. In Leberbiopsien von mit *S. mansoni* infizierten Hamstern sowie in mit SEA stimulierten Hepatozyten konnte ebenfalls eine Induktion von Cyclin D1 nachgewiesen werden [21].

2.2.5 DNA-Schädigung in der kolorektalen Karzinogenese

Für die Entstehung sporadischer CRC sind Mutationen und epigenetische Veränderungen ursächlich [72, 130]. Zu dieser Aussage passen Beobachtungen, dass CRC-Zelllinien zumeist entweder eine Chromosomen- oder Mikrosatelliteninstabilität aufweisen [84]. Genetische Instabilität tritt typischerweise früh in der kolorektalen Karzinogenese auf, was zu einer allgemein höheren Mutations- und DNA-Schädigungsrate führt [130]. Folglich ist auch die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Mutationen höher, die Protoonkogene zu Onkogenen aktivieren oder Tumorsuppressorgene inaktivieren. Deswegen ist für die Erkennung einer beginnenden kolorektalen Karzinogenese auch eine Einschätzung der DNA-Schädigung sinnvoll. In der vorliegenden Arbeit wurden mit PARP-1 und γ H2a.X zwei Proteine untersucht, die als Markerproteine für DNA-Schädigung gelten [14, 31].

2.2.5.1 PARP-1

Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase 1 (PARP-1) ist ein Protein, das mittels mehrerer Zinkfingerdomänen DNA-Schäden erkennen kann [11, 55, 81]. Bei DNA-Schädigung steigt die intrazelluläre PARP-1-Konzentration an [70]. PARP-1 modifiziert verschiedene andere Proteine [115] und sich selbst [26, 36] posttranslational durch Poly-ADP-Ribosylierung (PARylierung). PARP-1 reagiert auf DNA-Doppelstrang- [11] und -Einzelstrangbrüche [55]. Zusätzlich ist PARP-1 auch an verschiedenen DNA-Reparaturwegen beteiligt [90, 93, 117]. Auf molekularer Ebene katalysiert aktiviertes PARP-1 die Umsetzung des für den Citratzyklus benötigten Coenzym Nicotinamidadenindinukleotid (NAD^+) zu Poly-ADP-Ribose (PAR) [14, 139]. Der NAD^+ -Umsatz ist abhängig vom Ausmaß des DNA-Schadens [14]. Durch den Wegfall von NAD^+ als Coenzym im Energiestoffwechsel kann es bis zu einem Abfall des zellulären Energieträgers Adenosintriphosphat (ATP) auf unphysiologisch niedrige Konzentrationen kommen [132, 154]. Eine starke DNA-Schädigung kann auf diesem Weg zu einem Zelluntergang führen [139], was auch als Suizid-Hypothese der Funktion von PARP-1 bezeichnet wird [13]. In einer Reihe von Tumorentitäten wird PARP-1 überexprimiert [107]. Auch in kolorektalen Karzinomen und Adenomen wurde ein erhöhtes PARP-1 gezeigt [65, 107].

Es ergibt sich ein zwiespältiges Bild der Wirkung von PARP-1 [38, 112]. Einerseits überwacht das Protein die DNA und initiiert bei einer Schädigung je nach Ausmaß des Schadens die Reparatur oder den Zelltod [11, 13, 93]. Andererseits ist PARP-1 auch mit Malignomen assoziiert [107, 112]. Die DNA-reparierende Eigenschaft von PARP-1 hemmt die Entstehung kolorektaler Karzinome. Bereits entstandene CRC werden aber durch die Wirkung von PARP-1 in ihrem Fortschreiten und Wachstum gefördert [38].

2.2.5.2 $\gamma\text{H2a.X}$

H2a.X ist eine Variante des Histons H2a [119]. H2a.X wird bei Auftreten von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) am Serin 139 phosphoryliert [78]. In diesem phosphorylierten Zustand wird es als $\gamma\text{H2a.X}$ bezeichnet und partizipiert an der Reparaturantwort auf die DNA-Schädigung [31, 128]. Die posttranslationale Modifikation von H2a.X zu $\gamma\text{H2a.X}$ geschieht innerhalb von Sekunden nach einem DSB [119]. Aufgrund dieses Umstandes ist $\gamma\text{H2a.X}$ ein etablierter Marker für DSB [31, 78].

γ H2a.X nimmt eine regulierende Rolle in DSB-Reparaturmechanismen ein [128], weswegen γ H2a.X auch als Tumorsuppressor bezeichnet werden kann [31]. Tierexperimente mit γ H2a.X-Knockout ergaben Phänotypen mit einer erhöhten Genominstabilität [25]. Im Doppelknockout von γ H2a.X mit P53 zeigte sich eine erhöhte Tumorneigung [9, 128]. Andererseits gilt ein erhöhtes γ H2a.X als prognostisch ungünstiger Biomarker für das CRC [83]. γ H2a.X korreliert mit Aggressivität und Progress von Tumoren [31, 83].

2.3 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Die vorliegende Dissertationsschrift beschäftigt sich mit dem übergeordneten Thema, ob und auf welche Weise eine Infektion mit *S. mansoni* vermittelt durch die Ova und die Ova-Antigene eine Karzinogenese-fördernde Wirkung auf Kolonenterozyten hat. Im Speziellen wird die Wirkung der Ova-Antigene bei einer Infektion auf folgende an das Modell der Adenom-Karzinom-Sequenz angelehnte Faktoren untersucht:

1. Protoonkogene im kanonischen Wnt-Signalweg, *Downstream*-Faktoren und JNK-/c-Jun-Aktivität und
2. Proteinmarker für das Ausmaß der auftretenden DNA-Schädigung.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Das für die Experimente der vorliegenden Dissertationsschrift verwendete Material wird in den nachfolgenden Abschnitten aufgeführt.

3.1.1 Geräte

Tabelle 1: Material - Geräte

Geräte	Hersteller
ChemoStar ECL & Fluorescence Imager	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Electrophoresis Power Supply Consort	Fisher Bioblock Scientific, Villeneuve-d'Ascq (Frankreich)

Geräte	Hersteller
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr®-Werk Biberach, Biberach
Gefrierschrank (-80 °C)	Thermo Fisher Scientific®, Waltham, Massachusetts (USA)
HERACELL 150 i CO2 Incubator	Thermo Fisher Scientific®, Waltham, Massachusetts (USA)
Kamera CoolHx540	Nikon®, Minato, Japan
Kühlschrank Profi Line	Liebherr®, Ochsenhausen
LaminAir HBB	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Lichtmikroskop DMIL	Leica® Microsystems, Wetzlar
Lichtmikroskop DMRB	Leica® Microsystems, Wetzlar
Magnetrührer RCTB	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Microliter Syringe Model 805	Hamilton Company, Reno, Nevada (USA)
MIKRO 120 (Zentrifuge)	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Mini-PROTEAN® Tetra Handcast Systems	BIO-RAD® Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien (USA)
Pipette serologisch 10 mL	Greiner Bio-One® International GmbH, Kremsmünster (Österreich)
Pipette serologische 5 mL	Greiner Bio-One® International GmbH, Kremsmünster (Österreich)
Pipetten Abimed	International Labmate Ltd, St Albans (Vereinigtes Königreich)
Pipetten Research plus	Eppendorf® SE, Hamburg
Pipetus®-akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
UltraRocker™ Rocking Plattform	BIO-RAD™ Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien (USA)

Geräte	Hersteller
Westernblotkammer Biometra® Fastblot™ B44	Analytik Jena GmbH+Co.KG, Jena (ehem. Biometra®)

3.1.2 Software

Tabelle 2: Material - Software

Software	Entwickler
ImageJ®, Version 1.4.3.67	Wayne Rasband (NIH), Bethesda USA
Microsoft Excel ®2019	Microsoft® Corporation, Redmond USA
Microsoft PowerPoint ® 2019	Microsoft® Corporation, Redmond USA
SPSS®, Version 26.0	IBM ®, Armonk USA

3.1.3 Zelllinien

In den Stimulations- und Inhibitionsversuchen wurde die Zelllinie SW620 verwendet. Wichtige Eigenschaften können der nachfolgenden Tabelle entnommen werden.

Tabelle 3: Material - Zelllinie

Firma	CLS Cell Lines Service GmbH, Eppelheim
Bezeichnung	SW620
Produktnummer	300466
Organismus	<i>Homo sapiens</i> (humane Zelllinie)
Gewebe	Dickdarm
Morphologie	Epithelial
Patienteninformation	51-jähriger, kaukasischer Mann
Zelltyp	Kolorektales Adenokarzinom, <i>Dukes' type C</i>
Wachstumseigenschaften	Adhärent
Beschreibung	SW620 entstammt einer Lymphknotenmetastase bei Rezidiv der Krebserkrankung.

3.1.3.1 Medien und Zusätze

Tabelle 4: Material – Medien und Zusätze Zellkultur

Medien und Zusätze	Hersteller
DPBS	Lonza Group AG, Basel (Schweiz)
FBS Good (Filtrated Bovine Serum)	PAN TM -Biotech GmbH, Aidenbach
Penicillin/Streptomycin/Amphotericin B Mix	PAN TM -Biotech GmbH, Aidenbach
RPMI 1640	PAN TM -Biotech GmbH, Aidenbach
Trypan Blue Stain 0.4 %	Gibco TM , Carlsbad, (Kalifornien, USA)
Trypsin/EDTA	PAN TM -Biotech GmbH, Aidenbach

3.1.3.2 *Schistosoma mansoni*-Ova Antigene als Zellkulturstimulanzen

Die Stimulanzen wurden von der Kooperationspartnerin Dr. Gabriele Schramm (Borstel) zur Verfügung gestellt.

Tabelle 5: Material - Zellkulturstimulanzen

Zellkulturstimulanzen
In <i>human embryonic kidney cells</i> (HEK-Zellen) rekombinant hergestelltes Interleukin-4-induzierendes Prinzip von <i>Schistosoma mansoni</i> Eiern (HEK-IPSE) (0,46 mg/ml)
<i>Phosphate-Buffered Saline</i> (PBS-Puffer): Derselbe Puffer, in dem HEK-IPSE und SEA gelöst vorliegen
<i>S. mansoni</i> soluble egg antigens (SEA) (1,52 mg/mL)

3.1.3.3 Inhibitoren der JNK und des kanonischen Wnt-Signalwegs

Tabelle 6: Material - Proteininhibitoren

Proteininhibitor	Hersteller
JNK-Inhibitor II SP600125	Calbiochem® (Merck® KGaA), Darmstadt
Tankyrase-Inhibitor XAV939 (Wnt-Hemmung)	Sigma-Aldrich® Corporation, (Merck® KGaA), St. Louis (USA)

3.1.4 Reagenzien und Chemikalien

Tabelle 7: Material – Reagenzien und Chemikalien

Reagenzien und Chemikalien	Hersteller
Ammoniumperoxodisulfat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA) pH 7	Merck® KGaA, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Dimethylsulfoxid ROTIPURAN®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Dodecylsulfate-Na-salt in pellets	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ethanol ROTIPURAN®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Glycin PUFFERAN®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Hydrochloric acid (HCl)	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim
Isopropanol	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim
Luminol	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim
Methanol	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim
Milchpulver (Blotting grade)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Neo Mount Wasserfreies Eindeckmittel	Merck® KGaA, Darmstadt
Neo-Clear (Xylol-Ersatz)	Merck® KGaA, Darmstadt
Nuclear Fast Red Counterstain	Vector Laboratories® Inc., Newark USA
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific®, Waltham, Massachusetts (USA)

Reagenzien und Chemikalien	Hersteller
p-Cumarsäure	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim
Polyoxyethylenesorbitan	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim
Proteome Profiler™ Human Phospho-Kinase Array Kit	R&D Systems, Inc., Minneapolis USA
Rotiphorese® Gel 30 (37, 5: 1)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Trinatriumcitrat-Dihydrat	Merck® KGaA, Darmstadt
Tris Base	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim
TRIS PUFFERAN®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Vector® Blue Substrate Kit, Alkaline Phosphatase (AP)	Vector Laboratories® Inc., Newark USA
Wasserstoffperoxid 30%	Merck® KGaA, Darmstadt
Xylol	VWR International GmbH, Darmstadt
Zitronensäure	Merck® KGaA, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim

3.1.4.1 Puffer und Lösungen

Tabelle 8: Material – Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen	Rezept
Citratpuffer: Stammlösung A pH 2,1:	21,01 g Zitronensäure 0,1 M mit Aqua dest. auf 1 L aufgefüllt
Stammlösung B pH 8,4:	29,41 g Trinatriumcitrat-Dihydrat 0,1 M mit Aqua dest. auf 1 L aufgefüllt
Gebrauchsfertiger Citratpuffer pH 6,0:	9 mL Stammlösung A

Puffer und Lösungen	Rezept
	41 mL Stammlösung B mit Aqua dest. auf 500 mL aufgefüllt
ECL-Entwicklungslösung	950 µL Aqua dest. 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
Lämmli-Puffer (1x)	1500 µL Aqua dest. 500 µL Lämmli-Puffer-Stammlösung pH 6,8 (4x)
Lämmli-Puffer-Stammlösung pH 6,8 (4x)	40 % Glycerin 20 % β-Mercaptoethanol 8 % SDS 20 % 1 M Tris HCl pH 6,8 0,02 % Bromphenolblau auf 100% mit Aqua dest. aufgefüllt
Laufpuffer (1x)	100 mL Laufpuffer-Stammlösung 900 mL Aqua dest.
Laufpuffer-Stammlösung pH 8,6 (10x)	10 g SDS 30 g Tris 144 g Glycin mit Aqua dest. auf 1 L aufgefüllt
PBS-Puffer pH 7,4 (1x) (Waschen IHC)	100 mL PBS-Puffer pH Stammlösung (10x) mit Aqua dest. auf 1 L aufgefüllt Titration mit HCL bis pH 7,4
PBS-Puffer pH Stammlösung (10x) (Waschen IHC)	80 g NaCl 2 g KCl 11,5 g Na ₂ HPO ₄ 2,45 g KH ₂ HPO ₄ mit Aqua dest. auf 1 L aufgefüllt

Puffer und Lösungen	Rezept
SDS-PAGE Sammelgellösung (3% Polyacrylamid)	330 µL Polyacrylamid Gel 30 2130 µL Aqua dest. 830 µL Tris Puffer pH 6,8 40 µL APS 4 µL TEMED
SDS-PAGE Sammelgelpuffer pH 6,8 (4x)	365 mL Aqua dest. 125 mL 2 M Tris pH 6,8 10 mL 20 % SDS
SDS-PAGE Trenngel-Lösung (10% Polyacrylamid)	3400 µL Polyacrylamid Gel 30 100 µL SDS 10 % 1950 µL Tris Puffer 2 M pH 8,8 4550 µL Aqua dest. 100 µL APS 10 µL TEMED
TBS-T-Puffer	250 mL 10 x TBS-Stammlösung 2,5 mL Tween 20 2250 mL Aqua dest.
Transferpuffer pH 9,2	5,82 g Tris (48 mM) 2,93 g Glycin (39 mM) 200 mL Methanol (20 %) mit Aqua dest. auf 1 L aufgefüllt
Trenngel-Puffer pH 8,8 (4x) für SDS-PAGE	375 mL 2 M Tris/HCl 10 mL SDS 115 mL Aqua dest.
Tris-Buffered Saline-Stammlösung 10x (TBS-Stammlösung 10x) pH 7,5	24,2 g Tris pH 7 (200 mM)

Puffer und Lösungen	Rezept
	80 g NaCl (1,37 M) mit Aqua dest. auf 1 L aufgefüllt
Tris-HCl/SDS pH 6,8 für SDS-PAGE	6,05 g Tris base (=0,5 M) in 40 mL Aqua dest. gelöst; mit 1 M HCl auf pH 6,8 eingestellt 100 mL Aqua dest. Lösung filtriert (0,45 µm) 0,4 g SDS (=0,4 %)

3.1.5 Antikörper

3.1.5.1 Primärantikörper *Western Blot*

Tabelle 9: Material - Primärantikörper *Western Blot*

Primärantikörper	Technische Angaben und Hersteller
c-Jun (60A8) Verdünnung 1:1.000 Molekulargewicht des nachzuweisenden Proteins: 43,48 kDa	Gewinnung: <i>Rabbit (monoclonal antibody)</i> Firma: Cell Signaling Technology® Inc., Cambridge (Vereinigtes Königreich) Art. Nr.: #9165
Cyclin D1 (DCS-6) Verdünnung 1:500 Molekulargewicht des nachzuweisenden Proteins: 37 kDa	Gewinnung: <i>Mouse (monoclonal antibody)</i> Firma: Santa Cruz Biotechnology® Inc., Dallas, Texas (USA) Art. Nr.: sc-20044
GAPDH Verdünnung: 1:10.000 Molekulargewicht des nachzuweisenden Proteins: 36 kDa	Gewinnung: <i>Mouse (monoclonal IgG2b)</i> Firma: ProteinTech® Group Inc., Rosemont (USA) Art. Nr.: 60004-1-Ig
PARP-1 Verdünnung: 1:1.000 Molekulargewicht des nachzuweisenden Proteins: 116 kDa (ganzes Protein) und 89 kDa (großes Fragment)	Gewinnung: <i>Rabbit (polyclonal antibody)</i> Firma: Cell Signaling Technology® Inc., Cambridge (Vereinigtes Königreich) Art. Nr.: #9542

Primärantikörper	Technische Angaben und Hersteller
Phospho-c-Jun (Ser63) (54B3) Verdünnung 1:1.000 Molekulargewicht des nachzuweisenden Proteins: 48 kDa	Gewinnung: <i>Rabbit (monoclonal antibody)</i> Firma: Cell Signaling Technology® Inc., Cambridge (Vereinigtes Königreich) Art. Nr.: #3270
Phospho-GSK-3β (Ser9) (5B3) Verdünnung 1:1.000 Molekulargewicht des nachzuweisenden Proteins: 46 kDa	Gewinnung: <i>Rabbit (monoclonal antibody)</i> Firma: Cell Signaling Technology® Inc., Cambridge (Vereinigtes Königreich) Art. Nr.: #9323
Phospho-Histone H2A.X (Ser139) (20E3) Verdünnung 1:1.000 Molekulargewicht des nachzuweisenden Proteins: 15 kDa	Gewinnung: <i>Rabbit (monoclonal antibody)</i> Firma: Cell Signaling Technology® Inc., Cambridge (Vereinigtes Königreich) Art. Nr.: #9718
Phospho-β-Catenin (Ser33/37/Thr41) Verdünnung 1:1.000 Molekulargewicht des nachzuweisenden Proteins: 92 kDa	Gewinnung: <i>Rabbit (monoclonal antibody)</i> Firma: Cell Signaling Technology® Inc., Cambridge (Vereinigtes Königreich) Art. Nr.: #9561
α-Tubulin Verdünnung 1:1.000 Molekulargewicht des nachzuweisenden Proteins: 52 kDa	Gewinnung: <i>Rabbit (polyclonal antibody)</i> Firma: Cell Signaling Technology® Inc., Cambridge (Vereinigtes Königreich) Art. Nr.: #2144
β-Catenin (Aminoterminaler Antigen) Verdünnung 1:1.000 Molekulargewicht des nachzuweisenden Proteins: 92 kDa	Gewinnung: <i>Rabbit (polyclonal antibody)</i> Firma: Cell Signaling Technology® Inc., Cambridge (Vereinigtes Königreich) Art. Nr.: #9581

3.1.5.2 Sekundärantikörper *Western Blot*

Tabelle 10: Material - Sekundärantikörper *Western Blot*

Sekundärantikörper	Technische Angaben und Hersteller
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, HRP Verdünnung 1:5.000	Gewinnung: Goat Reaktiv auf: Mouse-IgG Firma: Invitrogen®, Carlsbad, Kalifornien (USA) Art. Nr.: A16072
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, HRP Verdünnung 1:5.000	Gewinnung: Goat Reaktiv auf: Rabbit-IgG Firma: Invitrogen®, Carlsbad, Kalifornien (USA) Art. Nr.: A16104

3.1.5.3 Primärantikörper Immunhistochemie

Tabelle 11: Material - Primärantikörper Immunhistochemie

Primärantikörper	Technische Angaben und Hersteller
ChromPure Rabbit IgG (whole molecule) Verdünnung 1:22.400	Gewinnung: Rabbit (Ganzes, unkonjugiertes Protein IgG) Firma: Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Cambridge (Vereinigtes Königreich) 011-000-003
β-Catenin (Aminoterminaler Antigen) Verdünnung 1:2.000	Gewinnung: Rabbit (polyclonal antibody) Firma: Cell Signaling Technology® Inc., Cambridge (Vereinigtes Königreich) Art. Nr.: #9581

3.1.5.4 Detektionssystem Immunhistochemie

Genutzt wurde zur Entwicklung der immunhistochemischen Schnitte das Detektionssystem ImmPRESS® -AP Horse Anti-Rabbit IgG Polymer Detection Kit, Alkaline Phosphatase der Firma Vector Laboratories®, Inc., Burlingame, Kalifornien (USA) mit der Artikelnummer MP-5401. Die beinhalteten Produkte werden in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 12: Material - Detektionssystem Immunhistochemie

Bezeichnung	Übersetzung/Technische Angaben
ImmPRESS®-AP (alkaline phosphatase) Polymer Anti-Rabbit IgG Reagent (ready-to-use)	Alkalische Phosphatase-gekoppelter Antikörper gegen Kaninchen-IgG-Antikörper. Gewinnung: Pferd
2.5% Normal Horse Serum for blocking (ready-to-use)	2,5% gebrauchsfertiges, normales Pferdeserum zur Blockierung

3.1.6 Verbrauchsmaterial

Folgende Verbrauchsmaterialien kamen in den Experimenten zum Einsatz:

Tabelle 13: Material - Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Biosphere Filter Tips	SARSTEDT® AG & Co. KG, Nümbrecht
Biosphere Filter Tips 100	SARSTEDT® AG & Co. KG, Nümbrecht
CELLSTAR® 24 Well Cell Culture Plate	Greiner Bio-One® International GmbH, Kremsmünster (Österreich)
CELLSTAR® TUBES, 15 mL	Greiner Bio-One® International GmbH, Kremsmünster (Österreich)
CELLSTAR® TUBES, 50 mL	Greiner Bio-One® International GmbH, Kremsmünster (Österreich)
CELLSTAR® Zellkultur Schale	Greiner Bio-One® International GmbH, Kremsmünster (Österreich)
Disposable Glass Pasteur Pipettes 230 mm	VWR International GmbH, Darmstadt
Eppendorf®-Reaktionsgefäße 0,5 ml / 1,5 ml / 2 ml	Eppendorf® SE, Hamburg
Färbeeinsatz aus Hüttenglas für Färbeküvetten	R. Langenbrink, Emmendingen
Färbeküvette mit Falzdeckel aus Hüttenglas	R. Langenbrink, Emmendingen
Filterpapier	IKA-Werke, Staufen

Immobilon-P Transfer Membrane	Merck Millipore® Limited, Tullagreen, Carrigtohill ED (Irland)
Micro-Touch	Ansell, Richmond (Australien)
Neubauer Zählkammer	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Objektträger Super Frost Ultraplus	R. Langenbrink, Emmendingen
Objektträgerküvette Coplin Staining Jar with Cover, Glass	DWK Life Sciences (Wheaton), Großbritannien
Pipettenspitzen 1000 µL, blau	SARSTEDT® AG & Co. KG, Nümbrecht
Pipettenspitzen 10 µL, farblos	SARSTEDT® AG & Co. KG, Nümbrecht
Pipettenspitzen 200 µL, gelb	SARSTEDT® AG & Co. KG, Nümbrecht
Reagiergefäß 1,5 mL	SARSTEDT® AG & Co. KG, Nümbrecht
Reagiergefäß 2,0 mL	SARSTEDT® AG & Co. KG, Nümbrecht
Vernichtungsbeutel	SARSTEDT® AG & Co. KG, Nümbrecht

3.2 Methoden

3.2.1 Hamstermodell der *Schistosoma mansoni*-Infektion

Die Tierversuche wurden wie von Roderfeld et al. beschrieben [118] von unserem Kooperationspartner – der Arbeitsgruppe von Professor Christoph Grevelding, Parasitologie der JLU Gießen – durchgeführt. Als Zwischenwirte des Parasiten *S. mansoni* dienen Frischwasserschnecken (*Biomphalaria glabrata*), als Endwirte weibliche, syrische Goldhamster (*Mesocricetus auratus*). Die *S. mansoni*-Stämme wurden von der Bayer AG (Monheim) bezogen. Die Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit dem europäischen Übereinkommen zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Wirbeltiere (ETS Nr. 123; überarbeiteter Anhang A) durchgeführt und vom Regierungspräsidium Gießen genehmigt (Aktenzeichen V54-19 c 20/15 c GI 18/10 Nr. A1/2014). Die Proben stammen entweder von Hamstern, die nur mit einem Parasitengeschlecht infiziert wurden, genannt „monosexuell infiziert“ (ms) oder von gemischtgeschlechtlich infizierten Hamstern, genannt „bisexuell infiziert“ (bs). Es wurden Gewebeproben aus dem Kolon der Hamster verwendet.

Tabelle 14: Übersicht Infektionsstatus der Hamster

Zugeordnete Nummern der Hamster	Gruppenzugehörigkeit
58761, 62770, 62771, 62772, 62773, 62774, 62775, 63673, 63674, 63675, 63676	Bisexuell infiziert
58212, 59827, 59828, 59836	Monosexuell infiziert

3.2.2 Zellkultur

Im Folgenden wird beschrieben, welche Schritte zur Etablierung der SW620-Zellkultur sowie zur Durchführung der Stimulations- und Inhibitionsexperimente durchgeführt wurden.

3.2.2.1 Auftauen, Kultivierung und Passage der Zellen

Bei der Kulturaussaat der SW620-Zellen wurden die im flüssigen Stickstoff gelagerten Zellen aus dem Stickstoffbehälter entnommen und in einem Wasserbad bei 37 °C fast vollständig aufgetaut. Als noch ein kleiner Rest Eis im Röhrchen zu sehen war, wurden die Zellen in eine Zellkulturschale von 100 mm x 20 mm mit 10 mL frischem Medium gegeben. Als Medium diente RPMI mit 10% fetalem Kälberserum und 1% Penicillin/Streptomycin/Amphotericin. Die Zellen wurden bei 37 °C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ kultiviert.

Abhängig von der lichtmikroskopisch kontrollierten Bewachung der Platte wurden die Zellen ein- bis zweimal pro Woche passagiert. Dazu wurde eine neue Zellkulturschale mit 10 mL frischem Medium vorbereitet und das Medium der Vorgängerschale mithilfe einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt. Die Zellen wurden dreimal mit jeweils 10 mL PBS gewaschen und der PBS-Puffer jeweils abgesaugt. Anschließend wurde auf die Zellen 1 mL Trypsin-EDTA gegeben. Die Zellen wurden so für etwa fünf Minuten inkubiert, bis lichtmikroskopisch eine Ablösung der Zellen zu sehen war. Auf die gelösten Zellen wurden 4 mL frischen Mediums gegeben und das Gemisch wurde sorgfältig resuspendiert. Zuletzt wurde 1 mL der Zellsuspension in die vorbereitete, neue Zellkulturschale gegeben und unter den zuvor genannten Bedingungen im Brutschrank weiter inkubiert.

3.2.2.2 Aussaat bestimmter Zellzahlen für Stimulationsversuche

Für die Stimulationsversuche wurden 24-Well Platten vorbereitet, indem in jedes Well 500 µL serumhaltiges, zellfreies Medium gegeben wurden. Anschließend wurden wie oben beschrieben die sich in Kultur befindlichen SW620-Zellen mit 1 mL Trypsin-EDTA von der Zellkulturschale abgelöst und in 4 mL serumhaltigem Medium sorgfältig resuspendiert. Das Gesamtvolumen der Suspension betrug 5 mL. Von diesem Gesamtvolumen wurden 50 µL entnommen und im Verhältnis 1:2 mit Trypanblau gemischt. Mithilfe einer Pipette wurde eine ausreichende Menge davon in eine Neubauer Zählkammer gegeben. Anschließend wurden die Zellen der Gebrauchsanweisung dieser Zählkammer folgend unter dem Lichtmikroskop gezählt. Die in der ursprünglichen Zellsuspension vorliegende Zellzahl_{gesamt} wurde nach der untenstehenden Formel berechnet. Dabei entsprach das Volumen_{Suspension} 5 mL und der Verdünnungsfaktor bei der gewählten Verdünnung 2. Der weitere Faktor 2,5 ist vom Hersteller der Zählkammer vorgegeben.

$$Zellzahl_{gesamt} = 2,5 * Volumen_{Suspension} * Verdünnungsfaktor * Zellen_{gezählt}$$

Mithilfe der nun erhaltenen Zellzahl_{gesamt} ließ sich das für ein Well der 24-Well Platte benötigte Volumen_{Aussaat} berechnen. Außerdem wurde die Anzahl der Zellen benötigt, die pro Well ausgesät werden sollte (Zellzahl_{gewünscht}).

$$Volumen_{Aussaat} = \frac{Zellzahl_{gewünscht}}{Zellzahl_{gesamt}} * Volumen_{Suspension}$$

In die vorbereitete 24-Well Platte wurde in jedes Well nun das gleiche, berechnete Volumen_{Aussaat} pipettiert. Die 24-Well Platte wurde in den Brutschrank gestellt. Das Wachstum der Zellen wurde täglich lichtmikroskopisch überprüft und das serumhaltige Medium ebenfalls täglich gewechselt. Von der restlichen Zellsuspension wurde zur Aufrechterhaltung der Zellkultur 1 mL in eine neue, 10 mL frisches Medium enthaltene Zellkulturschale überführt. Diese wurde ebenfalls in den Brutschrank gestellt.

3.2.2.3 Stimulationsversuche der Zelllinien

Die Stimulationsversuche mit den SW620-Zellen wurden in den wie oben beschrieben vorbereiteten 24-Well Platten durchgeführt. Einen Tag vor dem Stimulationsversuch wurde das Medium gegen ein serumfreies und Penicillin/Streptomycin/Amphotericin-

freies RPMI ausgewechselt. Vor der Stimulation folgte eine weitere lichtmikroskopische Kontrolle. Verwendung fanden nur *Wells*, in denen die Zellen gleichmäßig gewachsen waren und eine Konfluenz zwischen 70% und 90% aufwiesen.

Zur Stimulation wurde das alte RPMI mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt und zügig durch 200 µL frisches RPMI ersetzt, welches der Versuchsplanung folgend je nach *Well* SEA, HEK-IPSE oder PBS enthielt. Verwendet wurde dasselbe PBS, in welchem die SEA- und IPSE-Proben gelöst waren. Ein beispielhaftes Pipettierschema findet sich im Anhang. Die so bestückten 24-*Well*-Platten kamen für vier Stunden in den Inkubator. Die Konzentrationen, mit denen die Zellen in den Stimulationsversuchen inkubiert wurden, können der Tabelle 15 entnommen werden.

Tabelle 15 – Konzentrationen der zur Stimulation in Zellkultur verwendeten Antigene der *S. mansoni*-Ova

<i>S. mansoni</i>-Ova-Antigen	Konzentration der Stammlösung	Verdünnung	Konzentration der Stimulationslösung
SEA	1,52 µg/µL	2:207	14,7 µg/mL
HEK-IPSE	0,46 µg/µL	4,5:209,5	9,9 µg/mL
		0,5:205,5	1,1 µg/mL

3.2.2.4 Kombinierte Stimulations- und Inhibitionsversuche der Zelllinien

Die kombinierten Stimulations- und Inhibitionsversuche erforderten neben der unter 3.2.2.3 beschriebenen Stimulation eine zusätzliche Inhibition. Zum einen wurde der Tankyraseinhibitor XAV939 eingesetzt, um den kanonischen Wnt-Signalweg zu inhibieren. Zum anderen wurde der JNK-Inhibitor SP600125, um die Kinase JNK zu inhibieren. Zu diesem Zweck wurden die Zellen jeweils vor dem Stimulationsbeginn und während der Stimulation mit dem jeweilig genutzten Inhibitor beziehungsweise DMSO (als Kontrolle), in welchem die Inhibitoren gelöst vorlagen, in der gleichen Verdünnung inkubiert. Die genutzten Verdünnungen und Inkubationszeiten lassen sich der Tabelle 16 entnehmen. Im Anschluss an die Vorinkubation erfolgte ein Stimulationsexperiment wie oben beschrieben unter Ergänzung des jeweiligen Inhibitors beziehungsweise DMSO.

Tabelle 16: Inhibitorverwendung in Zellkultur

Inhibitor (Bezeichnung)	(Vor-)Inkubationszeit	Verdünnung
JNK-Inhibitor (SP600125)	30 Minuten vor Stimulationsbeginn und während der Stimulation.	Stammlösung (20 mM) 1:2000 verdünnt (10 µM)
Tankyrase-Inhibitor (XAV939)	15 Stunden vor Stimulationsbeginn und während der Stimulation.	Stammlösung (5 mg/ml) 1:2000 verdünnt (2,5 µg/ml)

3.2.2.5 Herstellung der Zelllysate der SW620-Zellen

Nach abgelaufener Stimulationsdauer wurden die für den Stimulationsversuch beziehungsweise den kombinierten Stimulations- und Inhibitionsversuch auf einer 24-Well Platte befindlichen SW620-Zellen lysiert. Dazu wurde Lämmli-Puffer (1x) angesetzt. Das sich in jedem Well befindende Medium mit den jeweiligen Stimulanzien wurde mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt. Anschließend wurden 60 µL Lämmli-Puffer (1x) in jedes Well gegeben. Zu diesem Zweck wurde eine 200 µL Pipettenspitze genutzt, deren Spitze mit einer Schere ein wenig abgeschnitten worden war, sodass die Öffnung größer wurde. Mit der Pipettenspitze wurde gründlich über den Well-Boden geschabt, um weitere Zellen abzulösen. Die Zelllysate wurde vor dem Überführen in jeweils ein beschriftetes 500 µL Eppendorf®-Gefäß noch fünfmal auf- und abpipettiert. Anschließend wurden die Lysate für zehn Minuten bei 95 °C auf der Heizplatte erwärmt. Zum Zweck des Druckausgleichs wurden nach einer Minute die Deckel der Gefäße geöffnet und wieder verschlossen. Zuletzt wurden die Lysate zur Lagerung in den Gefrierschrank bei -20 °C einsortiert.

3.2.3 *Western Blot* und *Phosphokinase Proteome Profiler™ Array*

Im Folgenden werden die verwendeten proteinbiochemischen Analysemethoden des *Western Blots* und des *Phosphokinase Proteome Profiler™ Arrays* beschrieben.

3.2.3.1 *Western Blot* Analyse

Die *Western Blot* Analyse besteht zusammengefasst aus drei Schritten. Zuerst wird das Proteingemisch in einer Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt, dann werden die aufgetrennten Proteine auf eine

Polyvinylidenfluoridmembran (PVDF-Membran) übertragen und anschließend wird das Zielprotein immunchemisch nachgewiesen.

Der erste Schritt, die SDS-PAGE, ist ein Verfahren zur Auftrennung der Proteine nach ihrer Molekularmasse in einem elektrischen Feld. Das dazu genutzte Gel bestand aus zwei unterschiedlichen Anteilen, dem Sammel- und dem Trenngel (Tabelle 8). Bei dem Ansetzen der Gele war entscheidend, dass TEMED und APS als letzte Anteile direkt vor dem Gießen hinzugegeben wurden, um die Polymerisation zu starten. Das Gel wurde zwischen zwei Glasplatten gegossen, die in einem Gel-Gießrahmen eingespannt wurden. Die Glasplatten waren zuvor mit 70%igem Ethanol gereinigt worden. In diese Vorrichtung wurde in einem ersten Schritt bis zur Markierung Trenngel gefüllt. Zur Vermeidung von Blasen wurde das freibleibende Volumen mit Ethanol gefüllt. Nach etwa zwanzigminütiger Wartezeit war das Trenngel ausreichend polymerisiert. Das Ethanol wurde abgegossen und mit Filterpapier wurden dessen Rückstände vorsichtig aufgenommen. Danach wurde das frisch angesetzte Sammelgel in den verbleibenden Raum über dem Trenngel gegossen und ein Probenkamm mit zehn Taschen eingeführt. Nach weiteren 20 Minuten war auch das Sammelgel polymerisiert und der Probenkamm wurde entfernt. Die entstandenen Probenaschen wurden mit destilliertem Wasser gespült, sodass sich keine Luft mehr darin befand. Die mit Gel befüllten Glasplatten wurden in den Elektrodenrahmen und dieser in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Die Elektrophoresekammer wurde bis zur Markierung „2 Gele“ mit Laufpuffer (1x, Tabelle 8) und der Elektrodenrahmen mit den Glasplatten bis zum Oberrand befüllt.

Vor der Probenauftragung wurden die Proben aus dem Gefrierschrank genommen und für fünf Minuten im Heizblock bei 95 °C erhitzt. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert, geschüttelt und erneut zentrifugiert, um eine gute Durchmischung der ganzen Probe zu gewährleisten. Als nächstes wurde eine Microliter-Spritze genutzt, um die Proben in die Geltaschen zu füllen. Eine der Geltaschen wurde statt mit einer Probe mit einem Proteingewichtsmarker (PAGE *Ruler*) befüllt. Die Elektrophoresekammer wurde mit dem Deckel verschlossen und an den *Power supply* angeschlossen. Dieser wurde zuerst für zehn Minuten auf 100 V und danach auf 130 V eingestellt. Letztere Einstellung wurde für etwa eine Stunde gehalten.

Der zweite große Schritt ist der Proteintransfer auf die PVDF-Membran. Dazu wurde die PVDF-Membran mit einem Bleistift beschriftet und für jeweils ca. fünf Sekunden

nacheinander in Ethanol, destilliertem Wasser und in dem Transferpuffer (Tabelle 8) geschwenkt. Zusätzlich wurden pro Membran und Gel sechs in Transferpuffer getränkte Filterpapiere benötigt. Zuerst wurden drei von diesen in den Biometra® Fastblot™ gelegt und auf die Filterpapiere möglichst blasenfrei die vorbereitete PVDF-Membran. Anschließend wurde das Gel aus der Elektrophoresekammer entfernt, indem mit einem Plastikkeil die Deckglasplatte abgelöst, das Sammelgel mit einem Papiertuch vorsichtig entfernt und das Trenngel mit dem Keil von der Glasplatte abgelöst wurde. Das Gel wurde kurz im Transferpuffer gebadet und anschließend auf die Membran im Biometra® Fastblot™ gelegt. Anschließend wurde das Gel möglichst blasenfrei von den drei verbliebenen, getränkten Filterpapieren abgedeckt und der so gebildete Stapel unter leichtem, mit einem sauberen Röhrchen appliziertem Druck von verbleibenden Luftbläschen befreit. Anschließend wurde der Biometra® Fastblot™ mit seinem Deckel verschlossen und an das Stromgerät angeschlossen. Dies wurde auf eine Stromstärke von 60 mA pro PVDF-Membran und auf eine Laufzeit von einer Stunde eingestellt.

Der dritte Schritt ist der immunchemische Nachweis der jeweiligen Zielproteine nach abgeschlossenem Proteintransfer auf die PVDF-Membran. Dazu wurde die Membran zur Blockierung unspezifischer Bindungen für eine Stunde in 10 mL Tris Buffered Saline (TBS)-Tween-Puffer (TBS-T-Puffer) mit 5% gelöstem Milchpulver in einer Plastikbox auf der Schüttelplatte gebadet (Tabelle 8). Nun folgte die Vorbereitung der Primärantikörper, welche in TBS-T-Puffer mit 5% Milchpulver verdünnt wurden (Tabelle 9). Nach dem Blockieren der unspezifischen Bindungen folgten zwei zehnmütige Waschschrirte mit TBS-T-Puffer auf der Schüttelplatte. Danach wurde der vorbereitete Primärantikörper über die Membran gegeben und in der Plastikbox bei 4 °C auf einer Schüttelplatte über Nacht gelagert. Am nächsten Tag folgten drei zehnmütige Waschschrirte auf der Schüttelplatte mit je etwa 10 mL TBS-T-Puffer. Anschließend wurde die Membran mit einem passenden *horseradish peroxidase*-(HRP)-gekoppelten Sekundärantikörper (Tabelle 10) in Kontakt gebracht, welcher gegen die Antikörper der Spezies des Primärantikörpers reaktiv war. Dieser Sekundärantikörper war im Verhältnis von 1:5000 in TBS-T-Puffer mit 5% Milchpulver verdünnt worden und diese Verdünnung blieb auf der Membran für eine Stunde unter ständigem, sanftem Schütteln auf der Schüttelplatte. Es folgten drei weitere, zehnmütige Waschschrirte mit TBS-T-Puffer auf der Schüttelplatte. Zur Detektion wurde die Membran wenige Sekunden in der

ECL-Entwicklerlösung geschwenkt, blasenfrei auf eine zuvor mit 70%igem Ethanol gesäuberte Glasplatte gelegt und im *ChemoStar ECL & Fluorescence Imager* positioniert. Die Chemilumineszenzaufnahmen erfolgten der Gebrauchsanweisung des Geräteherstellers folgend.

3.2.3.2 *Phosphokinase Proteome Profiler™ Array*

Der kommerziell erhältliche *Phosphokinase Proteome Profiler™ Array* wurde der beiliegenden Gebrauchsanweisung folgend durchgeführt. In dem mehrschrittigen Prozess wurden unter Verwendung der beiliegenden Puffer und Reagenzien Lysate von SW620-Zellen aus Zellkulturstimulationsexperimenten mit SEA beziehungsweise Kontrollinkubation mit PBS angefertigt. Diese Zellysate wurden anschließend als Versuchs- und Kontrollgruppen verwendet.

3.2.4 Histologische Methoden

In den nachfolgenden Kapiteln wird erläutert, welche Schritte für die immunhistochemischen Färbungen durchgeführt wurden.

3.2.4.1 Paraffineinbettung

Die Hamsterkolonproben (Tabelle 14) wurden für 16 Stunden bei 4 °C in 4% neutral gepuffertem Paraformaldehyd fixiert und für die histologischen Untersuchungen in Paraffin eingebettet.

3.2.4.2 Immunhistochemie

Jeder Objektträger wurde mit zwei benachbarten histologischen Paraffinschnitten desselben Hamsterkolons bestückt. Der zu färbende Objektträger wurde beschriftet und in den Färbeeinsatz aus Glas eingesetzt. Anschließend wurde der Färbeeinsatz nacheinander in sieben, verschiedene Lösungsmittel enthaltende Färbeküvetten getaucht. Der Objektträger war dabei ganz von der jeweiligen Flüssigkeit bedeckt. Die ersten drei Färbeküvetten, in denen der Objektträger nacheinander zehn, zehn und fünf Minuten badete, enthielten Xylol. Danach kamen zwei Färbeküvetten mit 99,6%igem Ethanol für jeweils fünf Minuten, eine Küvette mit 96%igem Ethanol für wenige Sekunden und anschließend eine Küvette mit 70%igem Ethanol für fünf Minuten. Anschließend wurde der Objektträger in eine Objektträgerküvette überführt und für fünf Minuten unter sanft fließendes Leitungswasser gestellt.

Zur Antigendemaskierung wurde die Objektträgerküvette mit Citratpuffer (Tabelle 8) gefüllt und für insgesamt zehn Minuten bei 750 W in die Mikrowelle gestellt. Alle zwei Minuten wurde überprüft, ob sich noch genug Citratpuffer in der Küvette befand. Nachdem die Küvette auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde die Küvette erneut für fünf Minuten unter fließendes Leitungswasser gestellt. Es folgten drei zweiminütige Waschschrte mit PBS-Puffer (1x) auf einer sich sanft bewegenden Schüttelplatte. Anschließend wurde der Objektträger der Objektträgerküvette entnommen und vorsichtig mit einem Papiertuch abgetrocknet. Mit den Ecken des Papiertuchs wurden vorsichtig die beiden histologischen Schnitte umfahren, sodass sich nur noch wenig Flüssigkeit darauf befand. Um zu verhindern, dass die Schnitte länger trocken lagen, wurde anschließend zügig auf beide Schnitte 40 μ L *Blocking Solution* aus einer Mischung aus 10%igem BSA und 2,5%igem Serum in gleichen Anteilen aus dem ImmPRESS®-Kit gegeben. Sollten noch Teile der Schnitte trocken gelegen haben, wurde mit der langen Seite einer sauberen Pipettenspitze der sich auf dem jeweiligen Schnitt befindende Tropfen auf die trocken liegenden Anteile des Schnitts gezogen ohne ihn dabei zu berühren. Die Schnitte wurden in einer feuchten Kammer waagrecht für eine Stunde gelagert. Anschließend folgten drei zweiminütige Waschschrte mit PBS-Puffer in einer Objektträgerküvette. Nach dem dritten Waschschrte wurde der Objektträger erneut mit einem Papiertuch abgetrocknet und die Schnitte wurden vorsichtig mit einer Ecke des Tuchs umfahren. Anschließend wurde auf einen der beiden Schnitte jedes Objektträgers 50 μ L des verdünnten Primärantikörpers (Tabelle 11) gegeben und bei Bedarf erneut mit der flachen Seite einer Pipettenspitze über dem Schnitt verteilt ohne diesen zu berühren. Der andere Schnitt diente zur Isotypkontrolle. Auf diesen Schnitt wurden 50 μ L so verdünnten IgGs der gleichen Spezies des Primärantikörpers gegeben, dass die Proteinkonzentrationen in Isotypkontroll- und Primärantikörperverdünnung gleich waren. Über Nacht wurde der waagrecht in einer feuchten Kammer liegende Objektträger im Kühlschrank bei 6 °C gelagert.

Am nächsten Tag folgten vier fünfminütige Waschschrte mit PBS-Puffer in einer Objektträgerküvette. Anschließend wurde der Objektträger mit einem Papiertuch abgetrocknet und die Schnitte wurden mit einer Ecke des Tuchs vorsichtig umfahren. Auf beide Schnitte wurde der jeweilige, gegen die Spezies des Primärantikörpers gerichtete und AP-gekoppelte Sekundärantikörper aus dem ImmPRESS® Kit getropft. Der

Objektträger wurde für eine halbe Stunde waagrecht in einer feuchten Kammer gelagert. Anschließend folgten weitere vier fünfminütige Waschschrte mit PBS-Puffer in einer Objektträgerküvette. Die Entwicklerlösung Vector® *AP blue* wurde nach der beiliegenden Anleitung frisch angesetzt. Erneut wurde der Objektträger mit einem Papiertuch abgetrocknet und die Schnitte wurden mit einer Ecke des Tuchs vorsichtig umfahren. Dann wurden 40 µL der Entwicklerlösung auf beide Schnitte pipettiert, der Tropfen bei Bedarf noch mit der flachen Seite einer Pipettenspitze über die Ränder des Schnitts gezogen und eine Stoppuhr gestartet, um die Entwicklungsdauer zu messen. Unter dem Lichtmikroskop wurde regelmäßig der Färbegrad der Schnitte kontrolliert. Sobald der gewünschte Färbegrad erreicht war, wurde die Stoppuhr angehalten, der Objektträger mit der langen Kante auf ein Papiertuch abgeklopft, um die Entwicklerlösung zu entfernen, und der Objektträger für fünf Minuten in eine Objektträgerküvette mit Leitungswasser gestellt. Anschließend folgte die Kernfärbung, wofür das Wasser in der Objektträgerküvette durch die Kernfärbelösung *Nuclear FAST Red Counterstain*® ersetzt wurde und einige Sekunden zum Einwirken in der Küvette belassen wurde. Danach wurde die Objektträgerküvette für fünf Minuten unter sanft fließendes Leitungswasser gestellt.

Der Objektträger wurde in den Färbereinsatz einer Färbeküvette gesetzt und für jeweils wenige Sekunden nacheinander in Färbeküvetten mit 96%igem Ethanol, zweimal Isopropanol und zweimal Neo Clear® gestellt, wobei der Objektträger stets mit der jeweiligen Flüssigkeit bedeckt sein musste. Anschließend wurden die Schnitte mit Abdeckplättchen und Neo Mount® bläschenfrei eingedeckt.

3.2.4.3 Fotoaufnahmetechnik der immunhistochemischen Färbungen

Der Objektträger wurde unter dem Lichtmikroskop betrachtet und bestimmte Areale in den gewünschten Vergrößerungen eingestellt. Anschließend wurde die Kamera eingeschaltet und am damit verbundenen Computer gestartet. Über die Auslösefunktion wurde eine Aufnahme gemacht und gespeichert.

3.2.5 Statistische Auswertung und graphische Darstellung

Die *Western Blots* wurden densitometrisch mithilfe der *Software* ImageJ®, Version 1.4.3.67 vermessen. Die so entstandenen Daten wurden im Programm Microsoft Excel® 2019 erfasst. In Microsoft Excel® wurden Berechnungen zur Normierung der Werte

durchgeführt. Um den unterschiedlichen optischen Hintergrunddichten und Entwicklungsstärken Rechnung zu tragen, wurden die in ImageJ® bestimmten optischen Dichten der Banden einer *Western Blot*-Membran geteilt durch die Summe aller auf ihr gemessenen optischen Dichten.

$$\begin{aligned} & \textit{Optische Dichte}(\textit{Musterprotein})_{\textit{normiert}} \\ &= \frac{\textit{Optische Dichte}(\textit{Musterprotein})_{\textit{gemessen}}}{\sum \textit{Optische Dichte}(\textit{Musterprotein})_{\textit{gemessen}}} \end{aligned}$$

Diese Normierung der optischen Dichten wurde jeweils für das Zielprotein und für das als Ladekontrolle genutzte Protein durchgeführt. Anschließend wurde für jedes so entstandene Datenpaar eine relative optische Dichte als Quotient der normierten optischen Dichten des Zielproteins und des Proteins der Ladekontrolle gebildet.

$$\begin{aligned} & \textit{Relative optische Dichte}(\textit{Zielprotein}) \\ &= \frac{\textit{Optische Dichte}(\textit{Zielprotein})_{\textit{normiert}}}{\textit{Optische Dichte}(\textit{Ladekontrolle})_{\textit{normiert}}} \end{aligned}$$

Die so bestimmten, relativen optischen Dichten wurden für die statistischen Berechnungen in die *Software* SPSS® Version 26.0 eingepflegt. Zur Überprüfung, ob die verschiedenen Gruppen Stichproben aus einer gemeinsamen Grundgesamtheit sein könnten, wurden auf Rangplatzsummen basierende, statistische Tests angewendet. Wenn mehr als zwei Stichproben miteinander verglichen werden sollten, wurde der Kruskal-Wallis-Test (H-Test) für unabhängige, nicht normalverteilte Stichproben angewendet. In diesem Test wurde zum einen die Wahrscheinlichkeit berechnet, mit der die Stichproben insgesamt zu einer gemeinsamen Grundgesamtheit gehören. Zum anderen wurden paarweise Vergleiche zwischen den einzelnen Versuchsgruppen durchgeführt. Die Zufallswahrscheinlichkeiten der paarweisen Vergleiche wurden einer Bonferroni-Korrektur unterzogen. Der Mann-Whitney-U-Test wurde angewendet, um zwei nicht normalverteilte, unabhängige Stichproben miteinander zu vergleichen. Die im Ergebnisteil genannten Zufallswahrscheinlichkeiten p sind jeweils exakte, zweiseitige Zufallswahrscheinlichkeiten.

Aufgrund des explorativen Ansatzes der Studie wurde darauf verzichtet, ein Signifikanzniveau festzulegen und aus den errechneten Zufallswahrscheinlichkeiten „p“ Signifikanzen abzuleiten. Die berechneten Zufallswahrscheinlichkeiten werden im

Ergebnisteil als Zahlenwerte angegeben. Anschließend werden die p-Werte zur Einordnung der Ergebnisse an dem p-Niveau $p \leq 0,05$ gemessen. Unterschreitet eine Zufallswahrscheinlichkeit das p-Niveau von $p \leq 0,05$, wird davon ausgegangen, dass zwei Versuchsgruppen sich in Bezug auf die Zielvariable voneinander unterscheiden.

Zur graphischen Darstellung wurde im Programm SPSS® die Option der *Box- and Whisker-Plots* gewählt. In dieser Art Diagramm beinhaltet die Ordinatenausdehnung der *Box* jene 50% der Daten, die das obere und untere Quartil ausspannen. Diese Ordinatenausdehnung entspricht also dem Interquartilabstand. Der waagerechte Strich in der *Box* stellt den Median dar. Die von der *Box* ausgehenden *Whisker* markieren den kleinsten und den größten Wert der Messreihe. Zudem wurden zur besseren Übersichtlichkeit aus den *Western Blot*-Aufnahmen nur Ausschnitte mit den jeweiligen *Western Blot*-Banden eingefügt.

Die abschließende Erstellung aller Graphiken erfolgte in Microsoft Power Point ® 2019.

4 Ergebnisteil

4.1 Induktion protoonkogener Faktoren in SEA-stimulierten SW620-Zellen

Als erster Schritt in der Untersuchung der Wirkung von Antigenen der *S. mansoni*-Ova auf Enterozyten des Kolons wurden Enterozyten-ähnliche SW620-Zellen in Zellkultur mit SEA stimuliert oder zur Kontrolle mit PBS-Puffer inkubiert. SW620-Zellen stellen ein in Zellkultur etabliertes Modell für kolorektale Enterozyten dar [23] und wurden ausgewählt, um eine Kontinuität zu den in unserer Arbeitsgruppe bereits durchgeführten Zellkulturexperimenten zu bieten. Nach der Zellkulturstimulation wurde, um einen Überblick über die Aktivität proliferationsfördernder und aktivierender Signalwege zu gewinnen, die Aktivierung von 37 Kinasen und zwei assoziierten Proteinen durch einen *Phosphokinase Proteome Profiler™ Array* analysiert. Hierbei handelt es sich um eine Analysemethode, mithilfe welcher kosteneffizient und probensparsam ein Einstieg in die Aktivität proliferationsfördernder und aktivierender Signalwege gewonnen werden kann. Die proteinbiochemische Auswertung durch den *Array* (Abb. 4a) wurde durch eine densitometrische Auswertung ergänzt (Abb. 4b). Hierbei wurden die ermittelten Signale der phosphorylierten Kinasen und assoziierten Proteine der SEA-stimulierten Zellen und der PBS-inkubierten Zellen zueinander ins Verhältnis gesetzt.

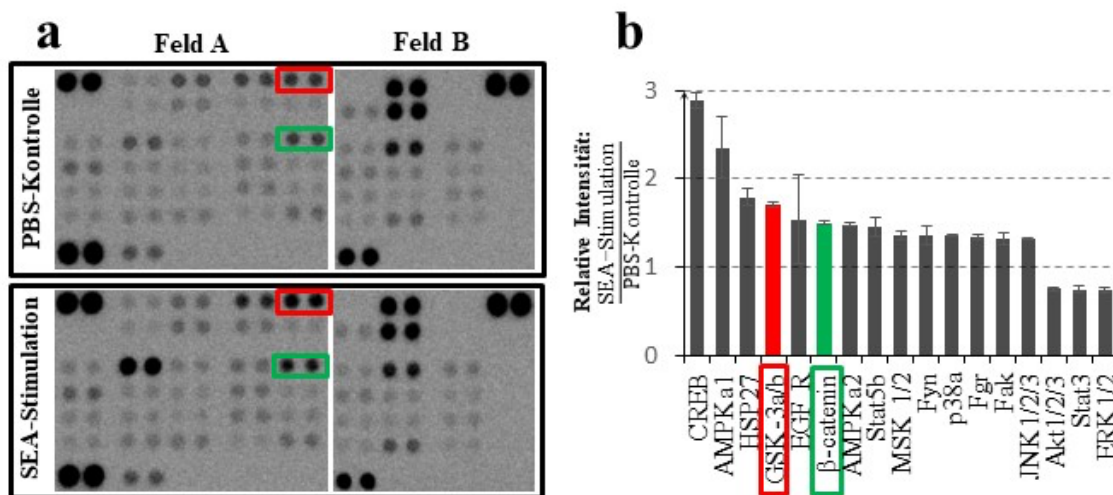


Abbildung 4 - Wnt-Aktivierung in SEA-stimulierten SW620-Zellen

Mittels *Phosphokinase Proteome Profiler™ Array* wurde die Regulation verschiedener Phosphokinasen in mit *S. mansoni*-Eierantigenen (SEA) stimulierten SW620-Zellen untersucht. In diesem *Array* werden die relativen

Konzentrationen von 37 phosphorylierten Kinasen und zwei assoziierten Proteinen untersucht. Auf der linken Seite (a) der Abbildung sind Aufnahmen zweier repräsentativ ausgewählter Membranen des *Arrays* zu sehen. Die obere Membran zeigt die Ergebnisse der mit PBS-Puffer inkubierten Zellen (a, oben), die untere die der SEA-stimulierten Zellen (a, unten). Jede phosphorylierte Kinase beziehungsweise jedes assoziierte Protein wurde pro Membran jeweils doppelt proteinbiochemisch analysiert (je zwei Punkte). Die Proteinkonzentrationen korrelieren mit der Größe und optischen Dichte der Signale. Unterschiedliche Größen und Farbdichten der immunochemisch analysierten Parameter deuten auf Unterschiede in Expression beziehungsweise. Phosphorylierung zwischen den Gruppen hin. Die Stimulation mit SEA induzierte in den SW620-Zellen die phosphorylierte Kinase GSK-3 β (roter Kasten) und β -Catenin (grüner Kasten). Auf der rechten Seite (b) ist eine grafische Übersicht der densitometrischen Auswertung des *Arrays* zu sehen. Auf der Ordinate sind die Mittelwerte der relativen Signalintensitäten als Balkendiagramm mit Standardfehlern dargestellt. Auf der Abszisse sind die jeweiligen phosphorylierten Kinasen und assoziierten Proteine aufgelistet. Die SEA-Stimulation in SW620-Zellen führte zu einer Induktion von β -Catenin (grün) und der phosphorylierten GSK-3 β (rot). Dies weist darauf hin, dass in der Zellkultur durch SEA, also durch Antigene der *S. mansoni*-Ova, der kanonische Wnt-Signalweg induziert wurde. Das Zellkulturexperiment sowie die Auswertung wurden zweifach durchgeführt.

Einige Faktoren, wie CREB, AMPKa1 oder HSP27, wurden durch die SEA-Stimulation induziert, andere wurden supprimiert. Zu den induzierten Faktoren gehören sowohl die phosphorylierte GSK-3 β (in Abbildung 4 rot markiert) als auch β -Catenin (in Abbildung 4 grün markiert). Beide Proteine sind wichtige Akteure im kanonischen Wnt-Signalweg [123]. Die weiteren induzierten oder supprimierten Faktoren wurden in dieser Forschungsarbeit nicht weiter untersucht. Mit dem kanonischen Wnt-Signalweg sollte insbesondere ein Fokus auf Faktoren gelegt werden, die im Modell der Adenom-Karzinom-Sequenz typischerweise früh in der kolorektalen Karzinogenese Veränderungen der Aktivität entwickeln [48].

4.2 Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs und von *Downstream*-Faktoren durch Antigene der *Schistosoma mansoni*-Ova

Im oben beschriebenen Zellkulturstimulationsversuch mit SEA an SW620-Zellen zeigte sich in der Auswertung durch den *Array* eine Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs in Form einer erhöhten Expression von β -Catenin und einer Induktion der p-GSK-3 β . Diesem Ergebnis wurde weiter nachgegangen und durch weitere Stimulationsversuche und Auswertungen durch *Western Blot*-Analysen näher überprüft. Neben der Stimulation mit SEA wurde nun auch mit einer rekombinant hergestellten Variante des sekretorischen Proteins IPSE der *S. mansoni*-Ova stimuliert.

Zusätzlich zu den Zellkulturexperimenten wurde die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs auch im Tiermodell untersucht. Hierfür wurden syrische Goldhamster entweder mono- (ms) oder bisexuell (bs) mit *S. mansoni* infiziert. In den bs-infizierten Hamstern war eine geschlechtliche Vermehrung der Parasiten mit Produktion von Ova

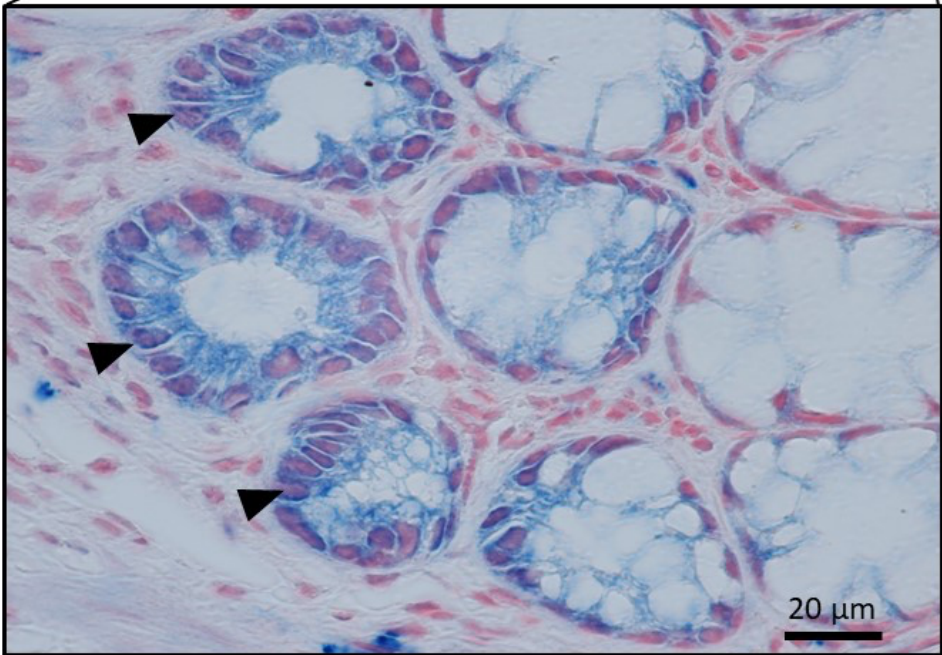
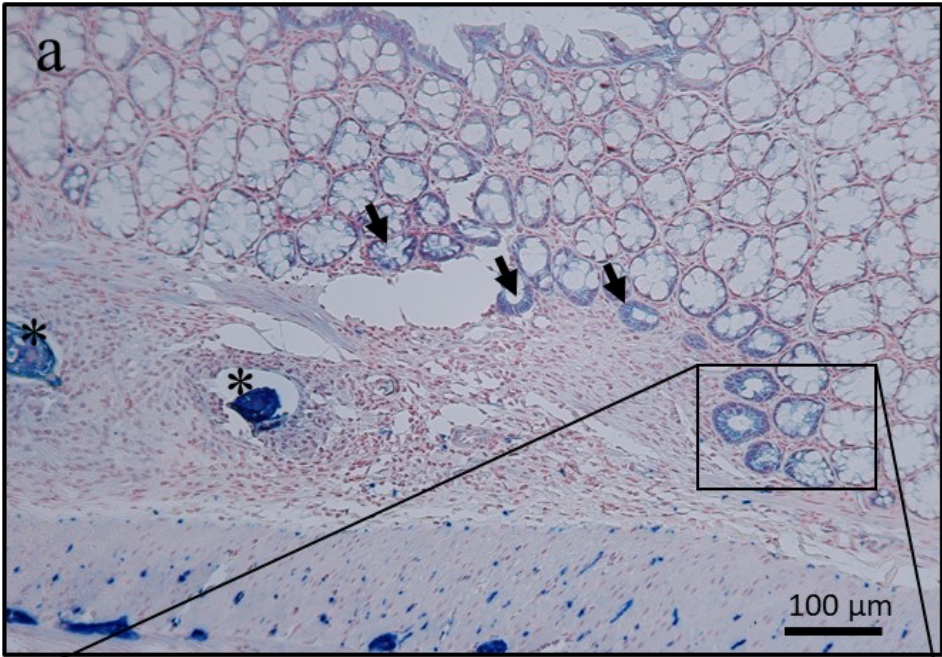
möglich, in den ms-infizierten Hamstern nicht. Am Tiermodell wurde am entnommenen Kolongewebe neben der *Western Blot*-Analyse eine Immunhistochemie durchgeführt. Durch die Verwendung des Tiermodells wurde eine natürliche Infektion mit *S. mansoni* sowie insbesondere der Einfluss der Ova auf das Kolongewebe modelliert.

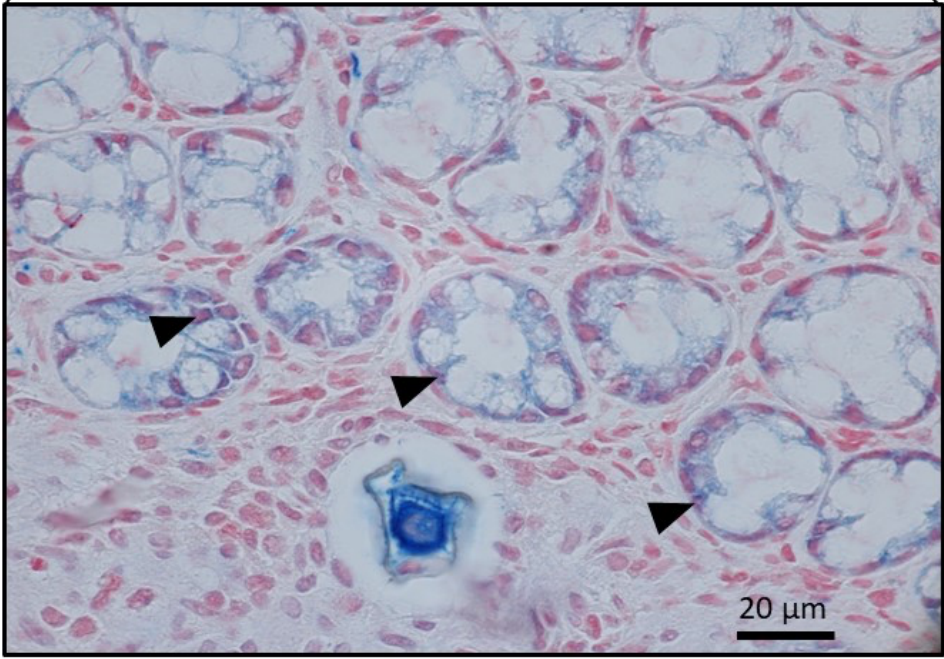
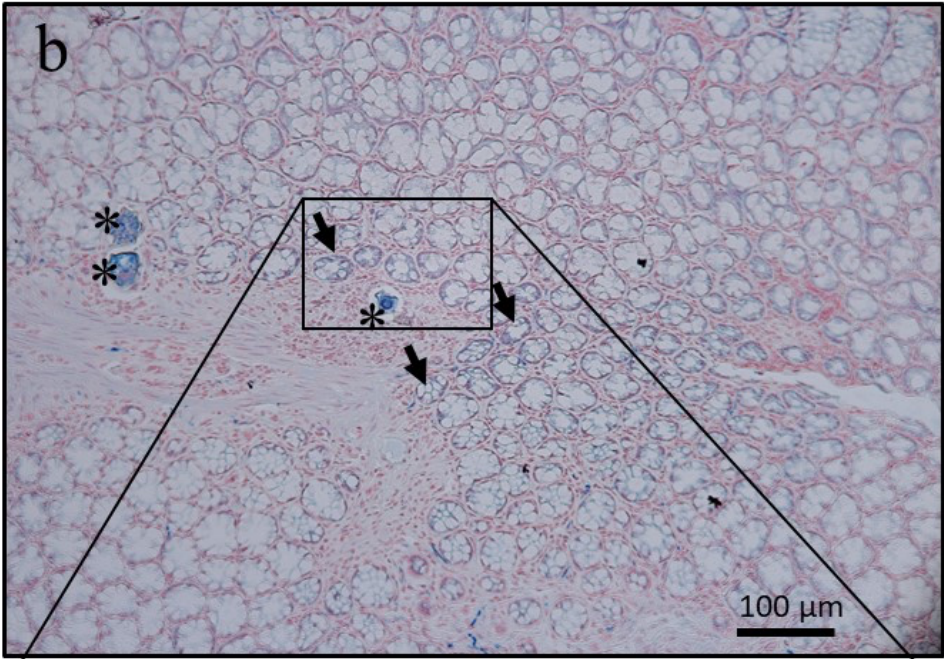
4.2.1 Immunhistochemischer Nachweis zytoplasmatisch und nukleär erhöhter β -Cateninexpression in der Umgebung der *Schistosoma mansoni*-Ova im Kolon bisex-infizierter Hamster

Im Hamstermodell wurde untersucht, ob und inwiefern *S. mansoni*-Ova zu einer Induktion β -Catenins führen. Eine Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs resultiert in einer Erhöhung β -Catenins im Zytoplasma wie auch im Zellkern [18, 145]. Repräsentative Proben aus dem Kolon der bs- und der ms-infizierten Hamster wurden immunhistochemisch unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen β -Catenin angefärbt. Die Versuchsgruppen unterschieden sich darin, dass im Intestinum bs-infizierter Hamster Parasiteneier vorlagen. Diese sind mikroskopisch durch ihre charakteristische Morphologie zu erkennen (Abb. 5a und 5b, Sterne). Im Intestinum ms-infizierter Hamster wurden keine Ova nachgewiesen (Abb. 5c).

In den Proben bs-infizierter Hamster war β -Catenin in den Enterozyten der Krypten in unmittelbarer Nähe der Ova und der umgebenden Granulome deutlich erhöht exprimiert (Abb. 5a und 5b, Pfeile, obere Bildausschnitte). Diese Induktion der β -Catenin-Expression war sowohl im Zytoplasma als auch in den Zellkernen der Enterozyten nachweisbar (Abb. 5a und 5b, Pfeilköpfe, untere Bildausschnitte), was eine nukleäre Translokation β -Catenins belegt.

In den Kolonpräparaten ms-infizierter Hamster waren keine Ova vorhanden. β -Catenin war homogen verteilt (Abb. 5c, oberer und unterer Bildausschnitt).





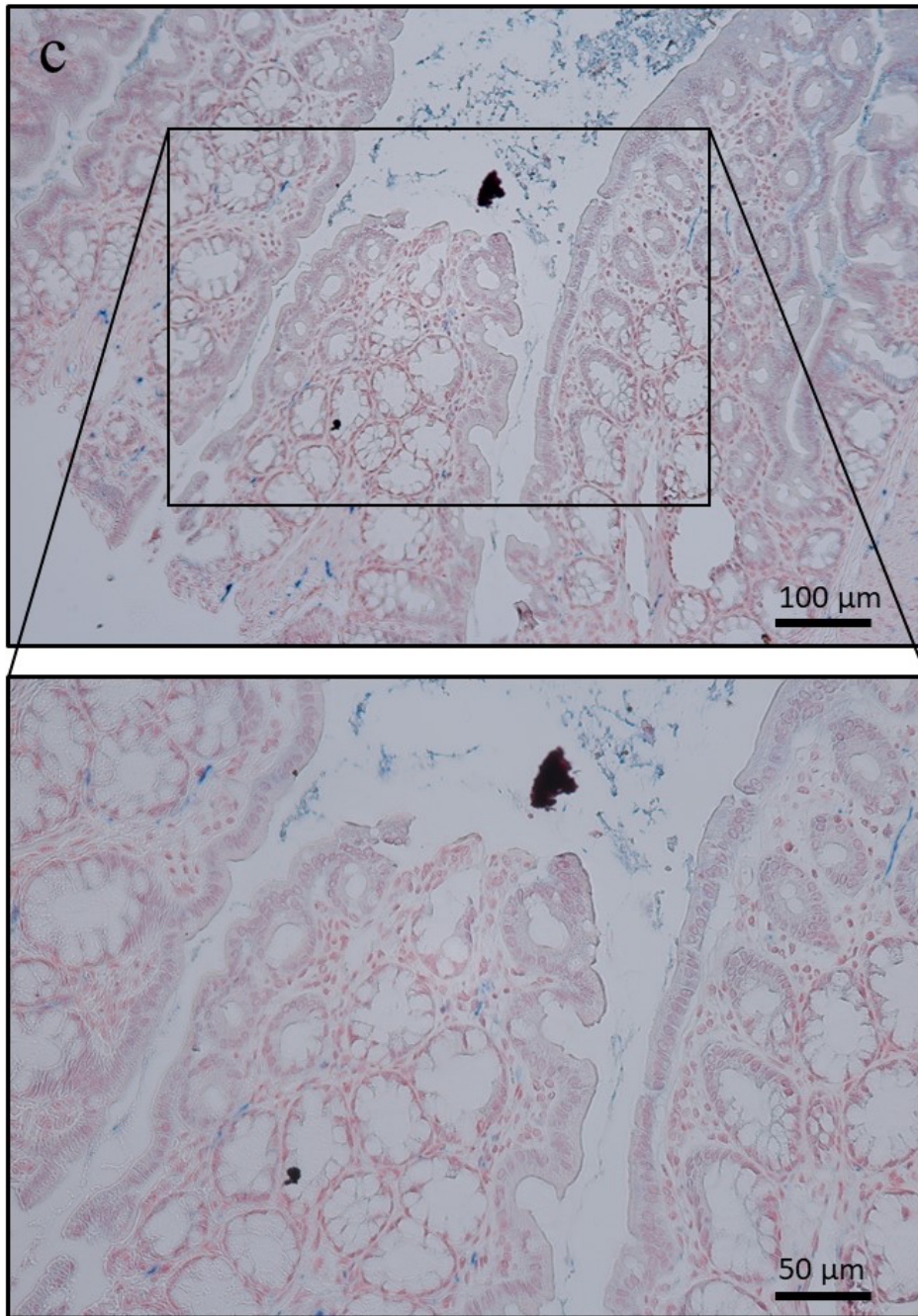


Abbildung 5: Erhöhtes β -Catenin in Zytoplasma und Nucleus der Enterozyten in unmittelbarer Umgebung der *S. mansoni*-Ova beziehungsweise der die Ova umgebenden Granulome

Kolonpräparate von bs- (n=7, Abbildungsteile a und b) und ms- (n=3, Abbildungsteil c) infizierten Hamstern wurden immunhistochemisch mit einem Primärantikörper gegen β -Catenin angefärbt. Die antikörpervermittelte Färbung stellt β -Catenin blau dar. In den Abschnitten a und b sind in den oberen Bildausschnitten (Vergrößerung 200x, Balken entspricht 100 μ m) Dickdarmkrypten in der Umgebung von Parasiteneiern (Sternchen) zu sehen. In Enterozyten in unmittelbarer Nähe des die Ova umgebenden Granulomgewebes ist β -Catenin erhöht (Pfeile) im Vergleich mit Enterozyten in weiterer Entfernung. In den unteren Bildausschnitten der Abbildungsteile a und b (Vergrößerung 1000x, Balken entspricht 20 μ m) ist neben der verstärkten zytoplasmatischen auch eine nukleäre Anfärbung zu sehen (Pfeilköpfe), was für eine nukleäre Translokation β -Catenins spricht. In Abbildungsteil c sind aufgrund der ms-Infektion des Hamsters keine Parasiteneier zu sehen (Vergrößerungen 200x bzw. 400x, Balken entsprechen 100 μ m bzw. 50 μ m). In den Präparaten ms-infizierter Hamster ist die β -Catenin-Verteilung homogener. Diese Ergebnisse zeigen eine lokalisierte Wirkung der *S. mansoni*-Ova auf das umliegende Kolongewebe. In den Enterozyten in der Nähe der Ova

und der Granulome ist der kanonische Wnt-Signalweg aktiviert, was sich durch die Induktion des Zielproteins β -Catenin zeigt [145]. Die gezeigten Bildausschnitte wurden repräsentativ ausgewählt und die Färbungen dreimal wiederholt.

4.2.2 Proteinbiochemischer Nachweis einer Induktion des kanonischen Wnt-Signalwegs im Kolon bisex-infizierter Hamster

Neben der immunhistochemischen Analyse des Kolongewebes der bs- und ms-infizierten Hamster für β -Catenin erfolgten *Western Blot*-Analysen des Gesamtgewebes für die Faktoren des kanonischen Wnt-Signalwegs β -Catenin und p-GSK-3 β [18].

4.2.2.1 β -Catenin im Kolongewebe bisex-infizierter Hamster tendenziell erhöht

Die Regulation des Zielproteins des kanonischen Wnt-Signalwegs β -Catenin im Kolon der bs- und ms-infizierten Hamster wurde auch durch *Western Blot*-Analysen untersucht. In den Gesamtgewebslysaten der Kolonproben der bs-infizierten Hamster war die β -Catenin-Expression tendenziell erhöht (Abb. 6, $p=0,138$).

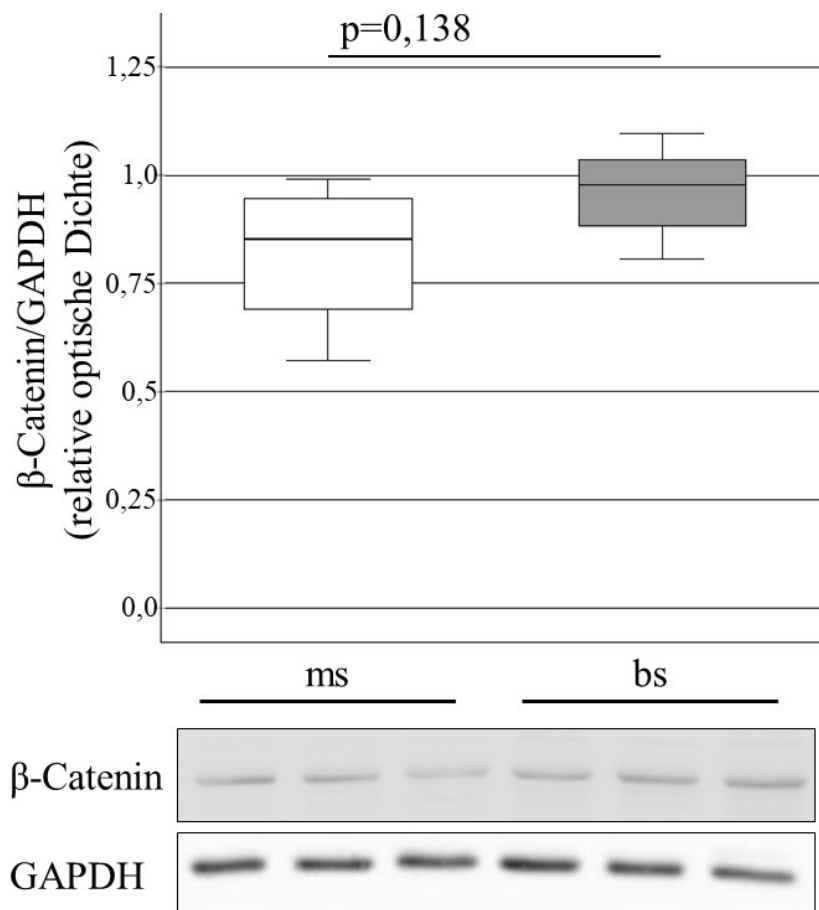


Abbildung 6: β -Catenin-Expression im Kolon bs-infizierter Hamster tendenziell erhöht

Western Blot-Analyse für das Protein β -Catenin in Kolonproben bs- ($n=11$) und ms- ($n=4$) infizierter Hamster. β -Catenin ist das Zielprotein des kanonischen Wnt-Signalwegs [18]. Im unteren Teil der Abbildung sind übereinander

repräsentativ aus drei Wiederholungen ausgewählte *Western Blot*-Banden für β -Catenin und das Ladekontrollprotein GAPDH gezeigt. Im oberen Teil der Abbildung wird das Ergebnis der densitometrischen Auswertung in Form von *Box- and Whisker-Plots* gezeigt. Auf der Ordinate ist die relative optische Dichte β -Catenins im Verhältnis zu GAPDH dargestellt. β -Catenin war im Kolon bs-infizierter Hamster tendenziell erhöht ($p=0,138$). Mann-Whitney-U-Test.

4.2.2.2 Vergleichbare Induktion von p-GSK-3 β im Kolon bisex- und monosex-infizierter Hamster

Zur weiteren Untersuchung der Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs wurden die Kolonproben der Hamster per *Western Blot* für p-GSK-3 β analysiert. Die phosphorylierte Variante der Kinase GSK-3 β ist kennzeichnend für einen aktiven kanonischen Wnt-Signalweg [123]. p-GSK-3 β lag in der bs- und der ms-infizierten Versuchsgruppe in vergleichbarer Menge vor (Abb. 7, $p=0,412$).

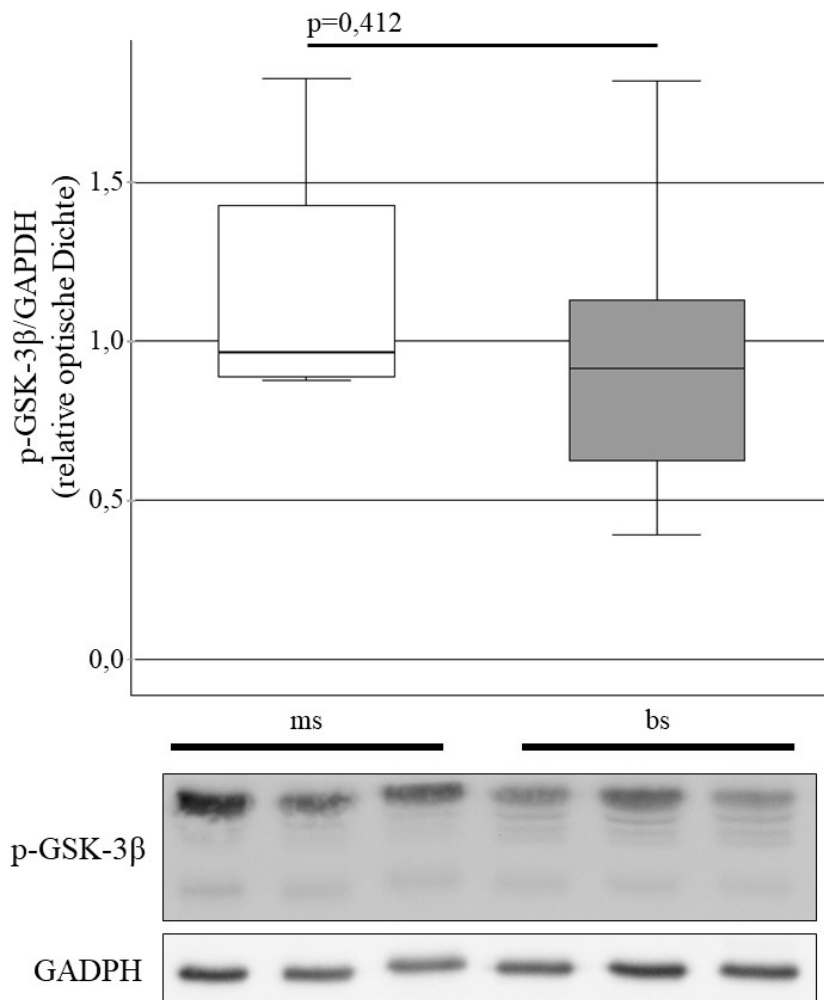


Abbildung 7: p-GSK-3 β im Kolon bs- und ms-infizierter Hamster vergleichbar induziert

Western Blot-Analyse der Kinase p-GSK-3 β in Kolonproben bs- ($n=11$) und ms- ($n=4$) infizierter Hamster. Die GSK-3 β ist Teil des β -Catenin *destruction complex* und wird durch Phosphorylierung zu p-GSK-3 β inaktiviert [63]. Im unteren Teil der Abbildung sind übereinander repräsentativ ausgewählte *Western Blots* für p-GSK-3 β und das

Ladekontrollprotein GAPDH gezeigt. Im oberen Teil der Abbildung wird das Ergebnis der gemeinsamen densitometrischen Auswertung der p-GSK-3 β *Western Blot*-Banden in Form von *Box- and Whisker-Plots* gezeigt. Auf der Ordinate ist die relative optische Dichte von p-GSK-3 β im Verhältnis zu GAPDH dargestellt. p-GSK-3 β war in den Kolonproben der beiden Infektionsgruppen gleich ($p=0,412$). Mann-Whitney-U-Test. Die gezeigten *Western Blots* wurden repräsentativ aus drei Wiederholungen ausgewählt.

4.2.3 In SW620-Zellkultur Induktion von Proteinen des kanonischen Wnt-Signalwegs nach Stimulation mit SEA und HEK-IPSE

Durch die Verwendung eines Zellkulturmodells wurde die isolierte Wirkung von Antigenen der *S. mansoni*-Ova auf den kanonischen Wnt-Signalweg ohne Beteiligung einer Immunreaktion des Wirts untersucht. SW620-Zellen wurden mit SEA und HEK-IPSE stimuliert und mit PBS-Puffer als Negativkontrolle inkubiert und anschließend mittels *Western Blot*-Analyse auf β -Catenin und p-GSK-3 β sowie Cyclin D1 ausgewertet.

4.2.3.1 Tendenzielle Induktion von β -Catenin in SW620-Zellen nach Stimulation mit HEK-IPSE

Die *Western Blot*-Auswertung auf das Zielprotein des kanonischen Wnt-Signalwegs β -Catenin [18] ergab in den mit 9,9 $\mu\text{g/mL}$ HEK-IPSE stimulierten Zellen eine tendenziell stärkere Expression als in der Kontrolle (Abb. 8, $p=0,013$ vor Bonferroni-Korrektur, 0,08 nach Bonferroni-Korrektur). Die β -Catenin-Expression in den SEA-stimulierten Zellen war unverändert zu der Kontrolle (Abb. 8, $p=0,081$ vor Bonferroni-Korrektur, 0,486 nach Bonferroni-Korrektur).

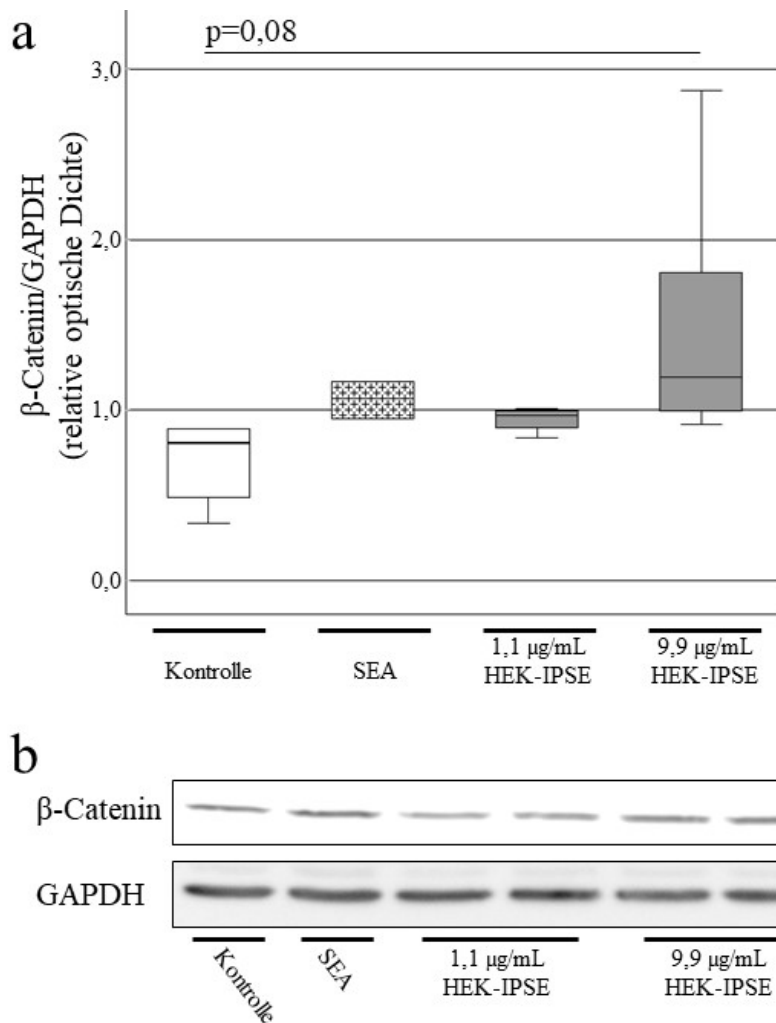


Abbildung 8: Tendenzielle Induktion von β -Catenin in mit HEK-IPSE stimulierten SW620-Zellen

Western Blot-Analyse für das Proteins β -Catenin in Zelllysaten von mit SEA ($n=6$), $1,1 \mu\text{g/mL}$ ($n=4$) beziehungsweise $9,9 \mu\text{g/mL}$ HEK-IPSE ($n=7$) stimulierten sowie mit PBS-Puffer (Kontrolle, $n=6$) inkubierten SW620-Zellen. Im unteren Teil der Abbildung (b) werden übereinander repräsentativ aus fünf Wiederholungen ausgewählte *Western Blots* für β -Catenin und das Ladekontrollprotein GAPDH gezeigt. Im oberen Teil (a) wird das Ergebnis der densitometrischen Auswertung in Form von *Box- and Whisker-Plots* gezeigt. Auf der Ordinate ist die relative optische Dichte von β -Catenin im Verhältnis zu GAPDH dargestellt. β -Catenin war in den mit $9,9 \mu\text{g/mL}$ HEK-IPSE stimulierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle tendenziell erhöht ($p=0,08$ nach Bonferroni-Korrektur). Zwischen der SEA-, der $1,1 \mu\text{g/mL}$ HEK-IPSE-stimulierten Versuchsgruppe waren die β -Catenin-Expressionen etwa gleich. Kruskal-Wallis-Test.

4.2.3.2 Induktion von p-GSK-3 β in SW620-Zellen durch Stimulation mit SEA

p-GSK-3 β korreliert mit der Aktivität des kanonischen Wnt-Signalwegs [63]. Aus diesem Grund erfolgte in den mit Antigenen der *S. mansoni*-Ova stimulierten Zellen eine Auswertung für p-GSK-3 β durch *Western Blots*. Die Phosphorylierung der Kinase GSK-3 β war in den SEA stimulierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle erhöht (Abb. 9, $p=0,002$ vor Bonferroni-Korrektur, $0,011$ nach Bonferroni-Korrektur). Die GSK-3 β -

Phosphorylierung war in den mit HEK-IPSE-stimulierten Zellen vergleichbar mit der Kontrolle (Abb. 9, $p=0,103$ vor Bonferroni-Korrektur, $0,617$ nach Bonferroni-Korrektur).

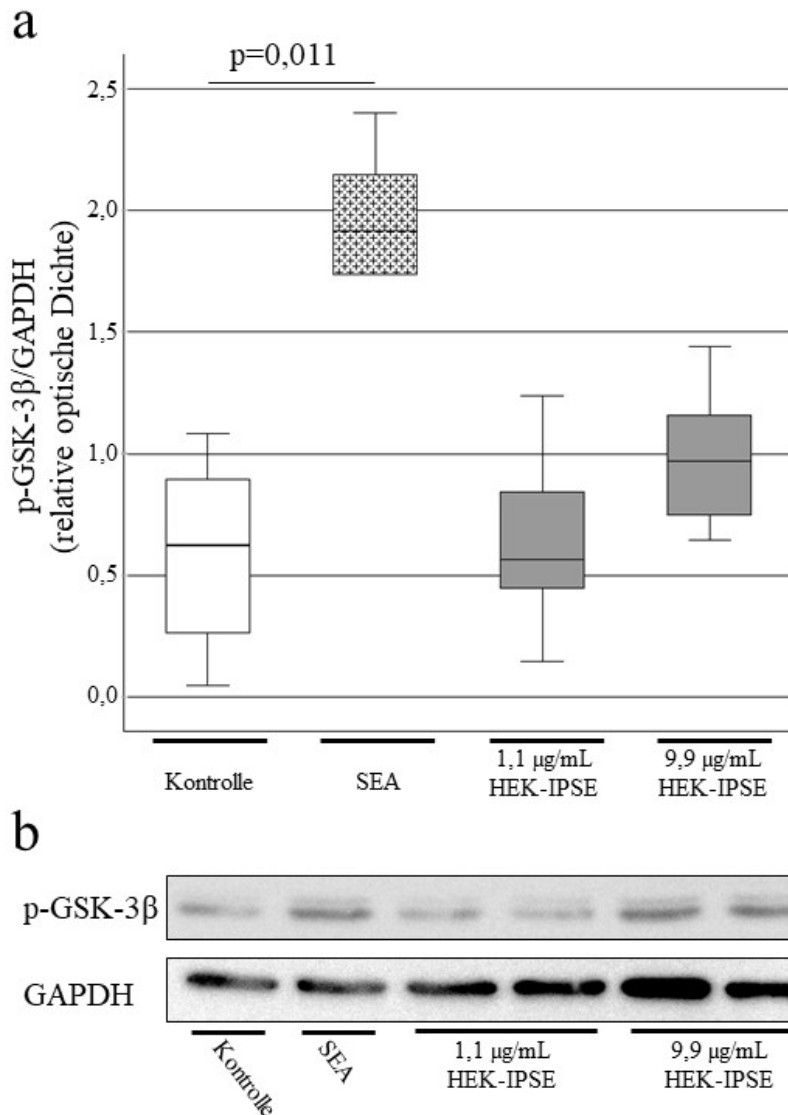


Abbildung 9: p-GSK-3β induziert in SEA-stimulierten SW620-Zellen

Western Blot-Analyse für p-GSK-3β in Zelllysaten von mit SEA ($n=6$), $1,1\ \mu\text{g/mL}$ ($n=7$) beziehungsweise $9,9\ \mu\text{g/mL}$ HEK-IPSE ($n=12$) stimulierten sowie mit PBS-Puffer (Kontrolle, $n=6$) inkubierten SW620-Zellen. Im unteren Teil der Abbildung (b) sind übereinander repräsentativ aus sechs Wiederholungen ausgewählte *Western Blot*-Banden für p-GSK-3β und das Ladekontrollprotein GAPDH gezeigt. Im oberen Teil der Abbildung (a) wird das Ergebnis der densitometrischen Auswertung in Form von *Box- and Whisker-Plots* gezeigt. Auf der Ordinate ist die relative optische Dichte von p-GSK-3β im Verhältnis zu GAPDH dargestellt. Die p-GSK-3β war in den mit SEA stimulierten SW620-Zellen induziert ($p=0,011$ nach Bonferroni-Korrektur). Zwischen den $1,1\ \mu\text{g/mL}$ und $9,9\ \mu\text{g/mL}$ mit HEK-IPSE-stimulierten Versuchsgruppen und der Kontrolle waren die p-GSK-3β-Expressionen etwa gleich. Kruskal-Wallis-Test.

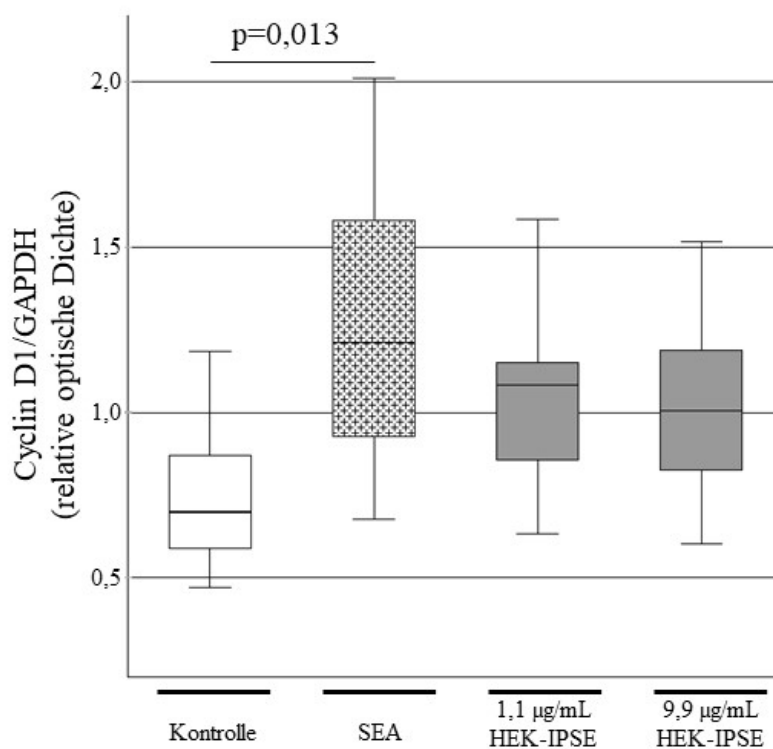
4.2.3.3 Induktion von Cyclin D1 in SW620-Zellen durch Stimulation mit SEA

Bei Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs kann β-Catenin in den Zellkern translozieren und als Kotranskriptionsfaktor für bestimmte Proteine wirken [80]. Im

Folgendes wurde untersucht, ob durch Stimulation mit Antigenen der *S. mansoni*-Ova auch Cyclin D1 – ein *Downstream*-Faktor des kanonischen Wnt-Signalwegs [131] – induziert wird.

Die *Western Blot*-Analyse ergab, dass Cyclin D1 in den SEA-stimulierten Zellen induziert wurde (Abb. 10, $p=0,002$ vor Bonferroni-Korrektur, $0,013$ nach Bonferroni-Korrektur), wohingegen die Cyclin D1-Expression in den mit HEK-IPSE-stimulierten Zellen auch bei hoher HEK-IPSE-Konzentration vergleichbar mit der Kontrolle war (Abb. 10, $p=0,07$ vor Bonferroni-Korrektur, $0,418$ nach Bonferroni-Korrektur).

a



b

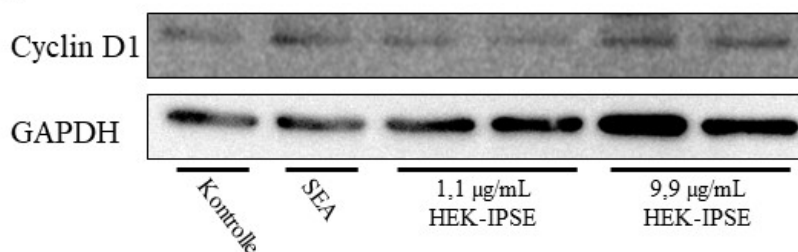


Abbildung 10: Cyclin D1 induziert in SEA-stimulierten SW620-Zellen

Western Blot-Analyse für Cyclin D1 in Zelllysaten von mit SEA ($n=9$), $1,1 \mu\text{g/mL}$ ($n=9$) beziehungsweise $9,9 \mu\text{g/mL}$ HEK-IPSE ($n=11$) und PBS (Kontrolle, $n=9$) stimulierten SW620-Zellen. Cyclin D1 hat eine große Bedeutung im Zellzyklus [35] und ist ein *Downstream*-Faktor einiger Signalwege, zu denen auch der kanonische Wnt-Signalweg

gehört [56]. Im Abbildungsteil b sind übereinander repräsentativ aus sechs Wiederholungen ausgewählte *Western Blot*-Banden für Cyclin D1 und das Ladekontrollprotein GAPDH gezeigt. Im Abbildungsteil a werden die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung in Form von *Box- and Whisker-Plots* gezeigt. Auf der Ordinate ist die relative optische Dichte von Cyclin D1 im Verhältnis zu GAPDH dargestellt. Cyclin D1 war in den mit SEA stimulierten Zellen induziert ($p=0,013$ nach Bonferroni-Korrektur). Zwischen den mit $1,1\mu\text{g/mL}$ und den mit $9,9\mu\text{g/mL}$ HEK-IPSE-stimulierten Versuchsgruppen und der Kontrolle waren die Cyclin D1-Expressionen etwa gleich. Kruskal-Wallis-Test.

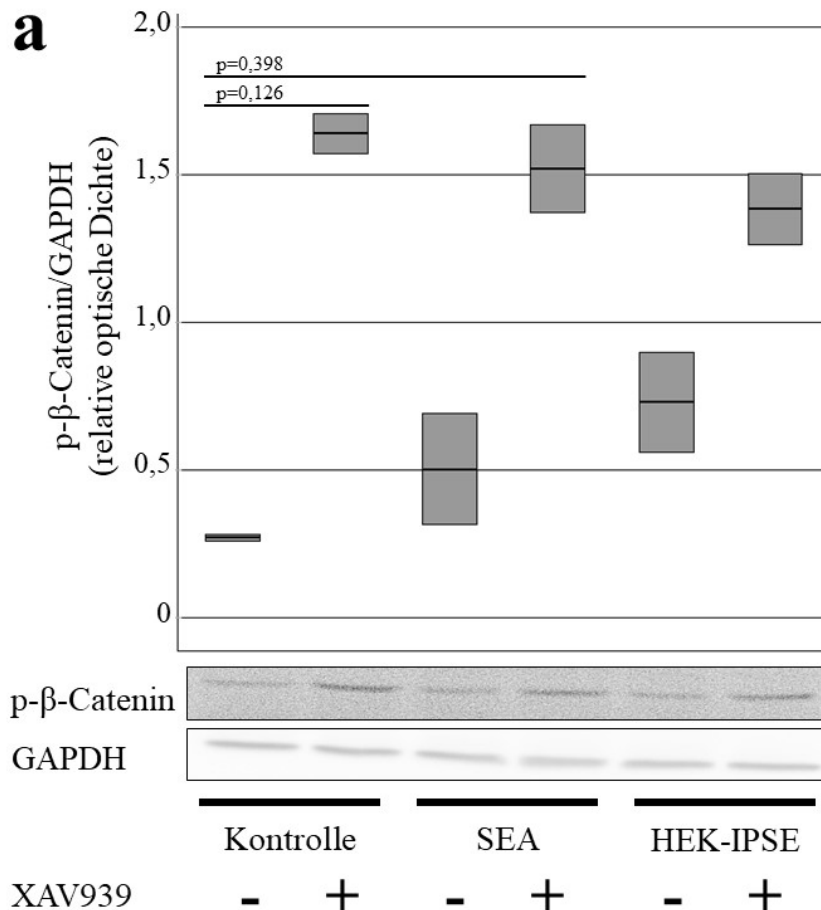
4.2.4 p- β -Catenin tendenziell erhöht durch Wnt-Inhibition mit XAV939 und Inkubation mit PBS bei unverändertem Cyclin D1

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob die Erhöhung von Cyclin D1 in Zellkultur nach Stimulation mit Antigenen der *S. mansoni*-Ova durch den kanonischen Wnt-Signalweg vermittelt wird. Zu diesem Zweck wurde ein kombiniertes Stimulations- und Inhibitionsexperiment mit SW620-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden mit SEA oder HEK-IPSE stimuliert oder zur Kontrolle mit PBS-Puffer inkubiert. Eine Hälfte der Zellen wurde zusätzlich mit dem Inhibitor des kanonischen Wnt-Signalwegs XAV939 inkubiert [66]. Insgesamt bestehen somit sechs unterschiedliche Versuchsgruppen (SEA, HEK-IPSE, PBS, SEA/XAV939, HEK-IPSE/XAV939 und PBS/XAV939). Die Auswertung erfolgte mittels *Western Blot* zum Nachweis von Cyclin D1 und p- β -Catenin. p- β -Catenin ist die phosphorylierte und damit zum Abbau markierte Variante von β -Catenin und ist somit charakteristisch für einen inaktiven kanonischen Wnt-Signalweg [85]. Eine Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs, beispielsweise durch Stimulation, würde somit zu einer Verminderung der Basisphosphorylierung führen. Eine Inhibition des kanonischen Wnt-Signalwegs würde dagegen zu einer Steigerung der Basisphosphorylierung führen. Von ursprünglich drei unabhängigen, identischen Versuchsreihen wurden nur zwei in die Auswertungen der folgenden Absätze einbezogen. Die *Western Blot*-Auswertung der ausgeschlossenen dritten Versuchsreihe wies in der Ladekontrolle deutliche Abweichungen auf.

p- β -Catenin war in der PBS/XAV939-Gruppe gegenüber der PBS-Gruppe tendenziell erhöht (Abb. 11a, $p=0,008$ vor Bonferroni-Korrektur, $0,126$ nach Bonferroni-Korrektur), was für einen weniger aktiven kanonischen Wnt-Signalweg in dieser Gruppe spräche. In der PBS/XAV939-Gruppe war außerdem die insgesamt höchste β -Catenin-Phosphorylierung aller Gruppen nachgewiesen worden. Zwischen der SEA/XAV939-Gruppe und der PBS-Gruppe war die β -Catenin-Phosphorylierung vergleichbarer (Abb. 11a, $p=0,027$ vor Bonferroni-Korrektur, $0,398$ nach Bonferroni-Korrektur). Die weiteren

paarweisen Vergleiche der weiteren Versuchsgruppen ergaben deutlich höhere Zufallswahrscheinlichkeiten $p > 0,7$ nach Bonferroni-Korrektur.

Im vorliegenden Experiment wurden die höchsten Expressionen von Cyclin D1 in den Zellen der SEA-Gruppe und der HEK-IPSE-Gruppe bestimmt. Die Cyclin D1-Expressionen in den Versuchsgruppen SEA/XAV939, HEK-IPSE/XAV939, PBS und PBS/XAV939 waren jeweils geringer. Sämtliche Zufallswahrscheinlichkeiten für den Vergleich der Cyclin D1-Expressionen zwischen den Gruppen waren jeweils $p > 0,7$ nach Bonferroni-Korrektur (Abb. 11b). Vor Bonferroni-Korrektur war die Zufallswahrscheinlichkeit für den Vergleich der Gruppen SEA und SEA/XAV939 $p = 0,127$. Für die Gruppen HEK-IPSE und HEK-IPSE/XAV939 lag diese bei $p = 0,096$. Somit wurde für die Cyclin D1-Expression nach Ausschluss einer Versuchsreihe und nach Bonferroni-Korrektur statistisch kein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen nachgewiesen.



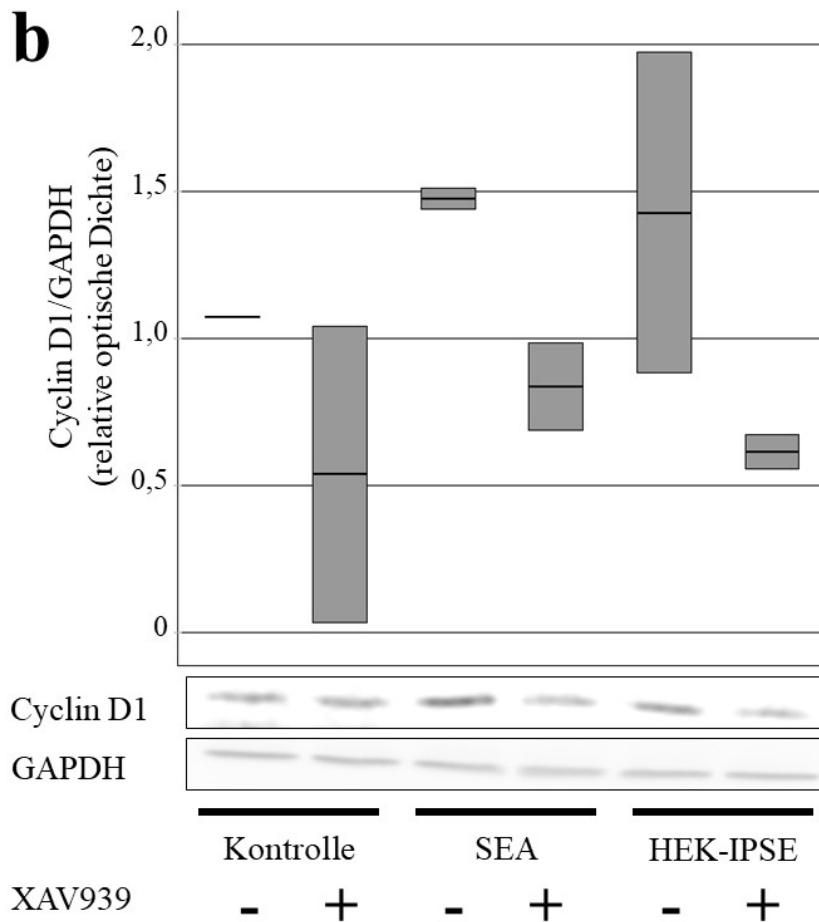


Abbildung 11: p- β -Catenin tendenziell erhöht in der PBS/XAV939-Versuchsgruppe, Cyclin D1-Expression vergleichbar zwischen den Versuchsgruppen

Western Blot-Analysen für p- β -Catenin (a) und Cyclin D1 (b) mit dem Ladekontrollprotein GAPDH von SW620-Zellen, an denen kombinierte Stimulations- und Inhibitionsversuche durchgeführt worden waren. Die Zellen wurden mit SEA, HEK-IPSE und mit PBS-Puffer (Kontrolle) stimuliert beziehungsweise inkubiert. Eine Hälfte der Zellen wurde mit dem Tankyraseinhibitor XAV939 (in DMSO gelöst) inkubiert (+), die andere Hälfte zur Kontrolle ausschließlich mit DMSO (-). Insgesamt bestehen sechs Versuchsgruppen (SEA, HEK-IPSE, PBS, SEA/XAV939, HEK-IPSE/XAV939 und PBS/XAV939). Der genutzte Tankyraseinhibitor XAV939 bewirkt eine höhere Stabilität des β -Catenin *destruction complex* und ist somit ein Inhibitor des kanonischen Wnt-Signalwegs [66]. In Abschnitt a sind neben *Western Blots* für p- β -Catenin die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung als *Boxplots* zu sehen. In Abschnitt b sind entsprechende *Boxplots* und *Western Blots* für Cyclin D1 abgebildet. p- β -Catenin ist die zum Abbau markierte Variante von β -Catenin. Somit kennzeichnet eine Erhöhung einen inaktiven kanonischen Wnt-Signalweg [85]. Cyclin D1 ist ein proliferationsförderndes Protein, das ein *Downstream*-Faktor eines aktiven kanonischen Wnt-Signalwegs ist [56]. Die Gruppengrößen betragen nach Ausschluss einer dritten Versuchsreihe jeweils n=2. Die gezeigten *Western Blots* wurden repräsentativ aus diesen beiden Versuchsreihen ausgewählt. Kruskal-Wallis-Test.

4.3 c-Jun in SW620-Zellen durch Stimulation mit HEK-IPSE induziert und zu p-c-Jun aktiviert

Im SW620-Zellkulturmodell wurde ebenfalls die isolierte Wirkung von Antigenen der *S. mansoni*-Ova auf die Induktion und Aktivierung des protoonkogenen Proteins c-Jun [16] untersucht. Dazu wurden Stimulationsexperimente mit SEA, mit 1,1 $\mu\text{g/mL}$ und mit

9,9 µg/mL HEK-IPSE sowie mit PBS-Puffer als Negativkontrolle durchgeführt. Dass SEA in SW620-Zellkultur aktivierend auf c-Jun wirkt, wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits nachgewiesen [150]. Im vorliegenden Experiment wurde untersucht, inwiefern eine solche Wirkung auch durch HEK-IPSE-Stimulation auftritt (Abb. 12).

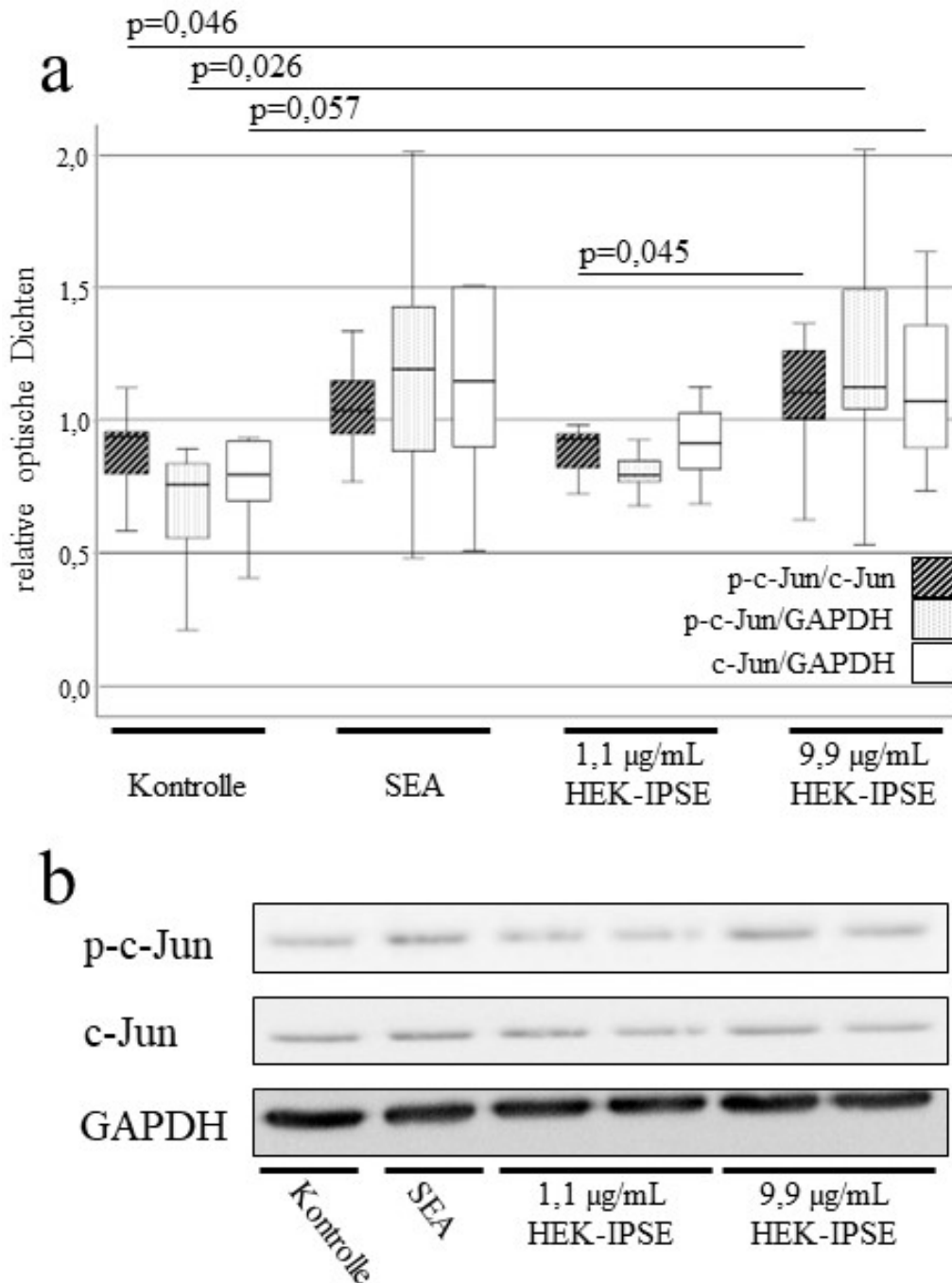


Abbildung 12: Induktion der aktivierten Proteinvariante p-c-Jun durch HEK-IPSE-Stimulation in SW620-Zellkultur

Western Blot-Analyse für c-Jun und p-c-Jun in Zelllysaten von mit SEA (n=9), mit 1,1 µg/mL (n=9) beziehungsweise mit 9,9 µg/mL HEK-IPSE (n=11) stimulierten und mit PBS (Kontrolle, n=9) inkubierten SW620-Zellen. Das

Protoonkogen c-Jun ist ein Teil des Transkriptionsfaktors AP-1 und wird in einigen Tumorerkrankungen überexprimiert [129]. Durch Phosphorylierung zu p-c-Jun wird c-Jun aktiviert [10]. Im unteren Teil der Abbildung (b) sind übereinander repräsentativ ausgewählte *Western Blot*-Banden für p-c-Jun, c-Jun und das Ladekontrollprotein GAPDH gezeigt. Im oberen Teil der Abbildung (a) werden die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung in Form von *Box- and Whisker-Plots* gezeigt. Auf der Ordinate sind die relativen optischen Dichten von p-c-Jun und c-Jun im Verhältnis zueinander (p-c-Jun/c-Jun) und zu GAPDH (p-c-Jun/GAPDH und c-Jun/GAPDH) dargestellt. In den mit 9,9 µg/mL HEK-IPSE stimulierten Zellen war im Vergleich zur Kontrolle p-c-Jun induziert ($p=0,026$) und c-Jun tendenziell induziert ($p=0,057$). p-c-Jun war relativ zu c-Jun in der mit 9,9 µg/mL HEK-IPSE-stimulierten Versuchsgruppe erhöht im Vergleich zur Kontrolle ($p=0,046$) und zur mit 1,1 µg/mL HEK-IPSE-stimulierten Versuchsgruppe ($p=0,045$). Kruskal-Wallis-Test. Die gezeigten *Western Blots* wurden repräsentativ aus acht Wiederholungen ausgewählt.

In den mit 9,9 µg/ml HEK-IPSE stimulierten Zellen war die aktivierte Proteinvariante p-c-Jun im Vergleich zur Kontrolle erhöht (Abb. 12a, p-c-Jun/GAPDH, $p=0,004$ vor Bonferroni-Korrektur, 0,026 nach Bonferroni-Korrektur).

Die nichtaktivierte Proteinvariante c-Jun war in den mit 9,9 µg/mL HEK-IPSE stimulierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle tendenziell stärker exprimiert (Abb. 12a, c-Jun/GAPDH, $p=0,01$ vor Bonferroni-Korrektur, 0,057 nach Bonferroni-Korrektur).

Die aktivierte Proteinvariante p-c-Jun wurde relativ zur nichtaktivierten Variante c-Jun in den mit 9,9 µg/mL HEK-IPSE stimulierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 12a, p-c-Jun/c-Jun, $p=0,008$ vor Bonferroni-Korrektur, 0,046 nach Bonferroni-Korrektur) und zu den mit 1,1 µg/mL HEK-IPSE stimulierten Zellen (Abb. 12a, p-c-Jun/c-Jun, $p=0,007$ vor Bonferroni-Korrektur, 0,045 nach Bonferroni-Korrektur) stärker induziert.

Diese Ergebnisse zeigen zusammenfassend, dass durch HEK-IPSE-Stimulation c-Jun induziert und zu p-c-Jun aktiviert wird. Zumindest anteilig wurde auch eine positive Konzentrationsabhängigkeit dieses Effekts gezeigt.

4.3.1 Verringerung der durch HEK-IPSE vermittelten c-Jun-Aktivierung durch JNK-Inhibition

In kombinierten Stimulations- und Inhibitionsexperimenten wurde untersucht, ob die Induktion und Aktivierung von c-Jun infolge der HEK-IPSE-Stimulation durch die c-Jun-N-terminale Kinase (JNK) vermittelt wird. Dazu wurden SW620-Zellen mit 9,9 µg/mL HEK-IPSE und mit SEA stimuliert oder mit PBS-Puffer als Negativkontrolle inkubiert. Je eine Hälfte der Zellen wurde zusätzlich mit dem JNK-Inhibitor SP600125 behandelt. Insgesamt gab es somit sechs unterschiedliche Versuchsgruppen (SEA, HEK-IPSE, PBS, SEA/SP600125, HEK-IPSE/SP600125, PBS/SP600125). Dass die durch SEA-Stimulation vermittelten Induktionen von c-Jun und p-c-Jun in SW620-Zellkultur durch

Zugabe des JNK-Inhibitors SP600125 abgeschwächt werden, wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits nachgewiesen [150]. In diesem Experiment wurde untersucht, inwiefern auch die durch HEK-IPSE-Stimulation vermittelte Induktion von c-Jun beziehungsweise p-c-Jun durch den JNK-Inhibitor abgeschwächt wird (Abb. 13).

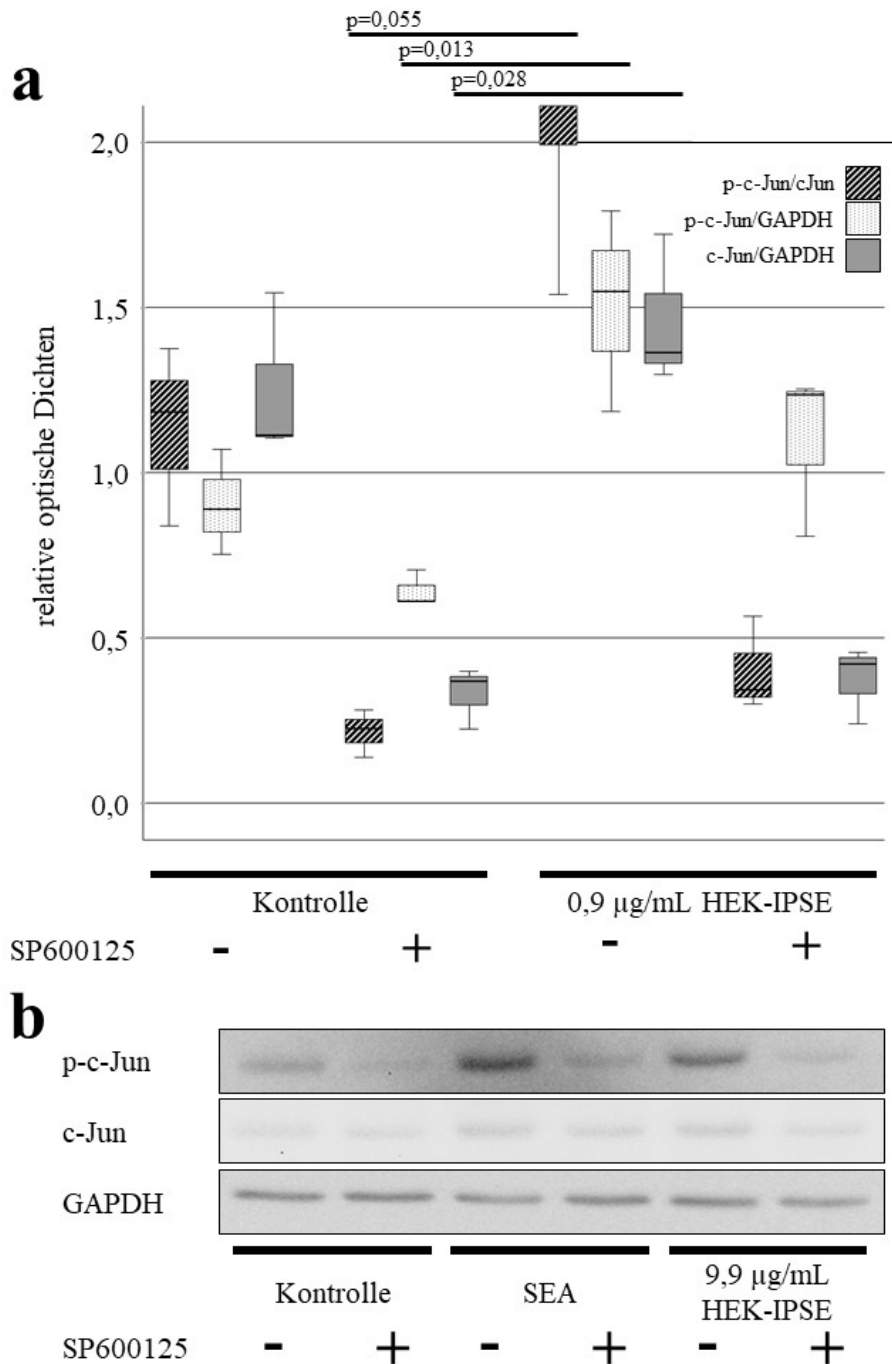


Abbildung 13: Induktion und Aktivierung c-Juns durch HEK-IPSE in SW620-Zellen modulierbar durch Inhibition der JNK.

Western Blot-Analysen für c-Jun und p-c-Jun mit dem Ladekontrollprotein GAPDH in SW620-Zellen, an denen kombinierte Stimulations- und Inhibitionsversuche durchgeführt worden waren (b). Stimuliert wurde jeweils mit SEA,

HEK-IPSE und mit PBS-Puffer (Kontrolle). Eine Hälfte der Zellen wurde mit dem JNK-Inhibitor SP600125 (gelöst in DMSO) inkubiert (+), die andere Hälfte nur mit DMSO (-). Insgesamt bestehen sechs unterscheidbare Versuchsgruppen (SEA [n=1], HEK-IPSE [n=3], PBS [n=3], SEA/SP600125 [n=1], HEK-IPSE/SP600125 [n=3], PBS/SP600125 [n=3]). Der genutzte Inhibitor bewirkt eine geringere Aktivität der c-Jun-N-terminale Kinase (JNK). Diese Kinase nimmt eine wichtige Rolle in der Phosphorylierung und damit der Aktivierung von c-Jun zu p-c-Jun ein [10]. Im oberen Teil der Abbildung (a) werden die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der HEK-IPSE stimulierten und PBS-inkubierten Versuchsgruppen in Form von *Box- and Whisker-Plots* gezeigt. Auf der Ordinate sind die relativen optischen Dichten von p-c-Jun und c-Jun im Verhältnis zueinander (p-c-Jun/c-Jun) und zu GAPDH (p-c-Jun/GAPDH und c-Jun/GAPDH) dargestellt. Kruskal-Wallis-Test. Die gezeigten Western Blots wurden repräsentativ aus drei Wiederholungen ausgewählt.

In der HEK-IPSE-Gruppe war p-c-Jun gegenüber der PBS/SP600125-Gruppe erhöht (Abb. 13, $p=0,002$ vor Bonferroni-Korrektur, $0,013$ nach Bonferroni-Korrektur). p-c-Jun war in der PBS-Gruppe tendenziell erhöht gegenüber der PBS/SP600125-Gruppe (Abb. 13, $p=0,042$ vor Bonferroni-Korrektur, $0,249$ nach Bonferroni-Korrektur). Ebenfalls war p-c-Jun in der HEK-IPSE-Gruppe tendenziell erhöht gegenüber der HEK-IPSE/SP600125-Gruppe (Abb. 13, $p=0,042$ vor Bonferroni-Korrektur, $0,249$ nach Bonferroni-Korrektur).

Das nicht phosphorylierte c-Jun war in der HEK-IPSE-Gruppe gegenüber der PBS/SP600125-Gruppe erhöht (Abb. 13, $p=0,005$ vor Bonferroni-Korrektur, $0,028$ nach Bonferroni-Korrektur). c-Jun war in der HEK-IPSE/SP600125-Gruppe tendenziell erhöht gegenüber der PBS/SP600125-Gruppe (Abb. 13, $p=0,042$ vor Bonferroni-Korrektur, $0,249$ nach Bonferroni-Korrektur).

p-c-Jun wurde relativ zur nicht phosphorylierten Variante c-Jun in der HEK-IPSE-Gruppe tendenziell stärker induziert gegenüber der PBS/SP600125-Gruppe (Abb. 13, $p=0,009$ vor Bonferroni-Korrektur, $0,055$ nach Bonferroni-Korrektur). Darüber hinaus war p-c-Jun im Vergleich zu c-Jun in der HEK-IPSE-Gruppe tendenziell erhöht gegenüber der HEK-IPSE/SP600125-Gruppe (Abb. 13, $p=0,042$ vor Bonferroni-Korrektur, $0,249$ nach Bonferroni-Korrektur) und in der PBS-Gruppe gegenüber der PBS/SP600125-Gruppe (Abb. 13, $p=0,042$ vor Bonferroni-Korrektur, $0,249$ nach Bonferroni-Korrektur).

Zusammengefasst wurde in diesem Experiment gezeigt, dass die Induktion und Aktivierung von c-Jun/p-c-Jun in Zellkultur durch Stimulation mit HEK-IPSE durch eine Inhibition der JNK tendenziell abgeschwächt wird. Der für SEA-Stimulation bereits vorbeschriebene Effekt [150] wurde auch für HEK-IPSE-Stimulation nachgewiesen.

4.4 Induktion von Markerproteinen für DNA-Schädigung in Kolonproben infizierter Hamster sowie in Zellkultur

Neben den protoonkogenen Signalwegen und insbesondere dem kanonischen Wnt-Signalweg liegt ein zweiter Fokus dieser Dissertationsschrift auf Markerproteinen für DNA-Schädigung. DNA-Schäden sind eine Ursache für die Entstehung von malignen Krebserkrankungen wie dem kolorektalen Karzinom [72, 84]. Aus diesem Grund wurden die Kolongewebeproben der Versuchstiere sowie die mit Antigenen der *S. mansoni*-Ova stimulierten SW620-Zellen proteinbiochemisch mittels *Western Blot* für die Markerproteine für DNA-Schäden PARP-1 [11] und γ H2a.X [78] untersucht.

4.4.1 Induktion von PARP-1 und γ H2a.X im Kolon bisex-infizierter Hamster

Die Proteinexpressionen der Markerproteine für DNA-Schädigung PARP-1 [11] und γ H2a.X [78] wurden in den Gesamtgewebslysaten der Kolonproben bs- und ms-infizierter Hamster per *Western Blot* analysiert (Abb. 14 und 15).

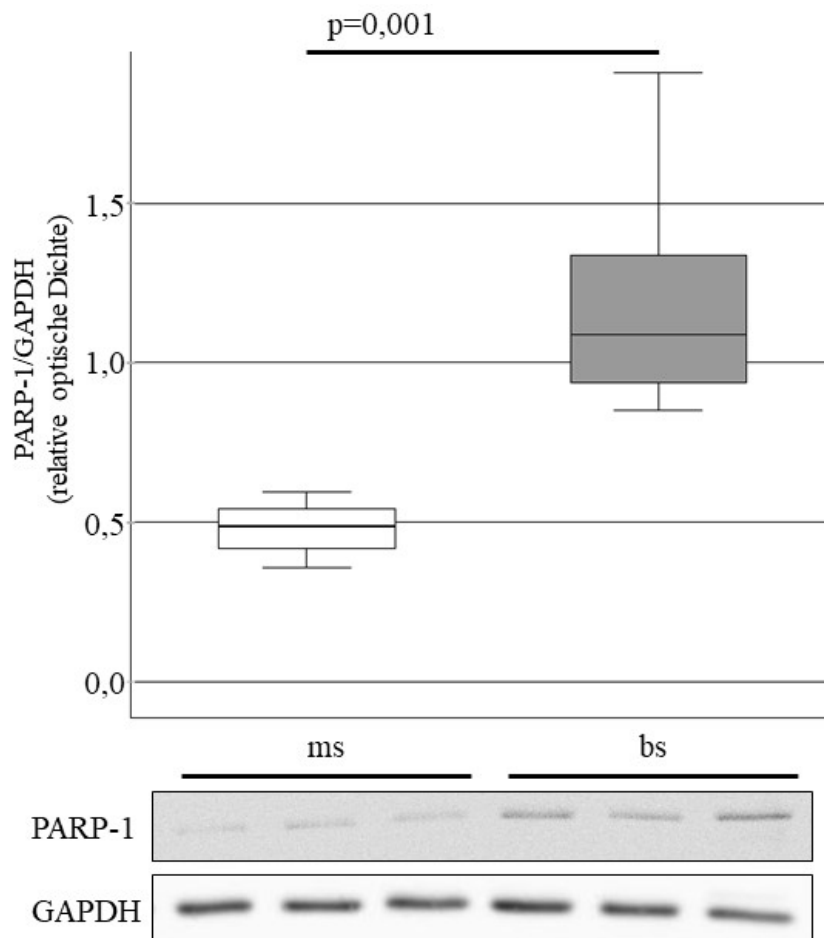


Abbildung 14: PARP-1 im Kolon bs-infizierter Hamster erhöht

Western Blot-Analyse zur Detektion von PARP-1 in Lysaten von Kolonproben bs- (n=11) und ms- (n=4) infizierter Hamster. PARP-1 ist ein Protein, welches bei DNA-Schädigung induziert wird [11]. Im unteren Teil der Abbildung werden übereinander repräsentativ aus drei Wiederholungen ausgewählte *Western Blots* für PARP-1 und das Ladekontrollprotein GAPDH gezeigt. Im oberen Teil der Abbildung ist das Ergebnis der densitometrischen Auswertung in Form von *Box- and Whisker-Plots* zu sehen. Auf der Ordinate ist die relative optische Dichte von PARP-1 im Verhältnis zu GAPDH dargestellt. PARP-1 wurde im Kolon bs-infizierter Hamster induziert ($p=0,001$). Mann-Whitney-U-Test.

In den Kolonproben der bs-infizierten Hamster war die PARP-1-Expression erhöht (Abb. 14, $p=0,001$). Das phosphorylierte Histon γ H2a.X war in den Kolonproben der bs-infizierten Hamster tendenziell erhöht (Abb. 15, $p=0,078$). Diese Ergebnisse wiesen auf eine erhöhte DNA-Schädigung im Kolongewebe der bs-infizierten Hamster im Vergleich zum Kolongewebe der ms-infizierten Hamster hin.

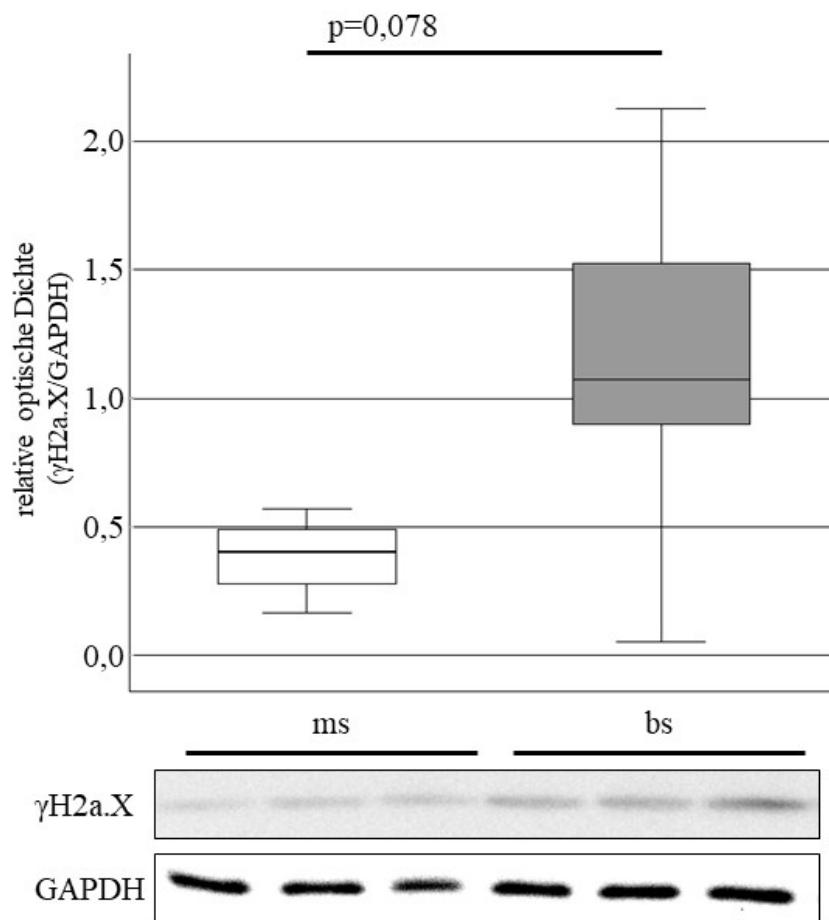


Abbildung 15: γ H2a.X tendenziell erhöht im Kolon bs-infizierter Hamster

Western Blot-Analyse für das Protein γ H2a.X in Kolonproben bs- (n=11) und ms- (n=4) infizierter Hamster. γ H2a.X ist eine Variante des Histons H2a und ist als sensibler Marker für DNA-Schädigung bekannt [119]. Im unteren Teil der Abbildung sind übereinander repräsentativ aus drei Wiederholungen ausgewählte *Western Blot*-Banden für γ H2a.X und das Ladekontrollprotein GAPDH gezeigt. Im oberen Teil der Abbildung wird das Ergebnis der densitometrischen Auswertung in Form von *Box- and Whisker-Plots* dargestellt. Auf der Ordinate ist die relative optische Dichte von

γ H2a.X im Verhältnis zu GAPDH dargestellt. γ H2a.X wurde im Kolon bs-infizierter Hamster tendenziell induziert ($p=0,078$). Mann-Whitney-U-Test.

4.4.2 Induktion von PARP-1 und γ H2a.X durch Stimulation mit HEK-IPSE und SEA

Auch im Zellkulturmodell wurde die Regulation der Markerproteine der DNA-Schädigung PARP-1 und γ H2a.X [11, 78] durch die isolierte Wirkung von Antigenen der *S. mansoni*-Ova untersucht. Dazu wurden SW620-Zellen jeweils mit SEA oder HEK-IPSE stimuliert beziehungsweise mit PBS-Puffer inkubiert.

PARP-1 war in den mit 9,9 μ g/ml HEK-IPSE stimulierten SW620-Zellen im Vergleich zur Kontrolle stärker exprimiert (Abb. 16, $p=0,001$ vor Bonferroni-Korrektur, 0,008 nach Bonferroni-Korrektur). In den mit SEA stimulierten Zellen war PARP-1 im Vergleich zur Kontrolle tendenziell stärker exprimiert (Abb. 16, $p=0,018$ vor Bonferroni-Korrektur, 0,111 nach Bonferroni-Korrektur). γ H2a.X wurde in den mit SEA stimulierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle tendenziell stärker induziert (Abb. 17, $p=0,016$ vor Bonferroni-Korrektur, 0,095 nach Bonferroni-Korrektur). Die Stimulation mit 9,9 μ g/ml HEK-IPSE veränderte die γ H2a.X-Induktion nicht (Abb. 17, $p=0,746$ vor Bonferroni-Korrektur, 1,0 nach Bonferroni-Korrektur). Diese Ergebnisse zeigen eine erhöhte DNA-Schädigung in den mit Antigenen der *S. mansoni*-Ova stimulierten SW620-Zellen.

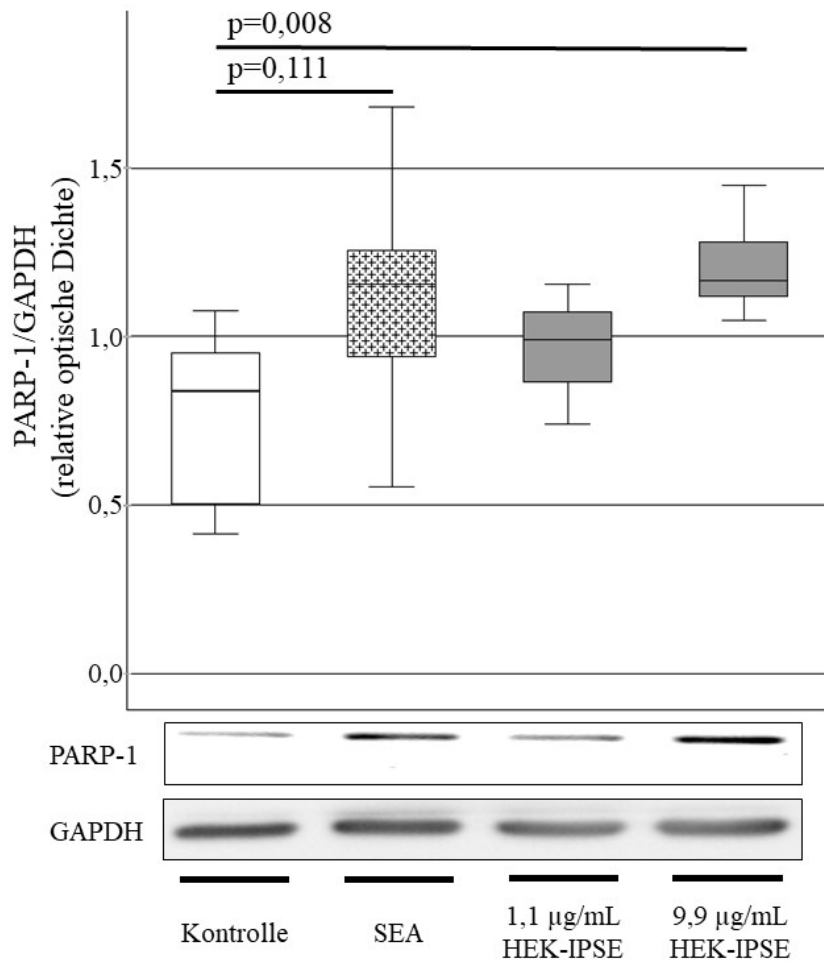


Abbildung 16: PARP-1 in SW620-Zellen durch HEK-IPSE-Stimulation induziert

Western Blot-Analyse für PARP-1 in Zelllysaten von mit SEA (n=9), mit 1,1 µg/ml (n=3) beziehungsweise mit 9,9 µg/ml HEK-IPSE (n=13) stimulierten und PBS-Puffer (Kontrolle, n=9) inkubierten SW620-Zellen. Im unteren Teil der Abbildung sind übereinander repräsentativ aus fünf Wiederholungen ausgewählte *Western Blots* für PARP-1 und das Ladekontrollprotein GAPDH gezeigt. Im oberen Teil der Abbildung wird das Ergebnis der densitometrischen Auswertung in Form von *Box- and Whisker-Plots* dargestellt. Auf der Ordinate ist die relative optische Dichte von PARP-1 im Verhältnis zu GAPDH dargestellt. PARP-1 wurde in den mit 9,9 µg/ml HEK-IPSE stimulierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle stärker induziert (p=0,008 nach Bonferroni-Korrektur). PARP-1 war in den SEA-stimulierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle tendenziell erhöht (p=0,111 nach Bonferroni-Korrektur). Kruskal-Wallis-Test.

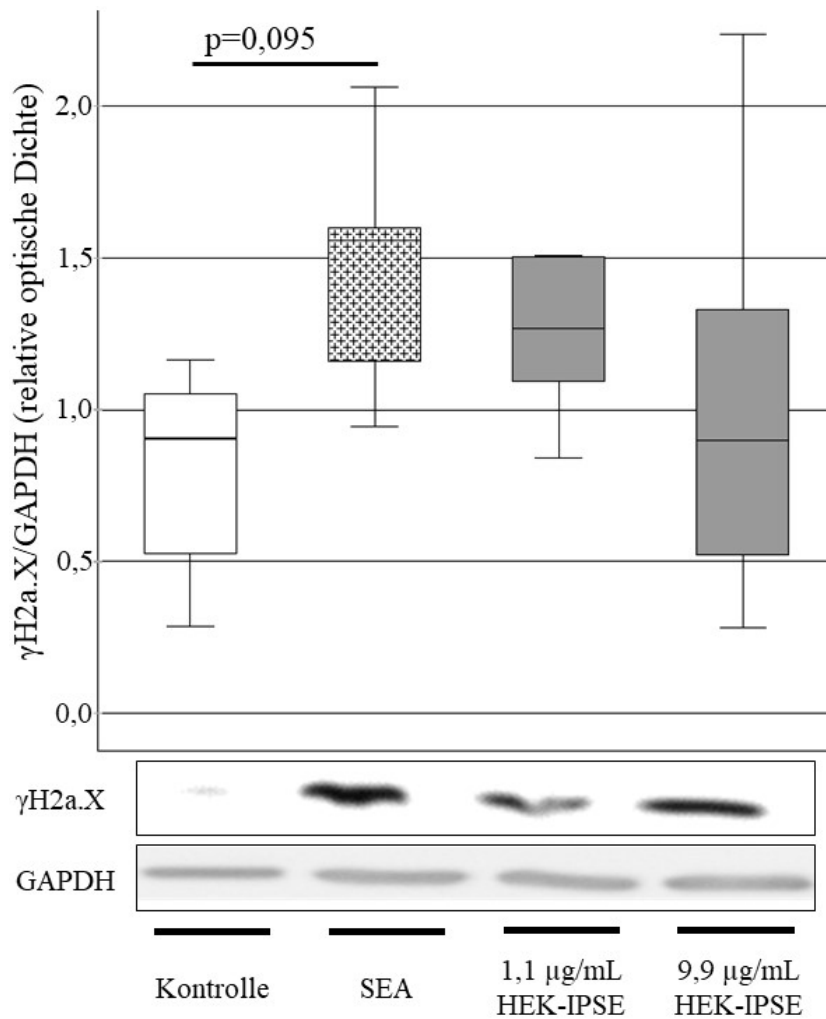


Abbildung 17: $\gamma\text{H2a.X}$ tendenziell erhöht in SEA-stimulierten SW620-Zellen

Western Blot-Analyse für $\gamma\text{H2a.X}$ in Zelllysaten von mit SEA (n=10), mit 1,1 $\mu\text{g/mL}$ (n=7) beziehungsweise mit 9,9 $\mu\text{g/mL}$ HEK-IPSE (n=16) stimulierten und mit PBS-Puffer (Kontrolle, n=10) inkubierten SW620-Zellen. Im unteren Teil der Abbildung sind übereinander repräsentativ aus sechs Wiederholungen ausgewählte *Western Blots* für $\gamma\text{H2a.X}$ und das Ladekontrollprotein GAPDH gezeigt. Im oberen Teil der Abbildung wird das Ergebnis der densitometrischen Auswertung in Form von *Box- and Whisker-Plots* dargestellt. Auf der Ordinate ist die relative optische Dichte von $\gamma\text{H2a.X}$ im Verhältnis zu GAPDH dargestellt. $\gamma\text{H2a.X}$ war in den mit SEA stimulierten Zellen tendenziell erhöht im Vergleich zur Kontrolle (p=0,095 nach Bonferroni-Korrektur). Kruskal-Wallis-Test.

5 Diskussion

Die vorliegende Studie soll zur Klärung der Frage beitragen, ob die chronische Schistosomiasis mansoni ein pathogenetischer Faktor für die Entstehung eines kolorektalen Karzinoms (CRC) sein könnte. Obwohl die Schistosomiasis mansoni in Teilen der Welt hochprävalent ist [146], hat diese Frage bisher in der Forschung wenig Resonanz gefunden. Ein Grund für diesen Umstand ist, dass die Schistosomiasis zu der Gruppe der *neglected tropical diseases* gezählt wird. Diese Erkrankungen sind vornehmlich in Ländern mit tropischem Klima und geringem *human development index* (HDI) prävalent und sind in den weltweiten Forschungsbestrebungen unterrepräsentiert [146, 151].

Für eine Reihe an Infektionserkrankungen ist bereits eine karzinogene Wirkung bekannt. Zu den Erregern mit nachgewiesener karzinogener Wirkung zählen beispielsweise das Hepatitis-B- und das Hepatitis-C-Virus, welche mit der Entstehung von hepatozellulären Karzinomen assoziiert sind und das Bakterium *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), welches unter anderem Magenkarzinome begünstigt [96]. Zu den Parasiten, die als Karzinogene identifiziert wurden, zählt der Leberegel *Opisthorchis viverrini*. Dieser ist mit der Entstehung von Cholangiokarzinomen assoziiert und zählt wie die Schistosomen zur Klasse der *Trematoden* [67]. Ebenfalls bekannt ist die Assoziation von *Schistosoma haematobium* (*S. haematobium*) mit der Entstehung von Harnblasenkarzinomen [17]. Dass Infektionserkrankungen im Allgemeinen und artverwandte Parasiten im Speziellen mit der Entstehung von Krebserkrankungen assoziiert sind, lässt einen möglichen Zusammenhang von Schistosomiasis mansoni und der kolorektalen Karzinogenese plausibel erscheinen. Die Frage, inwiefern der Parasit *Schistosoma mansoni* (*S. mansoni*) als Karzinogen in der kolorektalen Karzinogenese einzustufen ist, ist bislang noch nicht abschließend beantwortet worden. Einige der sich mit diesem Thema befassenden wissenschaftlichen Artikel verneinen einen Zusammenhang [34, 44], während andere die Schistosomiasis als möglichen Risikofaktor für kolorektale Karzinome sehen [3, 92].

Die Art *Schistosoma japonicum* (*S. japonicum*) ist eng mit *S. mansoni* verwandt und befällt ebenfalls das Intestinum [29]. Infektionen mit dieser Spezies wurden als Risikofaktor für das CRC ermittelt [87]. Patienten mit *S. japonicum*-assoziierten CRC hatten ein schlechteres Gesamtüberleben als Patienten mit einem nicht mit *S. japonicum*-

assoziierten CRC [148]. Wenn Schistosomeneier tief in der Darmwand, in der Leber oder in Lymphknoten nachweisbar sind, ist dies mit einer schlechteren Prognose verbunden [110]. Die Erkenntnisse über *S. japonicum* sind nicht ohne weiteres auf *S. mansoni* übertragbar. Trotzdem könnte aufgrund der großen biologischen und pathophysiologischen Ähnlichkeiten der beiden Erreger und der Erkrankungen ein ähnlicher karzinogener Effekt wie bei *S. japonicum* auch bei *S. mansoni* vermutet werden.

Ein zusätzliches Argument für die Annahme, dass ein solcher Zusammenhang zwischen chronischer Schistosomiasis mansoni und der Entstehung von CRC bestehen könnte, basiert auf folgender pathophysiologischer Überlegung: Die chronische, intestinale Form der Schistosomiasis mansoni ruft eine chronische Entzündung des Kolons hervor. Diese Entzündungsreaktion ist T_H2-gewichtet. Damit weist sie eine Ähnlichkeit zur Entzündungsreaktion der Colitis ulcerosa auf, welche mit einem deutlich erhöhten Darmkrebsrisiko assoziiert ist [24, 108].

Das wichtigste Argument gegen die Hypothese eines Zusammenhanges zwischen Schistosomiasis mansoni und kolorektaler Karzinogenese liegt in den bisher vorhandenen epidemiologischen Arbeiten zu diesem Thema. In diesen konnte überwiegend kein Zusammenhang der Schistosomiasis mansoni mit CRC nachgewiesen werden [44]. Eine einfache Erklärung für dieses Fehlen eines Nachweises wäre, dass es keinen Zusammenhang gibt. Diese Sichtweise würde dadurch unterstützt, dass derzeit in Hochprävalenzgebieten der Schistosomiasis die CRC-Prävalenz im globalen Vergleich eher niedrig ist [49]. Das bisherige Fehlen eindeutiger epidemiologischer Belege der Assoziation zwischen Schistosomiasis mansoni und dem CRC widerlegt einen Zusammenhang aber auch nicht. Für die mangelnde Sichtbarkeit eines Zusammenhanges zwischen chronischer Schistosomiasis mansoni und der Entstehung von CRC in epidemiologischen Studien lassen sich folgende Gründe finden:

In den Ländern Afrikas, in denen die Schistosomiasis mansoni besonders prävalent ist [29], gibt es oft keine ausreichend flächendeckende Infrastruktur zur Diagnostik des CRC [82]. Dies dürfte die Belastbarkeit der epidemiologischen Daten einschränken. Zusätzlich sind die bekannten Risikofaktoren des CRC in den von Schistosomiasis betroffenen Regionen nicht in gleichem Maß ausgeprägt wie in anderen Teilen der Welt. Zum einen ist das lebensstilassoziierte und wohlstandsbedingte Risikoprofil für das CRC in

Schistosomiasis-Gebieten oft weniger ausgeprägt [49, 151]. Zum anderen ist das Lebensalter ein wichtiger Risikofaktor für die Entstehung eines CRC [69]. Beispielsweise lag in Deutschland das mittlere CRC-Erkrankungsalter in den Jahren 2017 und 2018 bei über 70 Jahren [45]. In Weltregionen mit geringem HDI liegt die mittlere Lebenserwartung bei Geburt deutlich niedriger als in Regionen mit hohem HDI. In Subsaharaafrika lag sie in einem Bericht der Vereinten Nationen von 2022 bei 60,1 Jahren [143]. Menschen mit einem erhöhten Risiko für ein CRC erreichen somit wohlmöglich nicht das Lebensalter, in welchem sie an einem CRC erkrankt wären. Insgesamt sind viele der bekannten Risikofaktoren der kolorektalen Karzinogenese in Hochprävalenzgebieten der Schistosomiasis mansoni weniger ausgeprägt. Dadurch könnte die Schistosomiasis als möglicher beitragender CRC-Risikofaktor überlagert und der Effekt maskiert werden.

In Zukunft könnte sich dies ändern. Prognosen zufolge werden die lebensstilbedingten Risikofaktoren in den kommenden Jahrzehnten in den Hochprävalenzgebieten der Schistosomiasis mansoni zunehmen. Daher wird in diesen Gebieten auch ein Anstieg der CRC-Prävalenz erwartet [5, 51]. Zusätzlich dürften der Klimawandel und globalisierte Migrationsbewegungen dafür sorgen, dass die Schistosomiasis zukünftig auch in bisher nicht betroffenen Weltregionen wie beispielsweise (Süd-)Europa auftreten könnte [7, 15]. Die chronische Schistosomiasis mansoni dürfte aus den beiden aufgeführten Gründen in Zukunft häufiger auch Menschen mit einem ohnehin schon ausgeprägten CRC-Risikoprofil betreffen. Daher ist die in der vorliegenden Arbeit behandelte Frage, ob die Schistosomiasis mansoni ein Risikofaktor für das CRC ist, von großem Interesse.

Aus der hier präsentierten experimentellen Dissertationsschrift konnten folgende Haupterkenntnisse gezogen werden:

1. In SW620-Zellen und im Kolongewebe bisex-infizierter Hamster wird der Wnt-Signalweg durch *S. mansoni*-Ova beziehungsweise deren Antigene SEA und IPSE aktiviert. Auch Wnt-Signalweg-assoziierte, proliferationsfördernde Signalwege werden aktiviert.
2. Eine Inhibition des Wnt-Signalwegs beziehungsweise eine Inhibition der Kinase JNK schwächt die unter 1. genannten Effekte teilweise ab.

3. In Zellkultur und im Kolongewebe bisex-infizierter Hamster werden Markerproteine der DNA-Schädigung durch *S. mansoni*-Ova beziehungsweise deren Antigene erhöht.

5.1 Ergebnisdiskussion

5.1.1 Wnt-Aktivierung durch Antigene der *S. mansoni*-Ova in Zellkultur und im Kolon bisex-infizierter Hamster

Sowohl in Zellkulturexperimenten als auch im Kolongewebe infizierter Hamster wurde der kanonische Wnt-Signalweg durch *S. mansoni*-Ova beziehungsweise durch deren Antigene aktiviert. Die Bedeutung des Wnt-Signalwegs in der CRC-Entwicklung ist sehr umfassend belegt [48, 56, 103]. Die Aktivierung des Wnt-Signalwegs führt zur Aktivierung proliferationsfördernder Signale [56], weswegen Proteine des Wnt-Signalwegs auch als Protoonkogene beziehungsweise Tumorsuppressorgene bezeichnet werden, die bei entsprechenden Mutationen zur kolorektalen Karzinogenese beitragen [48, 63, 103].

5.1.1.1 Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs durch Stimulation in Zellkultur

Erste Hinweise auf eine Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs durch Antigene der Schistosomeneier wurden durch die Auswertung SEA-stimulierter Zellen mittels *Phosphokinase Proteome Profiler™ Array* gewonnen (Abb. 4). Diese Methode ist geeignet, um einen Überblick über die Expression einiger phosphorylierter Kinasen und assoziierter Proteine zu erlangen. In den SEA-stimulierten Zellen zeigte diese Analyse eine Erhöhung von p-GSK-3 β und von β -Catenin im Vergleich zur Kontrolle. Dies wies auf eine Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs hin [18, 63]. Das zur Zellkulturstimulation verwendete SEA ist ein Gemisch der löslichen Antigene der Schistosomeneier und ist etabliert als Induktor in Modellen, die die Reaktion von Wirtszellen auf *S. mansoni*-Ova nachbilden sollen [98]. SEA wird unten näher besprochen. Neben den Faktoren des kanonischen Wnt-Signalwegs wurden in den SEA-stimulierten Zellen weitere phosphorylierte Kinasen induziert. Zu den am meisten induzierten Faktoren zählten CREB, AMPK- α 1 und HSP27. Diese Faktoren sind jeweils assoziiert mit verschiedenen malignen Erkrankungen, zu denen auch das CRC zählt [6, 33, 137]. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Proteine und deren assoziierte

Signalwege jedoch nicht weiterverfolgt. Es sollte ein Fokus auf den kanonischen Wnt-Signalweg als einen der zentralen Signalwege der kolorektalen Karzinogenese im Modell der Adenom-Karzinom-Sequenz gelegt werden [48]. Weitere Forschungsarbeiten mit dem Ziel, auch diese Signalwege zu untersuchen, erscheinen sinnvoll.

Zur näheren Überprüfung der Erkenntnisse aus dem *Array* wurden weitere Zellkulturstimulationsexperimente durchgeführt und mittels *Western Blot*-Analysen ausgewertet. Zur Stimulation der Zellen wurde nun neben SEA auch HEK-IPSE genutzt. Bei HEK-IPSE handelt es sich um eine in HEK-Zellen rekombinant hergestellte Version des Proteins IPSE, welches nur von Schistosomeneiern gebildet und aktiv sekretiert wird [124]. IPSE ist in SEA enthalten [126] und wirkt an der Vermittlung der Immunreaktion im Wirtsorganismus mit [79, 100]. Ebenso wie SEA wird auch IPSE im weiteren Verlauf der Diskussion nähergehend besprochen. Durch die zusätzliche Stimulation mit einer Variante von IPSE sollte untersucht werden, ob die Effekte einer Stimulation mit IPSE mit denen einer Stimulation mit SEA übereinstimmende Ergebnisse bringen. Wenn Stimulationen mit IPSE und mit SEA jeweils ähnliche Ergebnisse erbrächten, wäre davon auszugehen, dass die Wirkung von SEA zumindest anteilig durch IPSE vermittelt wird. Die Stimulation der SW620-Zellen mit SEA bewirkte eine Erhöhung der p-GSK-3 (Abb. 9), die Stimulation mit HEK-IPSE eine tendenzielle Erhöhung β -Catenins (Abb. 8). Die Beobachtung aus dem *Phosphokinase Proteome Profiler™ Array*, dass SEA-Stimulation zu einer Erhöhung der p-GSK-3 β führte, wurde also im Zellkulturexperiment mittels *Western Blot*-Analysen verifiziert. Eine Induktion von β -Catenin durch SEA-Stimulation konnte mit der gewählten Methodik, Stichprobengröße und nach der Bonferroni-Korrektur nicht nachgewiesen werden. Die Bonferroni-Korrektur als Methode zur Korrektur gegen eine Kumulation des α -Fehlers bei multiplem Testen wird in der Literatur teils als sehr konservativ angesehen [114]. Die Vor- und Nachteile der Bonferroni-Korrektur werden weiter unten eingehender diskutiert.

Insgesamt bewirkten also die Stimulationen mit SEA wie auch mit HEK-IPSE jeweils eine tendenzielle oder tatsächliche Induktion eines der beiden untersuchten Proteine p-GSK-3 β oder β -Catenin, welche für einen aktivierten kanonischen Wnt-Signalweg stehen. Diese Ergebnisse der Zellkulturstimulationsversuche unterstützen die Annahme, dass Antigene der *S mansoni*-Ova den kanonischen Wnt-Signalweg aktivieren. Die Ergebnisse suggerieren, dass neben IPSE noch weitere Anteile von SEA an der

Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs beteiligt sein dürften. Weitere Bestandteile von SEA, die diesen Effekt vermitteln könnten, werden weiter unten aufgeführt.

5.1.1.2 Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs im Kolon bisex-infizierter Hamster

Auch im *in vivo*-Modell der bisexuell (bs-infiziert) oder monosexuell (ms-infiziert) mit *S. mansoni* infizierten Hamster wurde die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs im Darmgewebe untersucht. Der Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen bs- und ms-Infektion liegt in der Produktion von *S. mansoni*-Ova, welche nur in bs-infizierten Hamstern möglich ist [58].

Die Proteine, die als Parameter für die Aktivität des kanonischen Wnt-Signalwegs untersucht wurden, waren auch hier β -Catenin und die phosphorylierte Kinase p-GSK-3 β . In den *Western Blot*-Analysen der Kolonproben bs-infizierter Hamster wurde eine Tendenz zur Induktion β -Catenins festgestellt (Abb. 6). Bei der Auswertung der Kolonproben für die Kinase p-GSK-3 β zeigte sich im *Western Blot* kein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. In der *Western Blot*-Analyse für p-GSK-3 β waren neben der kräftigsten *Western Blot*-Bande noch weitere Banden mit unterschiedlichen molekularen Massen zu sehen (Abb. 7). Eine zu diskutierende Erklärung für die Vielzahl der *Western Blot*-Banden ist, dass die verschiedenen Banden unterschiedlich großen Proteinfragmenten der p-GSK-3 β entsprechen könnten. Die Aktivität der GSK-3 β und damit auch die Aktivität des kanonischen Wnt-Signalwegs kann neben der Phosphorylierung auch durch Fragmentierung moduliert werden [91]. Es lässt sich allerdings nicht ohne nähere Analyse der mutmaßlichen Proteinfragmente sagen, ob von einer Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs ausgegangen werden kann. Bestimmte Fragmente der GSK-3 β weisen in Experimenten sogar eine erhöhte Kinaseaktivität auf [54], was einem weniger aktiven kanonischen Wnt-Signalweg entspräche [123]. Zusammenfassend ist durch die Auswertung der Hamsterkolonproben auf die p-GSK-3 β kein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen nachgewiesen worden.

Über die *Western Blot*-Analysen hinaus wurde in histologischen Schnitten der Kolonproben der infizierten Hamster das Protein β -Catenin immunhistochemisch angefärbt (Abb. 5). In Präparaten bs-infizierter Hamster zeigte sich eine eindeutige und

lokalisierte Induktion von β -Catenin in den Enterozyten in räumlicher Nähe der *S. mansoni*-Ova. In diesen Enterozyten zeigte sich zum einen eine deutliche Akkumulation von β -Catenin im Zytoplasma. Zum anderen konnte in direkter Nähe zu den Eiern eine Induktion β -Catenins in den Zellkernen der Enterozyten beobachtet werden. Die Induktion von β -Catenin nahm sowohl zytoplasmatisch als auch in den Zellkernen mit zunehmender Entfernung zu den Ova ab (Abb. 5a und 5b). In den Präparaten der ms-infizierten Hamster konnte nichts Vergleichbares beobachtet werden (Abb. 5c). Die immunhistochemischen Färbungen belegen anhand der Erhöhung β -Catenins, dass der kanonische Wnt-Signalweg durch die räumliche Nähe zu *S. mansoni*-Ova aktiviert wird. Die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs resultiert in einer Erhöhung von β -Catenin im Zytoplasma, welches dann in den Zellkern transloziert. Dort wirkt β -Catenin als Kotranskriptionsfaktor und mediiert die Transkription von *Downstream*-Faktoren [64, 80]. Zu diesen zählen unter anderem Cyclin D1 [56] und c-Jun [62]. In der Immunhistochemie der Kolonproben der bs-infizierten Hamster für β -Catenin wurde sowohl eine Akkumulation im Zytoplasma als auch eine nukleäre Translokation von β -Catenin beobachtet (Abb. 5). Das legt nahe, dass auch *Downstream*-Faktoren des kanonischen Wnt-Signalwegs induziert werden könnten. Mit Cyclin D1 wurde einer dieser *Downstream*-Faktoren im folgenden Schritt untersucht. Die in der Immunhistochemie beobachtete Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs ist eindeutig auf die Wirkung der *S. mansoni*-Ova zurückzuführen. Ein Beleg ist zum einen das Fehlen dieses Effekts in den ms-infizierten Hamster, in denen keine Ova-Produktion stattfand. Eine Infektion mit adulten Würmern lag in beiden Versuchsgruppen vor, genügte aber nicht, um den kanonischen Wnt-Signalweg zu aktivieren. Zum anderen belegt die räumliche Verteilung der β -Catenin-Erhöhung, dass diese von der räumlichen Nähe zu den Ova abhängt.

Immunhistochemisch war in den Präparaten aus dem Hamsterkolon eindeutig eine Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs in Form einer β -Catenin-Erhöhung beobachtbar (Abb. 5a und 5b). Die *Western Blot*-Analysen ergaben nur teilweise und tendenzielle Hinweise auf eine solche Erhöhung (Abb. 6). Ein möglicher Grund für die nur tendenziell nachweisbare Induktion β -Catenins im Kolongewebe der bs-infizierten Hamster im *Western Blot* ist die Heterogenität der im Kolongewebe vorkommenden Zelltypen. Der in der Immunhistochemie beobachtete Effekt war vor allem ein

lokalisierter Effekt in den Enterozyten in räumlicher Nähe zu den Ova, nicht des gesamten Kolongewebes. Ein weiterer Grund könnte sein, dass β -Catenin auch an der Bildung der E-Cadherine in epithelialen Zell-Zell-Kontakten beteiligt ist [47]. In Gesamtgewebslysaten des genutzten Probenmaterials könnten dezente Konzentrationsunterschiede in Zytoplasma und Nukleus der Enterozyten schwer nachzuweisen sein. Ein insgesamt hohes Maß an β -Catenin könnte diese Unterschiede verschleiern. Zusammenfassend sind die Belastbarkeit und Aussagekraft der immunhistochemisch gewonnenen Ergebnisse höher einzuschätzen als die der *Western Blots*. Die Ergebnisse des *in vivo*-Modells legen nahe, dass im Kolongewebe der Kontakt zu *S. mansoni*-Ova lokalisiert zu einer Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs führt.

5.1.2 Aktivierung von Protoonkogenen beziehungsweise Wnt-Downstream-Faktoren durch Antigene der *Schistosoma mansoni*-Ova in Zellkultur

Nachdem eine Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs durch *S. mansoni*-Ova und deren Antigene nachgewiesen wurde, wurden anschließend die mit dem kanonischen Wnt-Signalweg assoziierten Proteine Cyclin D1 und c-Jun/p-c-Jun untersucht. Diese Proteine werden zu den *Downstream*-Faktoren des kanonischen Wnt-Signalwegs gezählt, die durch eine Aktivierung des Wnt-Signalwegs ebenfalls aktiviert werden [62, 131]. Cyclin D1 und c-Jun/p-c-Jun sind protoonkogen wirksame Proteine, die in einigen Tumorentitäten überexprimiert sind [16, 35].

Das Protein c-Jun ist ein Teil des Transkriptionsfaktors AP-1 und in verschiedenen Malignomen überexprimiert [41, 42, 122]. Es zählt zu den Protoonkogenen und ist mit verschiedenen proliferationsfördernden Faktoren assoziiert, zu denen auch Cyclin D1 zählt [42, 62]. Einige Aspekte der Wirkung der Schistosomiasis *mansoni* auf den c-Jun/AP-1-Signalweg in Zellen des Wirtsorganismus wurden bereits untersucht. In Lebergewebe und Leberzelllinien wurde eine Aktivierung von c-Jun durch *S. mansoni*-Ova beziehungsweise deren Antigene belegt [19, 118]. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde entdeckt, dass c-Jun im Kolongewebe bs-infizierter Hamster erhöht und aktiviert wird und dass in Zellkultur eine c-Jun-/p-c-Jun-Erhöhung durch SEA-Stimulation bewirkt wird [150]. In dieser Forschungsarbeit wurde auf diese Erkenntnisse aufgebaut. Der Fokus lag darauf, zu überprüfen, ob c-Jun sich auch durch Stimulation mit IPSE aktivieren lässt. In der Auswertung der Zellkulturstimulationsexperimente konnte

gezeigt werden, dass durch HEK-IPSE-Stimulation p-c-Jun- und tendenziell auch c-Jun induziert wurden (Abb. 12). Somit wurde belegt, dass auch die unmittelbare Wirkung von HEK-IPSE auf Kolonenterozyten-ähnliche Zellen ohne Vermittlung des Immunsystems zu einer Aktivierung des protoonkogen wirksamen c-Juns zu p-c-Jun führt. IPSE ist in SEA enthalten [98], weswegen die vorbeschriebene, durch SEA-vermittelte c-Jun/p-c-Jun-Aktivierung vermutlich anteilig durch IPSE vermittelt wird. Wie groß der Anteil von IPSE an der c-Jun aktivierenden Wirkung von SEA ist, ist bislang unklar und bietet Anlass für weitere Forschungsarbeiten.

Für das Protein Cyclin D1 wurde in unserer Arbeitsgruppe eine Überexpression im Kolongewebe bs-infizierter Hamster vorbeschrieben und gemeinsam mit den hier dargestellten Ergebnissen veröffentlicht [150]. Cyclin D1 ist ein wichtiger Faktor des Zellzyklus im Übergang von der G1- zur S-Phase [35]. Als typisches Protoonkogen wird Cyclin D1 in einer Vielzahl von Tumoren überexprimiert. Zu diesen zählen Sarkome, Lungen-, Cervix- und kolorektale Karzinome [4, 35]. Zudem ist Cyclin D1 ein Zielfaktor verschiedener proliferationsfördernder Signalwege, darunter auch des Wnt-Signalwegs [131, 140] und von AP-1/c-Jun [42].

Die hier präsentierten Ergebnisse zeigen eine Induktion von Cyclin D1 in den mit SEA stimulierten Zellen (Abb. 10). Neben der Stimulation mit SEA wurde auch eine Stimulation mit HEK-IPSE durchgeführt. Hier wurde kein Unterschied bezüglich Cyclin D1 im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen. Ein bemerkenswerter Aspekt dieses Ergebnisses ist, dass die Stimulation mit 1,1 µg/ml HEK-IPSE im Mittel etwas höhere Cyclin D1-Expressionen bewirkte als die Stimulation mit 9,9 µg/ml HEK-IPSE. Daraus ergibt sich die Frage, ob ein gegebenenfalls vorliegender, Cyclin D1-induzierender Effekt durch HEK-IPSE ein Optimum bei geringeren Konzentrationen haben könnte. Ein solcher Effekt, bei welchem die Induktion eines Zielantigens durch Stimulation mit IPSE in einer Zellkultur ein Konzentrationsoptimum hatte, wurde in der vorhandenen, wissenschaftlichen Literatur für Stimulationsversuche mit IPSE in der menschlichen Leberzelllinie Huh7 und Auswertung auf p-c-Jun beschrieben. Diese Stimulationsexperimente wurden als Konzentrationsreihe mit natürlichem IPSE zwischen 2,5 µg/ml und 0,25 ng/ml durchgeführt. Die Konzentration von p-c-Jun war am höchsten in den Zellen, die mit 2,5 ng/ml stimuliert worden waren. Höhere wie tiefere Konzentrationen des IPSE bewirkten weniger starke Effekte [118]. Diese Ergebnisse sind

aufgrund des unterschiedlichen verwendeten Zelltyps, der abweichenden IPSE-Variante und des anderen Zielproteins nur begrenzt vergleichbar. Für Stimulationen in Kolonzelllinien oder Auswertungen auf Cyclin D1 wurden keine vergleichbaren Ergebnisse gefunden. In dem hier vorliegenden Stimulationsexperiment (Abb. 10) wurden SW620-Zellen mit 1,1 µg/ml HEK-IPSE in der niedrigkonzentrierten und mit 9,9 µg/ml in der höherkonzentrierten Stimulationsgruppe stimuliert. Diese IPSE-Konzentrationen liegen deutlich über dem Stimulationsoptimum der zum Vergleich herangezogenen IPSE-Konzentrationen. Denkbar wäre, dass für die Induktion des Proteins Cyclin D1 das Konzentrationsoptimum für eine Stimulierbarkeit durch HEK-IPSE im Bereich von weniger als 1,1 µg/ml liegt.

Im direkten Vergleich mit der Auswertung der HEK-IPSE-Stimulation auf p-c-Jun in SW620-Zellen zeigte sich wie oben diskutiert bei HEK-IPSE-Konzentrationen von 1,1 µg/ml und 9,9 µg/ml ein positiver, konzentrationsabhängiger Zusammenhang von HEK-IPSE-Stimulation und p-c-Jun-Induktion (Abb. 12). Hier war daher nicht von einem niedrigeren Optimum bei Stimulation mit HEK-IPSE in Konzentrationen von einigen Nanogramm pro Milliliter auszugehen.

Zur näheren Untersuchung konzentrationsabhängiger Induzierbarkeit einzelner Proteine wären in weitergehenden Forschungsarbeiten Stimulationsexperimente in SW620-Zellen mit einer HEK-IPSE-Verdünnungsreihe von Interesse.

5.1.3 Verminderung der HEK-IPSE-abhängigen c-Jun-Aktivierung unter JNK-Inhibition in Zellkultur

Die durch HEK-IPSE-Stimulation in SW620-Zellkultur bewirkte Erhöhung von p-c-Jun und tendenziell auch c-Jun sollte näher untersucht werden. Es wurde überprüft, ob der Effekt sich durch Inhibition der JNK abschwächen lässt. Hierfür wurde der JNK-Inhibitor SP600125 genutzt.

SP600125 ist ein etablierter Inhibitor, der selektiv die JNK-abhängige Phosphorylierung von c-Jun hemmt [12]. Aufgrund der bekannten protoonkogenen Wirkung der *Downstream*-Faktoren der JNK wird eine Inhibition der JNK als mögliche Therapie für einige Krebserkrankungen diskutiert [155]. Experimentell wird SP600125 als zuverlässiger Inhibitor der JNK genutzt, eine klinische Anwendung dieses Inhibitors ist

aber für die Anwendung am Patienten aktuell nicht zugelassen [155]. Einige neuere JNK-Inhibitoren mit höherer Selektivität befinden sich momentan in Entwicklung [155].

Ergänzend zu den Ergebnissen der vorliegenden Dissertationsschrift wurde in unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass eine durch SEA vermittelte Erhöhung und Aktivierung von c-Jun in SW620-Zellen durch den JNK-Inhibitor SP600125 abgeschwächt wird [150]. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit für die Aktivierung von c-Jun durch Stimulation mit HEK-IPSE überprüft. Die Auswertung ergab, dass auch die durch HEK-IPSE-Stimulation bewirkte Induktion p-c-Jun durch Koinkubation mit dem JNK-Inhibitor tendenziell niedriger war (Abb. 13). Somit weisen die Ergebnisse des Experiments tendenziell darauf hin, dass die JNK an der Induktion von p-c-Jun durch HEK-IPSE-Stimulation beteiligt ist.

Parallelen zu diesem experimentellen Ergebnis lassen sich in der Literatur in Forschungsarbeiten zur sicher karzinogenen Infektionserkrankung der Typ-B-Gastritis mit dem Bakterium *H. pylori* finden [96]. Eine Veröffentlichung zu der Wirkung dieses Erregers ergab, dass die gemeinsame Kultur einer Magenkrebszelllinie mit *H. pylori* zu einer Transaktivierung der JNK führt [101]. In einer weiteren Veröffentlichung wurde an gemeinsam mit *H. pylori* kultivierten Zellen gezeigt, dass die AP-1-/c-Jun-Aktivität durch die gemeinsame Kultur mit dem *H. pylori* zunimmt und durch den auch in diesen Experimenten verwendeten JNK-Inhibitor SP600125 abgeschwächt wird [76]. In Bezug auf den JNK- und c-Jun-Signalweg hat eine gemeinsame Kultur von *H. pylori* mit Magenkrebszellen also einen Effekt, der Ähnlichkeiten mit der in der vorliegenden Arbeit beobachteten Wirkung von HEK-IPSE hat.

5.1.4 Veränderung der Stimulationsergebnisse unter Wnt-Inhibition

Die Stimationsversuche mit Antigenen der *S. mansoni*-Ova wurden mit einer Inhibition des kanonischen Wnt-Signalwegs kombiniert. Neben der Stimulation mit SEA und HEK-IPSE wurden die Zellen mit dem Inhibitor XAV939 inkubiert.

XAV939 ist ein Inhibitor des Enzyms Tankyrase [141]. Dieses Enzym katalysiert die PARylierung von Axin, welches dadurch für den Abbau markiert ist [95]. Wegen dieser Induktion des Abbaus von Axin wird die Aktivität des β -Catenin *destruction complex* vermindert. Auf diesem Weg trägt die Aktivität der Tankyrase zu einer höheren Aktivität des kanonischen Wnt-Signalwegs bei [77]. Die Inhibition der Tankyrase durch XAV939

ist selektiv, andere Poly-ADP-Ribosyltransferasen wie das in dieser Arbeit ebenfalls untersuchte PARP-1 werden durch XAV939 in sehr viel geringerem Ausmaß gehemmt [66].

Neben der Gruppe der Tankyraseinhibitoren, zu denen XAV939 zählt, gibt es noch eine Vielzahl weiterer Inhibitoren der Wnt-Signalwege. Aufgrund der Breite der verfügbaren Substanzen soll hier nur eine Auswahl diskutiert werden. Zu den kommerziell verfügbaren Inhibitoren zählen Moleküle, die neben dem kanonischen Wnt-Signalweg auch die nichtkanonischen Wnt-Signalwege inhibieren. Dazu gehören Moleküle, die die Wirkung des FZD-Rezeptors beziehungsweise der Liganden des Rezeptors inhibieren [73]. Weiterhin gibt es Inhibitoren des Enzyms Porcupine, welches eine Rolle bei der Modifikation von Proteinen des Wnt-Signalwegs im Endoplasmatischen Retikulum (ER) spielt und ebenfalls nicht ausschließlich den kanonischen Wnt-Signalweg hemmt [73]. Da der Fokus auf den kanonischen Wnt-Signalweg gelegt wurde, wurden diese Inhibitoren nicht verwendet. Zu den Molekülen, die selektiv den kanonischen Signalweg inhibieren, zählt neben den Tankyraseinhibitoren auch das Protein Dickkopf-1. Seine Wirkung erzielt Dickkopf-1 vornehmlich, indem es extrazellulär an Anteile der Wnt-Rezeptoren bindet [39]. Außerdem gibt es β -Catenin-Inhibitoren, die auf verschiedene Weisen die Wirkung von β -Catenin hemmen und somit auch den kanonischen Wnt-Signalweg unterbinden [73]. Die Selektivität für den kanonischen Signalweg hätte diese Inhibitoren zu möglichen Alternativkandidaten zu XAV939 gemacht. In künftigen Forschungsarbeiten könnten die verschiedenen Inhibitoren vergleichend untersucht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden kombinierte Stimulations- und Inhibitionsexperimente an SW620-Zellen durchgeführt. Die Stimulation erfolgte wie oben beschrieben mit den Antigenen der *S. mansoni*-Ova SEA und HEK-IPSE. Die Inhibition erfolgte mit XAV939. Dieses Experiment ergab, dass das zum Abbau markierte p- β -Catenin in den mit XAV939 inhibierten und mit PBS-Puffer inkubierten Zellen tendenziell erhöht war gegenüber den ebenfalls mit PBS-Puffer inkubierten aber nicht inhibierten Zellen (Abb. 11a). Diese tendenzielle Erhöhung ist ein Indiz dafür, dass die experimentelle Inhibition des kanonischen Wnt-Signalwegs gelungen ist [18]. Die weiteren bestimmten Zufallswahrscheinlichkeiten waren sowohl für p- β -Catenin als auch für Cyclin D1 zu hoch, um Aussagen über Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen zuzulassen. Eine

mögliche Erklärung dieser hohen Zufallswahrscheinlichkeiten ist, dass kein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen besteht und die beobachtete Verteilung der ausgewerteten Zielproteine zufällig entstanden ist. Im vorliegenden Experiment wurde eine von drei identischen Versuchsreihen aus der Auswertung ausgeschlossen, da die verwendete Ladekontrolle auch in wiederholten *Western Blot*-Auswertungen stärkste Ungleichheiten zwischen den Versuchsgruppen gezeigt hat. Hieraus resultierte die geringe Anzahl an eingeschlossenen Wiederholungen von jeweils $n=2$. Dies könnte ebenfalls ein möglicher Grund für den ausgebliebenen statistischen Beleg von Unterschieden zwischen den Versuchsgruppen sein. Weiterhin ist die gewählte Methode zur Korrektur gegen multiples Testen – die Bonferroni-Korrektur – eine etablierte und weit verbreitete aber auch recht konservative statistische Methode [114]. Sie führt zwar in den meisten Fällen zu einer recht geringen Falsch-Positiv-Rate, weist jedoch auch eine vergleichsweise hohe Falsch-Negativ-Rate auf [114], wodurch Ergebnisse nivelliert werden können.

Betrachtet man nur die densitometrische Auswertung der *Western Blots* für p- β -Catenin, wurde das höchste Signal für p- β -Catenin in den PBS-inkubierten und mit XAV939 inhibierten Zellen bestimmt (Abb. 11a). Wenn in künftigen Forschungsarbeiten ein solcher Effekt statistisch unterstützt würde, wäre dies im Umkehrschluss ein Hinweis auf eine Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs in den IPSE- und SEA-stimulierten Zellen. In stimulierten Zellen wäre eine Suppression des p- β -Catenins hinweisgebend auf eine Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs.

Betrachtet man nur die densitometrische Auswertung der Auswertung für Cyclin D1, so war im vorliegenden, kombinierten Stimulations- und Inhibitionsexperiment Cyclin D1 in den Zellen genau gegenläufig zu p- β -Catenin reguliert. Die höchsten Konzentrationen wurden in den nichtinhibierten aber mit SEA oder HEK-IPSE stimulierten Zellen nachgewiesen (Abb. 11b). Sollten zukünftige Forschungsarbeiten die hier beschriebene Cyclin D1-Verteilung statistisch belegen, würde dies die Vermutung unterstützen, dass Antigene der *S. mansoni*-Ova in der Form von SEA und HEK-IPSE zu einer Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs mit nachfolgender Aktivierung von *Downstream*-Faktoren in den Wirtszellen führen.

In der rezenten Forschungsliteratur finden sich Arbeiten, in denen die Auswirkung von Infektionen beziehungsweise von Antigenen der Infektionserreger unter Inhibition mit dem Tankyraseinhibitor XAV939 untersucht wird. In Zellkultur mit einer Magenkrebszelllinie führt die Stimulation mit dem *H. pylori*-Antigen Tip α zu einer Induktion von Cyclin D1. Dieser Effekt wird durch Inkubation mit XAV939 abgemindert [59]. Die Zellkulturstimulation mit einem Antigen des gesichert karzinogen wirkenden *H. pylori* [96] führt somit in Kombination mit XAV939 zu einem Ergebnis, dass mit der in diesem Experiment beschriebenen Verteilung von Cyclin D1 zwischen den Versuchsgruppen vergleichbar ist.

5.1.5 Erhöhung von DNA-Schädigungsmarkern durch Antigene der *Schistosoma mansoni*-Ova in Zellkultur und im Kolon bisex-infizierter Hamster

Neben der Untersuchung protoonkogener Signalwege wurde in der vorliegenden Arbeit ein zweiter Fokus auf die Regulation von Markerproteinen der DNA-Schädigung gelegt. Hierfür wurden die stimulierten Zellen und die Hamsterkolonproben auf die Proteine PARP-1 und γ H2a.X untersucht. Das Protein PARP-1 ist an verschiedenen DNA-Reparaturmechanismen beteiligt und wird proportional zum DNA-Schaden aktiviert [14]. Das Protein γ H2a.X ist ein Histon, welches ebenfalls eine wichtige Rolle in der DNA-Reparatur spielt [128]. Es wird bei DNA-Schädigung – insbesondere bei Doppelstrangbrüchen – aktiviert und ist mit prämaligen Läsionen assoziiert [31, 119]. Wenn diese Proteine induziert werden, ist dies jeweils hinweisgebend für eine gesteigerte DNA-Schädigung. Eine erhöhte DNA-Schädigungsrate resultierend in vermehrten, zufälligen Mutationen ist ein Risikofaktor für die Entwicklung von Karzinomen im Allgemeinen und für CRC im Speziellen [61, 130].

Sowohl in den Stimulationsexperimenten in Zellkultur mit Antigenen der *S. mansoni*-Ova als auch in den bs-infizierten Hamsterkolonproben zeigte sich im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle eine Induktion von PARP-1 beziehungsweise tendenzielle Induktionen von PARP-1 und γ H2a.X (Abb. 14-17). Durch die Zusammenschau der Ergebnisse aus dem *in vivo*- und dem *in vitro*-Modell lässt sich der Schluss ziehen, dass die DNA-Reparaturmechanismen infolge eines Kontakts zu Antigenen der *S. mansoni*-Ova aktiviert werden. Somit ergibt sich auch ein indirekter Hinweis auf eine verstärkte Schädigung der DNA.

Im Zellkulturmodell zeigte sich eine PARP-1-Erhöhung durch die HEK-IPSE-Stimulation (Abb. 16) sowie eine tendenzielle PARP-1- und γ H2a.X-Erhöhung durch SEA-Stimulation (Abb. 16 und 17). Dies ist ein Hinweis darauf, dass IPSE als Anteil von SEA eine Rolle in der DNA-Schädigung spielt, dass aber neben IPSE noch weitere Anteile von SEA ebenfalls daran beteiligt sein könnten. Weitere Anteile von SEA, die an der Induktion von DNA-Schäden beteiligt sein könnten, werden im Folgenden diskutiert.

5.2 Methodendiskussion und Limitationen

5.2.1 Tierversuchsmodell bisex- und monosex-infizierter syrischer Goldhamster

Die Verwendung des Syrischen Goldhamsters als Modell bietet den Vorteil eines etablierten *in vivo* Modells für die Schistosomiasis mansoni [57, 71]. Durch die experimentelle Einteilung der Versuchstiere in bs- und ms-infizierte Infektionsgruppen kann insbesondere der Einfluss der *S. mansoni*-Ova und ihrer Antigene auf den Darm eines lebenden Wirtsorganismus gut untersucht werden [58]. Das Tiermodell inkludiert die pathophysiologischen Anpassungen des vollständigen, intakten Kolons. Zusätzlich zur direkten Interaktion der Enterozyten mit den Antigenen der *S. mansoni*-Ova bewirkt die Schistosomiasis im intakten Wirtsorganismus eine Reaktion des zellulären wie humoralen Immunsystems [126] und Veränderungen des Mikrobioms im Kolon [135]. Ein Mehrwert, der durch das Experiment mit einem lebenden Wirtsorganismus im Vergleich zu Zellkulturexperimenten entsteht, ist die bessere Modellierung der Schistosomiasis mansoni des Menschen. Andererseits ist bei jedem Tierversuch und so auch in diesem Fall die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen limitiert.

Gegenüber Hamstern werden andere Versuchstiere wie Ratten oder Mäuse bedeutend häufiger zu wissenschaftlichen Zwecken genutzt. In der EU und Norwegen machten die syrischen Goldhamster im Jahr 2020 etwa 0,2% aller wissenschaftlich genutzten Versuchstiere aus [46]. Für Hamsterantigene werden daher insgesamt weniger spezifische Antikörper entwickelt. Ein mögliches Problem wären daher unspezifische Bindungen. In der *Western Blot*-Auswertung der Hamsterkolonproben auf p-GSK-3 β zeigten sich mehrere, übereinanderliegende Banden (Abb. 7). Eine mögliche Erklärung hierfür wären wie oben diskutiert unspezifische Bindungen.

5.2.2 Stimmulations- und Inhibitionsversuche in Zellkultur

Die für die Experimente in Zellkultur verwendeten SW620-Zellen stammen aus einer Lymphknotenmetastase eines CRC eines kaukasischen Mannes [28]. Neben den SW620-Zellen stehen zahlreiche weitere Zelllinien des kolorektalen Karzinoms zur Verfügung. Diese entstammen teilweise Metastasen und teilweise einem Primarius und unterscheiden sich in ihren (epi-)genetischen Ausprägungen, der Wachstumsrate und der Neigung zur Apoptose [2]. Die SW620-Zellen bieten ein etabliertes Zellkulturmodell des menschlichen CRC [23]. In der vorliegenden Arbeit wurden die SW620-Zellen genutzt, um eine Kontinuität zu den zuvor durchgeführten Stimmulationsexperimenten mit SEA unserer Arbeitsgruppe zu schaffen. In unserer Arbeitsgruppe war die SW620-Zelllinie als Zelllinie etabliert worden, nachdem sie mit verschiedenen weiteren kolorektalen Zelllinien unter Stimulation mit SEA vergleichend untersucht worden war.

Der Vorteil des Zellkulturmodells liegt in der sehr genauen Kontrollierbarkeit der einflussnehmenden Variablen, die die Versuchs- und Kontrollgruppen voneinander unterschieden. Andere Faktoren wie die Wachstumsdauer, Anzahl und Dichte der Zellen sowie die Umweltbedingungen waren für alle Gruppen gleich. In den hier beschriebenen Experimenten lag der einzige Unterschied zwischen den Gruppen in der Stimulation mit Antigenen der *S. mansoni*-Ova oder mit PBS-Puffer. In den kombinierten Stimmulations- und Inhibitionsexperimenten lag ein weiterer Unterschied in der zusätzlichen Inkubation mit einem der beiden verwendeten Inhibitoren oder DMSO. Die genutzten Inhibitoren wurden im Rahmen der Ergebnisdiskussion eingehend besprochen. Weil dies die einzigen Unterschiede der einwirkenden Faktoren waren, lassen sich die beobachteten Abweichungen zwischen den Gruppen in der anschließenden *Western Blot*-Auswertung auch unmittelbar auf diese Unterschiede zurückführen.

Die Anwendbarkeit der in diesem Modell gewonnenen Erkenntnisse auf den Gesamtorganismus des Menschen wird limitiert durch mehrere Umstände. Erstens spiegelt eine Zellkultur nicht die strukturelle Komplexität des enteralen Schleimhautgewebes wider. Die Verwendung von Primärzellen oder komplexeren Modellen wie beispielsweise *Organ on a chip*-Modellen könnten in zukünftigen Forschungsvorhaben wertvolle Einblicke geben. Zweitens ist in einer Zellkultur die zelluläre und humorale Immunreaktion des Körpers auf den Parasiten nicht gegeben. Dieser Umstand ist einerseits eine Limitation, bietet andererseits den Vorteil, dass die

kultivierten Zellen unmittelbar und ohne Beeinflussung durch Immunzellen auf die Antigene reagieren. Drittens kann die Verwendung der Antigene SEA und HEK-IPSE die natürliche Infektion nur nachahmen.

5.2.2.1 SEA und HEK-IPSE

SEA ist ein Gemisch löslicher *S. mansoni*-Ova-Antigene, bei denen es sich vornehmlich um die Proteinfraction handelt. Ein großer Teil der enthaltenen Proteine wird aus den Ova erst bei Untergang des Parasiteneis freigesetzt [98]. Von Ova, die den Lebenszyklus erfolgreich vollenden und ausgeschieden werden, werden große Teile von SEA also nicht freigesetzt. Neben diesen Anteilen enthält SEA auch Proteine, die von lebendigen Schistosomen-Ova sekretiert werden [98, 126].

IPSE macht über 80% der exkretorischen Proteine aus. Abgesehen von IPSE gibt es auch weitere exkretorische Proteine der Schistosomen-Ova. Hierzu zählt insbesondere Omega-1 [97], aber auch einige weitere Proteine wie Kappa-5, das *S. mansoni chemokine binding glycoprotein* (SmCKBP) und das Homolog des *High mobility group box 1*-Proteins (SmHMGB1). Für die genannten Proteine sind jeweils einige Auswirkungen auf den Wirtsorganismus und dessen Immunreaktion bekannt. Namensgebend für IPSE ist die Wirkung auf basophile Granulozyten mit Induktion des Interleukin 4 [126]. Omega-1 hingegen interagiert insbesondere mit dendritischen Zellen und moderiert den Wechsel der T_H1 -betonten zur T_H2 -betonten Immunreaktion [136], der im Krankheitsverlauf der akuten zur chronischen Schistosomiasis mansoni eintritt [24]. Für Kappa-5 wird ein Zusammenhang zur Fibrosierung der Leber vermutet [1]. SmCKBP bindet Chemokine und schwächt die Inflammation ab, während SmHMGB1 in der Lage ist, Inflammation zu induzieren [1]. Durch die Heterogenität der Auswirkungen der Anteile von SEA auf den Wirtsorganismus ergibt sich, dass die Wirkung jedes einzelnen Teilproteins von SEA nicht identisch mit der Wirkung von SEA sein kann.

In den Zellkulturexperimenten der vorliegenden Arbeit ergaben sich teilweise Unterschiede zwischen den mit SEA und den mit HEK-IPSE stimulierten Zellen. Einzelne Proteinauswertungen zeigten in den mit SEA stimulierten Zellen Unterschiede zur Kontrolle, die sich in den mit HEK-IPSE stimulierten Zellen nicht oder nur schwächer zeigten. Eine mögliche Erklärung für diese Unterschiede wäre, dass für diese Effekte die anderen in SEA enthaltenen Proteine verantwortlich sind. Ein weiterer Aspekt ist, dass

das verwendete HEK-IPSE rekombinant in menschlichen HEK-Zellen hergestellt wurde, weswegen Unterschiede zum natürlichen IPSE – zum Beispiel in der Glykosylierung – zu erwarten sind [126].

In der Summe haben die genutzten experimentellen Modelle der Schistosomiasis mansonii, das Hamstermodell wie auch das Zellkulturmodell, einige Schwächen und Stärken, die sich gegenseitig teilweise ausbalancieren. Das Hamstermodell modelliert die echte Erkrankung im lebenden Organismus, während sich in Zellkultur ein unmittelbarer, kontrollierter Zusammenhang zwischen den Antigenen als Ursache und den beobachteten Proteinexpressionen als Wirkung beschreiben lässt.

5.2.3 Proteinbiochemische Auswertung

Der *Phosphokinase Proteome Profiler™ Array* wurde als Auswertungsmethode zu Beginn der Forschungsarbeit durchgeführt. Der *Array* bot aufgrund der Vielzahl der ausgewerteten Kinasen und assoziierten Proteine einen Überblick über den Zustand der Aktivierung einiger Signalwege. Dies war Durchführung der gezielten und aufwendigeren *Western Blot*-Analysen hilfreich. Aus diesem relativ breitgefächerten Einstieg in die Analyse der Auswirkung von Antigenen der Schistosomeneier auf die Zellen ließen sich Ansatzpunkte für die fokussierte Analyse finden.

Die im Anschluss durchgeführten proteinbiochemischen Methoden des *Western Blots* und der Immunhistochemie sind lange etablierte, breit verfügbare Standardmethoden. Die *Western Blot*-Banden ließen sich mithilfe der *Software* ImageJ® semiquantitativ auswerten und einer Statistik zuführen. Quantitativ auswertbare Methoden könnten in zukünftigen Forschungsarbeiten vertiefende, wertvolle Informationen liefern.

Eine Limitation der Immunhistochemie ist, dass eine Verblindung aufgrund der eindeutigen Sichtbarkeit der *S. mansoni*-Ova in der Versuchsgruppe der bs-infizierten Hamster nicht möglich war (Abb. 5).

Durch die Wahl der oben besprochenen DNA-Schädigungsmarker konnte indirekt auf stattfindende DNA-Schädigung geschlossen werden. Die verwendeten Methoden können einen solchen Effekt nicht direkt nachweisen. In künftigen Arbeiten könnten insbesondere in Hinblick auf mögliche, die Karzinogenese befördernde Effekte der Schistosomiasis mansonii zusätzlich Methoden wie beispielsweise DNA-

Sequenzierungen Verwendung finden. So könnten Mutationen als Resultat einer DNA-Schädigung direkt nachgewiesen werden.

5.2.4 Statistische und testtheoretische Limitationen

Die vorliegende Dissertationsschrift folgte einem explorativen Ansatz. Signifikanzen und Kausalität werden daher in dieser Arbeit nicht benannt. Zum Zweck der Einordnung der berechneten Zufallswahrscheinlichkeiten wurde ein p-Niveau von 0,05 verwendet. An diesem wurden die im Ergebnisteil als Zahlenwerte angegebenen Zufallswahrscheinlichkeiten p gemessen.

Die Auswertung der *Western Blots* ergab semiquantitative Daten. Aus der Auswertung dieser Daten entsteht keine Verhältnisskala. Quantitative Aussagen wie beispielsweise „der Effekt entspricht einer Verdopplung der Proteinmenge“ sind nicht möglich, Aussagen über Erhöhung oder Erniedrigung im Vergleich zueinander allerdings schon.

Weiterhin ist die Verwendung der Bonferroni-Korrektur kontrovers zu diskutieren. Die Bonferroni-Korrektur senkt die Wahrscheinlichkeit für Fehler der ersten Art/ α -Fehler bei multiplem Testen. Hierbei handelt es sich um das fälschliche Akzeptieren der Alternativhypothese, wenn die Nullhypothese korrekt wäre. Die Bonferroni-Korrektur ist hierfür eine vielfach verwendete und weit verbreitete Methode [114]. Andererseits wird die Bonferroni-Korrektur als eine konservative Methode zur Korrektur angesehen, bei welcher der Fehler der zweiten Art/ β -Fehler wahrscheinlicher wird. Bei diesem wird eine Alternativhypothese zugunsten der Nullhypothese abgelehnt, obgleich die Alternativhypothese eigentlich die korrekte wäre [114]. Andere statistische Korrekturmethode gegen die α -Fehler-Kumulierung werden als weniger konservativ angesehen [114]. In der vorliegenden Dissertationsschrift wurde sich für die konservativere aber gut etablierte Bonferroni-Korrektur entschieden. Die Verwendung weniger konservativer Korrekturmethode des multiplen Testens hätte in der Auswertung der Ergebnisse zu mehr Zufallswahrscheinlichkeiten $p < 0,05$ führen können. Andererseits hätte sich auch die Wahrscheinlichkeit für einen α -Fehler erhöht.

5.3 Ausblick

Ein Zusammenhang intestinaler Schistosomiasis mansoni mit der kolorektalen Karzinogenese ist bislang weder ausgeschlossen noch belegt [20, 60]. Bei sich

verändernden lebensstilbezogenen Risikofaktoren in den Hochinzidenzgebieten der *S. mansoni* sowie bei Ausbreitung der Endemiegebiete in Länder mit gesellschaftlich bereits ausgeprägterem Risikoprofil für das CRC könnte sich eine Mitbeteiligung einer Schistosomiasis mansoni an der kolorektalen Karzinogenese demaskieren. Die vorliegende Dissertationsschrift kann diese Frage nicht abschließend beantworten. Sie schafft aber mit dem Nachweis der Aktivierung protoonkogener Signalwege und dem indirekten Hinweis auf DNA-Schäden Anknüpfungspunkte, an die weitere Forschungsarbeiten anschließen können. Sollte sich in künftigen Forschungsarbeiten die Annahme erhärten, dass die Schistosomiasis mansoni kein Risikofaktor für die Entstehung eines CRC ist, so bietet die vorliegende Forschungsarbeit doch Erkenntnisse über die zellbiologisch-pathophysiologische Wirkung, die *S. mansoni*-Ova und deren Antigene auf das Kolon haben. Neben einer Fortsetzung der experimentellen Forschung zur Pathophysiologie der Schistosomiasis mansoni unter Ausweitung der Methodik wären insbesondere epidemiologische Arbeiten wertvoll. Von großem Interesse wäre eine flächendeckende, koloskopische Befunderhebung in Hochprävalenzgebieten der Schistosomiasis zum Beispiel im Rahmen einer CRC-Präventionsstrategie. Solche koloskopische Befunde in Verknüpfung mit der Information, ob und über welchen Zeitraum eine Schistosomiasis mansoni besteht oder bestanden hat, könnten eine belastbare epidemiologische Datengrundlage bieten, um die Frage nach einem Zusammenhang zwischen der kolorektalen Karzinogenese und der Schistosomiasis mansoni zu beantworten. Um die sonstigen Risikofaktoren des CRC als etwaige konfundierende Variablen zu kontrollieren, könnte als Studiendesign beispielsweise eine in Bezug auf diese Risikofaktoren gematchte Fallkontrollstudie gewählt werden.

6 Zusammenfassung

6.1 Zusammenfassung in deutscher Sprache

Die Schistosomiasis mansoni ist eine parasitäre Erkrankung, die trotz der sehr hohen Prävalenz in einigen Weltregionen noch vergleichsweise wenig Beachtung in der Forschung gefunden hat (*neglected disease*). Die Schistosomiasis mansoni betrifft neben der Leber vor allem das Kolon und kann chronifizieren. Länger anhaltende Infektionen lösen im Kolon chronische, T_H2-gewichtete Entzündungsreaktionen aus, die der Inflammation bei einer Colitis ulcerosa ähnelt. Diese pathophysiologische Ähnlichkeit war Grundlage der Fragestellung der vorliegenden Arbeit. Es wurde untersucht, inwiefern eine Schistosomiasis mansoni an der kolorektalen Karzinogenese beteiligt sein kann. In den meisten Forschungsarbeiten zur Schistosomiasis werden die Schistosomeneier als zentrales und die Pathologie auslösendes Agens betrachtet. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der Fokus auf die Wirkung der Ova der *S. mansoni* beziehungsweise derer Antigene gelegt.

Hierzu wurden verschiedene methodische Ansätze kombiniert. Zum einen wurden syrische Goldhamster in zwei Infektionsgruppen eingeteilt, von denen eine Infektionsgruppe „normal“ mit *S. mansoni* infiziert wurde (bs-infiziert). Die zweite Versuchsgruppe wurde ebenfalls mit *S. mansoni* infiziert, allerdings nur mit einem Geschlecht der Würmer, weswegen keine geschlechtliche Vermehrung und keine Ova-Produktion möglich war (ms-infiziert). In diesem *in vivo*-Modell unterschieden sich die Versuchsgruppen somit durch das Vorhandensein oder das Fehlen der Parasiteneier. Untersucht wurde das Kolongewebe der Tiere. Neben diesem Tiermodell bildeten Zellkulturversuche an der SW620-Kolonzelllinie die zweite Basis der Forschungsarbeit. In diesem *in vitro*-Modell wurden die Zellen mit Antigenen der *S. mansoni*-Ova stimuliert. Zur Stimulation wurde zum einen SEA verwendet, wobei es sich um ein Gemisch aller in *S. mansoni*-Ova enthaltenen Proteine handelt. Zum anderen wurden die Zellen mit einer in HEK-Zellen rekombinant hergestellten Version des Proteins IPSE stimuliert. IPSE ist ein sekretorisches Protein der *S. mansoni*-Ova, für das bereits einige Auswirkungen auf das Immunsystem der Wirtstiere bekannt sind. Die

Zellkulturstimulationen mit den Antigenen der *S. mansoni*-Ova wurden in zwei eigenständigen Experimenten mit je einem Enzyminhibitor kombiniert: In einem Experiment wurde die Kinase JNK inhibiert. Diese spielt eine wichtige Rolle in der Aktivierung des Proteins c-Jun, welches Teil des AP1-Transkriptionsfaktors und ein Protoonkogen ist. In einem weiteren Zellkulturexperiment wurde der kanonische Wnt-Signalweg inhibiert.

Die aus der Zellkultur und dem Tierversuch gewonnenen Probenmaterialien wurden proteinbiochemisch durch *Western Blots*, mittels Immunhistochemie und *Phosphokinase Proteome Profiler™ Array* ausgewertet. Die untersuchten Proteine lassen sich drei Kategorien zuordnen: Erstens wurden Proteine untersucht, die für eine Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs sprechen. Zu nennen sind β -Catenin und die Kinase p-GSK-3 β . Zweitens wurden ausgewählte Protoonkogene untersucht, die zumindest anteilig als *Downstream*-Faktoren des kanonischen Wnt-Signalwegs gelten. Zu nennen sind Cyclin D1 und c-Jun mit seiner aktivierten Variante p-c-Jun. Drittens wurden Proteine untersucht, die für eine verstärkte DNA-Schädigung sprechen. Ausgewertet wurden die Proteine PARP-1 und γ -H2a.X.

Für den kanonischen Wnt-Signalweg waren im *in vivo*- wie auch im *in vitro*-Modell in den jeweiligen Versuchsgruppen im Gegensatz zur Kontrollgruppe Belege für eine Aktivierung zu finden. Im Kolon der bs-infizierten Hamster zeigte sich dies besonders durch die immunhistochemische Anfärbung von β -Catenin, dem Zielprotein des kanonischen Wnt-Signalwegs. In der Zellkultur zeigte sich die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs insbesondere durch eine Erhöhung der p-GSK-3 β durch SEA-Stimulation. Cyclin D1 konnte erhöht in den SEA-stimulierten Zellen nachgewiesen werden, c-Jun und dessen aktivierte Form p-c-Jun wurden durch HEK-IPSE-Stimulation in den Zellen erhöht. Die Cyclin D1-Erhöhung erschien durch Inhibition des kanonischen Wnt-Signalwegs vermindert. Die Erhöhung der c-Jun-Varianten wurde unter JNK-Inhibition abgeschwächt. Unter den Markern für DNA-Schädigung zeigte sich für PARP-1 eine Induktion sowohl im Kolon der bs-infizierten Hamster als auch in den Zellen nach HEK-IPSE-Stimulation.

Zusammenfassend wurde in dieser Dissertationsschrift gezeigt, dass Ova der *S. mansoni* und ihre Antigene in den Wirtszellen eine Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs

und der proliferationsfördernden Proteine Cyclin D1 und (p-)c-Jun sowie eine DNA-Schädigung induzieren können. Die Erhöhung des Cyclin D1 wurde anteilig durch den kanonischen Wnt-Signalweg vermittelt. Die Erhöhung von (p-)c-Jun durch IPSE-Kontakt benötigt die Aktivität der JNK. Diese Dissertationsschrift erbringt Hinweise darauf, dass Ova der *S. mansoni* einen Risikofaktor der Entstehung des CRC darstellen könnten.

6.2 Zusammenfassung in englischer Sprache

Schistosomiasis mansoni is a parasitic disease, that – being a neglected tropical disease – has received comparatively little research attention despite its very high prevalence in some regions of the world. In addition to the liver, Schistosomiasis mansoni primarily affects the colon and can become chronic. Prolonged infections trigger a chronic, T_H2-weighted inflammatory reaction in the colon, which is similar to the inflammation in ulcerative colitis. This pathophysiological similarity was the basis of the research question of the present study. The extent to which *S. mansoni* may be involved in colorectal carcinogenesis was investigated. In most research on schistosomiasis, schistosome eggs are considered as a central agent causing the pathology. Therefore, the present study focused on the effect of *S. mansoni* eggs and their antigens.

Various methodological approaches were combined for this purpose. Firstly, Syrian golden hamsters were divided into two differently infected groups, of which one group was "regularly" infected with *S. mansoni* (bs-infected). The second experimental group was also infected with *S. mansoni*, but only with one sex of the worms, which is why no sexual reproduction and no egg production was possible (ms-infected). In this *in vivo* model, the experimental groups thus differed in the presence or absence of parasite eggs. The colon tissue of the animals was examined. In addition to this animal model, cell culture experiments on the SW620 colon cell line formed the second basis of the research work. In this *in vitro* model, the cells were stimulated with antigens of the *S. mansoni* ova. On the one hand, SEA was used for stimulation, which is a mixture of all proteins contained in *S. mansoni*-Ova. On the other hand, the cells were stimulated with a recombinant version of the protein IPSE produced in HEK cells. IPSE is a secretory protein of *S. mansoni*-Ova for which some effects on the host immune system are already known. The cell culture stimulations with the antigens of the *S. mansoni*-Ova were combined with an enzyme inhibitor in two independent experiments: In one experiment,

the kinase JNK was inhibited, which plays an important role in the activation of the protein c-Jun, which is part of the AP1 transcription factor and a protooncogene. In a further cell culture experiment, the canonical Wnt signaling pathway was inhibited.

The sample materials obtained from the cell culture and the animal experiment were analyzed protein biochemically by Western blots, immunohistochemistry and Phosphokinase Proteome Profiler™ Array. The analyzed proteins can be assigned to three categories: Firstly, proteins indicative of activation of the canonical Wnt signaling pathway were examined. These include β -catenin and the kinase p-GSK-3 β . Secondly, selected proto-oncogenes were examined that are considered to be at least partially downstream factors of the canonical Wnt signaling pathway. These include Cyclin D1 and c-Jun with its activated variant p-c-Jun. Thirdly, proteins were evaluated that indicate increased DNA damage. The proteins PARP-1 and γ -H2a.X were evaluated.

In contrast to the control group, there was evidence of activation of the canonical Wnt signaling pathway in both the *in vivo* and *in vitro* models in the respective test groups. In the colon of the bs-infected hamsters, this was particularly evident by immunohistochemical staining for β -catenin, the target protein of the canonical Wnt signaling pathway. In cell culture, the activation of the canonical Wnt signaling pathway was shown in particular by an increase in p-GSK-3 β by SEA stimulation. Cyclin D1 was found to be increased in cells stimulated with SEA, c-Jun and its activated form p-c-Jun were increased in the cells by HEK-IPSE stimulation. The Cyclin D1 increase appeared reduced by inhibition of the canonical Wnt signaling pathway. The increase in c-Jun variants was attenuated under JNK inhibition. Among the markers for DNA damage, PARP-1 showed an induction both in the colon of bs-infected hamsters and in the cells after HEK IPSE stimulation.

Overall, this dissertation showed that *S. mansoni*-Ova and their antigens can lead to activation of the canonical Wnt signaling pathway and the proliferation-promoting proteins Cyclin D1 and (p-)c-Jun and can induce DNA damage in the host cells. The increase in Cyclin D1 was partly mediated by the canonical Wnt signaling pathway. The increase of (p-)c-Jun by IPSE contact requires the activity of JNK. This dissertation provides evidence that *S. mansoni*-Ova in fact may be a risk factor in the development of CRC.

7 Abkürzungs-, Abbildungs-, Tabellenverzeichnis

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
AP1	<i>Activator protein 1</i> Transkriptionsfaktor
APC	<i>Adenomatous-polyposis-coli</i> -Protein
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BER	Basen-Exzisionsreparatur (DNA-Reparaturmechanismus)
BSA	Bovines Serumalbumin
bs-infiziert	bisexuell mit <i>Schistosoma mansoni</i> infiziert
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
cm	Zentimeter
CRC	Kolorektales Karzinom
CU	Colitis Ulcerosa
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSB	DNA-Doppelstrangbrüche
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FAP	Familiär adenomatöse Polyposis
FZD	<i>Frizzled</i> ; bezieht sich auf Rezeptoren der <i>Frizzled</i> -Familie
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GSK-3 β	Glykogensynthase-Kinase 3 β
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HCl	Salzsäure
HDI	<i>Human Development Index</i>
HEK-IPSE	In <i>human embryonic kidney cells</i> rekombinant hergestelltes IPSE
HEK-Zellen	<i>Human embryonic kidney cells</i>
HR	Homologe Rekombination
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IgE	Immunglobulin E
IHC	Immunhistochemie
IL-4	Interleukin 4
IPSE	Interleukin-4-induzierendes Prinzip der <i>Schistosoma mansoni</i> Eier
JNK	c-Jun-N-terminale-Kinase

kDa	Kilodalton
mA	Milliampere
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
ms-infiziert	monosexuell mit <i>Schistosoma mansoni</i> infiziert
n	Stichprobengröße
NAD ⁺	Nicotinamidadeninukleotid (Coenzym)
NER	Nukleotid-Exzisions-Reparatur (DNA-Reparaturmechanismus)
NFκB	<i>Nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells</i>
NHEJ	<i>Non-homologous-end-joining</i> (DNA-Reparaturmechanismus)
NLS	Nukleäres Lokationssignal
p	Zufallswahrscheinlichkeit
PAR	Poly-ADP-Ribose
PARP-1	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase 1
PARylierung	Poly-ADP-ribosylierung
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i> /Phosphatgepufferte Salzlösung
p-GSK-3□	phosphorylierte Glykogensynthase-Kinase 3β
PVDF-Membran	Polyvinylidenfluoridmembran
<i>S. mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEA	Soluble Egg Antigen
SmCKBP	<i>S. mansoni chemokine binding glycoprotein</i>
SmHMGB1	Homolog des <i>High mobility group box 1</i> -Proteins
SP600125	JNK-Inhibitor
TBS-T-Puffer	<i>Tris Buffered Saline-Tween</i> -Puffer
TCF	Transkriptionsfaktor der T-Zellfaktorgruppe
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
T _H 1-Zellen	T-Helferzellen vom Typ 1
T _H 2-Zellen	T-Helferzellen vom Typ 2
V	Volt
W	Watt
WHO	Weltgesundheitsorganisation
Wnt	Wortschöpfung aus " <i>Wingless</i> " und "Int-1"
XAV939	Tankyrase-Inhibitor (Wnt-Inhibitor)
YLDs	<i>Years Lived with Disability</i>

µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µM	Mikromol
γH2a.X	Phosphorylierte Variante des Histons H2a

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Lebenszyklus der <i>Schistosoma mansoni</i>	3
Abbildung 2: Adenom-Karzinom-Sequenz.....	8
Abbildung 3: Der kanonische Wnt-Signalweg.....	10
Abbildung 4 - Wnt-Aktivierung in SEA-stimulierten SW620-Zellen	38
Abbildung 5: Erhöhtes β-Catenin in Zytoplasma und Nukleus der Enterozyten in unmittelbarer Umgebung der <i>S. mansoni</i> -Ova beziehungsweise der die Ova umgebenden Granulome.....	43
Abbildung 6: β-Catenin-Expression im Kolon bs-infizierter Hamster tendenziell erhöht	44
Abbildung 7: p-GSK-3β im Kolon bs- und ms-infizierter Hamster vergleichbar induziert	45
Abbildung 8: Tendenzuelle Induktion von β-Catenin in mit HEK-IPSE stimulierten SW620-Zellen	47
Abbildung 9: p-GSK-3β induziert in SEA-stimulierten SW620-Zellen.....	48
Abbildung 10: Cyclin D1 induziert in SEA-stimulierten SW620-Zellen	49
Abbildung 11: p-β-Catenin tendenziell erhöht in der PBS/XAV939-Versuchsgruppe, Cyclin D1-Expression vergleichbar zwischen den Versuchsgruppen.....	52
Abbildung 12: Induktion der aktivierten Proteinvariante p-c-Jun durch HEK-IPSE-Stimulation in SW620-Zellkultur.....	53
Abbildung 13: Induktion und Aktivierung c-Juns durch HEK-IPSE in SW620-Zellen modulierbar durch Inhibition der JNK.	55
Abbildung 14: PARP-1 im Kolon bs-infizierter Hamster erhöht.....	58
Abbildung 15: γH2a.X tendenziell erhöht im Kolon bs-infizierter Hamster	58
Abbildung 16: PARP-1 in SW620-Zellen durch HEK-IPSE-Stimulation induziert.....	60
Abbildung 17: γH2a.X tendenziell erhöht in SEA-stimulierten SW620-Zellen.....	61

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Material - Geräte	14
Tabelle 2: Material - <i>Software</i>	16
Tabelle 3: Material - Zelllinie	16

Tabelle 4: Material – Medien und Zusätze Zellkultur.....	17
Tabelle 5: Material - Zellkulturstimulanzen	17
Tabelle 6: Material - Proteininhibitoren.....	17
Tabelle 7: Material – Reagenzien und Chemikalien	18
Tabelle 8: Material – Puffer und Lösungen	19
Tabelle 9: Material - Primärantikörper <i>Western Blot</i>	22
Tabelle 10: Material - Sekundärantikörper <i>Western Blot</i>	24
Tabelle 11: Material - Primärantikörper Immunhistochemie.....	24
Tabelle 12: Material - Detektionssystem Immunhistochemie.....	25
Tabelle 13: Material - Verbrauchsmaterial	25
Tabelle 14: Übersicht Infektionsstatus der Hamster	27
Tabelle 15 – Konzentrationen der zur Stimulation in Zellkultur verwendeten Antigene der <i>S. mansoni</i> -Ova	29
Tabelle 16: Inhibitorverwendung in Zellkultur	30

8 Literatur- und Bildquellenverzeichnis

8.1 Literaturverzeichnis

1. Acharya S, Da'dara AA, Skelly PJ. Schistosome immunomodulators. *PLoS Pathogens* 2021; 17 (12).
2. Ahmed D, Eide PW, Eilertsen IA, Danielsen SA, Eknæs M, Hektoen M, Lind GE, Lothe RA. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis* 2013; 2 (9): e71.
3. Almeida GFG, Sarinho FW, Carvalho de Abreu E Lima P, Oliveira Filho JB, Moura MAdL, Ribeiro LNB, Rolim de Brito B, Lira MMdM, Maior MdRMS, Domingues ALC. DNA Repair Defect and RAS Mutation in Two Patients With *Schistosoma mansoni*-Associated Colorectal Cancer: Carcinogenesis Steps or Mere Coincidence? *Journal of global oncology* 2017; 3 (4): 423–6.
4. Arber N, Hibshoosh H, Moss SF, Sutter T, Zhang Y, Begg M, Wang S, Weinstein IB, Holt PR. Increased expression of cyclin D1 is an early event in multistage colorectal carcinogenesis. *Gastroenterology* 1996; 110 (3): 669–74.
5. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut* 2017; 66 (4): 683–91.
6. Asgharzadeh F, Moradi-Marjaneh R, Marjaneh MM. The Role of Heat Shock Protein 27 in Carcinogenesis and Treatment of Colorectal Cancer. *Current Pharmaceutical Design* 2022; 28 (32): 2677–85.
7. Asundi A, Beliavsky A, Liu XJ, Akaberi A, Schwarzer G, Bisoffi Z, Requena-Méndez A, Shrier I, Greenaway C. Prevalence of strongyloidiasis and schistosomiasis among migrants: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet. Global health* 2019; 7 (2): e236-e248.
8. Barsoum RS, Esmat G, El-Baz T. Human schistosomiasis: clinical perspective: review. *Journal of Advanced Research* 2013; 4 (5): 433–44.
9. Bassing CH, Suh H, Ferguson DO, Chua KF, Manis J, Eckersdorff M, Gleason M, Bronson R, Lee C, Alt FW. Histone H2AX: A Dosage-Dependent Suppressor of Oncogenic Translocations and Tumors. *Cell* 2003; 114 (3): 359–70.
10. Behrens A, Sibilia M, Wagner EF. Amino-terminal phosphorylation of c-Jun regulates stress-induced apoptosis and cellular proliferation. *Nature genetics* 1999; 21 (3): 326–9.
11. Benjamin RC, Gill DM. Poly(ADP-ribose) synthesis in vitro programmed by damaged DNA. A comparison of DNA molecules containing different types of strand breaks. *The Journal of biological chemistry* 1980; 255 (21): 10502–8.
12. Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW, O'Leary EC, Sakata ST, Xu W, Leisten JC, Motiwala A, Pierce S, Satoh Y, Bhagwat SS, Manning AM, Anderson DW. SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001; 98 (24): 13681–6.
13. Berger NA. Poly(ADP-Ribose) in the Cellular Response to DNA Damage. *Radiation Research* 1985; 101 (1): 4.
14. Berger SJ, Sudar DC, Berger NA. Metabolic consequences of DNA damage: DNA damage induces alterations in glucose metabolism by activation of poly(ADP-ribose) polymerase. *Biochemical and biophysical research communications* 1986; 134 (1): 227–32.
15. Berry A, Moné H, Iriart X, Mouahid G, Aboo O, Boissier J, Fillaux J, Cassaing S, Debuissou C, Valentin A, Mitta G, Théron A, Magnaval J-F. Schistosomiasis haematobium, Corsica, France. *Emerging infectious diseases* 2014; 20 (9): 1595–7.
16. Bohmann D, Bos TJ, Admon A, Nishimura T, Vogt PK, Tjian R. Human proto-oncogene c-jun encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1. *Science (New York, N.Y.)* 1987; 238 (4832): 1386–92.

17. Botelho MC, Machado JC, Brindley PJ, Da Correia Costa JM. Targeting molecular signaling pathways of *Schistosoma haematobium* infection in bladder cancer. *Virulence* 2011; 2 (4): 267–79.
18. Bullions LC, Levine AJ. The role of beta-catenin in cell adhesion, signal transduction, and cancer. *Current Opinion in Oncology* 1998; 10 (1).
19. Bülow V von, Gindner S, Baier A, Hehr L, Buss N, Russ L, Wrobel S, Wirth V, Tabatabai K, Quack T, Haerberlein S, Kadesch P, Gerbig S, Wiedemann KR, Spengler B, Mehl A, Morlock G, Schramm G, Pons-Kühnemann J, Falcone FH, Wilson RA, Bankov K, Wild P, Grevelding CG, Roeb E, Roderfeld M. Metabolic reprogramming of hepatocytes by *Schistosoma mansoni* eggs. *JHEP Reports* 2022; 5 (2).
20. Bülow V von, Lichtenberger J, Grevelding CG, Falcone FH, Roeb E, Roderfeld M. Does *Schistosoma Mansoni* Facilitate Carcinogenesis? *Cells* 2021; 10 (8).
21. Bülow V von, Schneider M, Dreizler D, Russ L, Baier A, Buss N, Lichtenberger J, Härle L, Müller H, Tschuschner A, Schramm G, Pons-Kühnemann J, Grevelding CG, Roeb E, Roderfeld M. *Schistosoma mansoni*-Induced Oxidative Stress Triggers Hepatocellular Proliferation. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology* 2024; 17 (1): 107–17.
22. Burke ML, Jones MK, Gobert GN, Li YS, Ellis MK, McManus DP. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. *Parasite immunology* 2009; 31 (4): 163–76.
23. Calabrese CR, Almassy R, Barton S, Batey MA, Calvert AH, Canan-Koch S, Durkacz BW, Hostomsky Z, Kumpf RA, Kyle S, Li J, Maegley K, Newell DR, Notarianni E, Stratford IJ, Skalitzky D, Thomas HD, Wang L-Z, Webber SE, Williams KJ, Curtin NJ. Anticancer chemosensitization and radiosensitization by the novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor AG14361. *Journal of the National Cancer Institute* 2004; 96 (1): 56–67.
24. Caldas IR, Campi-Azevedo AC, Oliveira LFA, Silveira AMS, Oliveira RC, Gazzinelli G. Human schistosomiasis mansoni: immune responses during acute and chronic phases of the infection. *Acta tropica* 2008; 108 (2-3): 109–17.
25. Celeste A, Petersen S, Romanienko PJ, Fernandez-Capetillo O, Chen HT, Sedelnikova OA, Reina-San-Martin B, Coppola V, Meffre E, Difilippantonio MJ, Redon C, Pilch DR, Orlau A, Eckhaus M, Camerini-Otero RD, Tessarollo L, Livak F, Manova K, Bonner WM, Nussenzweig MC, Nussenzweig A. Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science (New York, N.Y.)* 2002; 296 (5569): 922–7.
26. Chapman JD, Gagné J-P, Poirier GG, Goodlett DR. Mapping PARP-1 auto-ADP-ribosylation sites by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of proteome research* 2013; 12 (4): 1868–80.
27. Citarda F, Tomaselli G, Capocaccia R, Barcherini S, Crespi M. Efficacy in standard clinical practice of colonoscopic polypectomy in reducing colorectal cancer incidence. *Gut* 2001; 48 (6): 812–5.
28. CLS Cell Lines Service GmbH. CLS Product Information: SW620. [Zuletzt geprüft: 31.8.2023], Online: <https://cls.shop/de/SW-620/300466>.
29. Colley DG, Bustinduy AL, Secor WE, King CH. Human schistosomiasis. *Lancet (London, England)* 2014; 383 (9936): 2253–64.
30. Cook JA, Jordan P. Excretion of *Schistosoma mansoni* ova in the urine. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1970; 64 (5): 793–4.
31. Corujo D, Buschbeck M. Post-Translational Modifications of H2A Histone Variants and Their Role in Cancer. *Cancers* 2018; 10 (3).
32. Crohn BB, Rosenberg B. The sigmoidoscopic picture of chronic ulcerative colitis (non-specific). *Am J Med Sci* 1925 (170 (2)): 220–7.
33. Dai W, Xu Y, Mo S, Li Q, Yu J, Wang R, Ma Y, Ni Y, Xiang W, Han L, Zhang L, Cai S, Qin J, Chen W-L, Jia W, Cai G. GLUT3 induced by AMPK/CREB1 axis is key for withstanding energy stress and augments the efficacy of current colorectal cancer therapies. *Signal transduction and targeted therapy* 2020; 5 (1): 177.

34. Darre T, Djiwa T, Dare S, Alassani F, Napo-Koura G. Difficult Causality Relationship between Colorectal Cancer and Schistosomiasis. *Pathology oncology research POR* 2020; 26 (1): 597–8.
35. Deshpande A, Sicinski P, Hinds PW. Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. *Oncogene* 2005; 24 (17): 2909–15.
36. Desmarais Y, Ménard L, Lagueux J, Poirier GG. Enzymological properties of poly(ADP-ribose)polymerase: characterization of automodification sites and NADase activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1991; 1078 (2): 179–86.
37. Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF (Leitlinienprogramm Onkologie). S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 2.1, 2019: AWMF Registrierungsnummer: 021/007OL.
38. Dörsam B, Seiwert N, Foersch S, Stroh S, Nagel G, Begaliew D, Diehl E, Kraus A, McKeague M, Minneker V, Roukos V, Reißig S, Waisman A, Moehler M, Stier A, Mangerich A, Dantzer F, Kaina B, Fahrner J. PARP-1 protects against colorectal tumor induction, but promotes inflammation-driven colorectal tumor progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2018; 115 (17): E4061-E4070.
39. Doucet D, Brubaker C, Turner D, Gregory CA. Factors affecting the role of canonical Wnt inhibitor Dickkopf-1 in cancer progression. *Frontiers in Oncology* 2023; 13.
40. Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* 2001; 48 (4): 526–35.
41. Eferl R, Ricci R, Kenner L, Zenz R, David J-P, Rath M, Wagner EF. Liver Tumor Development. *Cell* 2003; 112 (2): 181–92.
42. Eferl R, Wagner EF. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nature reviews. Cancer* 2003; 3 (11): 859–68.
43. El-Ansary A, Al-Daihan S. Important aspects of Biomphalaria snail-schistosome interactions as targets for antischistosome drug. *Medical science monitor international medical journal of experimental and clinical research* 2006; 12 (12): RA282-292.
44. Elbaz T, Esmat G. Hepatic and Intestinal Schistosomiasis: Review. *Journal of Advanced Research* 2013; 4 (5): 445–52.
45. Erdmann F, Spix C, Katalinic A, Christ M, Folkerts J, Hansmann J, Kranzhöfer K, Kunz B, Manegold K, Penzkofer A, Tremel K, Vollmer G, Weg-Remers S, Barnes B, Buttman-Schweiger N, Dahm S, Fiebig J, Franke M, Gurung-Schönfeld I, Haberland J, Imhoff M, Kraywinkel K, Starker A, Berenberg-Gossler P von, Wienecke A. Krebs in Deutschland für 2017/2018: Robert Koch-Institut, 2021.
46. European Commission. Commission Staff Working Document SWD(2020)15 final: Summary Report on the statistics on the use of animals for scientific purposes in the Member States of the European Union and Norway in 2020. PART C: Member State Data 2020 and Member State Comparative Tables for 2020. [Zuletzt geprüft: 29.8.2023], Online: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?qid=1581689520921&uri=CELEX:52020SC0015>.
47. Faux MC, Coates JL, Kershaw NJ, Layton MJ, Burgess AW. Independent interactions of phosphorylated β -catenin with E-cadherin at cell-cell contacts and APC at cell protrusions. *PLoS one* 2010; 5 (11): e14127.
48. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61 (5): 759–67.
49. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F. Global Cancer Observatory: Cancer Today. [Zuletzt geprüft: 30.8.2023], Online: https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/10_8_9-Colorectum-fact-sheet.pdf.
50. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Laversanne M, Colombet M, Mery L, Piñeros M., Znaor A., Soerjomataram I., Bray F. Global Cancer Observatory: Cancer Today. [15.2.2024].
51. Ferlay J, Laversanne M, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F. Global Cancer Observatory: Cancer tomorrow. [Zuletzt geprüft: 30.8.2023], Online: <https://gco.iarc.fr/tomorrow>.

52. Foulkes WD. A tale of four syndromes: familial adenomatous polyposis, Gardner syndrome, attenuated APC and Turcot syndrome. *QJM monthly journal of the Association of Physicians* 1995; 88 (12): 853–63.
53. Gelfand M, Ross W. I. The distribution of schistosome ova in the alimentary tract in subjects of bilharziasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1953; 47 (3): 215–7.
54. Goñi-Oliver P, Lucas JJ, Avila J, Hernández F. N-terminal cleavage of GSK-3 by calpain: a new form of GSK-3 regulation. *The Journal of biological chemistry* 2007; 282 (31): 22406–13.
55. Gradwohl G, Ménissier de Murcia JM, Molinete M, Simonin F, Koken M, Hoeijmakers JH, Murcia G de. The second zinc-finger domain of poly(ADP-ribose) polymerase determines specificity for single-stranded breaks in DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1990; 87 (8): 2990–4.
56. Gregorieff A, Clevers H. Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes & development* 2005; 19 (8): 877–90.
57. Grevelding CG. The female-specific W1 sequence of the Puerto Rican strain of *Schistosoma mansoni* occurs in both genders of a Liberian strain. *Molecular and biochemical parasitology* 1995; 71 (2): 269–72.
58. Grevelding CG. Genomic instability in *Schistosoma mansoni*. *Molecular and biochemical parasitology* 1999; 101 (1-2): 207–16.
59. Guo K, Duan J, Lu J, Xiao L, Han L, Zeng S, Tang X, Li W, Huang L, Zhang Y. Tumor necrosis factor- α -inducing protein of *Helicobacter pylori* promotes epithelial-mesenchymal transition and cancer stem-like cells properties via activation of Wnt/ β -catenin signaling pathway in gastric cancer cells. *Pathogens and disease* 2022; 80 (1).
60. H Salim OE, Hamid HKS, Mekki SO, Suleiman SH, Ibrahim SZ. Colorectal carcinoma associated with schistosomiasis: a possible causal relationship. *World J Surg Onc* 2010; 8 (1): 68.
61. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144 (5): 646–74.
62. Hasselblatt P, Gresh L, Kudo H, Guinea-Viniegra J, Wagner EF. The role of the transcription factor AP-1 in colitis-associated and beta-catenin-dependent intestinal tumorigenesis in mice. *Oncogene* 2008; 27 (47): 6102–9.
63. He R, Du S, Lei T, Xie X, Wang Y. Glycogen synthase kinase 3 β in tumorigenesis and oncotherapy (Review). *Oncology reports* 2020; 44 (6): 2373–85.
64. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, Da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science (New York, N.Y.)* 1998; 281 (5382): 1509–12.
65. Hirai K, Ueda K, Hayaishi O. Aberration of poly(adenosine diphosphate-ribose) metabolism in human colon adenomatous polyps and cancers. *Cancer research* 1983; 43 (7): 3441–6.
66. Huang S-MA, Mishina YM, Liu S, Cheung A, Stegmeier F, Michaud GA, Charlat O, Wiellette E, Zhang Y, Wiessner S, Hild M, Shi X, Wilson CJ, Mickanin C, Myer V, Fazal A, Tomlinson R, Serluca F, Shao W, Cheng H, Shultz M, Rau C, Schirle M, Schlegl J, Ghidelli S, Fawell S, Lu C, Curtis D, Kirschner MW, Lengauer C, Finan PM, Tallarico JA, Bouwmeester T, Porter JA, Bauer A, Cong F. Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature* 2009; 461 (7264): 614–20.
67. Hughes T, O'Connor T, Techasen A, Namwat N, Loilome W, Andrews RH, Khuntikeo N, Yongvanit P, Sithithaworn P, Taylor-Robinson SD. Opisthorchiasis and cholangiocarcinoma in Southeast Asia: an unresolved problem. *International Journal of General Medicine* 2017; 10: 227–37.
68. Ilyas M, Tomlinson IP, Rowan A, Pignatelli M, Bodmer WF. Beta-catenin mutations in cell lines established from human colorectal cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997; 94 (19): 10330–4.

69. Johnson CM, Wei C, Ensor JE, Smolenski DJ, Amos CI, Levin B, Berry DA. Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. *Cancer causes & control CCC* 2013; 24 (6): 1207–22.
70. Juarez-Salinas H, Sims JL, Jacobson MK. Poly(ADP-ribose) levels in carcinogen-treated cells. *Nature* 1979; 282 (5740): 740–1.
71. Kapp K, Coustau C, Wippersteg V, Jourdane J, Kunz W, Grevelding CG. Transplantation of in vitro-generated *Schistosoma mansoni* mother sporocysts into *Biomphalaria glabrata*. *Parasitology research* 2003; 91 (6): 482–5.
72. Kastan MB, Bartek J. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 2004; 432 (7015): 316–23.
73. Katoh M. Canonical and non-canonical WNT signaling in cancer stem cells and their niches: Cellular heterogeneity, omics reprogramming, targeted therapy and tumor plasticity (Review). *International journal of oncology* 2017; 51 (5): 1357–69.
74. Kaur I, Schramm G, Everts B, Scholzen T, Kindle KB, Beetz C, Montiel-Duarte C, Blindow S, Jones AT, Haas H, Stolnik S, Heery DM, Falcone FH. Interleukin-4-inducing principle from *Schistosoma mansoni* eggs contains a functional C-terminal nuclear localization signal necessary for nuclear translocation in mammalian cells but not for its uptake. *Infection and immunity* 2011; 79 (4): 1779–88.
75. Khalek FJA, Gallicano GI, Mishra L. Colon Cancer Stem Cells. *Gastrointestinal Cancer Research GCR* 2010 (Suppl 1): S16-23.
76. Kim MH, Yoo HS, Chang HJ, Hong MH, Kim HD, Chung IJ, Shin BA, Cho MJ, Ahn BW, Jung YD. Urokinase plasminogen activator receptor is upregulated by *Helicobacter pylori* in human gastric cancer AGS cells via ERK, JNK, and AP-1. *Biochemical and biophysical research communications* 2005; 333 (3): 874–80.
77. Kim MK. Novel insight into the function of tankyrase. *Oncology letters* 2018; 16 (6): 6895–902.
78. Kinner A, Wu W, Staudt C, Iliakis G. γ -H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic acids research* 2008; 36 (17): 5678–94.
79. Knuhr K, Langhans K, Nyenhuis S, Viertmann K, Kildemoes AMO, Doenhoff MJ, Haas H, Schramm G. *Schistosoma mansoni* Egg-Released IPSE/alpha-1 Dampens Inflammatory Cytokine Responses via Basophil Interleukin (IL)-4 and IL-13. *Frontiers in Immunology* 2018; 9: 2293.
80. Kramps T, Peter O, Brunner E, Nellen D, Froesch B, Chatterjee S, Murone M, Züllig S, Basler K. Wnt/Wingless Signaling Requires BCL9/Legless-Mediated Recruitment of Pygopus to the Nuclear β -Catenin-TCF Complex. *Cell* 2002; 109 (1): 47–60.
81. Langelier M-F, Ruhl DD, Planck JL, Kraus WL, Pascal JM. The Zn3 domain of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) functions in both DNA-dependent poly(ADP-ribose) synthesis activity and chromatin compaction. *The Journal of biological chemistry* 2010; 285 (24): 18877–87.
82. Lee R, Holmes D. Barriers and recommendations for colorectal cancer screening in Africa. *Global Health Action*; 16 (1).
83. Lee Y-C, Yin TC, Chen Y-T, Chai C-Y, Wang JY, Liu M-C, Lin Y-C, Kan JY. High expression of phospho-H2AX predicts a poor prognosis in colorectal cancer. *Anticancer research* 2015; 35 (4): 2447–53.
84. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 1997; 386 (6625): 623–7.
85. Li VSW, Ng SS, Boersema PJ, Low TY, Karthaus WR, Gerlach JP, Mohammed S, Heck AJR, Maurice MM, Mahmoudi T, Clevers H. Wnt signaling through inhibition of β -catenin degradation in an intact Axin1 complex. *Cell* 2012; 149 (6): 1245–56.
86. Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg G-H, Tan Y, Zhang Z, Lin X, He X. Control of β -Catenin Phosphorylation/Degradation by a Dual-Kinase Mechanism. *Cell* 2002; 108 (6): 837–47.
87. Liu W, Zeng H-Z, Wang Q-M, Yi H, Mou Y, Wu C-C, Hu B, Tang C-W. Schistosomiasis combined with colorectal carcinoma diagnosed based on endoscopic findings and clinicopathological

- characteristics: a report on 32 cases. *Asian Pacific journal of cancer prevention APJCP* 2013; 14 (8): 4839–42.
88. Lucius R, Loos-Frank B, Lane RP (Hrsg.). *Biologie von Parasiten*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2018.
 89. Lucius R, Loos-Frank B, Lane RP. Parasitische Würmer (Helminthen) und Myxozoa. In: Lucius R, Loos-Frank B, Lane RP (Hrsg.). *Biologie von Parasiten*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2018, S. 249–412.
 90. Luijsterburg MS, Krijger I de, Wiegant WW, Shah RG, Smeenk G, Groot AJL de, Pines A, Vertegaal ACO, Jacobs JJJ, Shah GM, van Attikum H. PARP1 Links CHD2-Mediated Chromatin Expansion and H3.3 Deposition to DNA Repair by Non-homologous End-Joining. *Molecular cell* 2016; 61 (4): 547–62.
 91. Ma S, Liu S, Huang Q, Xie B, Lai B, Wang C, Song B, Li M. Site-specific phosphorylation protects glycogen synthase kinase-3 β from calpain-mediated truncation of its N and C termini. *The Journal of biological chemistry* 2012; 287 (27): 22521–32.
 92. Madbouly KM, Senagore AJ, Mukerjee A, Hussien AM, Shehata MA, Navine P, Delaney CP, Fazio VW. Colorectal cancer in a population with endemic *Schistosoma mansoni*: is this an at-risk population? *International journal of colorectal disease* 2007; 22 (2): 175–81.
 93. Maltseva EA, Rechkunova NI, Sukhanova MV, Lavrik OI. Poly(ADP-ribose) Polymerase 1 Modulates Interaction of the Nucleotide Excision Repair Factor XPC-RAD23B with DNA via Poly(ADP-ribosylation). *The Journal of biological chemistry* 2015; 290 (36): 21811–20.
 94. Mann B, Gelos M, Siedow A, Hanski ML, Gratchev A, Ilyas M, Bodmer WF, Moyer MP, Riecken EO, Buhr HJ, Hanski C. Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999; 96 (4): 1603–8.
 95. Mariotti L, Pollock K, Guettler S. Regulation of Wnt/ β -catenin signalling by tankyrase-dependent poly(ADP-ribosylation) and scaffolding. *British journal of pharmacology* 2017; 174 (24): 4611–36.
 96. Martel C de, Georges D, Bray F, Ferlay J, Clifford GM. Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. *The Lancet. Global health* 2020; 8 (2): e180–e190.
 97. Mathieson W, Wilson RA. A comparative proteomic study of the undeveloped and developed *Schistosoma mansoni* egg and its contents: the miracidium, hatch fluid and secretions. *International journal for parasitology* 2010; 40 (5): 617–28.
 98. Meevissen MHJ, Yazdanbakhsh M, Hokke CH. *Schistosoma mansoni* egg glycoproteins and C-type lectins of host immune cells: molecular partners that shape immune responses. *Experimental parasitology* 2012; 132 (1): 14–21.
 99. Mesquita NF, Silva RA, Brandão CL, Dinis-Ribeiro MJ, Fernandes NS, Lomba-Viana H, Dias LM. Schistosomal colonic polyposis. *Gastrointestinal Endoscopy* 2003; 58 (6): 910–1.
 100. Meyer NH, Mayerhofer H, Tripsianes K, Blindow S, Barths D, Mewes A, Weimar T, Köhli T, Bade S, Madl T, Frey A, Haas H, Mueller-Dieckmann J, Sattler M, Schramm G. A Crystallin Fold in the Interleukin-4-inducing Principle of *Schistosoma mansoni* Eggs (IPSE/ α -1) Mediates IgE Binding for Antigen-independent Basophil Activation*. *The Journal of biological chemistry* 2015; 290 (36): 22111–26.
 101. Mitsuno Y, Yoshida H, Maeda S, Ogura K, Hirata Y, Kawabe T, Shiratori Y, Omata M. *Helicobacter pylori* induced transactivation of SRE and AP-1 through the ERK signalling pathway in gastric cancer cells. *Gut* 2001; 49 (1): 18–22.
 102. Morgan E, Arnold M, Gini A, Lorenzoni V, Cabasag CJ, Laversanne M, Vignat J, Ferlay J, Murphy N, Bray F. Global burden of colorectal cancer in 2020 and 2040: incidence and mortality estimates from GLOBOCAN. *Gut* 2023; 72 (2): 338–44.
 103. Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science (New York, N.Y.)* 1997; 275 (5307): 1787–90.

104. Munemitsu S, Albert I, Souza B, Rubinfeld B, Polakis P. Regulation of intracellular beta-catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995; 92 (7): 3046–50.
105. Nation CS, Da'dara AA, Marchant JK, Skelly PJ. Schistosome migration in the definitive host. *PLoS neglected tropical diseases* 2020; 14 (4): e0007951.
106. Nebel OT, el-Masry NA, Castell DO, Farid Z, Fornes MF, Sparks HA. Schistosomal disease of the colon: a reversible form of polyposis. *Gastroenterology* 1974; 67 (5): 939–43.
107. Nosho K, Yamamoto H, Mikami M, Taniguchi H, Takahashi T, Adachi Y, Imamura A, Imai K, Shinomura Y. Overexpression of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) in the early stage of colorectal carcinogenesis. *European journal of cancer (Oxford, England 1990)* 2006; 42 (14): 2374–81.
108. Osawa E, Nakajima A, Fujisawa T, Kawamura YI, Toyama-Sorimachi N, Nakagama H, Dohi T. Predominant T helper type 2-inflammatory responses promote murine colon cancers. *International journal of cancer* 2006; 118 (9): 2232–6.
109. Palma FDE de, D'Argenio V, Pol J, Kroemer G, Maiuri MC, Salvatore F. The Molecular Hallmarks of the Serrated Pathway in Colorectal Cancer. *Cancers* 2019; 11 (7).
110. Pan W, Guo J, Li J, Su J, Zhang X, Liu J, Xu C, Hou Y. Presence of schistosome eggs in lymph node predict unfavorable prognosis in schistosomal colorectal cancer. *European journal of cancer prevention the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)* 2023.
111. Patel S, Alam A, Pant R, Chattopadhyay S. Wnt Signaling and Its Significance Within the Tumor Microenvironment: Novel Therapeutic Insights. *Frontiers in Immunology* 2019; 10: 2872.
112. Pazzaglia S, Pioli C. Multifaceted Role of PARP-1 in DNA Repair and Inflammation: Pathological and Therapeutic Implications in Cancer and Non-Cancer Diseases. *Cells* 2019; 9 (1).
113. Pearce EJ, MacDonald AS. The immunobiology of schistosomiasis. *Nature reviews. Immunology* 2002; 2 (7): 499–511.
114. Perneger TV. What's wrong with Bonferroni adjustments. *BMJ (Clinical research ed.)* 1998; 316 (7139): 1236–8.
115. Poirier GG, Murcia G de, Jongstra-Bilen J, Niedergang C, Mandel P. Poly(ADP-ribosyl)ation of polynucleosomes causes relaxation of chromatin structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1982; 79 (11): 3423–7.
116. Rao TP, Kühl M. An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more. *Circulation research* 2010; 106 (12): 1798–806.
117. Robu M, Shah RG, Petitelerc N, Brind'Amour J, Kandan-Kulangara F, Shah GM. Role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in the removal of UV-induced DNA lesions by nucleotide excision repair. *PNAS* 2013; 110 (5): 1658–63.
118. Roderfeld M, Padem S, Lichtenberger J, Quack T, Weiskirchen R, Longerich T, Schramm G, Churin Y, Irunbam K, Tschuschner A, Windhorst A, Grevelding CG, Roeb E. Schistosoma mansoni Egg-Secreted Antigens Activate Hepatocellular Carcinoma-Associated Transcription Factors c-Jun and STAT3 in Hamster and Human Hepatocytes. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 2018.
119. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *The Journal of biological chemistry* 1998; 273 (10): 5858–68.
120. Ross AG, Bartley PB, Sleigh AC, Olds GR, Li Y, Williams GM, McManus DP. Schistosomiasis. *New England Journal of Medicine* 2002; 346 (16): 1212–20.
121. Ross AG, Vickers D, Olds GR, Shah SM, McManus DP. Katayama syndrome. *The Lancet. Infectious diseases* 2007; 7 (3): 218–24.
122. Rotondo JC, Borghi A, Selvatici R, Mazzoni E, Bononi I, Corazza M, Kussini J, Montinari E, Gafà R, Tognon M, Martini F. Association of Retinoic Acid Receptor β Gene With Onset and Progression of

- Lichen Sclerosus-Associated Vulvar Squamous Cell Carcinoma. *JAMA dermatology* 2018; 154 (7): 819–23.
123. Rubinfeld B, Albert I, Porfiri E, Fiol C, Munemitsu S, Polakis P. Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science (New York, N.Y.)* 1996; 272 (5264): 1023–6.
 124. Schramm G, Falcone FH, Gronow A, Haisch K, Mamat U, Doenhoff MJ, Oliveira G, Galle J, Dahinden CA, Haas H. Molecular characterization of an interleukin-4-inducing factor from *Schistosoma mansoni* eggs. *The Journal of biological chemistry* 2003; 278 (20): 18384–92.
 125. Schramm G, Gronow A, Knobloch J, Wippersteg V, Grevelding CG, Galle J, Fuller H, Stanley RG, Chiodini PL, Haas H, Doenhoff MJ. IPSE/alpha-1: a major immunogenic component secreted from *Schistosoma mansoni* eggs. *Molecular and biochemical parasitology* 2006; 147 (1): 9–19.
 126. Schramm G, Mohrs K, Wodrich M, Doenhoff MJ, Pearce EJ, Haas H, Mohrs M. Cutting edge: IPSE/alpha-1, a glycoprotein from *Schistosoma mansoni* eggs, induces IgE-dependent, antigen-independent IL-4 production by murine basophils in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 2007; 178 (10): 6023–7.
 127. Schulte G, Bryja V. The Frizzled family of unconventional G-protein-coupled receptors. *Trends in pharmacological sciences* 2007; 28 (10): 518–25.
 128. Scully R, Xie A. Double strand break repair functions of histone H2AX. *Mutation research* 2013; 750 (1-2): 5–14.
 129. Shaulian E, Karin M. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* 2001; 20 (19): 2390–400.
 130. Shih IM, Zhou W, Goodman SN, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Evidence that genetic instability occurs at an early stage of colorectal tumorigenesis. *Cancer research* 2001; 61 (3): 818–22.
 131. Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, Ben-Ze'ev A. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999; 96 (10): 5522–7.
 132. Sims JL, Berger SJ, Berger NA. Poly(ADP-ribose) Polymerase inhibitors preserve nicotinamide adenine dinucleotide and adenosine 5'-triphosphate pools in DNA-damaged cells: mechanism of stimulation of unscheduled DNA synthesis. *Biochemistry* 1983; 22 (22): 5188–94.
 133. Song L, Li Y. The Role of Stem Cell DNA Methylation in Colorectal Carcinogenesis. *Stem cell reviews and reports* 2016; 12 (5): 573–83.
 134. Sripa B, Kaewkes S, Sithithaworn P, Mairiang E, Laha T, Smout M, Pairojkul C, Bhudhisawasdi V, Tesana S, Thinkamrop B, Bethony JM, Loukas A, Brindley PJ. Liver fluke induces cholangiocarcinoma. *PLoS medicine* 2007; 4 (7): e201.
 135. Stark KA, Rinaldi G, Cortés A, Costain A, MacDonald AS, Cantacessi C. The role of the host gut microbiome in the pathophysiology of schistosomiasis. *Parasite immunology* 2023; 45 (4): e12970.
 136. Steinfeld S, Andersen JF, Cannons JL, Feng CG, Joshi M, Dwyer D, Caspar P, Schwartzberg PL, Sher A, Jankovic D. The major component in schistosome eggs responsible for conditioning dendritic cells for Th2 polarization is a T2 ribonuclease (omega-1). *The Journal of experimental medicine* 2009; 206 (8): 1681–90.
 137. Steven A, Heiduk M, Recktenwald CV, Hiebl B, Wickenhauser C, Massa C, Seliger B. Colorectal Carcinogenesis: Connecting K-RAS-Induced Transformation and CREB Activity In Vitro and In Vivo. *Molecular cancer research MCR* 2015; 13 (8): 1248–62.
 138. Suzuki H, Yamamoto E, Yamano H-O, Nakase H, Sugai T. Integrated Analysis of the Endoscopic, Pathological and Molecular Characteristics of Colorectal Tumorigenesis. *Digestion* 2019; 99 (1): 33–8.
 139. Szabó C, Dawson VL. Role of poly(ADP-ribose) synthetase in inflammation and ischaemia-reperfusion. *Trends in pharmacological sciences* 1998; 19 (7): 287–98.
 140. Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 1999; 398 (6726): 422–6.

141. Tian X-H, Hou W-J, Fang Y, Fan J, Tong H, Bai S-L, Chen Q, Xu H, Li Y. XAV939, a tankyrase 1 inhibitor, promotes cell apoptosis in neuroblastoma cell lines by inhibiting Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Journal of experimental & clinical cancer research CR* 2013; 32 (1): 100.
142. Toda KS, Kikuchi L, Chagas AL, Tanigawa RY, Paranaguá-Vezozzo DC, Pfiffer T, Rocha MdS, Alves VAF, Carrilho FJ. Hepatocellular Carcinoma Related to Schistosoma mansoni Infection: Case Series and Literature Review. *Journal of clinical and translational hepatology* 2015; 3 (4): 260–4.
143. UNDP. Uncertain times, unsettled lives: Shaping our future in a transforming world. New York, NY: United Nations Development Programme, 2022.
144. Valvezan AJ, Zhang F, Diehl JA, Klein PS. Adenomatous polyposis coli (APC) regulates multiple signaling pathways by enhancing glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) activity. *The Journal of biological chemistry* 2012; 287 (6): 3823–32.
145. van de Wetering M, Cavallo R, Dooijes D, van Beest M, van Es J, Loureiro J, Ypma A, Hursh D, Jones T, Bejsovec A, Peifer M, Mortin M, Clevers H. Armadillo Coactivates Transcription Driven by the Product of the Drosophila Segment Polarity Gene dTCF. *Cell* 1997; 88 (6): 789–99.
146. Vos T, Flaxman AD, Naghavi M, Lozano R, Michaud C, Ezzati M, Shibuya K, Salomon JA, Abdalla S, Aboyans V, Abraham J, Ackerman I, Aggarwal R, Ahn SY, Ali MK, Alvarado M, Anderson HR, Anderson LM, Andrews KG, Atkinson C, Baddour LM, Bahalim AN, Barker-Collo S, Barrero LH, Bartels DH, Basáñez M-G, Baxter A, Bell ML, Benjamin EJ, Bennett D, Bernabé E, Bhalla K, Bhandari B, Bikbov B, Bin Abdulhak A, Birbeck G, Black JA, Blencowe H, Blore JD, Blyth F, Bolliger I, Bonaventure A, Boufous S, Bourne R, Boussinesq M, Braithwaite T, Brayne C, Bridgett L, Brooker S, Brooks P, Brugha TS, Bryan-Hancock C, Bucello C, Buchbinder R, Buckle G, Budke CM, Burch M, Burney P, Burstein R, Calabria B, Campbell B, Canter CE, Carabin H, Carapetis J, Carmona L, Cella C, Charlson F, Chen H, Cheng AT-A, Chou D, Chugh SS, Coffeng LE, Colan SD, Colquhoun S, Colson KE, Condon J, Connor MD, Cooper LT, Corriere M, Cortinovis M, Vaccaro KC de, Couser W, Cowie BC, Criqui MH, Cross M, Dabhadkar KC, Dahiya M, Dahodwala N, Damsere-Derry J, Danaei G, Davis A, Leo D de, Degenhardt L, Dellavalle R, Delossantos A, Denenberg J, Derrett S, Des Jarlais DC, Dharmaratne SD, Dherani M, Diaz-Torne C, Dolk H, Dorsey ER, Driscoll T, Duber H, Ebel B, Edmond K, Elbaz A, Ali SE, Erskine H, Erwin PJ, Espindola P, Ewoigbokhan SE, Farzadfar F, Feigin V, Felson DT, Ferrari A, Ferri CP, Fèvre EM, Finucane MM, Flaxman S, Flood L, Foreman K, Forouzanfar MH, Fowkes FGR, Franklin R, Fransen M, Freeman MK, Gabbe BJ, Gabriel SE, Gakidou E, Ganatra HA, Garcia B, Gaspari F, Gillum RF, Gmel G, Gosselin R, Grainger R, Groeger J, Guillemin F, Gunnell D, Gupta R, Haagsma J, Hagan H, Halasa YA, Hall W, Haring D, Haro JM, Harrison JE, Havmoeller R, Hay RJ, Higashi H, Hill C, Hoen B, Hoffman H, Hotez PJ, Hoy D, Huang JJ, Ibeanusi SE, Jacobsen KH, James SL, Jarvis D, Jasrasaria R, Jayaraman S, Johns N, Jonas JB, Karthikeyan G, Kassebaum N, Kawakami N, Keren A, Khoo J-P, King CH, Knowlton LM, Kobusingye O, Koranteng A, Krishnamurthi R, Laloo R, Laslett LL, Lathlean T, Leasher JL, Lee YY, Leigh J, Lim SS, Limb E, Lin JK, Lipnick M, Lipshultz SE, Liu W, Loane M, Ohno SL, Lyons R, Ma J, Mabweijano J, MacIntyre MF, Malekzadeh R, Mallinger L, Manivannan S, Marcenes W, March L, Margolis DJ, Marks GB, Marks R, Matsumori A, Matzopoulos R, Mayosi BM, McAnulty JH, McDermott MM, McGill N, McGrath J, Medina-Mora ME, Meltzer M, Mensah GA, Merriman TR, Meyer A-C, Miglioli V, Miller M, Miller TR, Mitchell PB, Mocumbi AO, Moffitt TE, Mokdad AA, Monasta L, Montico M, Moradi-Lakeh M, Moran A, Morawska L, Mori R, Murdoch ME, Mwaniki MK, Naidoo K, Nair MN, Naldi L, Narayan KMV, Nelson PK, Nelson RG, Nevitt MC, Newton CR, Nolte S, Norman P, Norman R, O'Donnell M, O'Hanlon S, Olives C, Omer SB, Ortblad K, Osborne R, Ozgediz D, Page A, Pahari B, Pandian JD, Rivero AP, Patten SB, Pearce N, Padilla RP, Perez-Ruiz F, Perico N, Pesudovs K, Phillips D, Phillips MR, Pierce K, Pion S, Polanczyk GV, Polinder S, Pope CA3, Popova S, Porrini E, Pourmalek F, Prince M, Pullan RL, Ramaiah KD, Ranganathan D, Razavi H, Regan M, Rehm JT, Rein DB, Remuzzi G, Richardson K, Rivara FP, Roberts T, Robinson C, León FR de, Ronfani L, Room R, Rosenfeld LC, Rushton L, Sacco RL, Saha S, Sampson U, Sanchez-Riera L, Sanman E, Schwebel DC, Scott JG, Segui-Gomez M, Shahraz S, Shepard DS, Shin H, Shivakoti R, Singh D, Singh GM, Singh JA, Singleton J, Sleet DA, Sliwa K, Smith E, Smith JL, Stapelberg NJC, Steer A, Steiner T, Stolk WA, Stovner LJ, Sudfeld C, Syed S, Tamburlini G, Tavakkoli M, Taylor HR, Taylor JA, Taylor WJ, Thomas B, Thomson WM, Thurston GD, Tleyjeh IM, Tonelli M, Towbin JA, Truelsen T, Tsilimbaris MK, Ubeda C, Undurraga EA, van der Werf, Marieke J, van Os J, Vavilala MS, Venketasubramanian N, Wang M, Wang W, Watt K, Weatherall DJ, Weinstock MA, Weintraub R, Weisskopf MG, Weissman MM, White RA, Whiteford H, Wiersma ST, Wilkinson JD, Williams

- HC, Williams SRM, Witt E, Wolfe F, Woolf AD, Wulf S, Yeh P-H, Zaidi AKM, Zheng Z-J, Zonies D, Lopez AD, Murray CJL, AlMazroa MA, Memish ZA. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* (London, England) 2012; 380 (9859): 2163–96.
147. Wang S-Y, Gao K, Deng D-L, Cai J-J, Xiao Z-Y, He L-Q, Jiao H-L, Ye Y-P, Yang R-W, Li T-T, Liang L, Liao W-T, Ding Y-Q. TLE4 promotes colorectal cancer progression through activation of JNK/c-Jun signaling pathway. *Oncotarget* 2016; 7 (3): 2878–88.
148. Wang W, Lu K, Wang L, Jing H, Pan W, Huang S, Xu Y, Bu D, Cheng M, Liu J, Liu J, Shen W, Zhang Y, Yao J, Zhu T. Comparison of non-schistosomal colorectal cancer and schistosomal colorectal cancer. *World J Surg Onc* 2020; 18 (1): 149.
149. Warren KS, Mahmoud AA, Cummings P, Murphy DJ, Houser HB. Schistosomiasis mansoni in Yemeni in California: duration of infection, presence of disease, therapeutic management. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 1974; 23 (5): 902–9.
150. Weglage J, Wolters F, Hehr L, Lichtenberger J, Wulz C, Hempel F, Baier A, Quack T, Köhler K, Longereich T, Schramm G, Irungbam K, Mueller H, Buelow V von, 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. *Scientific reports* 2020; 10 (1): 22373.
151. WHO. Schistosomiasis - fact sheet. [Zuletzt geprüft: 30.8.2023], Online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>.
152. Wilson MS, Mentink-Kane MM, Pesce JT, Ramalingam TR, Thompson R, Wynn TA. Immunopathology of schistosomiasis. *Immunology and cell biology* 2007; 85 (2): 148–54.
153. Winawer SJ, Zauber AG, Ho MN, O'Brien MJ, Gottlieb LS, Sternberg SS, Waye JD, Schapiro M, Bond JH, Panish JF. Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup. *New England Journal of Medicine* 1993; 329 (27): 1977–81.
154. Yamamoto H, Uchigata Y, Okamoto H. Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly(ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. *Nature* 1981; 294 (5838): 284–6.
155. Zhu Y, Shuai W, Zhao M, Pan X, Pei J, Wu Y, Bu F, Wang A, Ouyang L, Wang G. Unraveling the Design and Discovery of c-Jun N-Terminal Kinase Inhibitors and Their Therapeutic Potential in Human Diseases. *Journal of medicinal chemistry* 2022; 65 (5): 3758–75.

8.2 Bildquellenverzeichnis

Quellen von in Abbildungsanteilen, die nicht selbst erstellt wurden	
Abbildung und Bildbestandteil	Quelle
Abbildung 1: <i>Biomphalaria glabrata</i> (Süßwasserschnecke)	Wikimedia Commons (Website, Creative Commons Lizenz): https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=7278526 (abgerufen am 07.07.2023) Erstellt von Fred A. Lewis, Yung-san Liang, Nithya Raghavan & Matty Knight
Abbildung 1:	Servier Medical Art (Website, Creative Commons Lizenz):

<i>Schistosoma mansoni</i> in verschiedenen Entwicklungsstadien	https://smart.servier.com/?s=schistosoma (abgerufen am 07.07.2023)
---	--

9 Anhang

Stimulation SW620-Zellen mit SEA und HEK-IPSE

Vorbereitung der Stimulationszusätze (4 Eppendorf-Gefäße)

In der Darstellung sind die zu erstellenden Mischungen bereits den *Wells* der 24-*Well*-Platte zugeordnet. Beispielsweise wurde für die *Wells* A1 und B1 ein Volumen von insgesamt 410 μ L angesetzt, welches neben dem Zellkulturmedium RPMI 9 μ L PBS-Puffer enthält. In der späteren Stimulation werden in beide *Wells* je 200 μ L dieser Mischung pipettiert.

	1	2	3	4	5	6
A	410 μ l (RPMI + 9 μ l PBS)	410 μ l (RPMI + 4 μ l SEA)	820 μ l (RPMI + 2 μ l HEK-IPSE)		820 μ l (RPMI + 18 μ l HEK-IPSE)	
B						
C						
D						

- nur zuvor nicht aufgetaute Aliquots verwenden
- HEK-IPSE: Rekombinant aus HEK Zellen gewonnen (0,46 mg/ml, 5 μ l Aliquots)
- SEA (1,52 mg/ml, 10 μ l Aliquots)
- PBS aus Lieferung von Borstel (19.09.2018)

Schematische Darstellung einer 24-*Well*-Platte:

In jedes *Well* waren vor Stimulation die gleiche Menge Zellen ausgesät worden und bis zur Stimulation gleich behandelt. Am Tag der Stimulation wurden die *Wells* anhand des unten dargestellten Schemas mit den wie oben beschrieben vorbereiteten Stimulationsflüssigkeiten befüllt.

	1	2	3	4	5	6
A	Neg. Kontrolle: 4,5 μ l PBS	2 μ l SEA	0,5 μ l HEK-IPSE	0,5 μ l HEK-IPSE	4,5 μ l HEK-IPSE	4,5 μ l HEK-IPSE
B	Neg. Kontrolle: 4,5 μ l PBS	2 μ l SEA	0,5 μ l HEK-IPSE	0,5 μ l HEK-IPSE	4,5 μ l HEK-IPSE	4,5 μ l HEK-IPSE
C						
D						

Anhang 1: Beispielhaftes Pipettierschema eines Zellkulturstimulationsversuchs.

10 Publikationsverzeichnis, Kongressbeitrag

Teile der vorliegenden Arbeit wurden unter folgenden Titeln veröffentlicht:

Originalarbeit

Weglage J, Wolters F, Hehr L, Lichtenberger J, Wulz C, Hempel F, Baier A, Quack T, Köhler K, Longenrich T, Schramm G, Irungbam K, Mueller H, Buelow V von, Tschuschner A, Odenthal M, Drebbler 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. *Scientific reports* 2020; 10 (1): 22373.

Kongressbeiträge

Weglage, J, Wulz C, Hehr L, Schramm G, Quack T, Grevelding CG, Roderfeld M, Roeb E. Aktivierung des Protoonkogens c-Jun durch Schistosoma mansoni im Ileum infizierter Hamster und im Zellkultursystem. *Zeitschrift für Gastroenterologie*. 2019; 57(09): e299.

Weglage, J, Schramm, G, Quack, T, Grevelding, CG, Roderfeld, M, Roeb, E. Schistosoma mansoni aktiviert den Wnt-Signalweg im Kolon. *Science Day der Justus-Liebig-Universität*. Gießen, 01.11.2019.

Weitere Veröffentlichung:

Originalarbeit

Irungbam, K, Churin, Y, Matono, T, **Weglage, J**, Ocker, M, Glebe, D, Hardt, M, Koepfel, A, Roderfeld, M, Roeb, E. Cannabinoid receptor 1 knockout alleviates hepatic steatosis by downregulating perilipin 2. *Laboratory Investigation* 2020; Volume 100, Issue 3.

11 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten 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

12 Danksagung

Ich möchte mich von Herzen bedanken bei allen, die mich während der Anfertigung dieser Dissertationsschrift unterstützt und begleitet haben. Zuallererst gebührt mein Dank Frau Univ.-Prof. Dr. med. Elke Roeb, für die exzellente fachliche Unterstützung und die Ermöglichung der hier präsentierten Forschungsarbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn PD Dr. rer. nat. Martin Roderfeld bedanken, der mich bei meiner Arbeit im Labor betreute. Ich danke für die vielen anregenden Diskussionen, für seine Offenheit für meine Vorschläge und für die Hilfe bei der Umsetzung.

Ich bedanke mich bei der AG Roeb, namentlich bei Annette Tschuschner, Karuna Irungbam, Felix Hempel, Laura Hehr und Celina Wulz. Insbesondere möchte ich mich bei Friederike Wolters bedanken, an deren Forschungsarbeit die hier präsentierten Ergebnisse anknüpfen.

Ein weiterer Dank gilt dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, welches mir im JLU TRAINEE-Programm durch ein wissenschaftlich weiterbildendes Curriculum und finanzielle Unterstützung eine große Hilfe war.

Außerdem möchte ich mich bei Jonas Tschammer aus dem Institut für medizinische Statistik der Justus-Liebig-Universität Gießen für die Beratung bei der statistischen Auswertung der Daten bedanken. Weiterhin bedanke ich mich bei Dr. Gabriele Schramm vom *Research Center Borstel, Leibniz Lung Centre* für die freundliche Zusammenarbeit.

Ich danke meinen Freunden für die großartigen Jahre in Gießen.

Ich bedanke mich bei meiner Freundin Klara, die mich auf jedem Schritt während des Studiums und seitdem begleitet hat.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie für den großartigen Rückhalt während meines gesamten Studiums. Ich danke meinen Eltern Agnes und Heinrich Weglage und meinen Geschwistern Luise, Emma, Johann, Frieda und Jasper Weglage.