

**Identifizierung zellulärer Zielgene des humanen
Papillomvirus Typ 8 (HPV8)
in transgenen Mäusen und humanen Keratinozyten**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Daliborka Lazić
aus Köln

Köln 2011

Berichterstatter: Prof. Dr. S.I. Korsching
Prof. Dr. H.J. Pfister

Tag der mündlichen Prüfung: 26.05.2011

“We are put in situations to build our character.

Not to destroy us.”

Nick Vujčić

All denen, die mich begleitet haben.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1. Onkogene Viren	1
1.2. Taxonomie der humanen Papillomviren	2
1.3. Die Rolle von HPV bei der Entstehung des Zervixkarzinoms	3
1.4. HPV bei der Entstehung des nicht-melanozytären Hautkrebses (NMHK)	4
1.5. Aufbau und Genomstruktur der Papillomviren	5
1.6. Der virale Lebenszyklus	7
1.7. Die viralen Proteine	8
1.7.1. E1	8
1.7.2. E2	9
1.7.3. Die Rolle von E6 und E7	9
1.7.3.1. E6	10
1.7.3.2. E7	12
1.8. Transgene Mausmodelle	13
1.9. Identifizierung zellulärer Zielgene von HPV8	14
1.10. Zielsetzung der Arbeit	16
2. MATERIALIEN	17
2.1. Mausstämme	17
2.2. Bakterien Stamm	17
2.2.1. Bakterienmedien	17
2.3. Eukaryonte Zellen	18
2.3.1. Zellkultur Medien	19
2.4. Spenderhaut und organotypische Hautmodelle	20
2.5. Nukleinsäuren	20
2.5.1. Plasmide	20
2.5.1.1. Klonierungsvektoren	20
2.5.1.2. Retrovirale Expressionsvektoren	21
2.5.2. Synthetisch hergestellte Oligonukleotide	21
2.5.2.1. Oligonukleotide für die Sequenzierung	21
2.5.2.2. Oligonukleotide für die reverse Transkription	21
2.5.2.3. Synthetische Oligonukleotide für die quantitative PCR	21
2.5.2.4. siRNA Duplex	23
2.5.3. DNA-und RNA-Längenstandards	23
2.5.4. Sonstige Nukleinsäuren	23
2.6. Enzyme	23
2.7. Antikörper	24
2.8. Kits und spezielle Reagenziensysteme	24
2.8.1. RNA Präparation	24
2.8.2. DNA Präparation	24
2.8.3. Transfektionsreagenzien	25
2.8.4. Immunologische / Immunhistochemische / Immunzytochemische Analysen	25
2.9. Lösungen und Puffer	25
2.10. Chemikalien und Reagenzien	27
2.11. In dieser Arbeit verwendete Geräte	28
3. METHODEN	29
3.1. Mausexperimente	29
3.1.1. UV-Bestrahlung von Mäusen	29

3.2. Molekularbiologische Methoden	30
3.2.1. Bakterienkulturen	30
3.2.1.1. Herstellung kompetenter Bakterienkulturen	30
3.2.1.2. Kultur und Lagerung von E. coli	30
3.2.1.3. Transformation mittels Hitzeschock	31
3.2.2. DNA-Techniken	31
3.2.2.1. Standard Methoden	31
3.2.2.2. Plasmidisolierung aus Bakterien	31
3.2.2.3. Spektrometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	32
3.2.2.4. Sequenzierung	32
3.2.3. RNA Techniken	33
3.2.3.1. RNA Isolation	33
3.2.3.2. Reverse Transkription	34
3.2.3.3. RNA-Interferenz	34
3.2.3.4. Polymerase Kettenreaktion (PCR)	35
3.2.3.5. Echtzeit-PCR	36
3.2.3.6. Extraktion von genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien	37
3.2.4. Zellkultur	38
3.2.4.1. Langzeitlagerung und Reaktivierung von Zellen	38
3.2.4.2. Kultivierung von Zelllinien	38
3.2.4.3. Transfektion von PT67 Zellen	38
3.2.4.4. Herstellung rekombinanter Retroviren	39
3.2.4.5. Infektion humaner primärer Keratinozyten	39
3.2.4.6. Behandlung von Zellen mit 5-Aza-2-Deoxycytidin	40
3.2.4.7. Organotypische Hautkulturen (Raft Kulturen)	40
3.2.5. Proteinanalysen	41
3.2.5.1. Proteinisolation	41
3.2.5.2. Western Blot Analysen	41
3.2.5.3. Immunhistochemische Analysen	42
3.2.5.4. Immunzytochemie	44
4. ERGEBNISSE	45
4.1. Kinetik der UV-induzierten Papillomentwicklung in HPV8-GFR transgenen Mäusen	45
4.1.2. Charakterisierung der Proliferations- und Apoptosemarker PCNA und PARP in UV bestrahlter FVB/n wt und HPV8-GFR Maushaut	49
4.1.3. Verifizierung der Micro Array Vorhersage	52
4.1.3.1. Quantifizierung der StefinA, Kallikrein-6, Lipocalin-2, FosI1 und Syntenin-2 Expressionsspiegel in HPV8-E6 und -E2 Mäusen	57
4.1.4. Immunologischer Nachweis von StefinA in Gesamtproteinextrakten aus FVB/n wt und HPV8-GFR Maushaut	60
4.1.4.1. Immunhistochemische Analyse der StefinA Expression in Maushautschnitten	61
4.2. Analyse der Expression des PDZ Proteins Syntenin-2 in humanen, kutanen Keratinozyten	64
4.2.1. Quantifizierung des Syntenin-2 mRNA Spiegels in UV bestrahlten, HPV8-E6 exprimierenden Keratinozyten	64
4.2.2. Quantifizierung der Syntenin-2 mRNA und Proteinspiegel in HPV8-E6, -E7 und -E6/7 exprimierenden primären Keratinozyten	65
4.2.3. Immunologischer Nachweis von Syntenin-2 in Ganzzell-Extrakten aus HPV E6 exprimierenden primären humanen Keratinozyten	67
4.2.4. Syntenin-2 Expression in primären humanen Keratinozyten	69
4.2.5. Syntenin-2 Expression in normaler humaner Haut und organotypischen Hautkulturen von pLZRS, HPV8-E6, -E7 und -E6/E7 exprimierenden nTERT Zellen	70
4.2.6. Charakterisierung der Syntenin-2 Expression in humanen kutanen PEK	72
4.2.7. Bestimmung der Syntenin-2 mRNA Expression in immortalisierten epithelialen Zelllinien	73
4.2.8. Syntenin-2 mRNA Expression in 5-Aza-2-Deoxycytidin behandelten Keratinozyten	75

4.2.9. Effekte des spezifischen knock-down von Syntenin-2 in primären humanen Keratinozyten	76
5. DISKUSSION	79
6. LITERATURVERZEICHNIS	88
7. ZUSAMMENFASSUNG	99
8. ABSTRACT	101
9. ANHANG	103
9.1. Abkürzungsverzeichnis	103
9.2. Danksagung	105
9.3. Erklärung	106
9.4. Lebenslauf	107

1. Einleitung

1.1. Onkogene Viren

Nach aktueller Einschätzung der International Agency for Research on Cancer, einer Einrichtung der Weltgesundheitsorganisation (WHO), wird von fünf Krebserkrankungen weltweit eine durch Infektionen verursacht, die in erster Linie durch Viren hervorgerufen werden (Parkin 2006; Bouvard et al. 2009). Bis heute wurden sieben onkogene Viren des Menschen beschrieben (Tabelle 1), die jährlich 10-15% der weltweiten Krebserkrankungen verursachen (Moore and Chang 2010).

Im Jahre 2008 erhielt Harald zur Hausen den Nobelpreis für Medizin. Er stellte bereits 1976 die Hypothese auf, dass humane Papillomviren (HPV) eine Rolle bei der Entstehung des Zervixkarzinoms spielen. Der Durchbruch gelang ihm schließlich in den 80-er Jahren, als er die DNA der HPV Typen 16 und 18 aus Zervixkarzinomen isolieren und klonieren konnte (Dürst et al. 1983; Boshart et al. 1984).

Tabelle 1: Zusammenfassung der bis heute bekannten humanen onkogenen Viren (entnommen aus Moore and Chang, 2010).

Virus	assoziierte Tumoren	beschrieben im Jahr	Referenzen
Epstein-Barr Virus (EBV)	Endemisches Burkitt-Lymphom (BL), Hodgkin's Disease, Posttransplantations-Lymphoproliferative Erkrankung (PTLD), Nasopharynxkarzinom (NPC)	1964	(Epstein et al. 1964)
Hepatitis B Virus (HBV)	Hepatozelluläre Karzinome	1965	(Blumberg et al. 1965)
Humanes T-Zell Leukämie Virus (HTLV-1)	Adulte T-Zell Leukämie (ATL)	1980	(Poiesz et al. 1980)
Hoch-Risiko humane Papillomviren (z.B. HPV 16 und 18)	Zervixkarzinom, u.a. anogenitale Karzinome	1983-1984	(Dürst et al. 1983; Boshart et al. 1984)
Hepatitis C Virus (HCV)	Leberzellkarzinom	1989	(Choo et al. 1989)
Kaposi's Sarcoma Herpesvirus (KSHV)	Kaposi's Sarcoma , maligne Lymphome	1994	(Chang et al. 1994)
Merkelzell Polyomavirus (MCPyV)	Merkelzell Karzinom	2008	(Feng et al. 2008)

1.2. Taxonomie der humanen Papillomviren

Die Familie der Papillomaviridae umfasst kleine, unbehüllte DNA-Viren, die das mehrschichtige Plattenepithel der Haut oder Schleimhaut infizieren. Bis heute wurden über 120 humane Papillomviren vollständig sequenziert. Darüber hinaus existieren etwa 120 partielle DNA-Sequenzen, die neue HPV Typen repräsentieren könnten (Bernard et al. 2010). Liegt beim Vergleich im hoch konservierten Hauptstrukturproteingen L1 die Sequenzhomologie unterhalb von 90%, so bestimmt dies einen neuen HPV Typ. Eine Homologie von 2% bis zu 10% innerhalb dieses Sequenzabschnitts definiert einen Subtyp, Homologien unterhalb von 2% hingegen eine Variante (de Villiers et al. 2004). Die Namensgebung neuer HPV-Typen erfolgt dabei numerisch, so wurde der erste isolierte Typ mit HPV1 benannt, darauf folgten HPV2, 3 usw. (de Villiers, 2001). Man unterscheidet aufgrund ihres Tropismus zwischen kutanen und mukosalen bzw. genitalen HPV-Typen, die in fünf Genera unterteilt werden (alpha, beta, gamma, mu und nu). Alpha und beta Papillomviren bilden mit fast 90% die zwei größten Gruppen innerhalb des Stammbaums der Papillomviren (Doorbar 2006) (Abb.1).

Mukosale HPV Typen gehören zur Gruppe der alpha-Papillomviren und werden aufgrund ihres Potentials, Keratinozyten zu transformieren, in Niedrig-Risiko (NR) und Hoch-Risiko (HR) Typen unterteilt (Munoz et al. 2003). Infektionen mit NR Typen verursachen häufig benigne, genitale Kondylome, wohingegen HR Typen mit malignen Anogenital- und Zervixkarzinomen assoziiert sind (zur Hausen 2002).

Die meisten Vertreter des Genus beta, so auch HPV8, zählen zu den sog. *Epidermodysplasia verruciformis* (EV) – Typen, welche ursprünglich aus Patienten mit der autosomal-rezessiven Genodermatose EV isoliert wurden. Bei dieser Erkrankung kommt es zu einer ungewöhnlich hohen Suszeptibilität gegenüber HPV Infektionen.

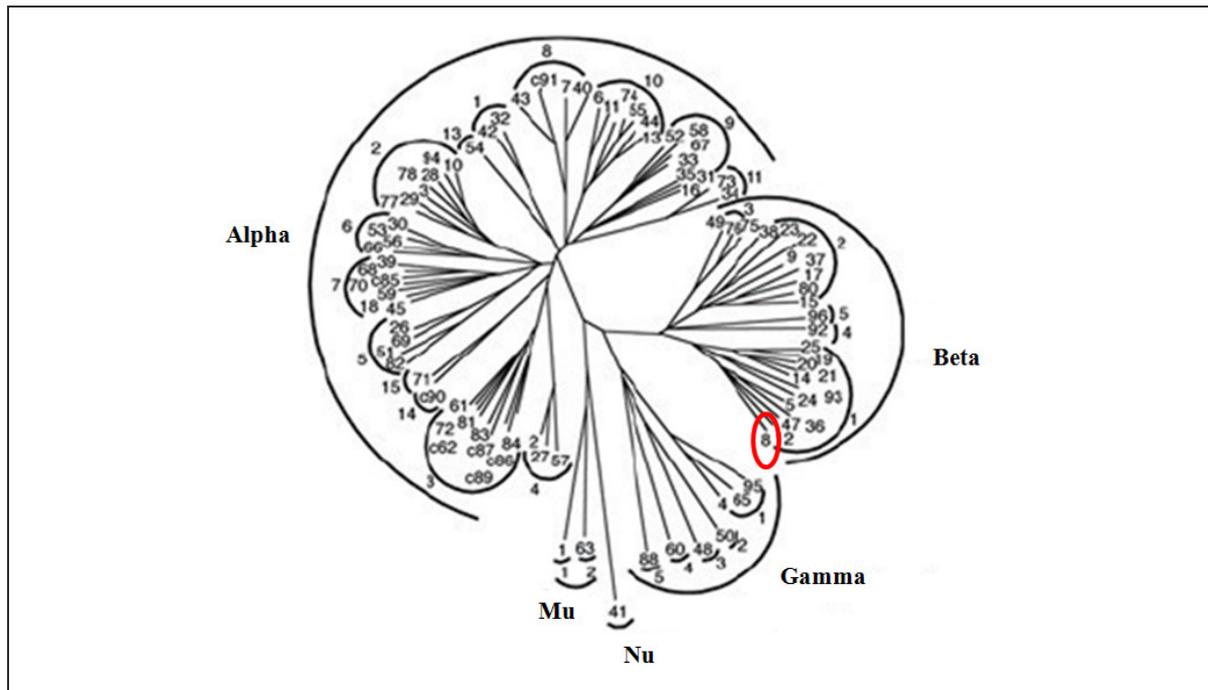


Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum von Papillomviren (modifiziert nach Doorbar 2006).

1.3. Die Rolle von HPV bei der Entstehung des Zervixkarzinoms

Eine HPV Infektion kann über mehrere Jahre persistieren und klinisch inapparent bleiben. Infektionen mit NR Typen verursachen jedoch häufig benigne epidermale Veränderungen, die sich im klinischen Bild als Warzen und Kondylome äußern (zur Hausen 2000). Eine Infektion mit HR Typen hingegen kann zur malignen Entartung des Epithels führen. Dabei kommt es in der *Zervix uteri* zum Verlust der normalen epidermalen Differenzierung und zur Ausbildung zervikaler intraepithelialer Neoplasien unterschiedlichen Schweregrades (CIN I-III). In 10-30% der Fälle entwickelt sich daraus ein invasives Zervixkarzinom, die weltweit zweithäufigste Krebserkrankung bei Frauen, die ohne Behandlung meistens zum Tode führt. In 99% dieser Karzinome können genitale HR HPV Typen, in erster Linie HPV16 (44-46%) und 18 (10-14%) sowie 31 und 45 (2-8%), nachgewiesen werden (Walboomers et al. 1999; Munoz 2000; Clifford et al. 2003), weshalb HPV16 und HPV18 seit 1995 von der WHO als Risikofaktor für die Entstehung des Zervixkarzinoms anerkannt werden.

HPV stellen den am häufigsten sexuell übertragenen Erreger dar (Palefsky 2010). Seit 2006 können junge Mädchen daher sinnvollerweise vor dem ersten Geschlechtsverkehr mit einem Impfstoff auf der Basis von „virus like particles“ (VLP), nicht-infektiösen Viruspartikeln, die aus Strukturproteinen des Viruskapsids bestehen, geimpft werden. In Europa sind bislang zwei Impfstoffe zugelassen. Eine Impfung mit Cervarix[®] schützt vor Infektionen mit HPV16

und 18. Gardasil® dagegen enthält VLP aus L1 von HPV6, 11, 16 und 18 und dient damit neben der Prävention des Zervixkarzinoms auch dem Schutz vor genitalen Warzen, die durch HPV6 oder 11 hervorgerufen werden. Die Epidemiologie für den Zusammenhang von HPV und Anal- sowie Genitalkarzinomen bei Männern ist verglichen mit dem Zervixkarzinom wenig verstanden, jedoch kann nach neueren Studien eine Impfung von Jungen im entsprechenden Alter die Inzidenz dieser Karzinome signifikant senken (Giuliano et al. 2011). Inwiefern eine Impfung auch zum Schutz vor einer Übertragung auf Frauen sinnvoll sein könnte oder ob es ausreichend ist, nur einen Sexualpartner zu impfen, bleibt fraglich.

1.4. HPV bei der Entstehung des nicht-melanozytären Hautkrebses (NMHK)

Während die ätiologische Rolle der genitalen HPV Infektion bei der Entstehung des Zervixkarzinoms anerkannt wird, wird die Bedeutung der Infektion mit kutanen HPV Typen bei der Entstehung von NMHK bis dato kontrovers diskutiert.

NMHK ist die häufigste Krebserkrankung in der kaukasischen Bevölkerung (Pfister 2003). Mit einer in der letzten Dekade gestiegenen Inzidenzrate macht NMHK gegenwärtig etwa 30% aller Krebserkrankungen aus (DePinho 2000; Madan et al. 2010). Anerkannte Risikofaktoren für die Entstehung sind Sonnenlicht-Exposition, insbesondere im jungen Alter, sowie ein geschwächter Immunstatus (Euvrard et al. 2003; Moloney et al. 2006; Staples et al. 2006). Epidemiologische und experimentelle Studien deuten des weiteren auf eine Rolle von HPV bei der Entstehung des NMHK hin (Akgül et al. 2006). Eine Infektion mit HPV erfolgt im frühen Kindesalter und die meisten Menschen sind mit multiplen HPV Typen persistent infiziert, wobei Familienmitglieder ein ähnliches HPV Typen Spektrum aufweisen (Antonsson et al. 2003; Weissenborn et al. 2009). Eine eindeutige Korrelation zwischen HPV Infektion und der Entstehung des NMHK wird bei Patienten mit der autosomal-rezessiv vererbten Hauterkrankung EV anerkannt. Das erstmals 1922 beschriebene klinische Bild (Lewandowsky und Lutz, 1922) zeichnet sich durch ein lebenslanges Auftreten von multiplen Hautläsionen aus, die vornehmlich an sonnenexponierten Stellen ein hohes Risiko besitzen, sich zu Plattenepithelkarzinomen (PEK) zu entwickeln. Während über 20 verschiedene HPV Typen in benignen Läsionen von EV-Patienten nachweisbar waren, werden HPV5 oder 8 in 90% der PEK mit hohen Kopienzahlen gefunden (Pfister 2003). Der molekulare Mechanismus, der es EV Patienten nicht ermöglicht die HPV Infektion zu kontrollieren, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Bislang konnte eine genetische Prädisposition DNA-Loci auf dem langen Arm des Chromosoms 17 und auf dem Chromosom 2 zugeordnet werden (Ramos et al. 2000). Mutationen in einem der auf Chromosom 17 lokalisierten Gene EVER1

und EVER2 sind mit dem EV Krankheitsbild assoziiert (Ramos et al. 2002). Die entsprechenden Proteine scheinen die Verteilung von Zink im Zellkern zu regulieren, indem sie den Zink Influx in den Nukleus hemmen (Lazarczyk et al. 2008). Es konnte gezeigt werden, dass Zink als Kofaktor eine Rolle für virale Proteine spielt (Lazarczyk and Favre 2008).

In epidemiologischen Studien wurde gezeigt, dass EV-HPV Typen nicht auf EV-Patienten beschränkt sind sondern auch in der Allgemeinbevölkerung vorkommen. Allerdings werden hier nur wenige virale DNA-Kopien in der Epidermis und den Haarfollikeln gefunden, wobei letztere vermutlich das natürliche Reservoir der kutanen HPV darstellen (Pfister 2003; Weissenborn et al. 2009). Darüber hinaus werden auch in PEK nur wenige virale DNA Kopien nachgewiesen, was darauf hindeutet, dass nur vereinzelt Zellen HPV positiv sind (Pfister 2003). Damit erscheint die ätiologische Rolle von HPV bei der Entstehung des PEK in der Allgemeinbevölkerung fraglich. Dafür spricht jedoch die Tatsache, dass in aktinischen Keratosen, die Vorläuferstufen des PEK darstellen, hohe Viruslasten gefunden werden, was auf eine Beteiligung von HPV während der frühen Stadien der Hautkarzinogenese hindeutet (Pfister 2003). Zudem zeigen Fallbeispiel Studien, dass Seropositivität gegen HPV8 mit einem erhöhten Risiko zur Entstehung von NMHK einhergeht (Feltkamp et al. 2003). Nicht zuletzt konnte in NMHK von immunsupprimierten Patienten eine erhöhte Anzahl an EV-HPV Typen nachgewiesen werden, was auf eine wichtige Rolle des Immunsystems bei der Prävention von HPV-vermitteltem Hautkrebs hindeuten könnte (Berkhout et al. 2000; Harwood et al. 2000).

1.5. Aufbau und Genomstruktur der Papillomviren

Papillomviren (PV) sind kleine (Durchmesser 55 nm) DNA-Viren, deren zirkuläres, doppelsträngiges Genom (7200-8000 bp) in einem ikosaedrischen Kapsid verpackt ist, welches sich aus 72 pentameren Kapsomeren zusammensetzt. In ausgereiften Virionen bildet die virale DNA nukleosomenähnliche Strukturen aus, indem sie mit den zellulären Histonen H2a, H2b, H3 und H4 der Wirtszelle zu einem chromatinähnlichen Komplex assoziiert (Favre et al. 1977; Pfister 1984).

Das Genom lässt sich funktionell in einen kodierenden und nicht-kodierenden Bereich unterteilen (Pfister and Fuchs 1994). Der kodierende Bereich umfasst mindestens sieben offene, teilweise überlappende Leserahmen, die bei allen PV trotz großer Sequenzunterschiede in einer konservierten Abfolge auf einem DNA Strang lokalisiert sind (Howley and Lowy, 2001). Deren Produkte werden im Verlauf des viralen

Vermehrungszyklus teilweise zu unterschiedlichen Zeiten exprimiert. So kodieren die sog. frühen Gene (early genes) für Proteine, denen vor allem regulatorische Funktionen bei der viralen Replikation und Transkription (E1, E2) sowie Zelltransformation (E5, E6, E7) zukommen, während die sog. späten Gene (late genes) L1 und L2 für die Strukturproteine des Kapsids kodieren.

Der nicht-kodierende Bereich („non coding region – NCR) ist zwischen den offenen Leserahmen des L1 und E6 Gens lokalisiert und beinhaltet neben dem Replikationsursprung und den Promotoren essentielle „cis“-regulatorische Elemente sowie keratinozytenspezifische Enhancer-Elemente. Eine Besonderheit der beta PV ist, dass ihre NCR nur weniger als halb so lang wie die entsprechenden Sequenzen anogenitaler alpha PV ist (Fuchs et al. 1986; Krubke et al. 1987).

Bei HPV8 wird die Transkription der polycistronischen mRNA an mindestens zwei epithelspezifischen Promotoren initiiert. Der späte Promotor P_{7535} ist am 5'-Ende der NCR lokalisiert, der frühe Promotor P_{175} befindet sich hingegen vor dem ORF des E6 (Stubenrauch et al. 1992). Durch alternatives Splicing der mRNA entstehen neben den Transkripten, die für die vollständigen Proteine kodieren auch solche, die für verkürzte Formen und Fusionsproteine kodieren (Baker und Calef, 1995).

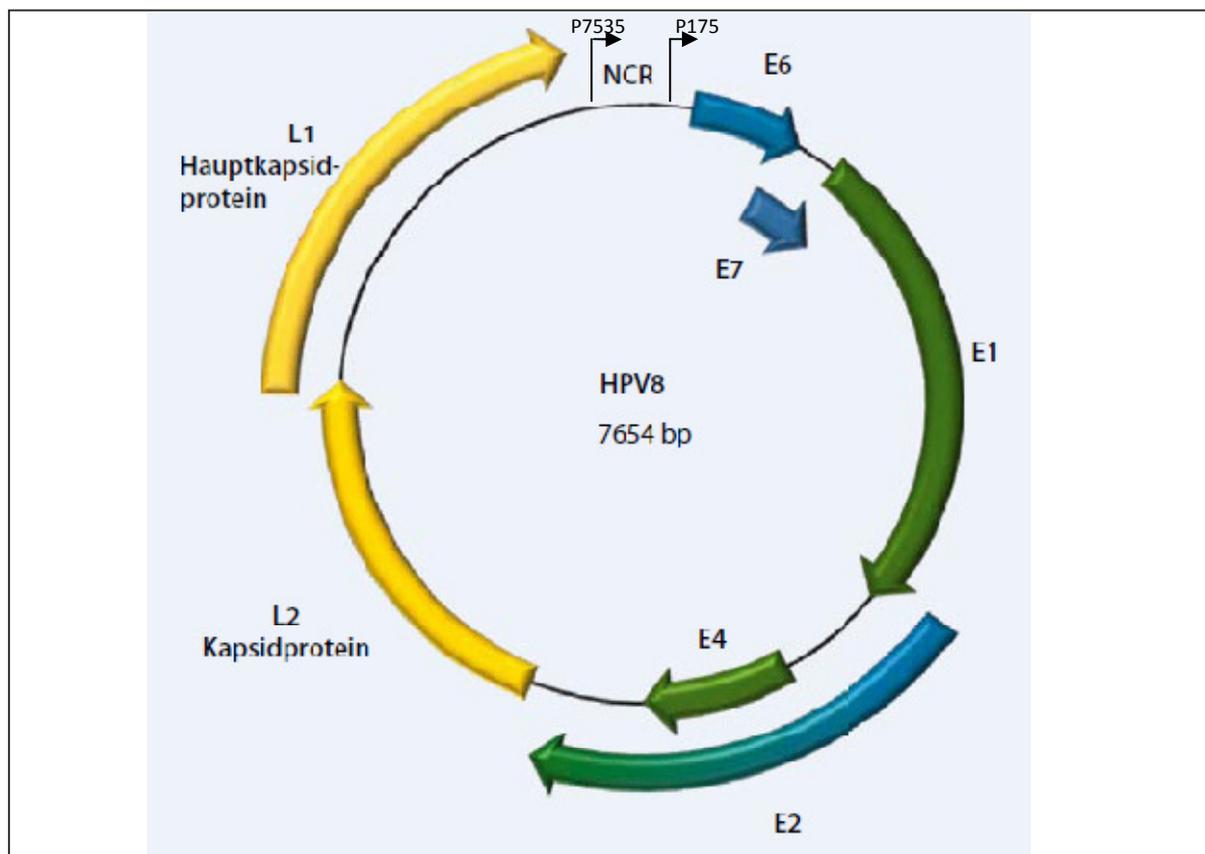


Abbildung 2: Schematische Darstellung des HPV8 Genoms. Das HPV Genom wird in die frühen Gene (grün und blau) sowie die späten Gene (gelb) und die NCR eingeteilt (modifiziert nach Pfister 2011).

1.6. Der virale Lebenszyklus

Die menschliche Haut gliedert sich in die drei Schichten Oberhaut (Epidermis), Lederhaut (Dermis) und Unterhaut (Subcutis). Die Oberhaut gehört zu den epithelialen Geweben und wird weiter in die Schichten Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum unterteilt (Abb. 3). Durch mitotische Teilung der Zellen des Stratum basale kommt es zu einer fortwährenden Erneuerung der Haut. Dabei wandern die Keratinozyten im Zuge der Differenzierung in die oberen Schichten und differenzieren im Stratum corneum zu kernlosen Hornzellen (Korneozyten), die letztendlich durch Zerfall der Hornschuppen abgestoßen werden. Der Vermehrungszyklus der PV ist eng an diesen Differenzierungsprozess der Keratinozyten gekoppelt.

Bei einer PV Infektion erfolgt die Synthese von neuen Virionen nur, wenn die infizierte Zelle sich mitotisch teilt und eine daraus resultierende infizierte Tochterzelle anschließend differenziert (Howley and Lowy 2007). Vermutlich durch Mikrowunden gelangen die PV zu der Basalschicht und infizieren die Keratinozyten. Im *in vitro* Modell konnte gezeigt werden, dass PV direkt an Komponenten der extrazellulären Matrix der Keratinozyten binden können und darüber ein Kontakt zu den Zellen vermittelt wird, wohingegen im *in vivo* Modell zunächst eine Bindung an die Basalmembran erfolgt (Roberts et al. 2007; Kines et al. 2009; Sapp and Bienkowska-Haba 2009). Den Rezeptor, der für die Adsorption der Viruspartikel verantwortlich ist, kennt man nicht eindeutig. Bekannt ist, dass das L1 Protein u.a. an die $\alpha 6$ -Untereinheit heterodimerer Integrine, Laminin-5 als auch Heparansulfat-Proteoglykane binden kann. Darüber hinaus wird ein möglicher Ko-Rezeptor diskutiert, der für die Internalisierung des gebundenen Virus notwendig ist. Eine Beteiligung des L2 Proteins bei der Infektion wird ebenfalls angenommen (Sapp and Bienkowska-Haba 2009; Horvath et al. 2010). So konnten HPV16 Pseudovirionen, deren L2 Protein zuvor durch die Proteinkonvertase Furin prozessiert wurde, trotz fehlender Heparansulfat-Proteoglykane Keratinozyten auf ihrer Oberfläche binden und erfolgreich infizieren. Zugabe eines Furin Inhibitors hingegen verhinderte die Infektion (Day et al. 2008). Das Viruspartikel wird nach vermitteltem Virus-Zell-Kontakt vermutlich über Endozytose aufgenommen. Die Infektion verläuft zunächst nicht produktiv und das Virus verbleibt mit geringer Kopienzahl episomal in den Basalzellen, wobei die frühen Gene E1, E2, E6 und E7 schwach exprimiert werden. Während dieser persistierenden Phase interagiert das Virusgenom mit dem zellulären Chromosomenapparat und sichert damit nach mitotischer Teilung der Wirtszelle die korrekte Weitergabe des Episoms an die Tochterzellen (You 2010). Lösen sich die Tochterzellen von der Basalmembran ab und wandern in die oberen Schichten des Stratum spinosum, so nimmt

die Expression der regulatorischen viralen Proteine zu und die vegetative Replikation beginnt. Neben den viralen Proteinen E1 und E2 werden zelluläre Faktoren benötigt, die nicht in den ruhenden basalen Zellen exprimiert werden. E7 begünstigt den Eintritt der in der G-Phase arretierten Zellen in die replikative S-Phase (Hamid et al. 2009). Beginnend in den oberen Schichten des Stratum spinosum bis zum Stratum granulosum nimmt die Synthese der Strukturproteine L1 und L2 zu und die Virusreifung findet statt. Mit der Abschuppung der ausdifferenzierten Kerneozyten werden die reifen Virionen freigesetzt. Dabei könnte das E4 Protein eine Rolle spielen, indem es zur Zerstörung des Zytoskeletts beiträgt (Doorbar et al. 1991).

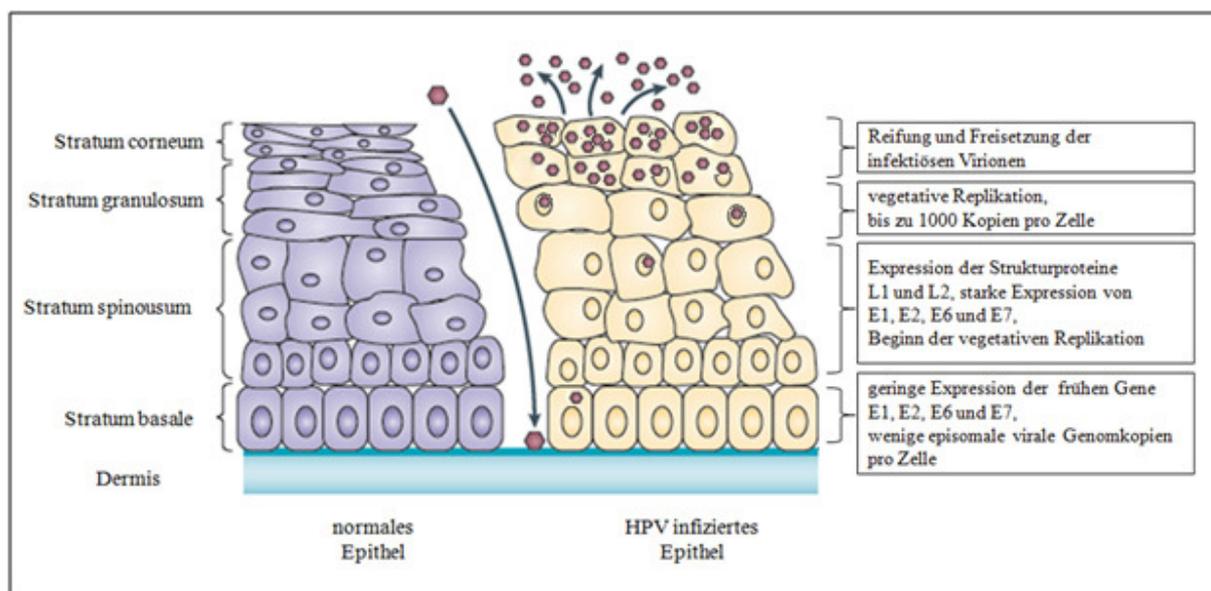


Abbildung 3: Dargestellt ist ein Querschnitt durch alle Schichten eines normalen Epithels im Vergleich zum HPV infizierten Epithel. Die Beschriftung links gibt die Bezeichnung der einzelnen Epithelschichten an, die Beschriftung rechts die Abhängigkeit der Virusreifung vom Differenzierungsgrad der Keratinozyten. Die roten Punkte stellen Viruspartikel dar, die durch Mikrowunden zur Basalmembran gelangen und an diese binden. Anschließend infizieren sie die basalen Keratinozyten (modifiziert nach Moody and Laimins 2010)

1.7. Die viralen Proteine

1.7.1. E1

Die Expression des E1 Proteins findet während des gesamten viralen Lebenszyklus statt, wobei die höchste Expression in der vegetativen Phase zu finden ist (Howley and Lowy 2001). Das E1-Protein ist ein hoch konservierter Replikationsinitiator mit ATPase und Helikase Aktivität (Hughes and Romanos 1993; Seo et al. 1993; Yang et al. 1993), der essentiell für die Vermehrung des viralen Genoms ist (Chow und Bruker, 1994). Die Affinität

des E1 Proteins zum Replikationsursprung ist jedoch sehr gering (Mohr et al. 1990). Erst durch Protein-Protein-Interaktionen mit dem an die DNA bindenden E2 Protein sowie durch Wechselwirkung mit weiteren zellulären Faktoren kann die Synthese des viralen Genoms induziert werden (Wilson et al. 2002).

1.7.2. E2

Das E2 Protein ist ein ca. 360 Aminosäuren (AS) großes, nukleäres Phosphoprotein, das zwei funktionelle Domänen besitzt: eine N-terminale Aktivierungsdomäne (AD) und eine C-terminale DNA-binde Domäne, die durch eine Scharnier-Sequenz (Hinge-Region) verbunden sind. E2 bindet als Dimer an die palindromische Konsensus Sequenz 5'-ACC(N6)GGT-3', welche mehrmals innerhalb der NCR lokalisiert ist (Giri and Yaniv 1988; Steger et al. 1996). Darüber hinaus bindet E2 auch an zelluläre Transkriptionsfaktoren wie CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) α und β und p300, wodurch nicht nur die viralen Promotoren reguliert werden sondern auch die Expression von zellulären Genen beeinflusst wird, die eine Rolle bei der Differenzierung von Keratinozyten spielen (Müller et al. 2002; Hadaschik et al. 2003; Krüppel et al. 2008). Gleichzeitig bindet E2 auch direkt an den Promotor zellulärer Gene wie der Metalloproteinase-9 (MMP-9) und des β 4-Integrin (Oldak et al. 2004; Akgül et al. 2011). Das E2 Protein spielt außerdem eine Rolle bei der viralen Replikation. Nach E2 Bindung an die promotor-proximale E2-Bindestelle (E2BS) wird das E1 Protein zum Replikationsursprung rekrutiert und bindet an die DNA (Mohr et al. 1990). Danach wird E2 aus dem Protein Komplex entlassen und die virale Replikation startet (Lusky et al. 1994).

Die transformierenden Eigenschaften des E2 Proteins konnten in Tiermodellen gezeigt werden. Infektion von Kaninchen mit dem Waldkaninchen-Papillomvirus (cottontail-rabbit papillomavirus = CRPV) führt zur Entstehung spontaner Hauttumore. Mutationen in der E2 AD führen zu einer signifikant erniedrigten Tumorentstehungsrate *in vivo* (Jeckel et al. 2002). Expression des humanen HPV8-E2 Proteins in transgenen Mäusen führt ebenfalls zur spontanen Tumorentstehung (Pfefferle et al. 2008).

1.7.3. Die Rolle von E6 und E7

Die vermehrte Expression der HPV Onkogene E6 und E7 wird als eine der Ursachen für die maligne Entartung HPV-positiver Tumoren angesehen (Chow and Broker 1997), da sie zelluläre Vorgänge wie Apoptose (Lagunas-Martinez et al. 2010), Zellproliferation (Hamid et

al. 2009) und Zellmorphologie (Thomas et al. 2008) auf teilweise kooperative Weise beeinflussen können.

1.7.3.1. E6

Das ca. 150 AS große E6 Protein der HR HPV ist ein nukleäres Phosphoprotein (Grossman et al. 1989), das zwei ungewöhnlich große Zink-Finger Domänen enthält, die eine Rolle bei der Proteinstabilität und –aktivität spielen (Smola-Hess und Pfister, 2002). Eine im C-Terminus befindliche Konsensussequenz X-S/T-X-V/L ermöglicht die Bindung an PDZ-Proteine wie hDLG, hScrib, MUPP1, MAGUKs und PAR3, die bei der Ausbildung epithelialer Zell-Zellkontakte und bei der Zellpolarität eine Rolle spielen, und durch Interaktion mit E6 in die Ubiquitin-abhängige Proteolyse geführt werden (Pim and Banks 2010). Die Interaktion mit den PDZ Proteinen Paxillin und Zyxin (Tong et al. 1997; Degenhardt and Silverstein 2001) beeinträchtigt zudem die Zellmorphologie. Kutane HPV kodieren nicht für ein PDZ Bindemotiv. In diesem Zusammenhang konnte interessanterweise für das genitale HPV18-E6 aber auch für dessen Splicevariante ohne PDZ Bindemotiv eine Interaktion und Ubiquitin-abhängige Degradation des an der Ausbildung von Tight Junctions beteiligten Proteins PTAJ gezeigt werden (Storrs and Silverstein 2007), was darauf hindeutet, dass die Bindung auch über andere Motive erfolgen kann.

HR HPV können die Aktivität des Tumorsuppressor Proteins p53 beeinflussen, indem E6 an den p53 Ko-Aktivator p300/CBP oder die Histon Acetyltransferase hADA3 bindet, wodurch diese degradiert werden (Patel et al. 1999; Kumar et al. 2002). So wird die Transkription p53-abhängiger Proteine inhibiert. Die prominenteste Funktion des HR HPV E6 Proteine ist jedoch die Inhibition der Apoptose durch Degradation von p53 (Werness et al. 1990). E6 bildet einen Komplex mit p53 und der Ubiquitin-Ligase E6-AP (E6 associated protein) was zur Ubiquitinierung von p53 und zu dessen proteasomalen Abbau führt (Scheffner et al. 1990; Scheffner et al. 1993). Dadurch kommt es zur Aufhebung der Zellzykluskontrolle an den Übergängen G1/S und G2/M, wodurch die virale Replikation in differenzierenden Keratinozyten aufrecht erhalten werden kann. Gleichzeitig führt die Deregulation des Zellzyklus zur Anhäufung von Mutationen und kann damit zur genetischen Instabilität führen (Fehrmann and Laimins 2003). Diese kann zusätzlich durch Beeinträchtigung des DNA Reparaturapparates verursacht werden, die auch für kutane HPV Typen nachgewiesen werden konnte. So interagiert bspw. E6 von HPV1, 8 und 16 mit dem Basenexzisionsreparatur-Protein XRCC1 (Iftner et al. 2002) und HPV5 und 18 E6 sind in der

Lage die Reparatur UVB-induzierter Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere zu beeinträchtigen (Giampieri and Storey 2004).

Es konnte gezeigt werden, dass E6 auch in p53-Null Mäusen die Apoptose inhibieren kann (Pan and Griep 1995). Durch Interaktion mit TNFR (tumor necrosis factor receptor), FADD (Fas associated death domain) und der Effektor Caspase-8 führen E6 Proteine der genitalen HR HPV zur Inhibition der extrinsischen Apoptose. Inwiefern andere HPV Typen diesen Signalweg deregulieren, ist noch nicht vollständig geklärt. Im Falle der intrinsischen Apoptose hingegen konnte eine Degradation des pro-apoptotischen Proteins Bak für HPV Typen des Genus alpha aber auch des Genus beta gezeigt werden (Jackson et al. 2000; Howie et al. 2009). Infolgedessen wird die Ausschüttung Apoptose induzierender Faktoren wie AIF (apoptosis inducing factor), Cytochrom *c* und Omi verhindert (Leverrier et al. 2007; Underbrink et al. 2008). Darüber hinaus konnte in HPV16-E6 exprimierenden Zellen eine gesteigerte Expression des anti-apoptotischen Bcl-2 gezeigt werden (Du et al. 2004). Zusätzlich kann HPV16-E6 die Expression von Apoptose Inhibitoren wie IAP (inhibitor of apoptosis) (Yuan et al. 2005) und Survivin (Borbely et al. 2006) induzieren. HPV5-E6 und HPV8-E6 exprimierende Keratinozyten hingegen zeigen einen verminderten Spiegel des pro-apoptotischen Proteins Bax (Struijk et al. 2008). Auf diese Weise blockiert das E6 Protein nicht nur multiple apoptotische Stimuli, sondern verhindert auch eine Kreuzaktivierung der Signalwege.

Eine weitere Möglichkeit zur Immortalisierung von Keratinozyten ist die Steigerung der Telomerase Aktivität. Das E6 Protein der HR HPV Typen aktiviert die Transkription der Telomerase in Abhängigkeit von E6-AP und Interaktion mit c-MYC und moduliert zusätzlich die Aktivität von transkriptionellen Repressoren (upstream stimulating factor 1 und 2) und Aktivatoren (MYC/MAX, SP1) sowie nukleären Transkriptionsfaktoren (X box-binding protein = NFX 1-91), die alle an den Promotor der Telomerase binden und dessen Aktivität regulieren. Zusätzlich kann das E6 der HR HPV Typen zur Acetylierung des Telomerase Promotors führen, was ebenfalls in einer Aktivierung resultiert. Darüber hinaus steigert es die Translation der Telomerase, indem es mit NFX 1-123, einer Splicevariante des NFX 1-91, und zytoplasmatischen Poly(A) bindenden Proteinen interagiert, die die mRNA stabilisieren (Howie et al. 2009).

HPV8-E6 übt außerdem einen regulatorischen Einfluss auf die virale Transkription aus, indem es den frühen Promotor aktiviert. Durch Kooperation mit E2 und direkte Bindung an p300 kann auch der späte Promotor durch E6 aktiviert werden (Müller-Schiffmann et al. 2006).

1.7.3.2. E7

Das ca. 100 AS große E7 Protein kommt in infizierten Zellen überwiegend im Zellkern vor (Smotkin et al. 1989). Eine der drei konservierten Regionen (CR = conserved region), CR2, enthält ein LXCKE Motiv, das die Bindung an Proteine der Retinoblastoma (Rb) Tumorsuppressor Familie (pRb, p107, p130) ermöglicht (Dyson et al. 1989; Dyson et al. 1992) was zu deren Ubiquitin-abhängigem Abbau führt. HR HPV besitzen eine 10-fach höhere Affinität für das pRB als NR Typen (Münger et al. 1989).

In ruhenden Zellen ist pRB hypophosphoryliert und mit dem Transkriptionsfaktor E2F assoziiert. Zur S-Phase hin wird es durch den Cyclin D / CDK4/6 - Komplex hyperphosphoryliert, was zur Freisetzung von E2F führt, wodurch der Übergang von der G1 zur S-Phase ermöglicht wird. Zusätzlich beeinträchtigt E7 die Funktion der zyklinabhängigen Kinase Inhibitoren p21^{CIP1} und p27^{KIP1}, die die Replikation inhibieren (Münger et al. 2001). So werden die Zellen in die replikative S-Phase geführt und die virale vegetative Replikation ermöglicht. Ein unkontrollierter Zellzyklus führt auch hier zur Anhäufung somatischer Mutationen und daraus resultierender genetischer Instabilität. Neben der durch Degradation vermittelten Freisetzung von E2F kann E7 auch direkt an E2F-1 binden und damit die E2F-1 abhängige Gentranskription aktivieren. Auch diese Bindung erfolgt bei HR HPV mit einer höheren Affinität verglichen zu NR Typen (Hwang et al. 2002). Eine Modulation der Gentranskription durch E7 kann auch über Bindung an den Faktor Mi2β und damit indirekt über die Histondeacetylase HDAC-1 erfolgen. Mutierte E7 Proteine, die nicht mehr Mi2β aber immer noch pRB binden können, sind nicht mehr in der Lage, den Zellzyklus Arrest zu überwinden (Brehm et al. 1999).

Das Rb Protein p130 spielt eine Rolle bei der Zelldifferenzierung, an die der virale Lebenszyklus gekoppelt ist. Sowohl HR als auch NR HPV-E7 binden an p130 und führen zu dessen Abbau (Zhang et al. 2006), was darauf hindeuten könnte, dass diese Degradation generell notwendig ist, um den viralen Vermehrungszyklus aufrechtzuerhalten.

Beta HPV Typen können ebenfalls pRB binden, jedoch mit einer geringeren Affinität als HR HPV. Trotzdem beobachtet man niedrige pRB Spiegel (Akgül et al. 2007). Zudem konnte für HPV8-E7 exprimierende Raft Kulturen ein invasiver Phänotyp demonstriert werden, was auf ein onkogenes Potential des E7 Proteins bei der kutanen Karzinogenese schließen lässt (Akgül et al. 2005).

1.8. Transgene Mausmodelle

Für HPV16 wurden vor Längerem verschiedene transgene Mausmodelle etabliert. Drei davon exprimieren die Transgene unter der Kontrolle des humanen Keratin14 (K14) Promotors. HPV16-GFR transgene Mäuse, die die **gesamte frühe Region** exprimieren, entwickeln spontan multiple Läsionen an epidermalen und mukosalen Lokalisationen, die sich innerhalb eines Jahres ausgehend von milden Hyperplasien bis hin zu PEK entwickeln können (Arbeit et al. 1994). HPV16-E6 Mäuse weisen ebenfalls hyperproliferative Hautläsionen auf, die sich meistens zu malignen Hauttumoren weiterentwickeln (Song et al. 1999). Im Gegensatz dazu entwickeln sich hyperproliferative Hautläsionen, die auch bei HPV16-E7 Mäusen beobachtet wurden, meist zu benignen Hauttumoren (Herber et al. 1996).

Bis dato wurden nur wenige transgene Mäuse etabliert, die für Gene kutaner HPV Typen kodieren. HPV1 ist mit der Entstehung palmarer und plantarer Warzen assoziiert. Transgene CBA/C57B1 Mäuse, die die GFR von HPV1 unter der Kontrolle des K6 Promotors exprimieren, zeigten lediglich einen vorübergehend epidermal hyperproliferativen Phänotyp (Tinsley et al. 1992). Transgene FVB/n Mäuse, die die HPV38 Onkogene E6 und E7 unter der Kontrolle des Rinderhomologs des humanen K10 Promotors exprimieren, entwickelten während einer Lebensspanne von 2 bis 2.5 Jahren keine spontanen Papillome. Erst nach einer Behandlung mit 7,12-Dimethylbenz[a]anthracen und 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (DMBA/TPA) nach dem Zweistufen-Karzinogenesemodell entwickelten diese transgenen Tiere Hautveränderungen innerhalb von 7-8 Wochen. Drei von acht Tieren entwickelten PEK (Dong et al. 2005). Ebenso bekommen SKH-hr1 Mäuse, die die HPV20 und HPV27 Onkogene E6 und E7 unter der Kontrolle des K10 Promotors exprimieren, innerhalb von zwei Jahren keine spontanen Tumore (Michel et al. 2006). HPV27 ist mit benignen Hautveränderungen assoziiert (Chan et al. 1997), wohingegen HPV20 vermehrt in PEK gefunden wird (de Villiers et al. 1997). Erst nach dreimaliger UV-Bestrahlung (90 – 200 mJ/cm²) beginnend in einem Alter von sechs Wochen entwickelten sich in zwei HPV20 und einem HPV27 transgenen Tier PEK. Darüber hinaus bildeten sich UV-induzierte Hautveränderungen im Vergleich zu HPV20 transgenen Mäusen in FVB/n wildtyp (wt) Kontrolltieren aber auch in den HPV27 transgenen Mäusen häufiger und früher zurück.

Um die Rolle von HPV8 bei der Hautkarzinogenese *in vivo* zu untersuchen, wurden in unserem Institut HPV8 transgene Mauslinien etabliert, die die **gesamte frühe Region** von HPV8 (HPV8-GFR, umfasst die Gene E1 / E2 / E4 / E6 / E7) oder nur - E6 bzw. - E2 exprimieren (Schaper et al. 2005; Pfefferle et al. 2008; Marcuzzi et al. 2009). Die Expression der Transgene wird durch den humanen K14 Promotor reguliert, welcher die Expression der

Transgene im Stratum basale, den Haarfollikeln und in geringerem Ausmaß im Stratum spinosum ermöglicht. Nahezu alle HPV8-GFR und -E6 transgenen Mäuse entwickelten spontan Papillome, Dysplasien der Haut und in 6% der Fälle PEK. Dabei konnte beobachtet werden, dass Hautveränderungen vornehmlich dorsal caudal auftraten und männliche Tiere diese früher und gehäuft an verletzten Stellen entwickelten, wahrscheinlich infolge von Rankämpfen. Einmalige UVA/B-Bestrahlung (10 J/cm² UVA und 1 J/cm² UVB) oder gezielte Verwundung durch Stanzbiopsien der HPV8-GFR und -E6 transgenen Tiere, die im Bezug auf die Papillomatose eine Phänokopie der HPV8-GFR Mäuse darstellen, führte zu einer synchronisierten Tumorentstehung innerhalb von drei Wochen (Marcuzzi et al. 2009; Hufbauer et al. 2010). UV-Bestrahlung führt zu einer Aktivierung des humanen K14 Promotors (Kinouchi et al. 2002), was in den HPV8-GFR und -E6 transgenen Mäusen in einer gesteigerten Expression des E6 resultierte (Hufbauer et al. 2010). Durch tätowieren einer spezifischen siRNA gegen HPV8-E6 konnte die durch die Verwundung induzierte Papillomentwicklung in HPV8-GFR Mäusen signifikant vermindert werden. Da aus Zellkulturexperimenten bekannt war, dass der E6 knock-down nach ca. 3 Tagen abnimmt, konnte daraus geschlossen werden, dass die erhöhte Expression des HPV8-E6 Gens besonders zu frühen Zeitpunkten entscheidend für die Papillomentwicklung in transgenen Tieren war (Hufbauer et al. 2010). Im Vergleich dazu heilte die Haut der FVB/n wt Kontrolltiere innerhalb der drei Wochen nach UV-Bestrahlung vollständig ab und wies histologisch keine Unterschiede zur unbehandelten FVB/n wt Maushaut auf.

Die HPV8-E2 transgenen Tiere hingegen entwickelten nur in 8% spontane Hautveränderungen und UV-Bestrahlung konnte in 87% der Fälle einen Tumor induzieren. PEK, die durch einen hohen Anteil an Spindelzellen gekennzeichnet waren, entwickelten sich in 2% (Pfefferle et al. 2008).

1.9. Identifizierung zellulärer Zielgene von HPV8

Um den Einfluss der frühen HPV8 Gene auf die zelluläre Genexpression zu untersuchen, wurde in Kooperation mit dem Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ Heidelberg, AG Dr. Angel/Dr. Hess) eine cDNA Micro Array Analyse durchgeführt. Gesamt RNA aus FVB/n wt sowie HPV8-GFR transgener Maushaut wurde isoliert und die synthetisierte cDNA auf eine 70-mer Oligonukleotid Plattform (Mouse Genom V.4.0, Operon) hybridisiert. Beim Vergleich der FVB/n wt mit der HPV8-GFR transgenen Maushaut wurden lediglich 17 zelluläre Gene identifiziert, die laut Array Vorhersage in transgener Maushaut allein durch die Expression der frühen HPV8 Gene dereguliert waren (Tabelle 2). Berücksichtigt wurden

dabei alle Gene, die mindestens eine 2-fache Deregulation aufwiesen. Lediglich für zwei Gene (Desmoplakin und dopachrome Tautomerase) wurde eine signifikant erniedrigte Expression vorhergesagt, während die restlichen 15 Gene einen erhöhten mRNA Spiegel aufweisen sollten.

Tabelle 2: Micro Array Vorhersage. Der Vergleich von unbehandelter FVB/n wt mit HPV8-GFR Maushaut deutete auf eine Deregulation von 17 zellulären Genen in transgener Maushaut hin.

<i>Gen Symbol</i>	<i>Name</i>	<i>x-fache Aktivierung bzw. Repression</i>
Klk6	Kallikrein-6	22
Stfa	StefinA	15
Spr2	Small proline rich proteins	15
Fos11	Fos related antigen 1	14.5
Csrp3	Cysteine and glycine rich protein 3	6.5
Lcn2	Lipocalin-2	5.5
Sfrp4	Secreted frizzled-related sequence protein 4	4.5
Actc1	Actin alpha cardiac	4
SDCBP2	Syntenin-2	3.5
Dusp1	Dual specificity phosphatase 1	3
Chrna1	Cholinergic receptor, alpha polypeptide 1	3
Dpep2	Dipeptidase-2	3
Samhd1	SAM domain and HD domain 1	2.5
Oas-2	Oligoadenylat synthetase 2	2.5
Atp10a	ATPase, class V, type 10a	2.5
Desmoplakin	Desmoplakin	-3
Dct	dopachrome Tautomerase	-5

1.10. Zielsetzung der Arbeit

Durch die Etablierung transgener Mausmodelle konnte gezeigt werden, dass HPV8-GFR und –E6 Mäuse in nahezu 100% der Fälle spontane Papillome entwickeln (Schaper et al. 2005; Marcuzzi et al. 2009). UVA/B-Bestrahlung und gezielte Verwundung führte innerhalb von drei Wochen zur Papillomentwicklung.

Ziel dieser Arbeit war es, die Expressionspiegel der in Tabelle 2 aufgelisteten Gene in FVB/n wt und HPV8-GFR transgener Maushaut vor und nach UV-Behandlung zu untersuchen. Hierzu sollte RNA aus normaler FVB/n wt, normaler HPV8-GFR Haut und aus zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach UV-Bestrahlung entnommenen Hautbiospien isoliert werden. Diese sollte anschließend in der quantitativen RT-PCR (qRT-PCR) eingesetzt werden, um die im Micro Array gewonnenen Daten zu verifizieren. Zur Standardisierung der qPCR Reaktion sollten bestimmte Regionen der einzelnen Gene amplifiziert und in den Vektor *pJET1.2* (Qiagen) kloniert werden. Um weiter den Einfluss der einzelnen HPV8 Onkogene zu untersuchen, sollte auch RNA aus HPV8-E6 und –E2 transgenen Mäusen isoliert und die Expression der Gene mittels qRT-PCR gemessen werden. Für Gene, für die eine Deregulation verifiziert werden konnte, sollte anschließend das Protein-Expressionsmuster in murinen sowie humanen Hautschnitten mittels Immunhistochemie charakterisiert sowie ihre Funktionen in HPV8 Onkogen-exprimierenden humanen Keratinozyten untersucht werden.

2. Materialien

2.1. Mausstämme

<i>Linie</i>	<i>Beschreibung</i>	<i>Referenz</i>
FVB/n wt	Wildtyp Inzuchtstamm	Charles River, Sulzfeld, Deutschland
FVB/n HPV8-GFR	exprimiert alle frühen Gene von HPV8	Schaper et al. 2005
FVB/n HPV8-E2	exprimiert HPV8-E2	Pfefferle et al. 2008
FVB/n HPV8-E6	exprimiert HPV8-E6	Marcuzzi et al. 2009

2.2. Bakterien Stamm

► *Epicurian coli*[®] XL-1 Blue

Genotyp: recA1, end A1, gyr96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac[F'proAB lacqZΔAM15

Tn10(Tet^r)] (Stratagene, La Jolla, USA).

2.2.1. Bakterienmedien

LB-Medium

Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	8 g/l
pH 7.5 mit NaOH	
→ add 1 Liter H ₂ O	

LB-Agar

Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	8 g/l
Bakterienagar	15 g/l
pH 7.5 mit NaOH	
→ add 1 Liter H ₂ O	

Transform Storage Puffer (TBS)

LB-Medium	
Polyethylenglykol (PEG)	10 %
DMSO	5 %
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	10 mM
MgSO ₄	10 mM

2.3. Eukaryonte Zellen

► RTS3b

Eine HPV-negative Keratinozyten-Zelllinie, die aus einem Hautkarzinom eines Nierentransplantatempfängers etabliert wurde. RTS3b Zellen waren in den allerfrühesten Passagen HPV positiv. Der Tumorsuppressor p53 ist nicht mutiert (Purdie et al. 1993).

► HaCaT

Bei dieser Zelllinie handelt es sich um eine spontan immortalisierte, aneuploide Zelllinie, die aus humaner Haut etabliert wurde. Die Keratinozyten-Zelllinie hat ihr Differenzierungspotential beibehalten und zeigt einen transformierenden Phänotyp. Der Tumorsuppressor p53 ist mutiert. Die Zellen sind nicht tumorigen. Über den HPV Status in den allerfrühesten Passagen ist in der Literatur nichts bekannt, heute ist die Zelllinie HPV negativ (Boukamp et al., 1988).

► PM1

Spontan immortalisierte Keratinozyten-Zelllinie, die von der Stirn eines immunsupprimierten Donors etabliert wurde. Trotz verändertem Wachstumsverhalten weisen die PM1 Zellen einen mit primären humanen Keratinozyten vergleichbaren Phänotyp auf. Der Tumorsuppressor p53 ist nicht mutiert (Proby et al. 2000).

► PT67

Dabei handelt es sich um eine Fibroblasten-Zelllinie zur Herstellung von infektiösen, nichtreplikationsfähigen Retroviren. PT67-Zellen haben die gag-, pol- und env-Gene des Moloney-Murine-Leukemia-Virus (MoMuLV) stabil in ihr Genom integriert (Miller and Chen 1996). Die Transfektion eines retroviralen Vektors, der das Verpackungssignal ψ^+ enthält, ermöglicht die Produktion infektiöser aber nicht replikationsfähiger Viren (Retro-XTM System, Clontech, Palo Alto).

► nTERT

Durch Überexpression der Telomerase mittels eines retroviralen Vektors wurde die immortalisierte Zelllinie nTERT aus primären humanen Vorhautkeratinozyten etabliert. Neben der erhöhten Telomeraseaktivität wurde eine veränderte Expression des Inhibitors p16^{INK4} in diesen Zellen beobachtet (Dickson et al. 2000).

► **MDA-MB-231** (HTB-26TM, ATCC[®])

Eine aneuploide Mammakarzinom-Zelllinie, die aus einem Adenokarzinom einer 51-jährigen Patientin etabliert wurde. Die Zellen exprimieren das Onkogen WNT7B.

2.3.1. Zellkultur Medien

<i>Zellen</i>	<i>Kulturmedium</i>
RTS3b	DMEM +10% FKS +1% Penicillin / Streptomycin
HaCaT	RM+
PM1	KGM-2 [®]
PT67	DMEM +10% FKS +1% Penicillin / Streptomycin
nTERT	KGM-2 [®]
primäre humane Keratinozyten	KGM-2 [®]
MDA-MB-231	DMEM +10% FKS +1% Penicillin / Streptomycin
HMEC	Mammary Epithelial Cell Growth Medium [®]

Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) (Invitrogen, Karlsruhe)

mit GlutamaxTM, 4500 mg/l Glukose

ohne Natriumpyruvat

FKS 10 % (Invitrogen, Karlsruhe)

Penicillin 100 units/ml (Invitrogen, Karlsruhe)

Streptomycin 100 µg/ml (Invitrogen, Karlsruhe)

Keratinozytenmedium Rheinwald Medium (RM+) (Freshney and Freshney, 2002)

DMEM 45%

DMEM / Nut Mix F12 (1:1)-Glutamax 45%

FKS 10%

Penicillin-Streptomycin 0,01%

Hydrokortison 0,4 µg/ml

Choleratoxin 10⁻¹⁰ M

Transferrin 5 µg/ml

Triiodothyronin 2 x 10⁻¹¹ M

Adenin 1,8 x 10⁻⁴ M

Insulin 5 µg/ml

Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF) 10 ng/ml

Einfriermedium für Zellen, die in DMEM bzw. RM+ Medium kultiviert wurden:

DMSO 10% (Invitrogen, Karlsruhe)

FKS 90% (Invitrogen, Karlsruhe)

Einfriermedium für primäre Keratinozyten

Cryo-SFM (Promocell, Heidelberg)

2.4. Spenderhaut und organotypische Hautmodelle

Spenderhaut, die für die Herstellung organotypischer Hautkulturen benötigt wurde, wurde von der European Skin Bank, Beverwijk, Niederlande bezogen.

Paraffinschnitte organotypischer Hautmodelle mit nTERT pLZRS, HPV8-E6, -E7 oder -E6/7 exprimierenden Zellen, die auf einer Kollagenmatrix kultiviert wurden, wurden freundlicherweise von M. Feltkamp, Universität Leiden, Niederlande zur Verfügung gestellt.

2.5. Nukleinsäuren

2.5.1. Plasmide

2.5.1.1. Klonierungsvektoren

pJET/Blunt1.2 (3.1 kb)

Blunt-End Klonierungsvektor aus GeneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas, St. Leon-Rot), der mit Eco321 (EcoRV) linearisiert wurde. In diesen Vektor können Inserts von 6 bp bis 10 kb ligiert werden. Ligiert der Vektor ohne entsprechendes Insert, so kommt es zur Expression eines letalen Gens und damit zur Selbstselektion. Ligiert dagegen ein Insert in den Vektor, so wird das letale Gen unterbrochen. Eine Ampizillin-Resistenz ermöglicht die Selektion positiver Klone.

pSuperior.retro.puro (7,3 kb)

Mit Hilfe dieses retroviralen Expressionsvektors können Sequenzen für short interfering RNAs (shRNA) exprimiert werden. Transfektion in die packaging Zelllinie PT67 ermöglicht die Bildung und Sekretion von infektiösen Retroviren, die den Expressionsvektor mit der zu exprimierenden shRNA unter der Kontrolle des H1 RNA Polymerase III Promotors beinhalten. Der so gewonnene infektiöse Überstand kann im Weiteren zur Infektion von primären Keratinozyten verwendet werden. Nach Infektion exprimieren diese stabil die im Expressionsvektor enthaltene shRNA, was durch RNA-Interferenz zu einem stabilen knock-down des Zielgens führt. Eine Puromycin Resistenz ermöglicht die Selektion von positiven Zellen.

2.5.1.2. Retrovirale Expressionsvektoren

pLXSN basierende HPV Expressionsplasmide

Hierbei handelt es sich um auf pLXSN basierende Expressionsvektoren, die die Leserahmen von HPV8-E6, -E7 und -E6/7, HPV1-E6, HPV4-E6, HPV5-E6, HPV16-E6, HPV20-E6 und HPV38-E6 integriert haben (Akgül et al. 2010).

2.5.2. Synthetisch hergestellte Oligonukleotide

Folgende Oligonukleotide (Metabion, Martinsried, Deutschland) wurden HPLC gereinigt in dieser Arbeit eingesetzt:

2.5.2.1. Oligonukleotide für die Sequenzierung

<i>Name</i>	<i>Sequenz 5'→3'</i>	<i>Position</i>
pJETseq	GGAGCAGGTTCCATTCATTG	387 – 406 in pJET1.2/blunt

2.5.2.2. Oligonukleotide für die reverse Transkription

<i>Name</i>	<i>Sequenz 5'→3'</i>
Oligo-dT ₂₃ -Primer	(T) ₂₃ V
Random Nonamers	(N) ₉

2.5.2.3. Synthetische Oligonukleotide für die quantitative PCR

<i>Gen</i>	<i>Forward-Primer Sequenz 5'→3'</i>	<i>Reverse-Primer Sequenz 5'→3'</i>	<i>Position (Gene ID)</i>
Sfta (murin)	CTTAAAAATAAAGGGAGGCCTG	ATCTTCTCCAGAAAGGCCTCT	43-277 nt (NM_025288.2)
Syntenin-2 (murin)	GACAGAACGTCATTGGGCTA	GGGAATAATGGTCAGTGTGATG	802-887 nt (NM_145535.1)
Klk6 (murin)	CTGAGGAGAATCCCAACTGC	TGGTATCTGGGAAGTCACCAT	623-692 nt (NM_001164696.1)
Lcn2 (murin)	CTTCAAATTACCCTGTATGGAAGA	GGGTGAAACGTTCCCTCAGT	484-548 nt (NM_008491.1)
Fosl1 (murin)	GTGCAGAAACCGAAGAAAGG	TTCTCATCCTCCAATTTGTCG	616-684 nt (NM_010235.2)

Sfrp4 (murin)	CTCCTGCCAGTGTCCACATA	ATTTTCAAGAAGCATCATCC	981-1068 nt (NM_016687.3)
Csrp3 (murin)	CTGAGAAGGTCATGGGAGGT	AGGCTCTTCCCACAGATGG	469-541 nt (NM_001198841.1)
Samhd1 (murin)	AGCGGTCAGGATCAATAAAGAG	TGAGCTGCTCTGCAAATTTCT	1750-1814 nt (NM_001139520.1)
Dusp1 (murin)	AGGACAACCACAAGGCAGAC	AACACTCTCCCTCCAGCATC	826-913 nt (NM_013642.3)
Actc1 (murin)	GCTTCCGCTGTCCAGAGA	ATGCCAGCAGATTCCATACC	846-906 nt (NM_009608.3)
Dpep2 (murin)	AGGAGTGTTACCGTGCAACC	GGGTGGAGTAAACTGGTGCT	1250-1331 nt (NM_176913.3)
Chrna1 (murin)	CAGACCAGGAGTCCAATAACG	AGACACACCAGCATAAACACTCC	1242-1335 nt (NM_007389.4)
Oas-2 (murin)	ACCCAGATCCAGAAAAAGAGG	TCAGCTAGAAGATGCCAGCAC	2065-2085 nt (NM_145227.3)
Atp10a (murin)	TGTCTCATCGCACCTATTGC	GGGTTTCTTGGCCAACTG	4127-4237 nt (NM_009728.2)
Dct (murin)	GGCTACAATTACGCCGTTG	CACTGAGAGAGTTGTGGACCAA	1822-1887 nt (NM_010024.3)
Dsp1 (murin)	GCGGAAGAGGAGCTGAGTAG	TCTTCTCTTGGAGGACTCG	5048-5108 nt (NM_023842.2)
HPRT1 (murin)	CCTAAGATGAGCGCAAGTTGAA	CCACAGGACTAGAACACCTGCTAA	798-884 nt (NM_013556)
HPV8E6 (human)	GCAACGTTTGAATTTA	CATGATACAAATGCTTAC	433-655 nt (M12737)
HPV8E2 (human)	AACAGCCACAACAAACCG	AGGACCTGGACCTGGATACG	3410-3586 nt (M12737)
HPRT1 (human)	TGACACTGGCAAAACAATGCA	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT	577-671 nt (NM_000194)
Syntenin-2 (human)	GTGGACGGGCAGAATGTTAT	ATGGAGATTCTGGCCACG	762-821 nt (NM_001199784.1)
Syntenin-1 (human)	TCCAGCAATTTTGTGAGAAGC	GCTCTGGATACAGTCTGGGATAG	231-304 nt (NM_001007067.1)

2.5.2.4. siRNA Duplex

Die Sequenz für die siRNA gegen humanes Syntenin-2 wurde freundlicherweise von Frau Prof. Zimmermann (Universität Leuven, Belgien) zur Verfügung gestellt (Mortier et al. 2005).

Name	Sequenz 5'→3'	Zielgen
sense huSyntenin-2	GATCCCCGCAACGGGCTCCTCACCAATTTCAAGA GAAATTGGTGAGGAGCCCGTTGCTTTTAA	humanes Syntenin-2
antisense huSyntenin-2	GGGCGTTGCCCGAGGAGTGGTTAAAGTTCTCTTT AACCACTCCTCGGGCAACGAAAAATTCGA	humanes Syntenin-2

2.5.3. DNA-und RNA-Längenstandards

- 6 x DNA Loading Dye (Fermentas, St. Leon-Rot)
- 6 x Orange DNA Loading Dye (Fermentas, St. Leon-Rot)
- GeneRuler™ 100bp DNA Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot)
- GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot)
- GeneRuler™ DNA Ladder, Low Range (Fermentas, St. Leon-Rot)

2.5.4. Sonstige Nukleinsäuren

- Desoxyribonukleotid Triphosphate (Fermentas, St. Leon)
- Hefe tRNA (Sigma-Aldrich, Steinheim)

2.6. Enzyme

Fast Digest Restriktionsenzyme wurden von der Firma Fermentas (St. Leon, Deutschland) bezogen.

- Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP) (Fermentas, St. Leon-Rot)
- Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe)
- Proteinase K (PEQLAB, Erlangen)
- T4-DNA Ligase (Fermentas, St. Leon-Rot)
- Taq DNA Polymerase (Fermentas, St. Leon-Rot)

2.7. Antikörper

<i>Antikörper (Firma)</i>	<i>Western Blot Blocklösung</i>	<i>IHC-P Blocklösung</i>	<i>IHC-F Blocklösung</i>
GAPDH (Abcam)	1:1000 5% BSA	-	-
StefinA (Abcam)	1:10.000 5% Milch	1:8000 1:1 PS/PBS / -CB	-
Syntenin-2 (ProteinTech)	1:1000 5% Milch	1:250 1:1 PS/PBS / -CB	1:100 10% FKS
Syntenin-1 (Abcam)	1:1000 5% Milch	-	-
PCNA (Abcam)	1:500 5% Milch	1:1000 1:1 PS/PBS / -CB	-
HPV8E2 (Janet Brandsma)	-	1:500 1:1 PS/PBS / +CB	-
Involucrin (Abcam)	1:1000 5% Milch	-	-
anti-rabbit (Darko)	1:2000 5% Milch	-	-
anti-mouse (Darko)	1:2000 5% Milch	-	-
Alexa Flour 488 anti-rabbit (Invitrogen)	-	-	1:800 10% FKS
anti-guineapig-POD (Janet Brandsma)	-	1:1000 PBS	-

PS = Pferdeserum / -CB = ohne Zitratpuffer Behandlung / +CB = mit Zitratpuffer Behandlung

2.8. Kits und spezielle Reagenziensysteme

2.8.1. RNA Präparation

- DNase I, RNase-free (Fermentas, St. Leon-Rot)
- miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden)
- Omniscript RT Kit (Qiagen, Hilden)
- QIAshredder (Qiagen, Hilden)
- RiboLock™ RNase Inhibitor (Fermentas, St. Leon-Rot)

2.8.2. DNA Präparation

- DirectPCR Lysis Reagent (Tail) (PEQLAB, Erlangen)
- GeneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas, St. Leon-Rot)
- QIAprep 8 Mini- und Maxiprep Kit (Qiagen, Hilden)
- QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden)

- QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden)
- QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden)
- DyeEx 2.0 Spin Kit (Qiagen, Hilden)

2.8.3. Transfektionsreagenzien

- FuGENE^{TM6} (Roche, Mannheim)

2.8.4. Immunologische / Immunhistochemische / Immunzytochemische Analysen

- DAPI (Merck, Darmstadt)
- DePeX (Serva Electrophoresis, Heidelberg)
- EDC Detektionskit (GE Healthcare, München)
- Immunomount (Thermo Scientific, Pittsburgh, USA)
- Hämatoxylin (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Liquid DAB Concentrated Substrate Pack (BioGenex, San Ramon, USA)
- Vectastain Elite ABC Kit (Universal) (Vector Laboratories, Burlingame, USA)

2.9. Lösungen und Puffer

Alle angesetzten Puffer und Lösungen wurden mit Wasser aus einer MilliQ Wasseraufbereitungsanlage (Millipore, Schwalbach) angesetzt.

Puffer

PBS (Phosphate Saline Buffer)

NaCl	137.0 mM
KCl	2.7 mM
Na ₂ HPO ₄	4.3 mM
KH ₂ PO ₄	1.4 mM

1 x TBS-T

Tris-Cl	10 mM
NaCl	150 mM
Tween20	0.05 %
→ pH = 8	

1 x TE

Tris	10 mM
EDTA	1 mM

1 x TAE

Tris	40 mM
EDTA	1 mM
→ pH = 8	

Cytidin-TAE

5 mM Cytidin in 1 x TAE

EthidiumbromidEthidiumbromide 0.5 µg/ml in H₂O***Puffer für Proteinanalysen*****RIPA Puffer**

NaCl	150 mM
Tris	50 mM
Nonidet-P40	1 %
Na-Deoxychelate	0.05 %
SDS	1 %

SDS (Sodium Dodecyl Sulfat Polyacrylamid) -Laufpuffer

Tris Base	30 g
Glyzin	144 g
SDS	10 g
→ add 1 Liter H ₂ O	

10 x Transferpuffer

Tris Base	30 g
Glyzin	144 g

1 x Transferpuffer

10 x Buffer	100 ml
Methanol	200 ml
H ₂ O	700 ml

Stripping Puffer

Tris pH 6.7	62.5 mM
SDS	2 %
β-Mercaptoethanol	100 mM

2.10. Chemikalien und Reagenzien

Alle verwendeten Chemikalien und Reagenzien waren mit dem Reinheitsgrad „zur Analyse“ gekennzeichnet und wurden sofern nicht anders vermerkt von folgenden Firmen bezogen: AppliChem (Darmstadt, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Qiagen (Hilden, Deutschland).

- Acrylamid (Roth, Karlsruhe)
- Agarose (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Ammoniumpersulfat (Biomol, Hamburg)
- Ampizillin (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- β -Mercaptoethanol (AppliChem, Darmstadt)
- 5-Aza-2-Deoxycytidin (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Chloroform (Roth, Karlsruhe)
- Dimethylformamid (Fluka, Buchs, Schweiz)
- Dimethyl Sulfoxid (DMSO) (AppliChem GmbH, Darmstadt)
- Ethidiumbromid (Roth, Karlsruhe)
- Fötales Rinderserum (FKS) (Invitrogen, Karlsruhe)
- Formaldehyd (Merck AG, Darmstadt)
- Formamid (Fluka, Buchs, Schweiz)
- Glukose (Roth, Karlsruhe)
- Glyzin (Roth, Karlsruhe)
- Ketamin (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Polybren (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Polyethylenglycol (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- RNALater (Qiagen, Hilden)
- Sodium Dodecyl Sulfat Polyacrylamid (SDS) (Roth, Karlsruhe)
- Sybr Green I (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- TEMED (BioRad, München)
- Tween20 (Roth, Karlsruhe)
- Xylazin (Sigma-Aldrich, Steinheim)

Laborbedarf aus Plastik wurde von den Firmen Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Falcon BD (Heidelberg, Deutschland), Greiner (Solingen, Deutschland), Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) sowie TPP (Trasadingen, Schweiz) bezogen.

2.11. In dieser Arbeit verwendete Geräte

- Axiophot Mikroskop (Zeiss, Göttingen)
- Biorupter (Diagenode, Liege, Belgien)
- elektrischer Rasierer (Wella, Karlsruhe)
- Fluoreszenzmikroskop Leica DMI 6000 B (Leica, Wetzlar)
- LightCycler System (Roche Diagnostics, Mannheim)
- Mixer Mill 301 (Qiagen, Hilden)
- PCR T3 Thermocycler (BioMetra, Göttingen)
- UV Lampe 801 (Waldmann, Villingen-Schwenningen)
- Nano-Drop (PEQLAB, Erlangen)

3. Methoden

3.1. Mausarbeiten

3.1.1. UV-Bestrahlung von Mäusen

Für die Bestrahlungsversuche wurden ausschließlich 5 Wochen \pm 1 Tag alte Mäuse verwendet. Zu Beginn der Bestrahlungsexperimente wurde ein Narkosemittel injiziert, das sich aus 100 mg des Analgetikums Ketamin-Hydrochlorid sowie 20 mg des Sedativums Xylazin-Hydrochlorid zusammensetzte. Anschließend wurde auf dem Rücken der Tiere eine etwa 4cm² große Fläche mit Hilfe eines elektrischen Rasierers rasiert. Die Tiere wurden mit einer UV-impermeablen Alufolie abgedeckt und die rasierten Stellen ausgespart. Die UV-Bestrahlung erfolgte mit Hilfe der UV Lampe 801 in einer Dosis von 10 J/cm² UVA und 1 J/cm² UVB (Marcuzzi et al. 2009). Nach Bestrahlung wurden die Tiere zu definierten Zeitpunkten durch zervikale Dislokation euthanisiert (Abb.4). Die bestrahlte Fläche wurde in vier Teile geteilt und für die einzelnen Versuche entsprechend den Protokollen präpariert. Für histologische und immunhistochemische Untersuchungen wurde ein Teil der Biopsie über Nacht in 4% Paraformaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet. Ein zweiter Teil wurde kryokonserviert und bei -80°C gelagert. Ein dritter Teil wurde für Proteinanalysen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und ebenfalls bei -80°C gelagert. Ein vierter Teil der Biopsie, der RNA Analysen dienen sollte, wurde sofort in RNALater inkubiert. Zusätzlich wurden Biopsien von nicht bestrahlter Haut als Kontrollen entnommen.

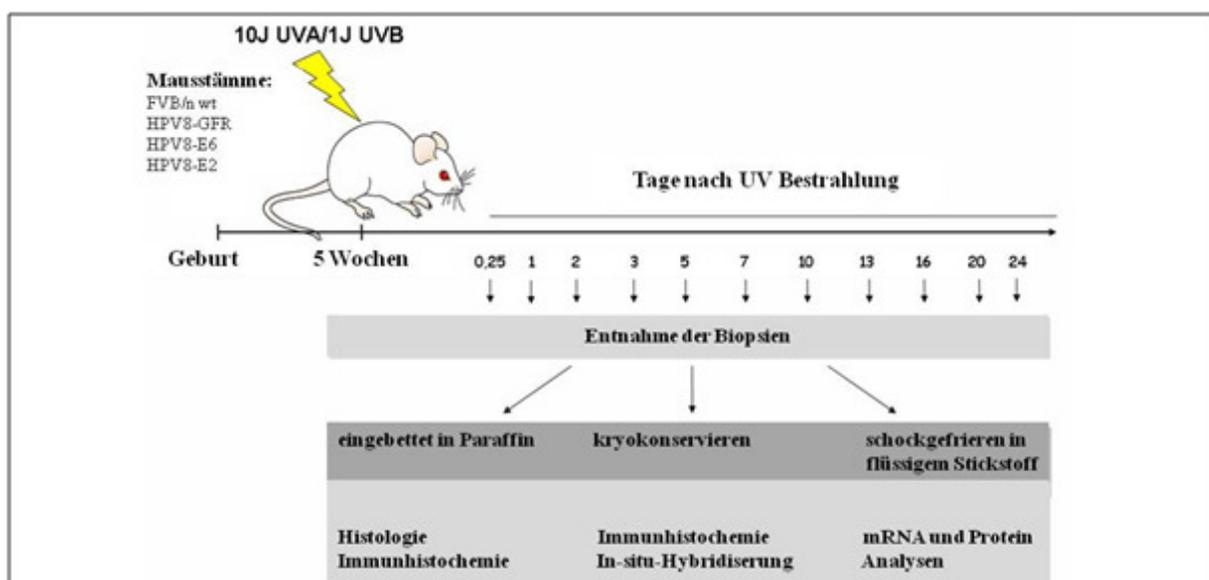


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Bestrahlungsprotokolls für Mausversuche. Für jeden aufgeführten Zeitpunkt wurden je sechs FVB/n wt und HPV8-GFR Mäuse einmalig mit UVA/B bestrahlt und Biopsien entnommen. Die Archivierung der Biopsien erfolgte entsprechend den grau unterlegten Angaben.

3.2. Molekularbiologische Methoden

Ausführliche Informationen und zusätzliche Verweise auf die Originalliteratur der nachfolgend beschriebenen molekularbiologischen Methoden sind enthalten in der aktuellen Sammlung in „Molecular Cloning“ (Sambrook et al. 2001).

3.2.1. Bakterienkulturen

3.2.1.1. Herstellung kompetenter Bakterienkulturen (Chung and Miller 1988)

Zu Beginn wurden 20 µl Bakteriensuspension in 5 ml LB-Medium ohne Antibiotikum inokuliert und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am Folgetag wurde die Übernachtskultur in 500 ml LB-Medium ohne Antibiotikum überführt und die Bakterien bei 37°C ca. 4 h inokuliert, bis sie eine Dichte von $OD_{600} = 0.3 - 0.6$ erreicht hatten. Die Bakteriensuspension wurde bei 4°C und 4000 x g für 10 min. sedimentiert. Das Pellet wurde in 1/10 Volumen der Hauptkultur in Transform Storage Buffer aufgenommen und aliquotiert. Die Bakteriensuspension wurde dabei stets auf Eis gehalten. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

3.2.1.2. Kultur und Lagerung von *E. coli*

Plattenkultur: Zur Herstellung einer Plattenkultur wurden 10 µl einer Bakteriensuspension auf eine Agarplatte pipettiert und mit einem sterilen Spatel gleichmäßig verteilt, bis der Nährboden alle Flüssigkeit aufgenommen hatte. Die Inkubation der Agarplatten erfolgte im Brutschrank. Mit Parafilm abgedichtete Plattenkulturen wurden bis zu 8 Wochen bei 4 °C aufbewahrt.

Flüssigkultur: Je nach Größe der Flüssigkultur wurden 2 ml bzw. 200 ml LB-Medium mit der entsprechenden Menge Antibiotikum versetzt. Mit einer ausgeglühten Platinöse wurde von einer Plattenkultur eine einzelne Kolonie übertragen und die Flüssigkultur über Nacht bei 37 °C, 200 x g inkubiert.

Glycerolstocks: Für eine dauerhafte Aufbewahrung von *E. coli* wurde 1 ml einer Übernachtskultur mit Glycerol bis zu einer Endkonzentration von 10% versetzt. Die Lagerung erfolgte in Kryoröhrchen bei -80 °C. Für die Reaktivierung der *E. coli*-Kultur wurde mit einer ausgeglühten Platinöse ein Abstrich vom Glycerolstock entnommen und ausplattiert. Von der erhaltenen Plattenkolonie konnten Einzelkolonien gewonnen werden.

3.2.1.3. Transformation mittels Hitzeschock

Die einfachste Methode zur Transformation von kompetenten Bakterien ist der sog. Hitzeschock. Hierzu wurden 100 µl Bakteriensuspension mit 5-10 ng Plasmid-DNA für 30 min. auf Eis inkubiert und gelegentlich resuspendiert, um eine gleichmäßige Verteilung der DNA zu gewährleisten. Anschließend wurde der Ansatz für 45 sek. im Wasserbad bei 42°C erhitzt und sofort 2 min. auf Eis abgekühlt. Dabei bilden sich kurzfristig Poren in der Zellmembran, die die Aufnahme der Plasmid-DNA ermöglichen. Nach Zugabe von 100 µl LB-Medium + 20 mM Glukose wurde der Ansatz bei 37°C, 600 x g für 1 h im Heizblock inkubiert. Abschließend wurde der Transformationsansatz auf Ampizillin haltigen Agarplatten ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37°C gelagert.

3.2.2. DNA-Techniken

3.2.2.1. Standard Methoden

- DNA-Gelelektrophorese
- Restriktion von DNA
- Dephosphorylierung von DNA-Enden
- DNA-Ligation

3.2.2.2. Plasmidisolation aus Bakterien

Die Aufarbeitung von Plasmiden erfolgte unter Verwendung von Reagenzien der Firma Qiagen mittels der alkalischen Lyse. Je nach Ausgangsvolumen wurde der Qiagen Plasmid Mini Kit bzw. Plasmid Maxi Kit verwendet.

Qiagen Plasmid Mini Kit: Im Standardprotokoll wurden 2 ml Bakterien-Übernachtskultur in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (10 min., 13000 x g). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 250 µl P1-Puffer (4°C) resuspendiert. Durch Zugabe von 250 µl P2-Puffer und anschließendem Schwenken wurden die Zellwände aufgeschlossen und Proteine denaturiert. Der alkalische pH der Lösung bewirkte zudem die Denaturierung der hochmolekularen chromosomalen DNA, nicht aber die der niedermolekularen Plasmid-DNA. Die Inkubation erfolgte maximal für 5 min. bei RT. Durch Zugabe von 350 µl P3-Natriumacetatpuffer und vorsichtigem Schwenken erfolgte die Neutralisation des Lysates. Bei der hohen Salzkonzentration und dem niedrigen pH-Wert präzipitieren die bakteriellen Proteine und Zelltrümmer mit samt der chromosomalen DNA, während die Plasmid-DNA in

nativer Form in Lösung verbleibt (Birnboim and Doly 1979). Die Trennung erfolgte durch Zentrifugation (10 min., 13000 x g). Der plasmidhaltige Überstand wurde anschließend auf eine Silicia-Säule (Qiagen, Hilden) überführt, die bis zu 20 µg DNA binden kann. Waschen mit 500 µl PE Buffer entfernte verbliebene Verunreinigungen. Die Eluation der DNA erfolgte mit 30 µl H₂O.

Qiagen Plasmid Maxi Kit: Bei 200 ml Bakterien-Übernachtkultur-Volumen wurde der Qiagen Plasmid Maxi Kit eingesetzt. Die Volumina der Puffer P1, P2 und P3 sowie die Zentrifugationsschritte wurden nach Herstellerangaben dem größeren Volumen der Bakterien Übernachtkultur angepasst. Der plasmidhaltige Überstand wurde über eine Silicia-Säule aufgereinigt und anschließend mit 100 - 500 µl H₂O eluiert.

3.2.2.3. Spektrometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur Bestimmung des DNA Gehaltes in einer wässrigen Lösung wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen (Absorptionsmaxima der DNA). Durch die Extinktion der Wellenlänge 280 nm (Absorptionsmaxima von Proteinen) wurde zusätzlich der Reinheitsgrad der DNA bestimmt. Der Quotient der beiden optischen Dichten entspricht dem Reinheitsgrad der DNA. Liegt dieser zwischen 1.7-2.0 (OD_{260}/OD_{280}), so entspricht dies einem hohen Reinheitswert. Abweichende Werte deuten auf eine Verunreinigung hin.

3.2.2.4. Sequenzierung

Zur Sequenzierung von Plasmid DNA wurde das BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v1.1 benutzt (T-Mix). Die Analyse erfolgte durch den 16 Kapillar-Sequencer (ABI Prism[®] 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems Hitachi, Foster City, CA, USA). Grundlage dabei ist die Methode des stochastischen Kettenabbruchs. Zunächst wird die DNA-Dopplehelix durch Erwärmen denaturiert. Durch die Anlagerung eines Primers kann einer der komplementären DNA-Stränge durch die DNA-Polymerase verlängert werden. Der T-Mix beinhaltet neben der Polymerase dNTPs (Desoxynukleotide) und ddNTPs (Didesoxynukleotide). Die vier ddNTPs besitzen keine 3'-Hydroxylgruppe. Durch das Fehlen der OH-Gruppe am 3'-Atom kann nach ihrem Einbau in einen DNA-Strang keine weitere Elongation erfolgen. Jedes der vier ddNTPs ist mit einem unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff markiert, der während der Kapillar-Gelelektrophorese mittels Laser angeregt und gemessen wird. Die Abfolgen der Farbsignale, die vom Sequencer ermittelt werden, geben direkt die Sequenz des DNA-Stranges wieder.

Reaktionsansatz:

200 ng Plasmid
 3-10 pmol Sense- oder Antisense-Primer
 2 μ l T-Mix

→ Gesamtvolumen 5 μ l

Amplifikationsprogramm:

94°C 10 sek.

94°C 10 sek.	}	29 Zyklen
Annealingtemperatur 10 sek.		
60°C 3 min.		

4°C ∞

3.2.3. RNA Techniken**3.2.3.1. RNA Isolation**

Zellen: Zur Isolierung von gesamt zellulärer RNA wurden pelletierte Zellen in 700 μ l QIAzol Lysis Reagenz gelöst und mit Hilfe einer Shredder-Säule (Qiagen, Hilden) homogenisiert.

Mausbiopsien: Die Mausbiopsien wurden nach der Entnahme in RNALater gelagert, um die RNA im Gewebe zu stabilisieren. Kurz vor der Isolation wurden die Mausbiopsien in ein steriles 1.5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß mit 700 μ l QIAzol Lysis Reagenz überführt und mit Hilfe einer Stahlkugel in der Kugelmühle Mixer Mill 301 (Qiagen, Hilden) für 10 min. bei 30 Hz homogenisiert. Anschließend wurde beiden Homogenaten 140 μ l Chloroform beigemischt und die Phasen in einem Zentrifugationsschritt (4°C, 12000 x g, 30 min.) getrennt. Der Überstand wurde in ein steriles 1.5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und mit 525 μ l 100% EtOH versetzt. Das Gemisch wurde im Folgenden an eine Silicia-Säule (Qiagen, Hilden) gebunden und mit 350 μ l RWT Puffer gewaschen. Die DNase-Behandlung erfolgte direkt auf der Säule, indem 10 μ l DNase-Solution (Qiagen, Hilden) mit 70 μ l RDD Puffer versetzt und auf die Mitte der Säule aufgetragen wurde. Die Inkubation erfolgte für 20 min. bei RT. Anschließend wurde die Säule ein weiteres Mal mit 350 μ l RWT Puffer sowie

zwei Mal mit 500 μ l RPE Puffer gewaschen. Zum Schluss wurde die Säule in ein steriles 1.5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und die RNA mit 30 μ l H₂O eluiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte am Nano-Drop.

3.2.3.2. Reverse Transkription

Die reverse Transkription erfolgte mit Hilfe des Omniscript Kits nach Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden). Dazu wurden 1 μ g Gesamt-RNA zunächst für 5 min. bei 65°C erhitzt, um Sekundärstrukturen zu lösen und die Zugänglichkeit der RNA für die reverse Transkriptase zu erhöhen. Anschließend wurde die RNA kurz auf Eis abgekühlt und der Reaktionsansatz für die reverse Transkription beigemischt.

Ansatz für die reverse Transkription:

Omniscript	1 μ l
10 x Puffer	2 μ l
dNTPs (5 mM)	2 μ l
Olido-dt ₂₃ -Primer (10 mM)	2 μ l
Nonamere (100 mM)	2 μ l
RNAse-Inhibitor	1 μ l
Gesamt-RNA	1 μ g
H ₂ O	add 20 μ l

Der Ansatz wurde 1.5 h bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung der reversen Transkriptase erfolgte durch einen Hitzeschritt für 10 min. bei 95°C. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

3.2.3.3. RNA-Interferenz

In dieser Arbeit wurde die RNA Interferenz mit Hilfe des retroviralen Vektors pSuperior.retro.puro (OligoEngine, Seattle, USA) in humanen primären Keratinozyten durchgeführt. Im ersten Schritt erfolgte ein Annealing der einzelsträngigen Oligonuklotidsequenzen zu einem kurzen DNA-Doppelstrang. Dieser wurde in einem zweiten Schritt über die Schnittstellen *Bgl II* und *HIND III* in den retroviralen Expressionsvektor pSuperior.retro.puro ligiert.

Ligations Ansatz:

1 μ l Vektor (20 ng)
1 μ l Oligonukleotid-Doppelstrang
1 μ l T4 Ligase
2 μ l Puffer
15 μ l H ₂ O
→ RT über Nacht

Reaktionsansatz:

1 mM	MgCl ₂
je 0.2 mM	dNTPs
0.5 μM	Sense-Primer
0.5 μM	Antisense-Primer
1 U	Taq-DNA-Polymerase
1 x	Taq-Polymerase Puffer
50-200 ng	genomische DNA

→ bidest. H₂O add 20 μl

Reaktionsbedingungen:

3 min.	94 °C erste Denaturierung	}	30 x
30 sek.	94 °C Denaturierung der erzeugten Kopien		
1 min.	variable Annealingtemperatur		
1 min.	72 °C Elongation		
5 min.	72 °C finale Elongation		

3.2.3.5. Echtzeit-PCR

Die Methode der Echtzeit-PCR, im englischen quantitative Real-Time-PCR (qPCR), beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR. Neben der Vervielfältigung eines Templates ermöglicht die qRT-PCR simultan die Quantifizierung der *de novo* amplifizierten DNA-Moleküle schon während der eigentlichen Reaktion. In dieser Arbeit wurde SYBRGreen als interkalierendes Reagenz verwendet. SYBRGreen lagert sich zwischen doppelsträngige DNA, wodurch die emittierte Fluoreszenz des Farbstoffes ansteigt und eine Quantifizierung der von Zyklus zu Zyklus zunehmenden doppelsträngigen DNA Menge ermöglicht. Im Anschluss an die qPCR wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, anhand derer die Fragmentlänge des Amplifikats und damit die Spezifität der PCR bestimmt werden konnte. Hierbei wurde die Temperatur langsam kontinuierlich erhöht (50°C → 95°C), bis bei einer für die Fragmentlänge spezifischen Schmelztemperatur der Doppelstrang denaturiert. Dabei wurde SYBRGreen freigesetzt und die Fluoreszenzzunahme detektiert.

Erstellung der Standardreihe: Für die in Tabelle 2 aufgelisteten Gene wurde je eine Standardreihe für die absolute Quantifizierung erstellt. Hierzu wurde der unter Verwendung der spezifischen Primer (siehe 2.5.2.3.) amplifizierende Genabschnitt in den Vektor *pJET1.2* (Qiagen, Hilden) kloniert und die Standardreihe in 50 ng/μl tRNA ausgehend von 1x10¹⁰/ 2 μl bis runter zu 1x10²/ 2 μl verdünnt und in der qPCR als absoluter Standard eingesetzt. Durch den Quotienten Gen/HPRT1 konnte so die absolute Kopienzahl pro HPRT1 pro Zelle bestimmt werden.

Ansatz:

1 x	Puffer
4 mM	MgCl ₂
1.6 µl	SYBRGreen 1:1000
5 %	DMSO
0.5 µM	Sense-Primer
0.5 µM	Antisense-Primer
2.5 %	BSA
0.2 µM	dNTPs
1 U	Platinum-Taq
2 µl	cDNA (5 ng/µl)

→ bidest. H₂O add 20 µl

Amplifikationsprogramm:

Vorlauf

95°C 60 sek.

Hauptprogramm

95°C 1 sek.

variable Annealingtemperatur 5 sek.

72°C 15 sek.

Schmelzanalyse

95° 15 sek.

70°C 20 sek.

Kühlung

40°C 10 sek.

} 40 x

3.2.3.6. Extraktion von genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien

Zur Identifizierung transgener HPV8-GFR, -8E6 und -8E2 Mäuse wurde den Tieren im Alter von 3 Wochen etwa 0.5 cm der Schwanzspitze entnommen, um daraus die gesamte genomische DNA zu isolieren. Hierzu wurden die Mausschwanzbiopsien in ein 1.5 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt und 180 µl DirectPCR[®] Lysis Reagent Tail (PEQLAB, Erlangen) sowie 10 µl Proteinase K (20 mg/ml) hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 56°C, 600 x g im Heizblock. Die Inaktivierung der Proteinase K erfolgte durch einen Hitzeschritt bei 70°C für 45 min. Anschließend wurden die Proben 1 min. bei 8000 x g zentrifugiert und 100 µl des Überstandes mit 900 µl H₂O verdünnt. Die Verdünnung wurde abschließend in einen qPCR Ansatz mit spezifischen Primern für die HPV8 Onkogene E6 und E2 eingesetzt.

3.2.4. Zellkultur

Die Zellkulturarbeiten der Sicherheitssufe S1 wurden an einer Lamin Air Reinraumwerkbank (Heraeus, Hanau, Deutschland) und S2 Arbeiten an einer Reinraumwerkbank CA/REV4 (Clean Air, Minneapolis, USA) durchgeführt. Alle Gegenstände und Lösungen, die eingesetzt wurden, waren steril filtriert bzw. mit 0.05% Inzidin desinfiziert.

3.2.4.1. Langzeitlagerung und Reaktivierung von Zellen

Die Zellen einer 175 cm² Kulturflasche wurden mit Trypsin abgelöst und sedimentiert (1370 x g, 5 min., RT). Das Zellpellet wurde in FKS mit 10% DMSO resuspendiert, die Zellsuspension in Einfrierröhrchen aliquotiert und bei -150°C gelagert. Zur Reaktivierung wurden die Zellaliquots im Wasserbad aufgetaut und in 9 ml PBS überführt. Anschließend wurden die Zellen erneut sedimentiert (1370 x g, 5 min., RT), in 20 ml Medium aufgenommen und auf 175 cm² Kulturflaschen ausgesät.

3.2.4.2. Kultivierung von Zelllinien

Grundsätzlich wurden die Zellen in Monolayer-Kultur bis zu einer Dichte von ca. 70% kultiviert. Bei der Subkultivierung wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA von der Kulturflasche abgelöst. Die Zellsuspension wurde anschließend mit Medium im gewünschten Verhältnis verdünnt und in neuen Kulturflaschen ausgesät.

Die Kultivierung von humanen primären Keratinozyten erfolgte in KBM-2[®] Medium. Die Passagierung erfolgte bei einer Dichte von 60-70%. Hierzu wurden die Keratinozyten mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA[®] von der Kulturflasche abgelöst. Die Reaktion wurde durch Zugabe von TNS[®] neutralisiert. Anschließend wurden die Zellen sedimentiert (1370 x g, 5 min., RT), in neuem Medium aufgenommen und ausgesät.

3.2.4.3. Transfektion von PT67 Zellen

Die Transfektion von PT67 Zellen erfolgte mit FuGENE^{TM6} Reagenz. Dazu wurde 770 µl serumfreies DMEM Medium und 30 µl FuGENE^{TM6} Reagenz in einem 1.5 ml Eppendorfreaktionsgefäß gemischt und 5 min. bei RT inkubiert. Darauf wurde das Gemisch vorsichtig in ein zweites Eppendorfreaktionsgefäß auf 10 µg DNA getropft und weitere 15 min. bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Lösung vorsichtig auf die Zellen getropft und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am Folgetag erfolgte ein Mediumwechsel.

3.2.4.4. Herstellung rekombinanter Retroviren

Für die Herstellung rekombinanter Retroviren wurde das Retro X-System (Clontech, Palo Alto) verwendet. Retrovirale Vektoren wurden hierzu zunächst in PT67 Zellen transfiziert, die infektiöse aber replikations-defiziente Retroviren produzieren. Diese Retroviren können im Folgenden verschiedene primäre Säugerzellen infizieren und damit ein fremdes Gen in das Genom der Säugerzelle einbringen. Nach Integration in das Genom sich teilender Säugerzellen ist eine stabile Expression des fremden Gens gewährleistet.

Nach Transfektion von PT67 Zellen wurden die positiven Klone nach 14-tägiger Selektion mit G418 (3 µg/µl) bei pLXSN basierenden Vektoren oder Puromycin (0.5 µg/µl) bei pSuperior.retro.puro basierenden Vektoren auf 75 cm² Kulturflaschen expandiert. Zur Gewinnung der Virusüberstände wurde bei einer Zelldichte von 80% das Medium gegen 8 ml frisches Medium ausgetauscht und die Zellen nun bei 32°C und 10% CO₂ inkubiert. Am Folgetag wurden die Überstände gewonnen, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.2.4.5. Infektion humaner primärer Keratinozyten

Die hergestellten rekombinanten Retroviren wurden zur Infektion primärer humaner Keratinozyten verwendet. Primäre humane Keratinozyten wurden einen Tag vor der Infektion in einer Zellzahl von 2×10^5 Zellen in 6 cm Schalen ausgesät. Kurz vor der Infektion wurde das Medium abgesaugt und gegen serumfreies DMEM mit 5 µg/ml Polybren ersetzt. Anschließend folgte eine 10-minütige Inkubation bei 37°C. Die viralen Überstände wurden zwischenzeitlich ebenfalls mit 5 µg/ml Polybren versetzt und nach Absaugen des Präinkubations-Mediums auf die Keratinozyten gegeben. Die Keratinozyten wurden im Folgenden 1h bei 300 x g RT zentrifugiert. Abschließend wurde der Überstand abgesaugt, die Keratinozyten mit PBS gewaschen und mit frischem KGM-2[®] Medium inkubiert. 48 h später wurde die Selektion bei pLXSN basierenden Vektoren mit G418 (3 µg/µl) und bei pSuperior.retro.puro basierenden Vektoren mit Puromycin (0.5 µg/µl) gestartet und positive Klone expandiert.

3.2.4.6. Behandlung von Zellen mit 5-Aza-2-Deoxycytidin

RTS3b, HaCaT und primäre humane Keratinozyten wurden in einer Zellzahl von 1×10^5 auf 6 cm Schalen ausgesät. Anschließend wurden die Zellen für drei Tage mit $10 \mu\text{M}$ 5-Aza-2-Deoxycytidin behandelt, wobei jeden Tag ein Mediumwechsel erfolgte. Als Negativkontrolle wurden Keratinozyten mit der entsprechenden Menge DMSO behandelt, in welchem das 5-Aza-2-Deoxycytidin gelöst wurde. Nach drei Tagen wurden die Zellen trypsiniert und pelletiert. Das Pellet wurde bei -80°C gelagert.

3.2.4.7. Organotypische Hautkulturen (Raft Kulturen)

Zu Beginn wurde menschliche Haut bestehend aus Epidermis und Dermis zweimal in PBS gewaschen und anschließend 10 Tage lang in PBS (600 U/ml Penicillin, $600 \mu\text{g/ml}$ Streptomycin, $250 \mu\text{g/ml}$ Gentamycin, $2,5 \mu\text{g/ml}$ Fungizone) bei 37°C gelagert (Todd et al. 1993). Nach der Inkubation wurde die Epidermis abgeschabt und die Dermis mehrmals in PBS gewaschen. Die so präparierte Dermis wurde im Weiteren in $1,5 \times 1,5 \text{ cm}$ große Quadrate geschnitten und in 6 cm Schalen so positioniert, dass ein Edelstahlring ($\text{Ø} = 1,2 \text{ cm}$) auf das Stratum reticulare (Unterseite der Dermis) gelegt werden konnte. Anschließend wurden primäre humane Fibroblasten geerntet und auf eine Zellzahl von 5×10^5 Zellen / ml eingestellt und je 1 ml in einen Edelstahlring pipettiert. Zuletzt wurde Keratinozytenmedium in die Schale gegeben und das Ganze bei 37°C und 10% CO_2 über Nacht inkubiert.

Am Folgetag wurde das Medium abgesaugt, der Ring entfernt, die Dermis umgedreht und der Ring auf die Papillardermis (Oberseite der Dermis) gelegt. Primäre humane Keratinozyten wurden geerntet und in jeden Ring 3×10^5 Keratinozyten pipettiert. Die Schale wurde wieder mit Keratinozytenmedium benetzt und die 6 cm Schale nun zwei Tage bei 37°C und 10% CO_2 gelagert. Zur Kontrolle wurde die gleiche Anzahl an Keratinozyten in einem 24-Loch inkubiert, das flächenmäßig der Größe des Edelstahlrings entsprach. Waren die Keratinozyten in der Kontrolle konfluent, so wurde die Dermis in 6 cm Schalen auf einem Edeltahlgitter platziert und gerade so viel Keratinozytenmedium in die Schale gegeben, dass die Dermis von unten benetzt war. In den kommenden 14 Tagen wurde an jedem dritten Tag ein Mediumwechsel durchgeführt. Am Tag 14 wurde die Raft Kultur in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet.

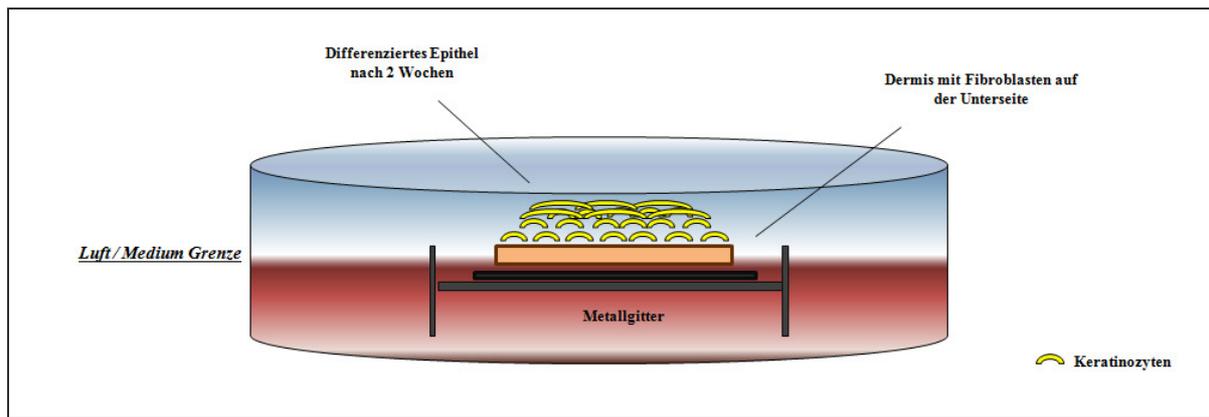


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Raft Kultur. Keratinozyten wurden auf humaner Dermis ausgesät. Sobald die Keratinozyten konfluent waren, wurde die Dermis auf einem Edeltstahlgitter positioniert und die Keratinozyten 14 Tage an der Luft-Medium Grenze kultiviert.

3.2.5. Proteinanalysen

3.2.5.1. Proteinisolation

Aus Zellen: Zellpellets wurden bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Das aufgetaute Zellepellet wurde je nach Größe in 100 - 400 μl RIPA Puffer mit 1 mM PMSF und 1 x Proteaseinhibitor resuspendiert und 30 min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben im Biorupter 2x für jeweils 5 min. sonifiziert.

Aus Mausbiopsien: Nach Entnahme der Hautbiopsien wurden die Proben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Proteinisolation bei -80°C gelagert. Kurz vor der Proteinisolation wurden die Proben in einem 2 ml Eppendorfreaktionsgefäß in RIPA Puffer mit 1 mM PMSF und 1 x Proteaseinhibitor aufgenommen und mit Hilfe einer Stahlkugel in der Kugelmühle Mixer Mill 301 für 10 min. bei 30 Hz homogenisiert. Anschließend wurden die Proben im Rollinkubator über Nacht bei 4°C lysiert. Am Folgetag erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 30 min. bei 4°C und $12000 \times g$ und der Überstand wurde entnommen. Die Konzentrationsbestimmung des Überstandes erfolgte mit Hilfe des Bio-Rad Protein Assay nach Angaben des Herstellers (BioRad, München).

3.2.5.2. Western Blot Analysen

Die Proben wurden zunächst in SDS-Probenpuffer für 5 min. bei 95°C erhitzt und durch ein SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend luftblasenfrei auf eine Nylonmembran (GE Healthcare, München) zwischen zwei Schwämmen und einer doppelten Lage Wattmanpapier aufgelegt und die Proteine bei 30 V ÜN auf die Nylonmembran geblottet. Die Membran wurde am Folgetag für 1 h in Blocklösung (5% Magermilch oder 5% BSA gelöst in

TBS-T) geschüttelt, um unspezifische Bindungen auf der Membran abzusättigen. Der Primärantikörper wurde im nächsten Schritt in der für den Antikörper entsprechenden Verdünnung auf die Membran gegeben und bei 4°C über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurde die Membran 3 x 5 min. in TBS-T gewaschen. Darauf folgte eine Inkubation mit dem peroxidasegekoppelten Sekundärantikörper in einer 1:2000 Verdünnung für 1 h bei RT. Nicht gebundene Antikörper wurden durch 3 x 5 min. in TBS-T Waschen entfernt. Die Membran wurde nach Angaben des Herstellers mit dem ECL-Detektionskit (GE Healthcare, München) behandelt. Abschließend konnte der Protein-Antikörper-Komplex durch die Chemolumineszenz auf einem Röntgenbild nachgewiesen werden.

3.2.5.3. Immunhistochemische Analysen

Das Prinzip der Immunhistochemie beruht auf der Affinität eines Antikörpers zu seinem Epitop, Antigen-Antikörper-Reaktion. In dieser Arbeit wurde die indirekte Methode der Immunhistochemie angewandt. Dabei wird im ersten Schritt ein Primärantikörper eingesetzt, der sich spezifisch gegen ein Epitop bzw. Antigen richtet. Im zweiten Schritt erfolgt die Inkubation mit einem zweiten Antikörper, dem sekundär Antikörper, der sich wiederum gegen den ersten Antikörper richtet. An den Sekundärantikörper ist dabei ein Enzym gekoppelt, welches in einer abschließenden Enzym-Substrat-Reaktion die Antikörperbindung sichtbar macht. Das in dieser Arbeit verwendete Prinzip beruht auf der hohen Affinität des Glykoproteins Avidin (Hühnereiweiß) zu Biotin. Dabei ist der Sekundärantikörper biotinkonjugiert und richtet sich gegen den Primärantikörper, der im ersten Schritt bereits an sein spezifisches Antigen gebunden hat. Avidin ist an eine Peroxidase konjugiert und besitzt zudem vier Bindestellen für Biotin, was zu einer Verstärkung der enzymatischen Reaktion führt. Die Peroxidase setzt Wasserstoff als Substrat um. Dabei entstehen frei werdende Protonen, die farblose Chromogene in ein farbiges Produkt oxidieren.

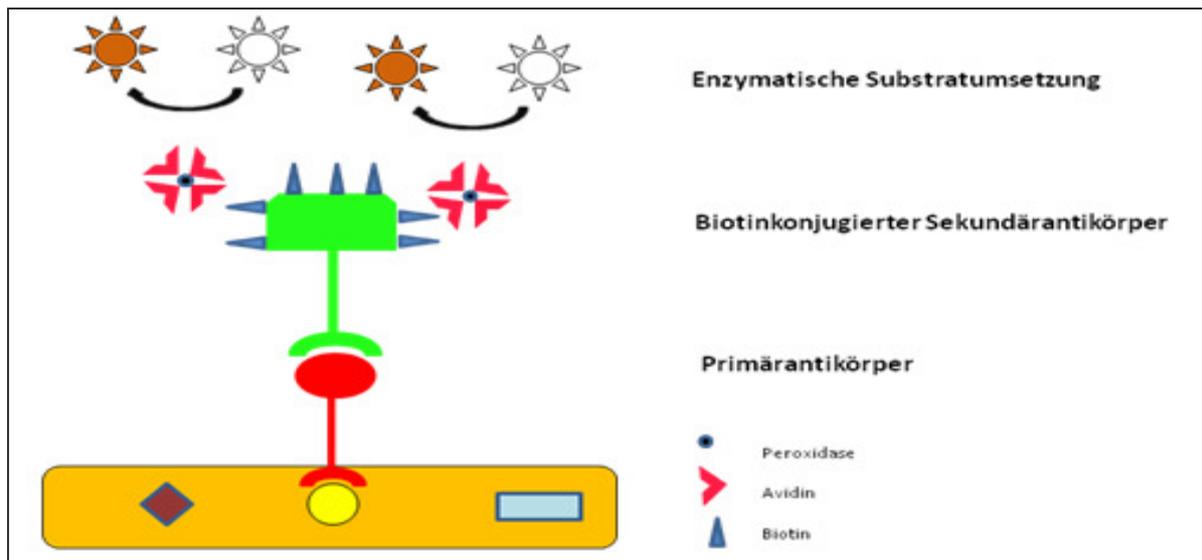


Abbildung 7: Prinzip der Immunhistochemie. Nach Bindung eines spezifischen Primärantikörpers an das Antigen, kann der biotinkonjugierte Zweitantikörper ebenfalls an den Komplex binden. Avidin bindet mit hoher Affinität an Biotin. So katalysiert im nächsten Schritt eine an Avidin konjugierte Peroxidase die enzymatische Reaktion und setzt Wasserstoff zu einem farbigen Produkt um.

Für histochemische Untersuchungen wurden die entnommenen Mausbiopsien ÜN in 4 % Paraformaldehyd fixiert und am Folgetag in PBS bei 4°C gelagert. Anschließend wurden Paraffinblöcke erstellt, von denen 4 µm dicke Hautschnitte auf Adhäsiv-Objektträgern aufgezogen wurden und histologisch durch Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbungen beurteilt. HE-Färbungen wurde in Kooperation mit dem Histologie Labor der Dermatologie des Universitätsklinikums zu Köln durchgeführt. Für Immunhistochemische Untersuchungen wurden die Schnitte in seriellen Schritten zu je 5 min. in Tauchbädern aus 100% Xylol (I) und (II), 100% EtOH, 90% EtOH sowie 70% EtOH entparaffinisiert. Anschließend wurden die Schnitte 20 min. bei RT in 3% H₂O₂ in MetOH inkubiert, um endogene Peroxidasen mit Gewebe abzusättigen. Darauf folgte je nach Antikörper (siehe 2.7.) eine Behandlung in aufgekochtem Zitratpuffer für 2 min. und die Schnitte wurden weitere 15 min. im aufgekochten Zitratpuffer jetzt bei RT inkubiert. Bei diesem Schritt wird das Gewebe permeabilisiert und für den Antikörper zugänglich gemacht. Die Schnitte wurden anschließend in PBS gespült und mit Pferdeserum (50%-ig verdünnt mit PBS) für 1h bei RT inkubiert. Bei diesem Schritt wurden unspezifische Bindungen im Gewebe abgesättigt. Danach folgte eine über Nacht Inkubation mit dem Primärantikörper bei 4°C in der entsprechenden Verdünnung des Primärantikörpers. Am Folgetag wurden die Schnitte 3 x für 5 min. in PBS gewaschen. Die Darstellung der enzymatischen Farbreaktion erfolgte unter Zuhilfenahme des Vectastain Elite ABC (Avidin-Biotin-Complex)-Kits (Vector Laboratories, Lörrach), der einen sekundären Antikörper gewonnen aus Pferd enthält, sowie die

Substratumsetzung unter Verwendung des Liquid DAB Kit (BioGenex, Hamburg) nach Angaben der Hersteller.

3.2.5.4. Immunzytochemie

Die Immunzytochemie beruht wie die Immunhistochemie auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Der Zweitantikörper ist hierbei an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, wodurch die Antigen-Antikörper-Bindung unter dem Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden kann.

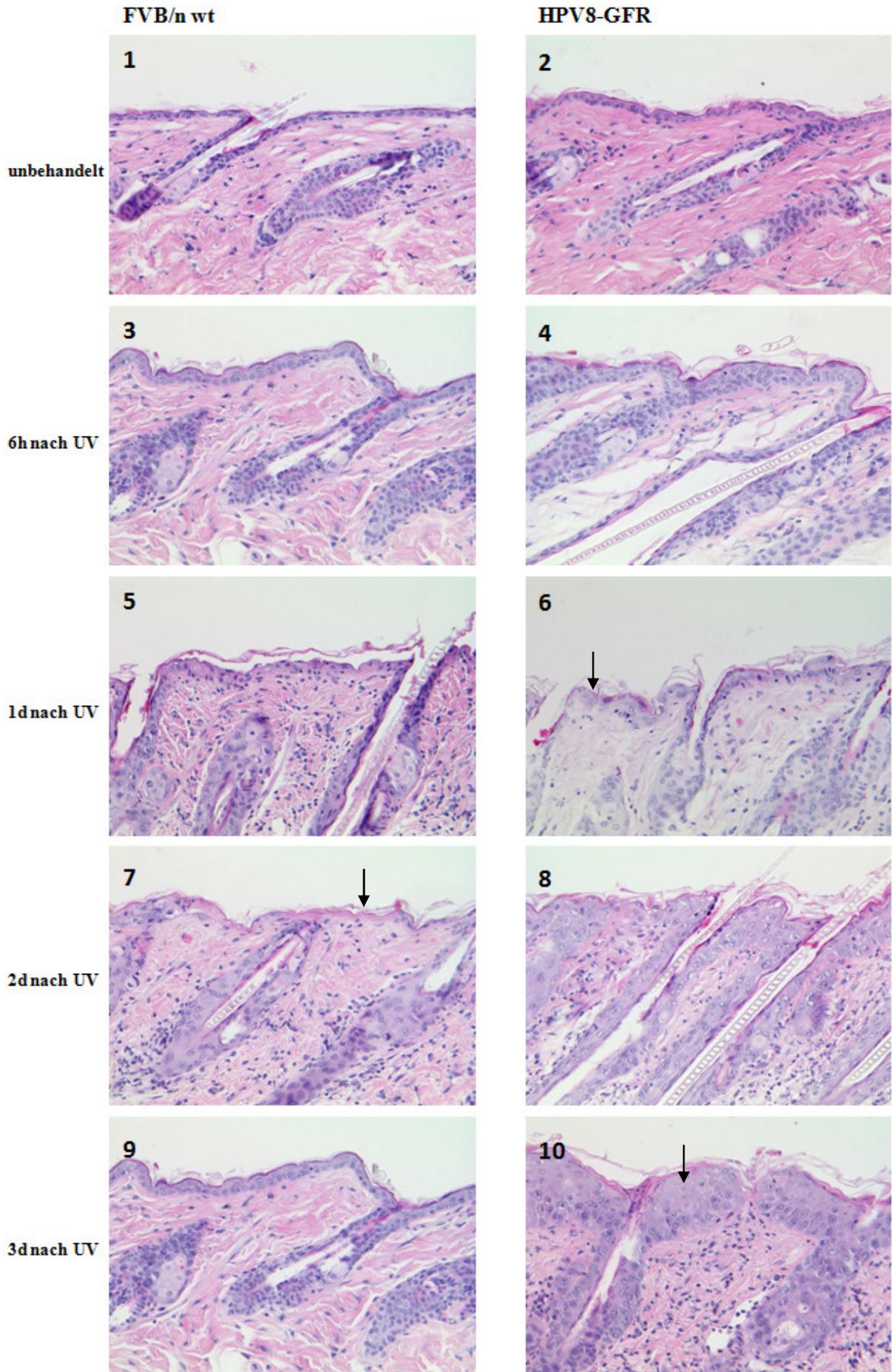
Die Zellen wurden zunächst auf Deckgläschen ausgesät und bis zu einer Dichte von 70 % kultiviert. Danach wurden diese mit PBS gewaschen (2 x 5 min.) und für 10 min. in 4 % Paraformaldehyd fixiert. Anschließend wurde ein 3-minütiger Waschschrift mit PBS durchgeführt. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte durch Inkubation in 0.1% Triton in PBS für 5 min. Darauf folgten weitere Waschschriffe (4 x 3 min. in PBS). Um unspezifische Bindungen abzusättigen, wurden die Zellen für 20 min. in 10% FKS in PBS inkubiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte für 90 min. bei RT. Danach wurden die Zellen kurz in PBS gewaschen und mit dem Sekundärantikörper im Dunkeln für 1h bei RT inkubiert. Anschließend wusch man die Zellen erneut kurz mit PBS. Zuletzt erfolgte eine DAPI Färbung (1:1000) für 2 min. bei RT. Hiernach wurden die Zellen mit bidest. H₂O gewaschen und mit einem Tropfen Immunomount eingebettet.

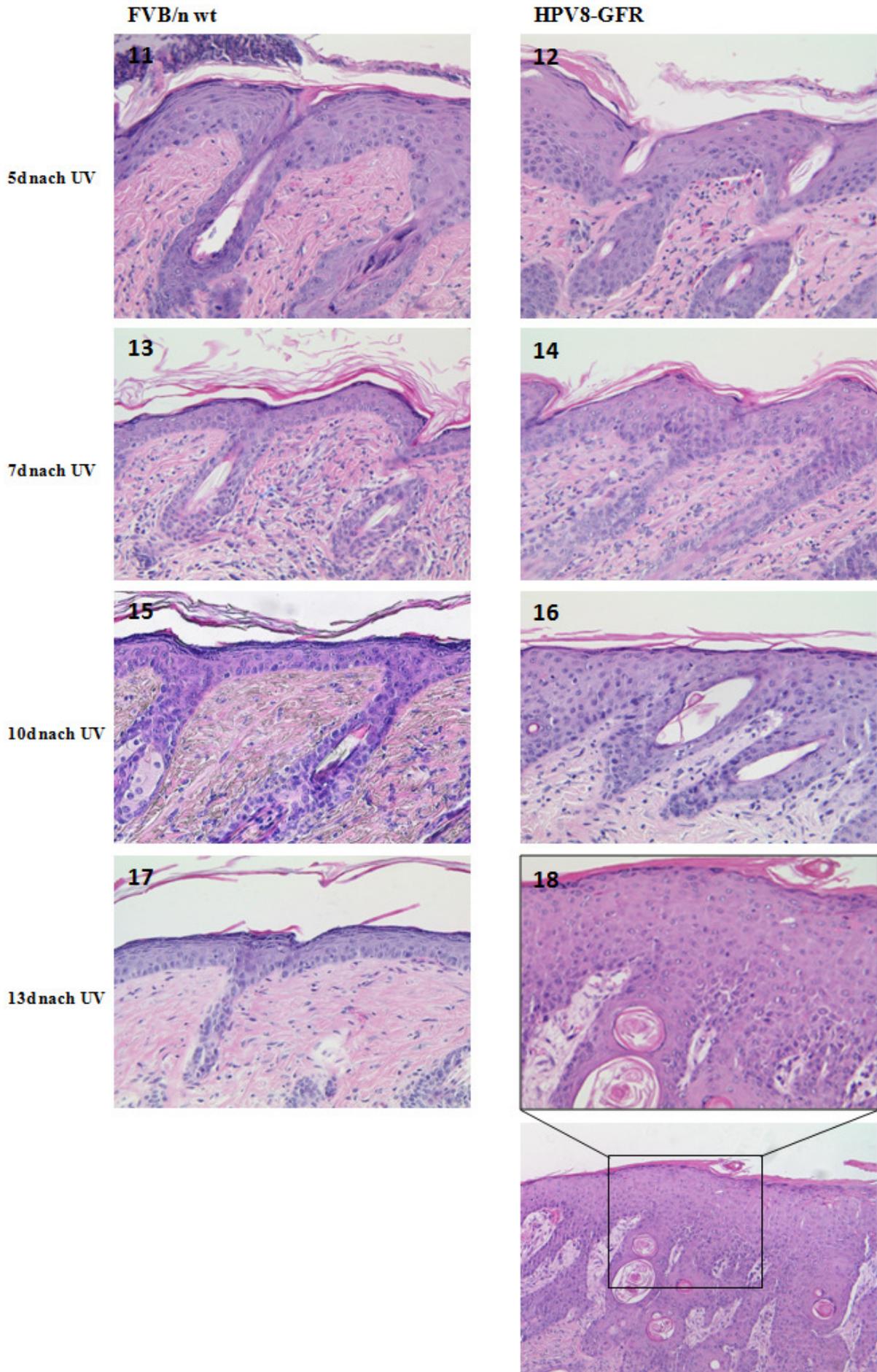
4. Ergebnisse

4.1. Kinetik der UV-induzierten Papillomentwicklung in HPV8-GFR transgenen Mäusen

Wie bereits in der Einleitung unter 1.8. beschrieben, führte eine einmalige UVA/B-Bestrahlung in der HPV8-GFR transgenen Maushaut zur Papillomentwicklung. Um eine detaillierte Dokumentation der epidermalen Veränderungen während der durch UV-Bestrahlung synchronisierten Tumorentstehung in der HPV8-GFR Maushaut im Vergleich zu FVB/n wt Tieren zu ermöglichen, wurden in drei unabhängigen Versuchsreihen je zwei Geschwistertiere aus demselben Wurf im Alter von 5 Wochen \pm 1 Tag einmalig mit UVA/B bestrahlt. Hautbiopsien nicht bestrahlter Geschwistertiere wurden als Kontrolle benutzt. Die Abbildung 8 zeigt exemplarisch die Histologien von HPV8-GFR und FVB/n wt Maushaut vor und zu bestimmten Zeitpunkten nach UV-Behandlung.

Histologisch wies unbehandelte HPV8-GFR transgene im Vergleich zu unbehandelter FVB/n wt Maushaut keine offensichtlichen Unterschiede auf (Abb.8, 1-2). Bereits sechs Stunden nach UV-Bestrahlung (Abb.8, 3-4) war die Epidermis in beiden Mauslinien leicht hyperproliferativ, was sich in einer Zunahme der epidermalen Schichtung äußerte. Größere Unterschiede zwischen der FVB/n wt und HPV8-GFR Epidermis wurden ein bis drei Tage nach Behandlung deutlich (Abb.8, 5-10). Die Reizsetzung durch UV führte zu einer massiven Schädigung der Haut und daraus resultierend zu einer zum Teil weitgehenden Zerstörung der interfollikulären Epidermis (Abb.8, 6-7 durch Pfeile markierte Positionen). Die Regeneration dieser Bereiche wurde durch Keratinozyten bewerkstelligt, die aus den Haarfollikeln einwanderten, und war ca. am dritten Tag nach UV-Bestrahlung abgeschlossen. Im Vergleich erschien dieser Prozess in den HPV8-GFR transgenen Tieren (Abb.8, 9-10) beschleunigt, was vor allem durch die stärkere und schnellere Ansammlung von Keratinozyten am Infundibulum (Übergang zwischen Haarfollikel und interfollikularen Epidermis) deutlich wurde (Abb.8, 10 durch Pfeil markierte Position). Die Epidermis war 5 Tage nach UV-Behandlung in beiden Mauslinien stark hyperproliferativ. Sieben bis 10 Tage nach Behandlung setzte in den FVB/n wt Tieren die Wundheilung ein, was mit einer Abnahme der stark hyperproliferativen Epidermis einherging. Mit Erreichen von Tag 24 war die FVB/n wt Epidermis (Abb.8, 21) völlig zurückgebildet und entsprach histologisch der unbehandelten Maushaut. Im Unterschied hierzu blieb die HPV8-GFR transgene Epidermis stark hyperproliferativ und entwickelte ab Tag 13 papillomatöse Hautveränderungen (Abb.8, 18, 20, 22).





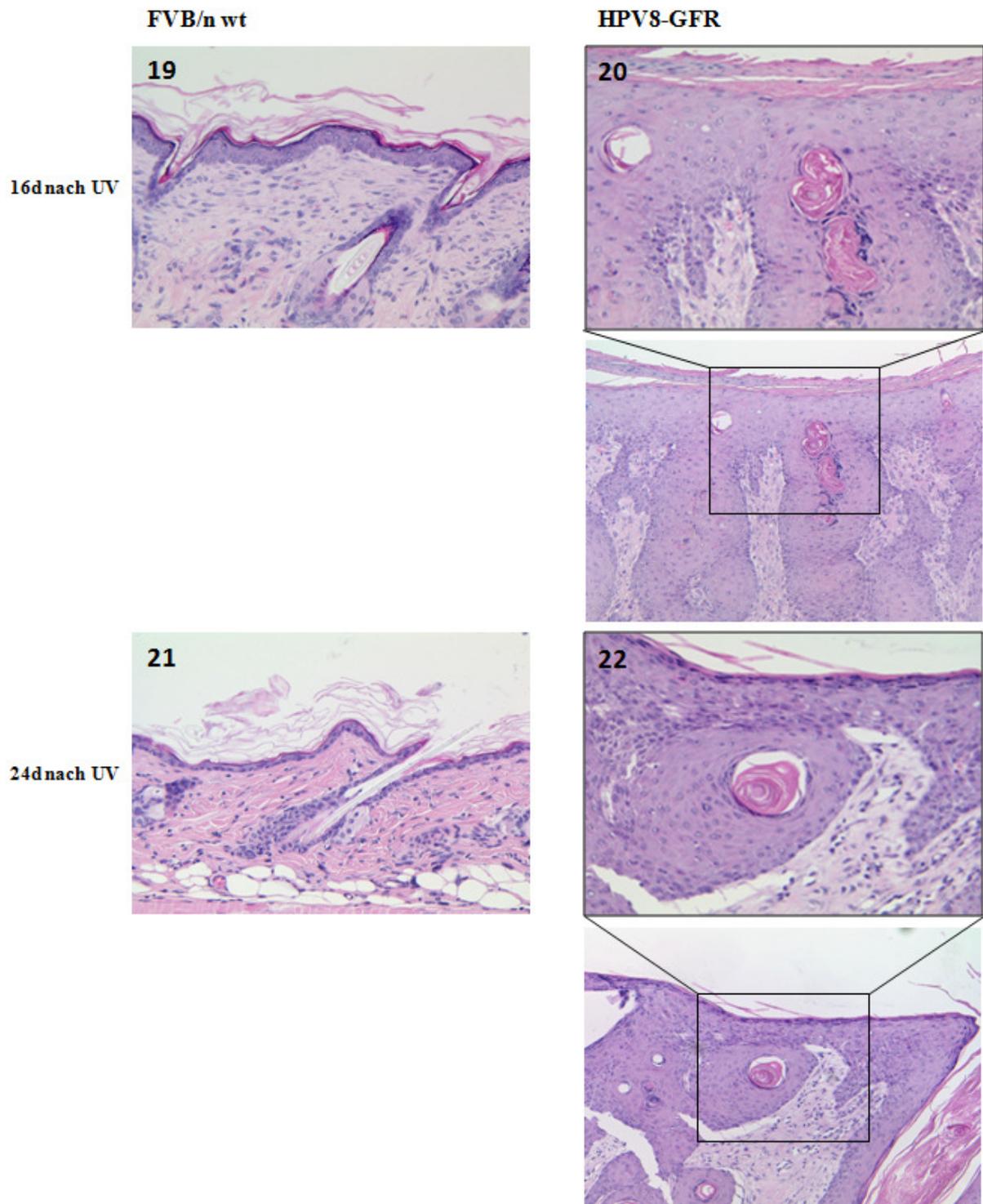


Abbildung 8: Histologien der unbehandelten sowie UV bestrahlten FVB/n wt und HPV8-GFR Maushaut. Dargestellt sind im direkten Vergleich die epidermalen Veränderungen in FVB/n wt links und HPV8-GFR transgener Maushaut rechts. Die Pfeilpositionen in 6+7 zeigen auf interfollikuläre Epidermisbereiche, die durch UV-Bestrahlung zerstört wurden. Die Pfeilposition in 10 veranschaulicht die Keratinozyten-Ansammlung am Infundibulum. Vergrößerung: 200x / Übersichtsvergrößerung: 100x

4.1.2. Charakterisierung der Proliferations- und Apoptosemarker PCNA und PARP in UV bestrahlter FVB/n wt und HPV8-GFR Maushaut

Um die Frage zu klären, ob die Abnahme der epidermalen Zelllagen in FVB/n wt Tieren bzw. die Zunahme in HPV8-GFR Tieren ab Tag 13 mit einer geänderten Apoptose oder Proliferation korrelierte, wurde zunächst immunhistochemisch das Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) nachgewiesen. Dabei handelt es sich um ein zelluläres Protein, dessen Expression eng an die S-Phase des Zellzyklus gekoppelt ist. In unbehandelter FVB/n wt und HPV8-GFR Maushaut konnte eine vergleichbare Intensität der PCNA Färbung im Nukleus der Keratinozyten gezeigt werden (Abb.9, 1-2). An Tag 3 wurden PCNA positive Keratinozyten in der basalen und den suprabasalen Schichten der Epidermis detektiert (Abb.9, 3-4). An Tag 10 waren in der HPV8-GFR Maushaut sowohl basal als auch suprabasal PCNA positive Keratinozyten zu finden, während in der FVB/n wt Maushaut diese nur basal und in den Haarfollikeln nachgewiesen werden konnten (Abb.9, 5-6). Ab Tag 16 nahm der Anteil an PCNA positiven Keratinozyten in der basalen und den suprabasalen Schichten (Abb.9, 8 durch Pfeil markierte Position) des sich entwickelnden Papilloms in der HPV8-GFR transgenen Maushaut deutlich zu, wohingegen die PCNA Proteinexpression in der bestrahlten FVB/n wt Haut wieder der unbehandelten Kontrolle entsprach. Somit konnte in HPV8-GFR transgenen Mäusen zu späten Zeitpunkten nach UV-Behandlung (Tag 16-24) eine vermehrte PCNA Expression nachgewiesen werden, was auf eine gesteigerte Proliferation der Keratinozyten hindeutete.

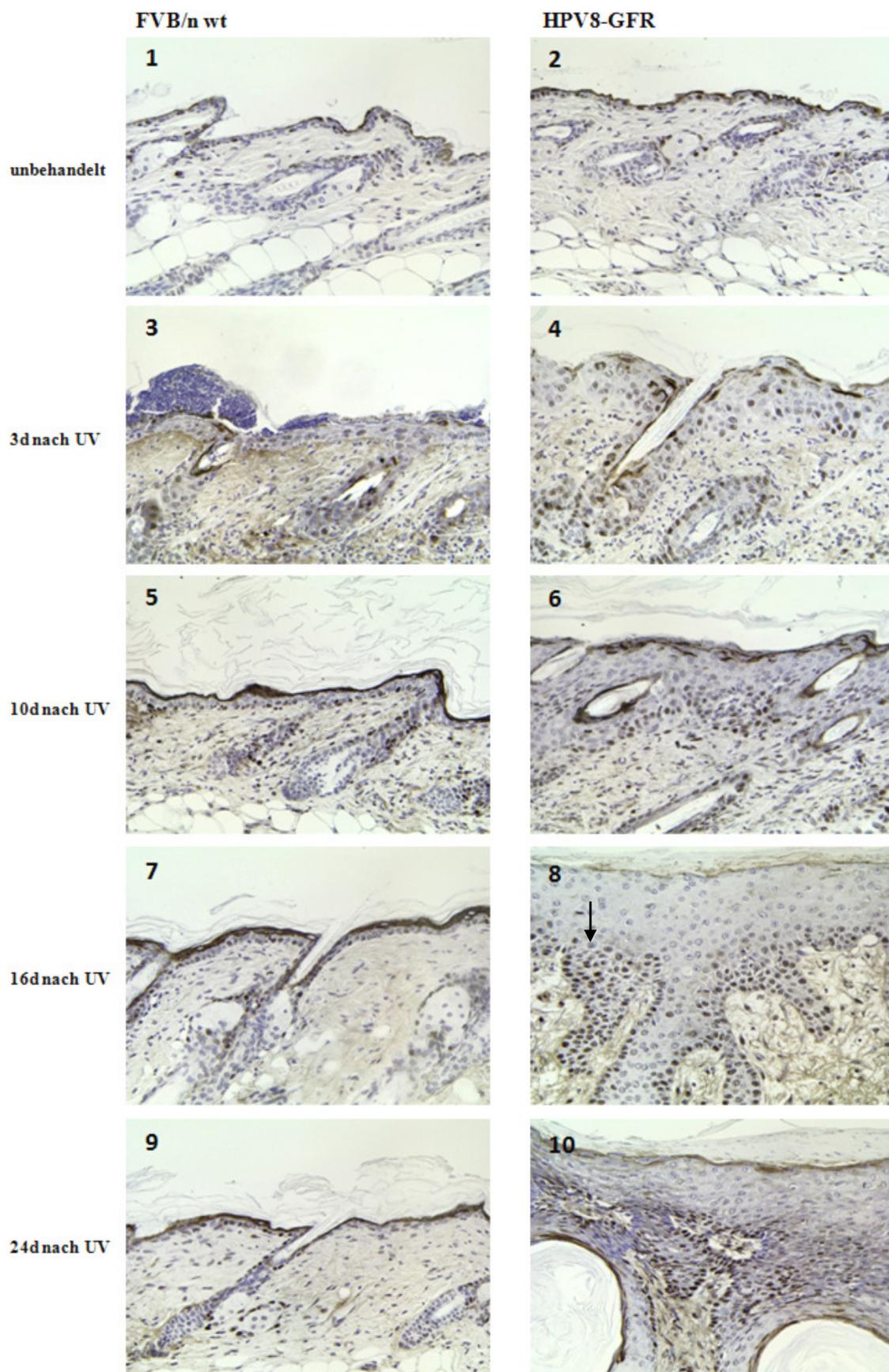


Abbildung 9: Immunhistochemischer Nachweis von PCNA in un behandelter und UV bestrahlter FVB/n wt und HPV8-GFR Maushaut. Die PCNA Expression wurde durch Braunfärbung dargestellt. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin (Blaufärbung). Die Pfeilposition in 8 veranschaulicht die PCNA Expression in den suprabasalen Schichten des sich entwickelnden Papilloms. Vergrößerung: 200x

Um die Frage zu klären, ob neben der Proliferation auch die Apoptose in transgener Maushaut verändert ist, wurde in Gesamtprotein Extrakten aus FVB/n wt und HPV8-GFR Maushaut das Protein Poly-[ADP-ribose]-polymerase-1 (PARP) mittels Western Blot Analyse nachgewiesen. PARP ist ein Substrat für Apoptose-spezifische Caspasen, wobei das Volllängen-Protein während der Apoptose in zwei Fragmente von 89 und 24 kDa gespalten wird. Für die Western Blot Analysen wurde nach jedem Bestrahlungsversuch eine Biopsie des UV bestrahlten sowie zum direkten Vergleich eine weitere Biopsie eines nicht bestrahlten Hautareals des gleichen Tieres entnommen. Daraus wurde Gesamtprotein isoliert und anschließend 15 µg Gesamtprotein auf PARP Proteinexpression untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass sowohl 13 und 24 Tage nach UV-Behandlung als auch in unbehandelten Proben in beiden Mauslinien eine vergleichbare Menge an gespaltenem PARP zu detektieren war (Abb.10). Dies deutete darauf hin, dass die Apoptose nicht dereguliert war. Damit konnte gezeigt werden, dass die Zunahme der epidermalen Schichtung ab Tag 13 in den HPV8-GFR transgenen Mäusen hauptsächlich auf die gesteigerte Proliferation der Keratinozyten zurückzuführen war.

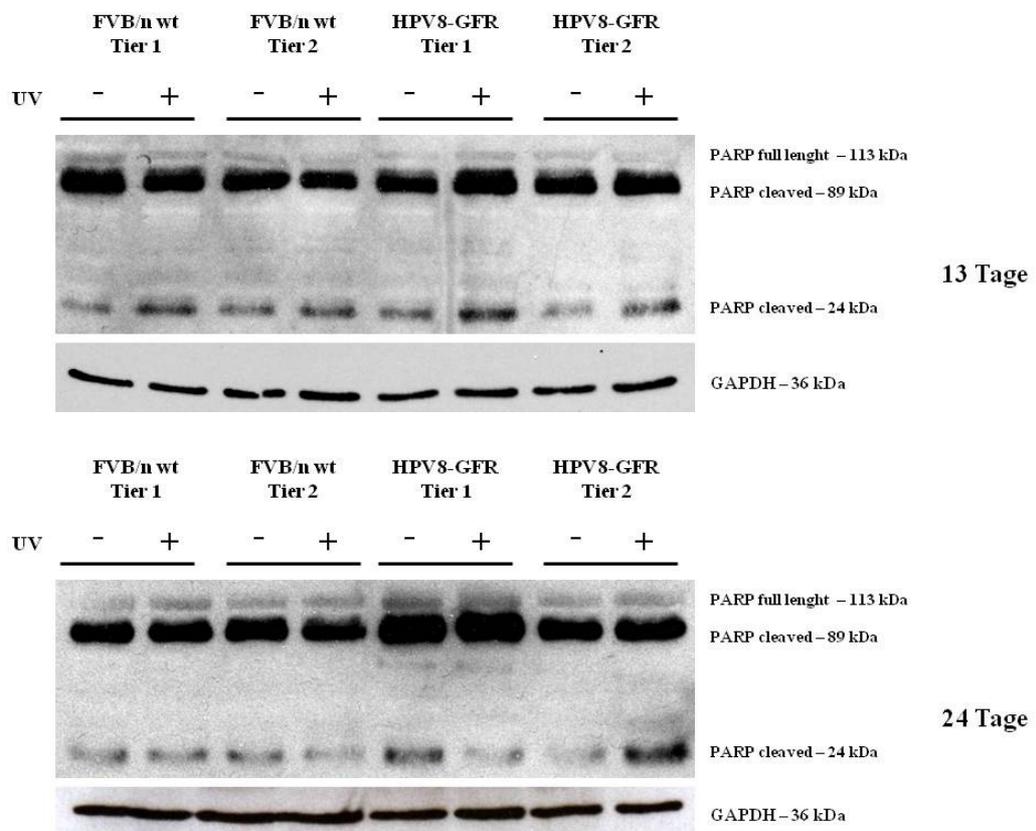


Abbildung 10: Immunologischer Nachweis von PARP in Proteinextrakten unbehandelter (-UV) und UV bestrahlter (+UV) FVB/n wt und HPV8-GFR Maushaut. 15 µg Gesamtprotein wurden in einem 12%-igen SDS-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und diese mit einem Antikörper gegen PARP inkubiert. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Auftragung wurde zusätzlich das Haushaltsgen GAPDH detektiert. Dargestellt sind für jeden Zeitpunkt die PARP Proteinspiegel in zwei FVB/n wt und zwei HPV8-GFR Mäusen.

4.1.3. Verifizierung der Micro Array Vorhersage

Um die in Tabelle 2 beschriebenen zellulären Gene als HPV8 Zielgene in transgener Maushaut zu verifizieren, wurde gesamtzelluläre RNA aus Hautbiopsien von insgesamt je sechs FVB/n wt und sechs HPV8-GFR Mäusen aus drei unterschiedlichen Würfen isoliert. Anschließend wurde die RNA revers transkribiert und die Expression der Gene mittels qPCR gemessen. Zur Konstruktion der Standardplasmide für die qPCR wurden zunächst spezifische Abschnitte der zellulären Gene amplifiziert und in den Blunt-End-Vektor *pJET1.2* kloniert. Für die Gene *Sfrp4*, *Samhd1* und *Dpep2* konnte kein spezifischer Genabschnitt amplifiziert werden, weshalb diese Gene nicht weiter untersucht wurden. Die qPCR Analysen zeigten, dass lediglich für *Sprr2*, *StefinA* und *Dusp1* eine Hochregulierung der mRNA Expression in nicht-läsionaler HPV8-GFR im Vergleich zur FVB/n wt Maushaut bestätigt werden konnte. Nach Normierung auf die absolute *HPRT1* Expression konnte für *Sprr2* ein 3-fach, für *StefinA* ein 10-fach und für *Dusp1* ein 4.3-fach erhöhter mRNA Spiegel in HPV8-GFR Maushaut gemessen werden (Abb.11). Für die restlichen zellulären Gene aus Tabelle 2 hingegen konnte die mittels Micro Array vorhergesagte Deregulation in nicht-läsionaler transgener Maushaut nicht bestätigt werden (Abb.13+14+15, Tag 0).

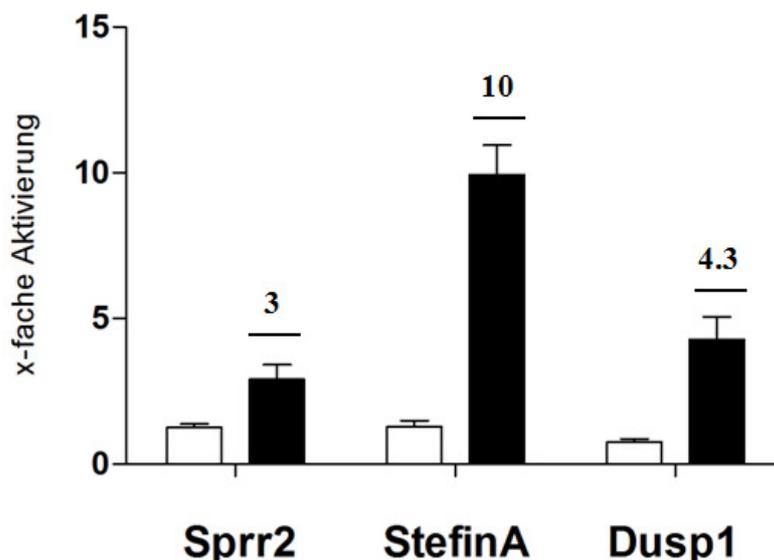


Abbildung 11: *Sprr2*, *StefinA* und *Dusp1* mRNA Expression in unbehandelter FVB/n wt (weiße Balken) und HPV8-GFR Maushaut (schwarze Balken). Die Quantifizierung der cDNA mittels qPCR erfolgte im Doppelansatz. Die Expressionsrate der zellulären Gene wurde auf die absolute *HPRT1* Expression normiert und auf den Median der unbehandelten FVB/n wt Maushaut bezogen. Die Zahlen über den Säulen geben den Mittelwert mit Standardabweichung von je sechs Tieren aus drei unabhängigen Experimenten an.

Um die Expression der zellulären Gene während der UV-induzierten Papillomentwicklung zu charakterisieren, wurden die Mäuse im nächsten Schritt einmalig mit UVA/B bestrahlt und Biopsien der bestrahlten Hautareale 6h, 1d, 2d, 3d, 5d, 7d, 10d, 13d, 16d und 24d nach Behandlung entnommen, um die Expression derjenigen zellulären Gene zu quantifizieren, die laut Micro Array Vorhersage mindestens 3.5-fach hochreguliert waren. *Csrp3* und *Actc1*, die laut Literatur primär Funktionen im Muskel erfüllen, wurden hierbei zunächst vernachlässigt. Die qPCR Analysen ergaben, dass UV-Bestrahlung in beiden Mauslinien zur Induktion der StefinA mRNA Expression führte. Interessanterweise war diese in den HPV8-GFR Mäusen bis Tag 10 kontinuierlich etwas höher als in den FVB/n wt Mäusen. Zu den Zeitpunkten 13, 16 und 24 Tage konnte in den FVB/n wt Mäusen eine Abnahme der StefinA Expression gemessen werden, wohingegen die mRNA Spiegel in den HPV8-GFR Tieren signifikant erhöht blieben (Abb. 12).

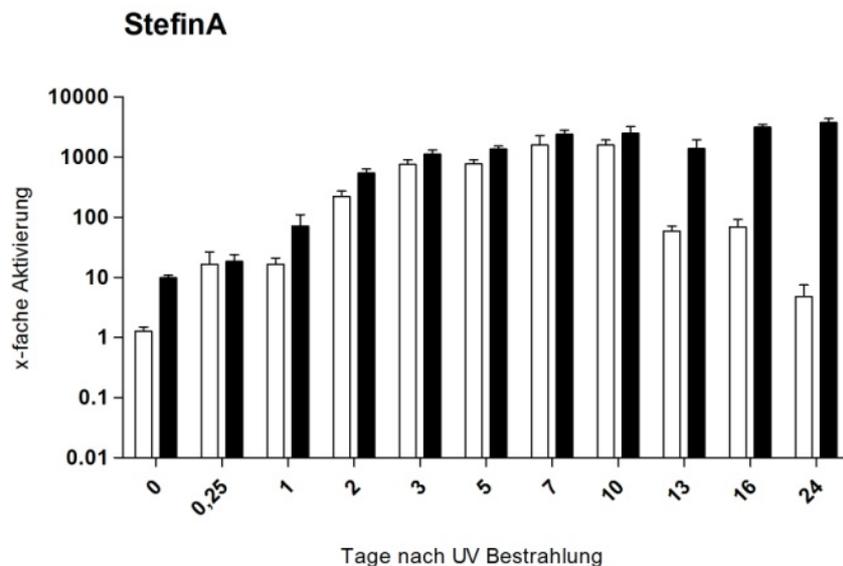


Abbildung 12: Expressionsspiegel von StefinA in unbehandelter und UV bestrahlter FVB/n wt (weiße Balken) und HPV8-GFR transgener Maushaut (schwarze Balken). Die x-Achse gibt die Tage nach UV-Bestrahlung an, an denen die Probenentnahmen erfolgten. Die Quantifizierung mittels qRT-PCR wurde für jede Probe im Doppelansatz durchgeführt. Die Expression der zellulären Gene wurde für jeden Zeitpunkt auf die absolute HPRT1 Expression normiert und auf den Median der unbehandelten FVB/n wt Maushaut bezogen (Tag 0). Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung von je sechs Tieren aus drei unabhängigen Versuchen.

Die Expression von Kallikrein-6 und Lipocalin-2 stieg in beiden Mauslinien zunächst an und erreichte bereits am dritten Tag nach UV-Bestrahlung das höchste Expressionsniveau. Ab Tag 10 für Kallikrein-6 und Tag 7 für Lipocalin-2 konnten in beiden Mauslinien leicht sinkende mRNA Spiegel detektiert werden. Deutliche Unterschiede wurden erst zwischen Tag 13 und 24 gemessen. In dieser Zeit sank die Expression in den FVB/n wt Tieren ab, wohingegen sie in den HPV8-GFR Mäusen signifikant erhöht blieb (Abb. 13). Die Expression von Fos11 erreichte bereits sechs Stunden nach UV in beiden Mauslinien das höchste Expressionsniveau. Die HPV8-GFR transgenen Tiere zeigten über die gesamte Kinetik eine vergleichbar hohe Fos11 mRNA Expression, wohingegen in den FVB/n wt Tieren zwischen 10 und 24 Tagen ein sinkender Fos11 mRNA Spiegel gemessen werden konnte, wobei auch an Tag 24 immer noch ein im Vergleich zur unbehandelten Maushaut um den Faktor 4 erhöhter Fos11 mRNA Gehalt detektiert wurde (Abb. 13).

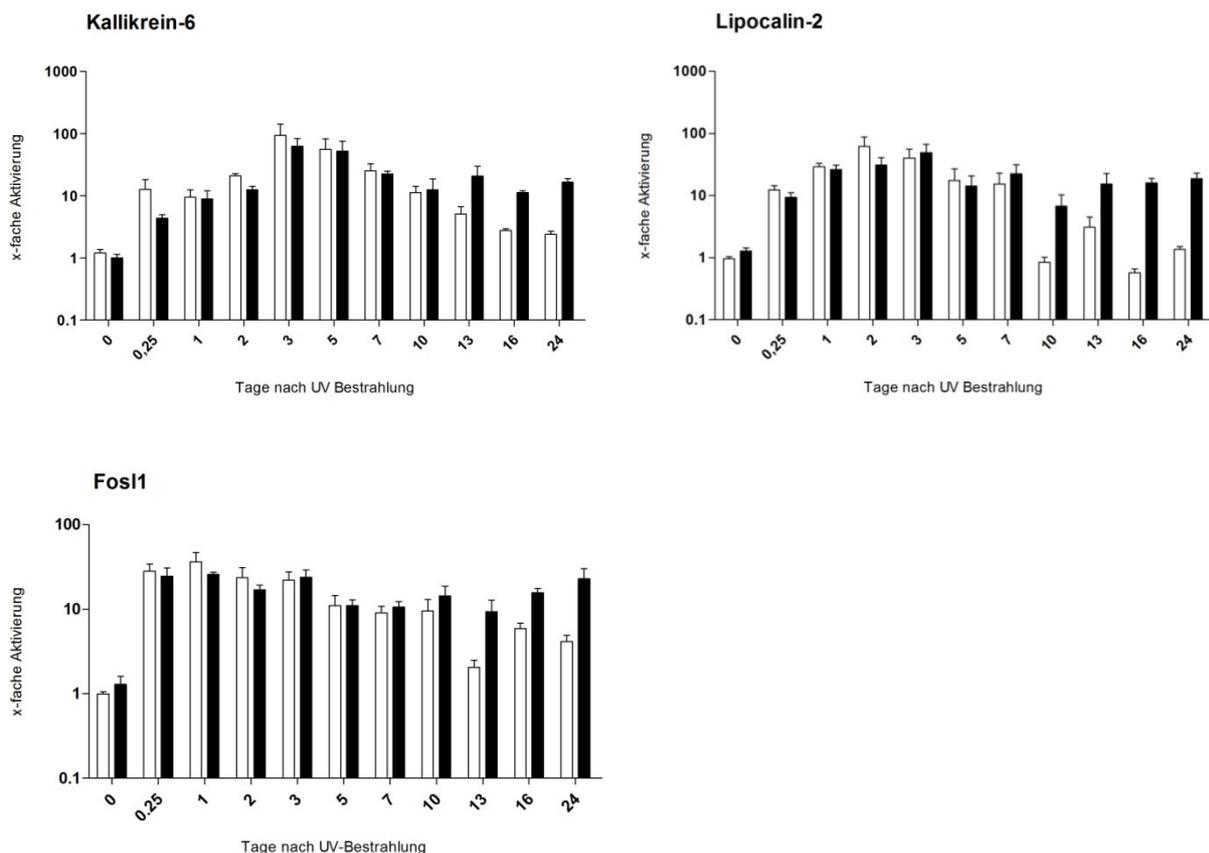


Abbildung 13: Expressionsspiegel von Kallikrein-6, Lipocalin-2 und Fos11 in un behandelter und UV bestrahlter FVB/n wt (weiße Balken) und HPV8-GFR transgener Maushaut (schwarze Balken). Die x-Achse gibt die Tage nach UV-Bestrahlung an, an denen die Probenentnahmen erfolgten. Die Quantifizierung mittels qRT-PCR wurde für jede Probe im Doppelansatz durchgeführt. Die Expression der zellulären Gene wurde für jeden Zeitpunkt auf die absolute HPRT1 Expression normiert und auf den Median der unbehandelten FVB/n wt Maushaut bezogen (Tag 0). Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung von je sechs Tieren aus drei unabhängigen Versuchen.

Die Untersuchung der Syntenin-2 mRNA Expression zeigte in den ersten drei Tagen nach UV-Bestrahlung eine auffällige Repression. Der mRNA Spiegel sank innerhalb des ersten Tages zunächst in beiden Mauslinien deutlich ab, stieg dann bis einschließlich Tag 7 an und erreichte sowohl in FVB/n wt als auch HPV8-GFR Maushaut eine Aktivierung um den Faktor 4. Danach sank die Expression in beiden Mauslinien wieder etwas ab und ab Tag 13 konnte in den FVB/n wt Mäusen eine weitere Abnahme der Syntenin-2 mRNA Expression gemessen werden, während die mRNA Spiegel in den HPV8-GFR Tieren erhöht blieben (Abb.14).

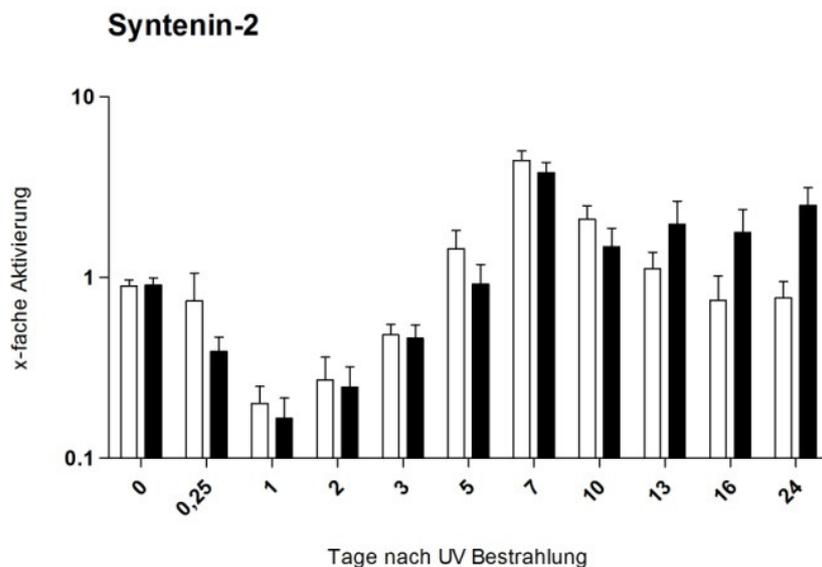


Abbildung 14: Expressionsspiegel von Syntenin-2 in unbehandelter und UV bestrahlter FVB/n wt (weiße Balken) und HPV8-GFR transgener Maushaut (schwarze Balken). Die x-Achse gibt die Tage nach UV-Bestrahlung an, an denen die Probenentnahmen erfolgten. Die Quantifizierung mittels qRT-PCR wurde für jede Probe im Doppelansatz durchgeführt. Die Expression der zellulären Gene wurde für jeden Zeitpunkt auf die absolute HPRT1 Expression normiert und auf den Median der unbehandelten FVB/n wt Maushaut bezogen (Tag 0). Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung von je sechs Tieren aus drei unabhängigen Versuchen.

Die meisten bisherigen Analysen zeigten, dass an Tag 3 nach UV-Behandlung das höchste Expressionsniveau und zwischen den Tagen 13 bis 24 die größten Unterschiede in der mRNA Expression der zellulären Gene gemessen werden konnten, weshalb die Quantifizierungen der weiteren Gene aus Tabelle 2, die laut Micro Array Vorhersage weniger als 3.5-fach hochreguliert waren, nur für diese Tage durchgeführt wurden (Abb. 15). Dabei konnte zunächst für *Csrp3* und *Actc1* gezeigt werden, dass beide Gene auch zu späten Zeitpunkten nach UV-Bestrahlung (13 und 24 Tage) keine signifikante Deregulation in HPV8-GFR Maushaut aufwiesen. Für *Chrna1* konnte 3 Tage nach Behandlung ein signifikanter Unterschied zwischen FVB/n wt und HPV8-GFR Mäusen gemessen werden. An Tag 13 und 24 war die *Chrna1* mRNA Expression in FVB/n wt und HPV8-GFR Tieren deutlich

gesunken, jedoch wiesen beide Mauslinien zu späten Zeitpunkten nach UV vergleichbare Chrna1 mRNA Spiegel auf. Für die Gene Oas-2, Atp10a und Desmolplakin konnte sowohl in unbehandelter als auch UV bestrahlter FVB/n wt und HPV8-GFR transgener Maushaut eine vergleichbare mRNA Expression gemessen werden. Das Gen Dct wies in unbehandelter Maushaut sowie an 3 Tage nach UV-Behandlung eine vergleichbare mRNA Expression auf, die in beiden Mauslinien zu späten Zeitpunkten nach UV (13 und 24 Tage) ca. 10-fach erhöht war. Für das Gen Dusp1 konnte zwar in unbehandelter HPV8-GFR Maushaut eine erhöhte mRNA Expression bestätigt werden, was darauf hindeutete, dass die Expression der frühen HPV8 Gene die mRNA Expression von Dusp1 beeinflusste, jedoch konnten im Laufe der Papillomentwicklung keine Unterschiede in der Dusp1 mRNA Expression zwischen den beiden Mauslinien quantifiziert werden.

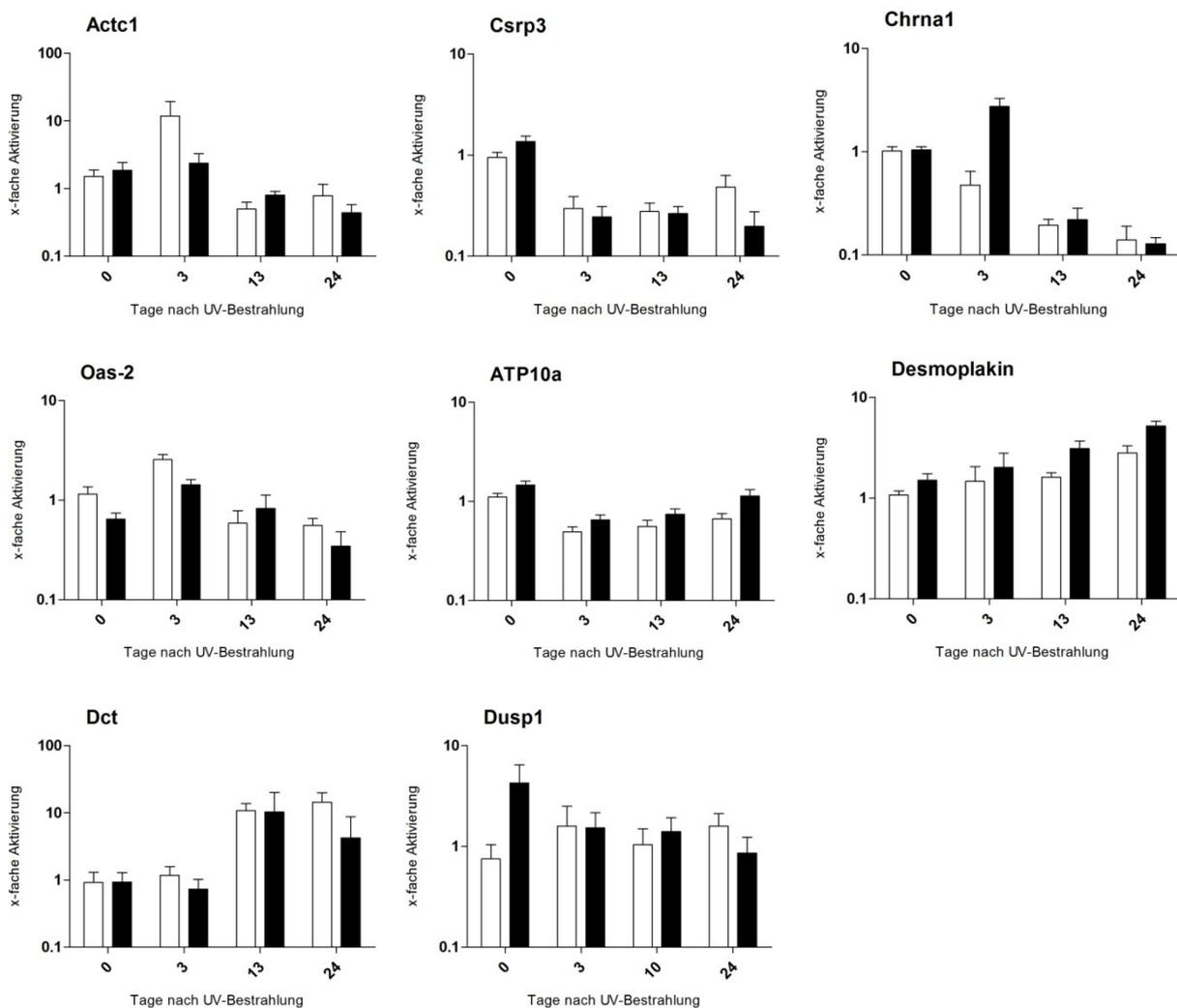


Abbildung 15: Expressionskinetiken der zellulären Gene, die laut Micro Array Vorhersage weniger als 3.5-fach hochreguliert waren. Die Quantifizierung mittels qRT-PCR wurde für Actc1, Csrp3, Chrna1, Oas-2, ATP10a, Desmolplakin, Dct und Dusp1 in unbehandelter (unbehandelt = 0 Tage, UV bestrahlt = 3, 13 und 24 Tage) FVB/n wt (weiße Balken) und HPV8-GFR transgener Maushaut (schwarze Balken) durchgeführt. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung von je sechs Tieren aus drei unabhängigen Versuchen.

4.1.3.1. Quantifizierung der StefinA, Kallikrein-6, Lipocalin-2, Fos11 und Syntenin-2

Expressionsspiegel in HPV8-E6 und -E2 Mäusen

Um den Einfluss einzelner HPV8 Gene auf die Expression von StefinA, Kallikrein-6, Lipocalin-2, Fos11 und Syntenin-2 zu untersuchen, wurden HPV8-E6 sowie -E2 transgene Tiere nach demselben Bestrahlungsprotokoll behandelt und die Expression der einzelnen Gene mittels qRT-PCR gemessen (Abb.16).

Für StefinA konnte in HPV8-GFR transgenen Tieren eine um den Faktor 10 erhöhte Expression gemessen werden. Im Vergleich dazu wurde in HPV8-E6 transgenen Tieren eine Aktivierung um den Faktor 2.4 gemessen, wohin gegen HPV8-E2 Mäuse keinen erhöhten StefinA mRNA Spiegel aufwiesen. Zehn Tage nach UV-Bestrahlung waren die StefinA mRNA Spiegel in allen vier Mauslinien bis zu 2500-fach erhöht. Am letzten Tag der Untersuchungsperiode war die StefinA mRNA Expression in den FVB/n wt Mäusen auf das Expressionsniveau unbehandelter FVB/n wt Maushaut gesunken, wohingegen die Expression in allen drei transgenen Mauslinien signifikant erhöht blieb.

Bei der Untersuchung der Kallikrein-6 Expression in unbehandelter FVB/n wt, HPV8-GFR und -E6 transgener Maushaut konnten keine Unterschiede im mRNA Spiegel gemessen werden. In unbehandelter HPV8-E2 Maushaut hingegen war die Expression um den Faktor 5.7 erhöht, was darauf hindeutete, dass das Onkogen E2 einen aktivierenden Einfluss auf die Kallikrein-6 Expression ausübte. Übereinstimmend mit diesem Ergebnis war der Kallikrein-6 mRNA Spiegel in den E2 Mäusen im Vergleich zu den anderen Linien auch 10 und 24 Tage nach UV erhöht. An Tag 24 war die Expression in den FVB/n wt Tieren signifikant gesunken, wohingegen die Kallikrein-6 Expressionsspiegel in allen drei transgenen Mauslinien erhöht blieben.

Bei der Untersuchung der Lipocalin-2 mRNA Expression konnten in unbehandelter Haut keine Unterschiede zwischen den vier Mauslinien gemessen werden. Zehn Tage nach UV konnte in den HPV8-GFR, -E6 und -E2 Mäusen ein erhöhter mRNA Spiegel gemessen werden, wohingegen die Expression in den FVB/n wt Mäusen wieder auf das Expressionsniveau der Kontrolle gesunken war. An Tag 24 entsprach die Lipocalin-2 mRNA Expression in den FVB/n wt und HPV8-E2 Mäusen der unbehandelten FVB/n wt Kontrolle, wohingegen in den HPV8-GFR und -E6 Tieren ein um den Faktor 18 erhöhter mRNA Spiegel gemessen werden konnte.

Die mRNA Expression von Fos11 war in der FVB/n wt und HPV8-GFR Maushaut vergleichbar, wohingegen in der -E6 und -E2 transgenen Haut eine deutliche Aktivierung der Fos11 mRNA Expression gemessen werden konnte. An Tag 10 nach UV-Behandlung wiesen

alle vier Mauslinien eine erhöhte Fos11 mRNA Expression auf, wobei HPV8-E6 und -E2 auch hier zu einer stärkeren Aktivierung der mRNA Expression führten. An Tag 24 war der Fos11 mRNA Spiegel in den FVB/n wt Tieren zwar gesunken aber im Vergleich zur Kontrolle immer noch um den Faktor 4 erhöht. In den drei transgenen Mauslinien hingegen konnte ein vergleichbarer bis zu 20-fach erhöhter mRNA Spiegel gemessen werden.

Die Analyse der Syntenin-2 mRNA Expression zeigte im Vergleich keine Deregulation in unbehandelten Proben und eine sehr schwache Aktivierung zehn Tage nach UV-Bestrahlung in allen vier Mauslinien. Wie bereits für Lipocalin-2 beschrieben sank die Syntenin-2 Expression in FVB/n wt und HPV8-E2 Mäusen am Tag 24 auf den Wert der Kontrolle, wohingegen eine leichte Aktivierung in HPV8-GFR und -E6 Tieren messbar blieb.

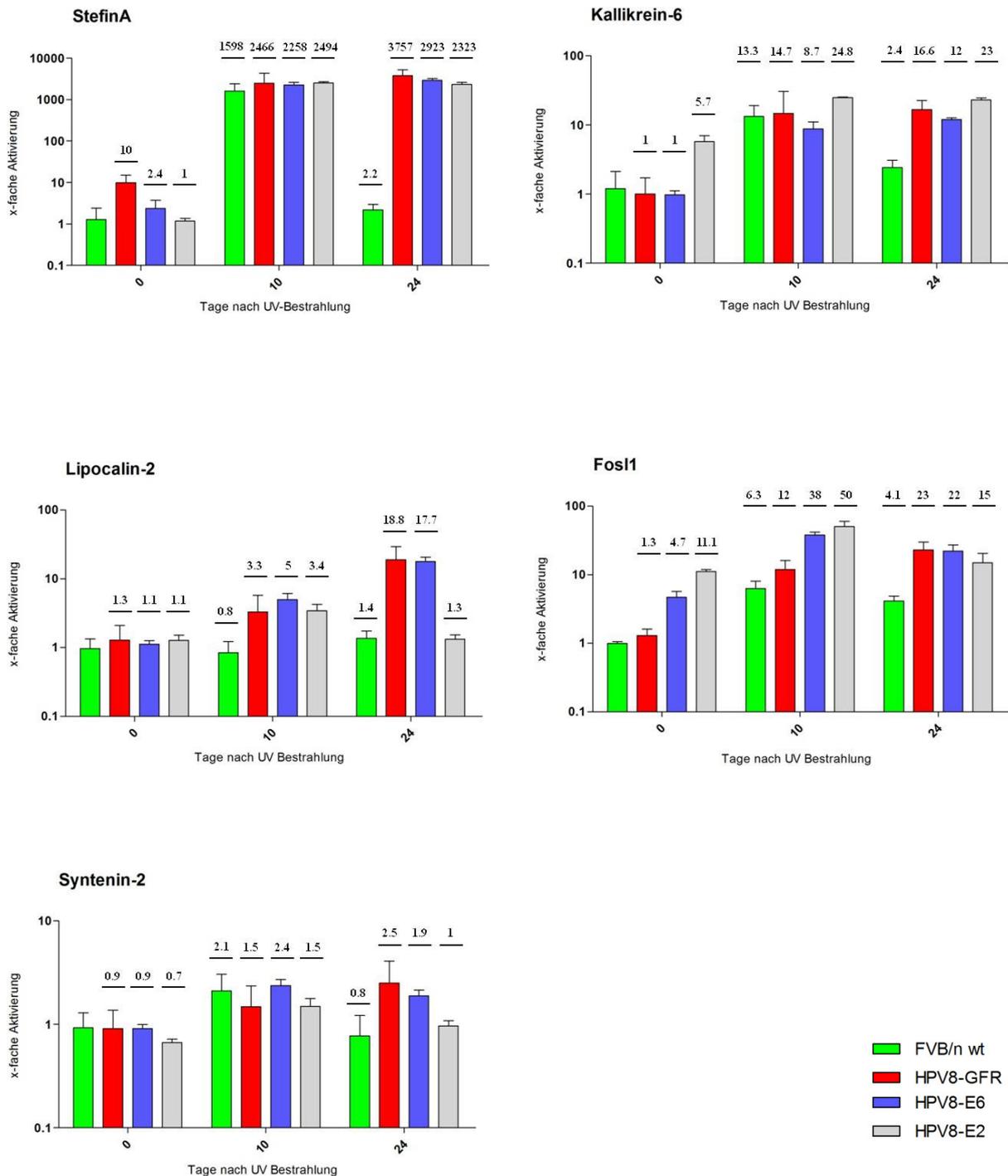


Abbildung 16: mRNA Expressionsspiegel von StefinA, Kallikrein-6, Lipocalin-2, Fos1 und Syntenin-2 in unbehandelter sowie UV bestrahlter FVB/n wt, HPV8-GFR, -E6 und -E2 transgener Maushaut. Aufgetragen ist die Aktivierung der mRNA Expression an x Tagen nach UV-Bestrahlung. Die Expression der zellulären Gene wurde auf die absolute HPRT1 Expression normiert und auf den Median der unbehandelten FVB/n wt Maushaut bezogen. Die Zahlen über den Säulen geben den Mittelwert mit Standardabweichung von je 6 Tieren aus drei unabhängigen Experimenten an.

4.1.4. Immunologischer Nachweis von StefinA in Gesamtproteinextrakten aus FVB/n wt und HPV8-GFR Maushaut

Wie in Abbildung 11 und 12 beschrieben, konnte für StefinA bereits in unbehandelter sowie UV bestrahlter HPV8-GFR transgener Maushaut eine signifikant erhöhte mRNA Expression gezeigt werden. Dies deutete darauf hin, dass StefinA ein direktes/indirektes Zielgen von HPV8 ist, was eine genauere Studie der StefinA Expression begründete.

Es wurden Western Blot Analysen durchgeführt, um die Frage zu klären, ob sich der mittels qRT-PCR gemessene, erhöhte StefinA mRNA Spiegel auch auf Proteinebene widerspiegelte. Hierzu wurden nach jedem Bestrahlungsversuch Biopsien des UV bestrahlten sowie eines nicht bestrahlten Hautareals des gleichen Tieres entnommen. Daraus wurde Gesamtprotein isoliert und 15 µg mittels Western Blot Analyse untersucht. In Abbildung 17 sind die Ergebnisse der Western Blot Analysen zum Zeitpunkt 5, 10 und 24 Tage nach UV-Bestrahlung für je zwei FVB/n wt und HPV8-GFR Tiere vergleichend dargestellt. In den Extrakten von Tag 5 der FVB/n wt Tiere konnte eine leichte Zunahme von StefinA detektiert werden, wohingegen in den HPV8-GFR Extrakten verhältnismäßig mehr StefinA Protein nachgewiesen wurde. Nach 10 Tagen konnte in FVB/n wt und HPV8-GFR Tieren eine deutlich erhöhte, vergleichbare StefinA Proteinmenge nachgewiesen werden. Am Tag 24 wurden signifikant unterschiedliche Proteinmengen detektiert. In Gesamtprotein von FVB/n wt Mäusen wurde kaum StefinA nachgewiesen, wohingegen in den HPV8-GFR Tieren eine stark erhöhte Proteinmenge detektiert wurde. Damit bestätigten die Western Blot Untersuchungen die Daten der qRT-PCR.

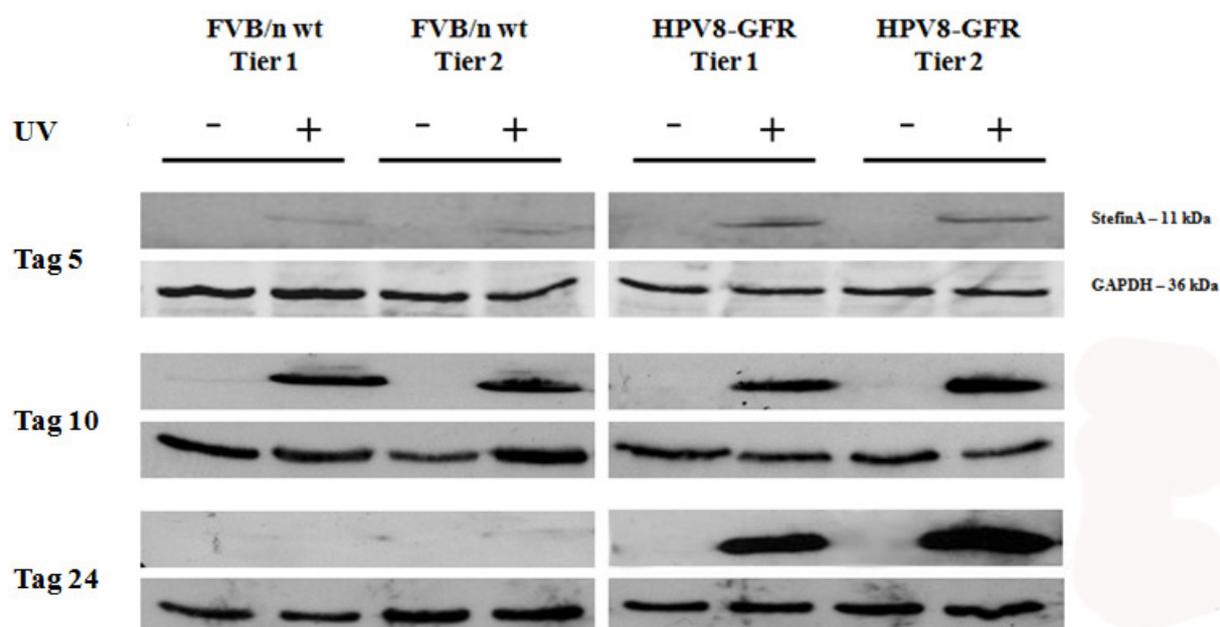


Abbildung 17: Immunologischer Nachweis von StefinA in Gesamtproteinextrakten aus unbehandeltem (-UV) und bestrahltem (+UV) FVB/n wt und HPV8-GFR transgener Maushaut. (a) 15 µg Gesamtprotein-Extrakt wurden in einem 12%-igen SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert, auf der StefinA detektiert wurde. Zusätzlich wurde als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung GAPDH nachgewiesen.

4.1.4.1. Immunhistochemische Analyse der StefinA Expression in Maushautschnitten

Zusätzlich zu den Western Blot Analysen wurden immunhistochemische Färbungen von Paraffin eingebetteten Maushautbiospien durchgeführt, um das Expressionsmuster von StefinA in FVB/n wt und HPV8-GFR transgener Maushaut in situ zu charakterisieren.

In unbehandelter Haut wurde in beiden Mauslinien in den Haarfollikeln eine konstitutive StefinA Expression nachgewiesen (Abb.18, 1-2). In den interfollikulären Bereichen der Epidermis hingegen konnten in HPV8-GFR Maushaut leicht erhöhte StefinA Proteinspiegel nachgewiesen und damit die Daten der qRT-PCR bestätigt werden. Zwischen 3 und 10 Tagen nach Bestrahlung (Abb.18, 3-8) waren keine offensichtlichen Unterschiede in der StefinA Proteinexpression bzw. dem Expressionsmuster in FVB/n wt und HPV8-GFR Tieren nachweisbar. StefinA wurde zu diesen Zeitpunkten in allen Schichten der Epidermis exprimiert. Wie bereits auf mRNA Ebene und in den Western Blot Analysen gezeigt, sank die StefinA Expression in der FVB/n wt Maushaut im Zuge von Wundheilungsprozessen ab und erreichte am Tag 24 nach Bestrahlung die Proteinspiegel der Kontrolltiere (Abb.18, 9). In der HPV8-GFR transgenen Haut hingegen blieb die StefinA Proteinexpression während der gesamten Untersuchungsperiode in der hyperproliferierenden Epidermis signifikant erhöht (Abb.18, 10).

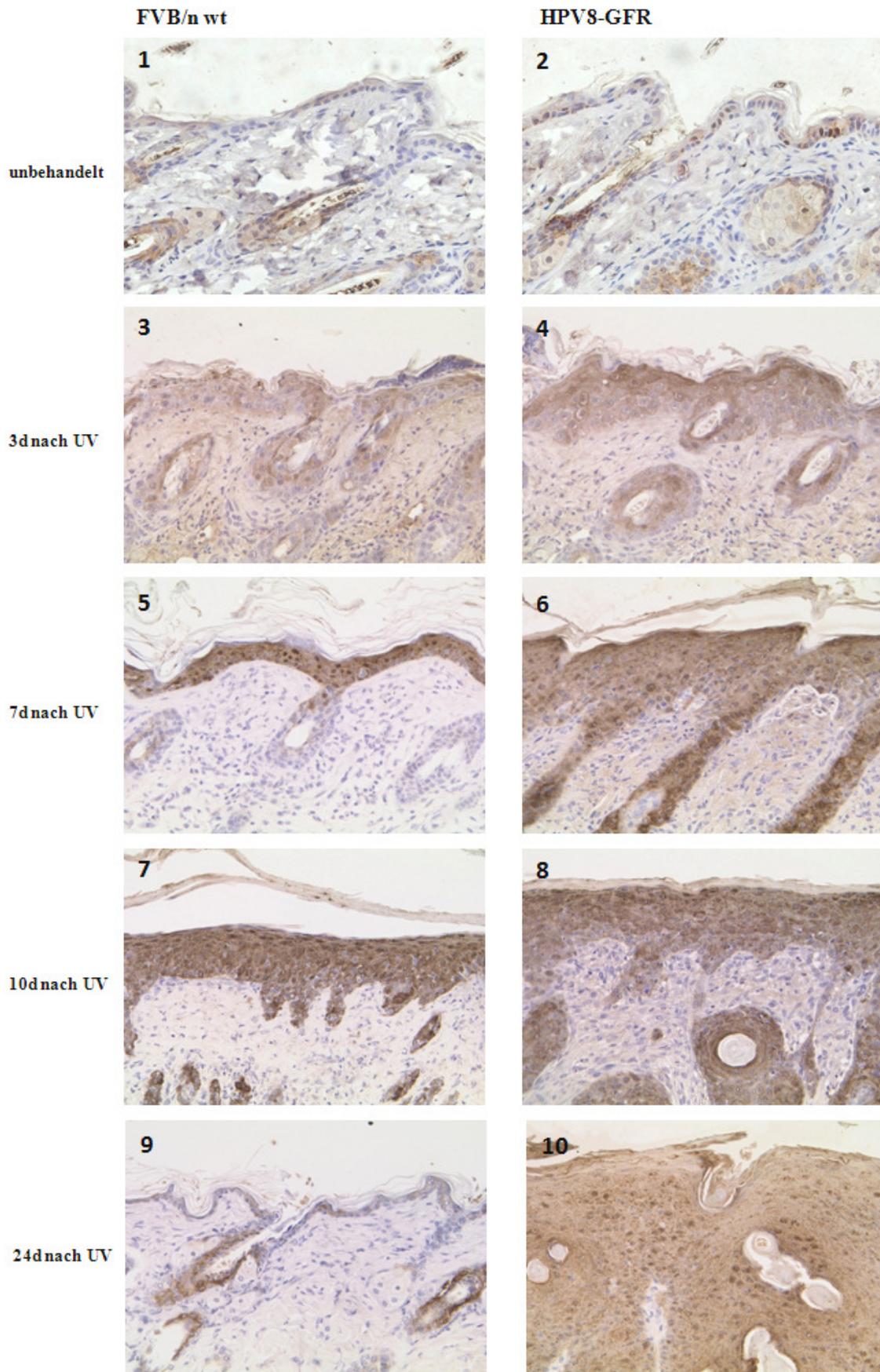


Abbildung 18: Immunhistochemischer Nachweis von StefinA in un behandelter und UV bestrahlter FVB/n wt und HPV8-GFR Maushaut. Die StefinA Proteineexpression wurde durch Braunfärbung nachgewiesen. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hilfe von Hämatoxylin (Blaufärbung). Vergrößerung: 200x

Um die Frage zu klären, ob die beobachtete StefinA Überexpression zu späten Zeitpunkten nach Bestrahlung HPV8 induziert oder aber mit der epidermalen Hyperproliferation assoziiert ist, wurde ein Schnitt eines UV-induzierten Papilloms (fixiert 20 Tage nach UV-Bestrahlung) einer FVB/n wt Maus (Abb.19, a) für StefinA gefärbt. Dieser Hautschnitt war HPV8 negativ, was durch die ausbleibende immunhistochemische Färbung des E2 Proteins (Abb.19, c) bestätigt werden konnte, und lieferte damit eine Kontrolle zur HPV8 induzierten Tumorentstehung (Abb.19, b). Wie in Abbildung 19 dargestellt, konnte auch in diesem UV-induzierten Papillom eine starke StefinA Proteinexpression nachgewiesen werden. Dies deutete darauf hin, dass nicht HPV8 sondern der Prozess der Papillomentwicklung die erhöhten StefinA Proteinspiegel zu späten Zeitpunkten nach UV-Bestrahlung bedingte.

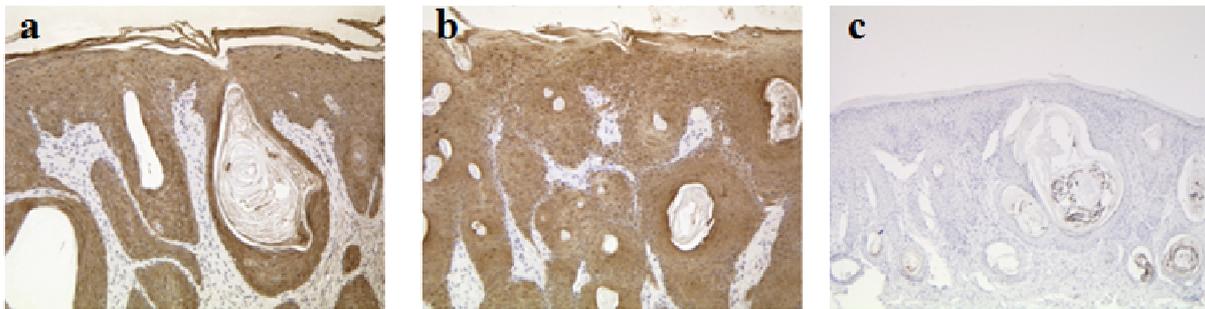


Abbildung 19: Immunhistochemischer Nachweis der StefinA Proteinexpression in Schnitten eines UV-induzierten FVB/n wt und eines HPV8-GFR Papilloms. (a) Deutliche StefinA Proteinexpression (Braunfärbung) in einem UV-induzierten Papillom einer FVB/n wt Maus. **(b)** Vergleichbare StefinA Proteinexpression (Braunfärbung) in einem HPV8-GFR induzierten Papillom. **(c)** Das UV-induzierte FVB/n wt Papillom zeigte keine HPV8-E2 Färbung. Die Gegenfärbung der Maushautschnitte erfolgte mit Hämatoxylin. Vergrößerung: 200x

4.2. Analyse der Expression des PDZ Proteins Syntenin-2 in humanen, kutanen Keratinozyten

4.2.1. Quantifizierung der Syntenin-2 mRNA Spiegel in UV bestrahlten, HPV8-E6 exprimierenden Keratinozyten

Die kinetischen Analysen in den transgenen Mäusen hatten nur für das Gen Syntenin-2 eine auffällige Repression zwischen 6 h und 3 Tage nach UV-Bestrahlung gezeigt (Abb.14), wohingegen die mRNA Expression der Gene StefinA, Kallikrein-6, Lipocalin-2 und Fos11 innerhalb dieser Zeitspanne signifikant anstieg (Abb. 12-13). Um die mRNA Expression des Syntenin-2 zusätzlich in einem humanen Modell zu charakterisieren, wurde der Syntenin-2 mRNA Spiegel in primären humanen Keratinozyten quantifiziert. Diese Keratinozyten exprimierten den Kontrollvektor pLXSN oder HPV8-E6 und wurden einmalig mit 8 mJ/cm² UVB bestrahlt. Anschließend wurde aus diesen Zellen 4, 8 und 24 Stunden später sowie aus unbestrahlten Kontrollzellen Gesamt-RNA isoliert (Akgül et al. 2010). Mittels qRT-PCR konnte gezeigt werden, dass UVB-Bestrahlung in pLXSN exprimierenden Keratinozyten bereits 4 und 8 h nach Behandlung zu leicht erhöhten Syntenin-2 mRNA Spiegeln führte und im Gegensatz zum Mausmodell nach 24 h in einer Aktivierung der Syntenin-2 Expression um den Faktor 2.2 resultierte. Überraschenderweise führte Expression von HPV8-E6 in primären humanen Keratinozyten bereits ohne UVB-Bestrahlung zu einem um den Faktor 10 signifikant erniedrigten Syntenin-2 mRNA Spiegel. Vier und 8 h danach führte auch in diesen Zellen UVB-Bestrahlung zu einem geringfügigen Anstieg der Syntenin-2 Expression, die jedoch im Gegensatz zur Kontrolle 24 h später zu keiner weiteren Aktivierung führte. Der mRNA Gehalt sank auf den Ausgangswert der HPV8-E6 exprimierenden Keratinozyten zurück. Dies deutete darauf hin, dass das E6 Protein von HPV8 neben der Inhibition der Syntenin-2 Genexpression in primären humanen Keratinozyten zusätzlich die beobachtete, UV-induzierte Aktivierung blockierte. Da die Syntenin Genfamilie nur aus den beiden Mitgliedern Syntenin-1 und Syntenin-2 besteht, welche eine hohe Sequenzhomologie aufweisen (Koroll et al. 2001), wurde in den gleichen Zellen zusätzlich Syntenin-1 quantifiziert. Im Vergleich waren weder HPV8-E6 noch UV-Licht in der Lage die Syntenin-1 mRNA Expression zu beeinflussen.

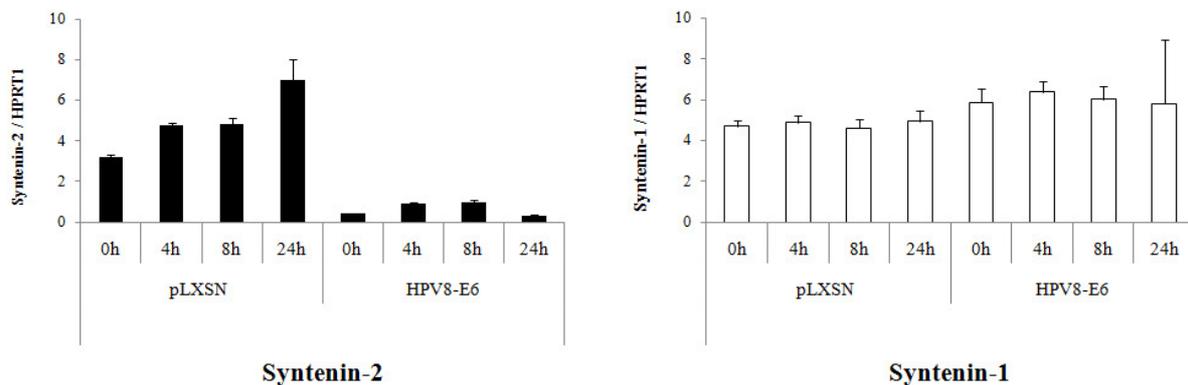


Abbildung 20: Quantifizierung von Syntenin-2 und Syntenin-1 in UVB bestrahlten primären humanen Keratinozyten. Gesamt-RNA wurde aus unbehandelten und UVB bestrahlten pLXSN und HPV8-E6 exprimierenden, primären Keratinozyten isoliert und die Syntenin-2 und Syntenin-1 mRNA Spiegel mittels qRT-PCR gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung aus zwei unabhängigen Experimenten.

4.2.2. Quantifizierung der Syntenin-2 mRNA und Proteinspiegel in HPV8-E6, -E7 und -E6/7 exprimierenden primären Keratinozyten

Um die Beeinflussung der Syntenin-2 Expression durch HPV8 genauer zu untersuchen, wurden Gesamt-RNA sowie Protein-Extrakte aus primären Keratinozyten eines weiteren Donors isoliert. Diese Zellen exprimierten jeweils den Kontrollvektor pLXSN, HPV8-E6 bzw. -E7 oder die Kombination -E6/7. Auf diese Weise konnte zum einen ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem beobachteten HPV8-E6 Effekt auf den Syntenin-2 mRNA Gehalt um einen donorspezifischen Effekt in einem definierten genetischen Hintergrund handelte. Zum anderen konnte in dieser Versuchsreihe vergleichend der Einfluss von E7 untersucht werden. Die Syntenin-2 mRNA Spiegel wurden mittels qRT-PCR quantifiziert (Abb.21, a). Dabei konnte gezeigt werden, dass HPV8-E6 und -E6/E7 exprimierende Keratinozyten einen um den Faktor 3.5 bzw. 2.8 erniedrigten Syntenin-2 mRNA Spiegel aufwiesen, während dieser in HPV8-E7 exprimierenden Zellen im Vergleich zu pLXSN unverändert blieb. Damit konnte bestätigt werden, dass HPV8-E6 die Syntenin-2 Transkription inhibiert. Im Gegensatz zu Syntenin-2 führte die Expression des HPV8-E6 zu keiner Veränderung des Syntenin-1 mRNA Spiegels (Abb.21, b). Um im Weiteren zu klären, ob das alpha HPV16-E6 auch in der Lage ist die Syntenin-2 Transkription zu inhibieren, wurde der mRNA Spiegel zusätzlich in HPV16-E6 exprimierenden primären Keratinozyten quantifiziert. Dabei konnte gezeigt werden, dass HPV16-E6 nicht in der Lage war, die Syntenin-2 mRNA Expression zu inhibieren (Abb.21, c). Damit war bewiesen, dass nur das

beta HPV8 und nicht das alpha HPV16 spezifisch die Syntenin-2 Transkription inhibieren kann. Zusätzlich wurde die Syntenin-2 Proteinexpression in Western Blot Analysen untersucht. Die mittels qRT-PCR erhobenen Daten spiegeln sich auch auf Proteinebene wider. HPV8-E6 exprimierende Keratinozyten zeigten signifikant verminderte Syntenin-2 Protein Spiegel. Das E7 Protein allein hingegen hatte keinen Einfluss auf den Syntenin-2 Proteingehalt. Wurden E6 und E7 zusammen exprimiert, so überwog der E6 Effekt (Abb.21, d).

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass Syntenin-2 in primären humanen Keratinozyten ein direktes/indirektes Zielgen von HPV8-E6 ist, dessen Expression bereits auf transkriptioneller Ebene inhibiert wird.

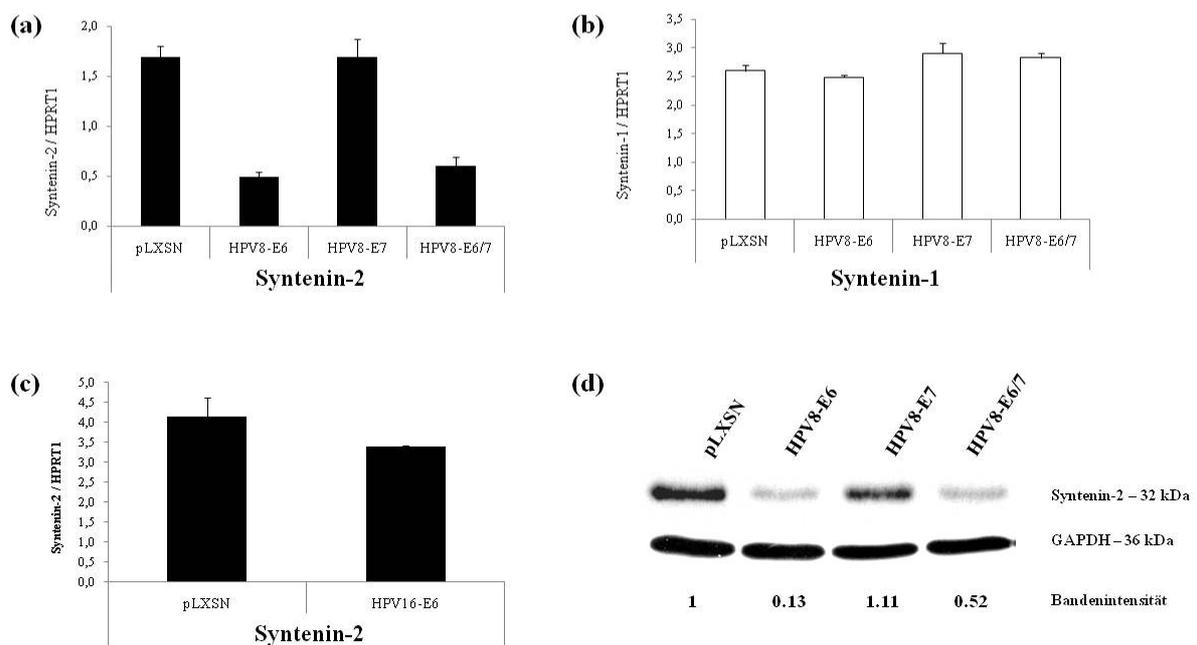


Abbildung 21: HPV8-E6 inhibiert die transkriptionelle Expression von Syntenin-2. (a) qRT-PCR Analysen der Syntenin-2 mRNA Expression in pLXSN, HPV8-E6, -E7 und -E6/E7 exprimierenden primären Keratinozyten. (b) qRT-PCR Analysen der Syntenin-1 mRNA Expression in pLXSN, HPV8-E6, -E7 und -E6/E7 exprimierenden Keratinozyten. (c) Syntenin-2 mRNA Spiegel in HPV16-E6 exprimierenden Keratinozyten eines weiteren Donors. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. (d) Immunologischer Nachweis von Syntenin-2 in Ganzzell-Extrakten von pLXSN, HPV8-E6, -E7 und -E6/E7 exprimierenden primären Keratinozyten. Die Banden für Syntenin-2 und GAPDH wurden quantifiziert und der Quotient in pLXSN exprimierenden Keratinozyten gleich 1 gesetzt.

4.2.3. Immunologischer Nachweis von Syntenin-2 in Ganzzell-Extrakten aus HPV E6 exprimierenden primären humanen Keratinozyten

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass das alpha HPV16-E6 nicht in der Lage ist, die Syntenin-2 Transkription zu beeinflussen. Wie in der Einleitung ausführlich beschrieben, besitzt das E6 Protein der HR alpha HPV Typen aber ein PDZ Bindemotiv über welches es in der Lage ist, verschiedenste zelluläre PDZ Proteine zu binden und zu degradieren. Im nächsten Schritt sollte daher die Frage geklärt werden, ob HPV16-E6 in der Lage ist, die Proteinspiegel des PDZ Proteins Syntenin-2 zu beeinflussen. Vergleichend dazu wurden die E6 Proteine verschiedener kutaner HPV Typen untersucht, die über kein PDZ Bindemotiv verfügen. In Abbildung 22 sind die Syntenin-2 Proteinspiegel primärer humaner Keratinozyten dargestellt, die jeweils die E6 Proteine der HPV Typen 1, 4, 5, 8, 16, 20 und 38 exprimierten. Expression der E6 Proteine der HPV Typen 1 (mu-HPV) und 4 (gamma-HPV), die beide mit benignen Hautläsionen assoziiert sind, führte im Vergleich zur Kontrolle zu keiner Veränderung der Syntenin-2 Proteinspiegel. Das E6 Protein der HPV Typen 5, 8, 20 und 38 (beta-HPV), die alle mit der Entstehung von Hauttumoren assoziiert sind, führte dagegen zu signifikant erniedrigten Syntenin-2 Proteinspiegeln, wobei HPV8-E6 und HPV20-E6 den stärksten Effekt zeigten. Das HPV16-E6 führte zu einem verminderten Syntenin-2 Proteinspiegel, der mit HPV5-E6 und HPV38-E6 vergleichbar war. Damit konnte erstmals gezeigt werden, dass kutane HPV Typen die Spiegel eines PDZ Domänen haltigen Proteins beeinflussen können. Für HPV8-E6 konnte eindeutig belegt werden, dass es Syntenin-2 bereits transkriptionell inhibiert, was die beobachteten, verminderten Proteinspiegel zur Folge hat. Welchen Mechanismus die anderen HPV Typen nutzen, muss in weiteren Studien geklärt werden. Für HPV16-E6 hingegen konnte eine Repression des Syntenin-2 Proteins nachgewiesen werden. Inwiefern das PDZ Bindemotiv dabei eine Rolle spielt, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

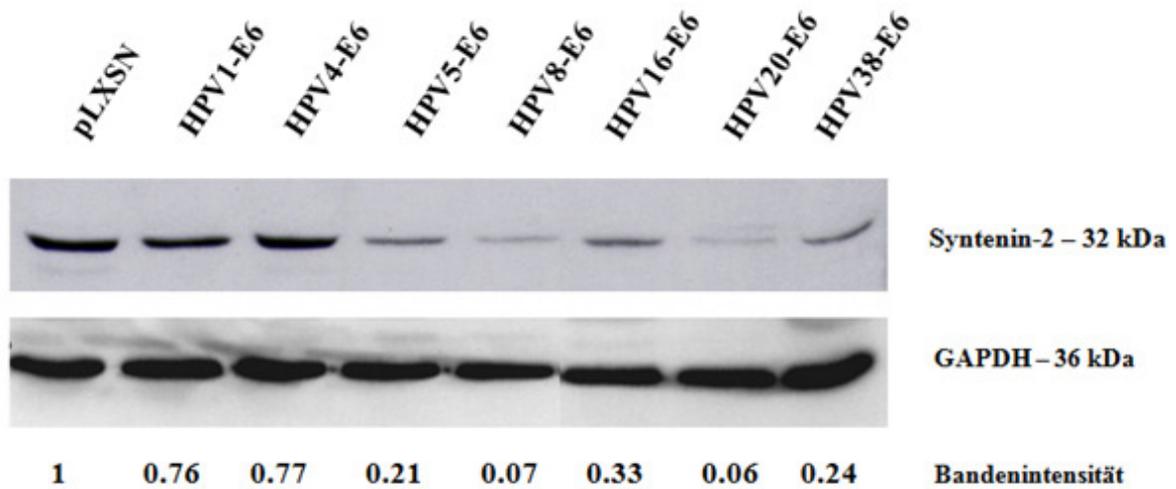


Abbildung 22: Western Blot Nachweis von Syntenin-2 in primären humanen Keratinozyten, die E6 Proteine verschiedener HPV Typen exprimierten. 15 µg Gesamtzell-Extrakt wurden in einem 12%-igen SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert, auf der Syntenin-2 detektiert wurde. Als Ladekontrolle wurde zusätzlich GAPDH nachgewiesen. Die Banden wurden quantifiziert und das Verhältnis von Syntenin-2 zu GAPDH in den pLXSN exprimierenden Keratinozyten gleich 1 gesetzt.

4.2.4. Syntenin-2 Expression in primären humanen Keratinozyten

Um das Expressionsmuster von Syntenin-2 in primären humanen Keratinozyten zu untersuchen, wurden Leervektor pLXSN und HPV8-E6 exprimierende Keratinozyten auf Glasdeckelchen ausgesät. Anschließend wurde Syntenin-2 mittels Immunzytochemie nachgewiesen. Dabei konnte gezeigt werden, dass Syntenin-2 in den großen, vermutlich differenzierenden Zellen der pLXSN Kultur sowohl kernlokalisiert als auch zytoplasmatisch vorliegt (Abb.23, Pfeilposition 1). Die kleinen, demnach undifferenzierten Zellen hingegen wiesen keine Syntenin-2 Expression auf (Abb.23, Pfeilposition 2). Die Expression von HPV8-E6 führte zur Inhibition der Syntenin-2 Expression in den differenzierteren Zellen, wobei vor allem der Syntenin-2 Gehalt im Nukleus deutlich abnahm.

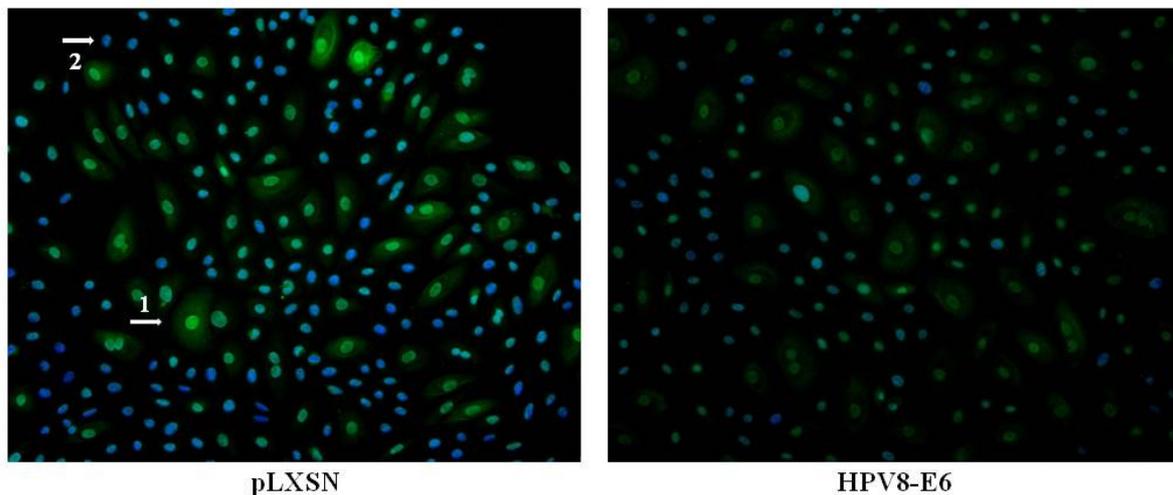


Abbildung 23: Immunzytochemischer Nachweis von Syntenin-2 in pLXSN und HPV8-E6 exprimierenden primären Keratinozyten. Auf Glasdeckelchen kultivierte primäre Keratinozyten wurden für Syntenin-2 gefärbt und mittels eines fluoreszierenden Zweitantikörpers dargestellt. Die Darstellung der Kerne erfolgte mit DAPI. Die Pfeilposition 1 weist auf große, differenziertere Keratinozyten hin, die Pfeilposition 2 auf kleine, Syntenin-2 negative Keratinozyten. Vergrößerung: 200x

4.2.5. Syntenin-2 Expression in normaler humaner Haut und organotypischen Hautkulturen von pLZRS, HPV8-E6, -E7 und –E6/E7 exprimierenden nTERT Zellen

Um erstmals das Expressionsmuster von Syntenin-2 in normaler humaner Haut zu charakterisieren, wurden Hautschnitte immunhistochemisch für Syntenin-2 gefärbt. In der Basalschicht wurden dabei nur vereinzelte, Syntenin-2 positive Keratinozyten beobachtet. Im Gegensatz dazu nahm die Syntenin-2 Proteinexpression in den suprabasalen Schichten deutlich zu und es konnte eine zytoplasmatische und nukleäre Färbung gezeigt werden. Dies deutete darauf hin, dass die Syntenin-2 Proteinexpression an die Differenzierung der Keratinozyten gekoppelt ist und im Zuge derer zunimmt. Im nächsten Schritt sollte das Syntenin-2 Expressionsmuster in nTERT basierenden, organotypischen Hautkulturen untersucht werden, die den Leervektor pLZRS bzw. HPV8-E6, -E7 oder –E6/E7 exprimierten. Dabei konnte gezeigt werden, dass Leervektor exprimierende nTERT Zellen, die im organotypischen Modell ein normal geschichtetes Epithel ausbilden, ein mit der normalen humanen Haut vergleichbares Syntenin-2 Expressionsmuster aufwiesen. Expression von HPV8-E6 führte in den nTERT Kulturen zur Störung der Differenzierung, was den Verlust der epithelialen Schichtung bedingte und gleichzeitig zu signifikant erniedrigten Syntenin-2 Proteinspiegeln führte. nTERT Kulturen, die HPV8-E7 exprimierten und eine vergleichbare Histologie wie die Kontrolle zeigten, zeigten auch ein vergleichbares Syntenin-2 Expressionsmuster. Wurden in den nTERT Kulturen HPV8-E6 und -E7 zusammen exprimiert, so überwog auch in diesem Modell der E6 Effekt. Damit konnten die in primären humanen Keratinozyten erhobenen Daten, die zeigten, dass HPV8-E6 einen inhibitorischen Effekt auf die Syntenin-2 Expression ausübt, auch in einem dreidimensionalen Hautmodell bestätigt werden.

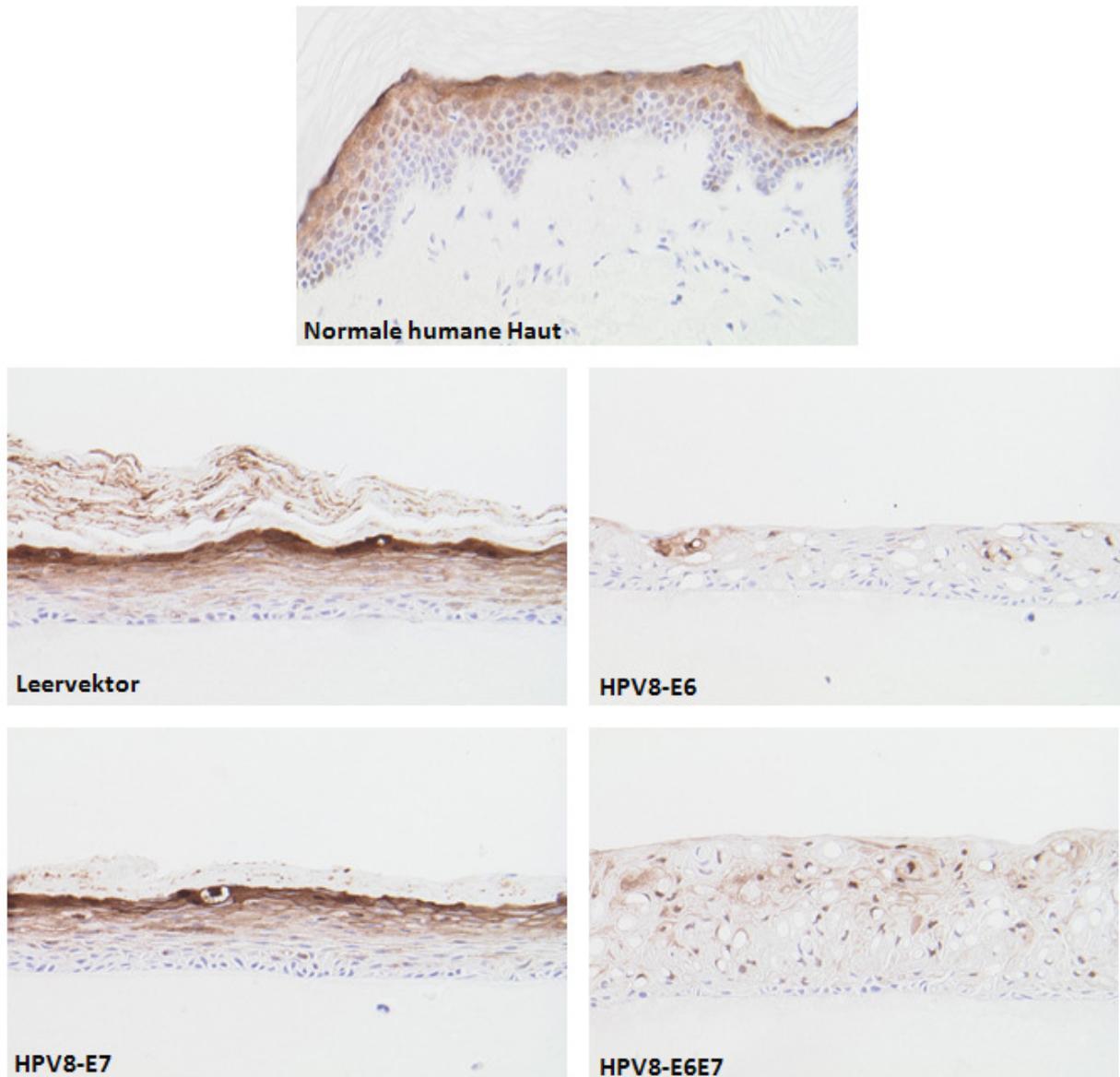


Abbildung 24: Immunhistochemische Färbung von Syntenin-2 in humaner Haut und nTERT basierenden organotypischen Hautschnitten. Dargestellt ist das Expressionsmuster von Syntenin-2 (Braunfärbung) in normaler humaner Haut im Vergleich zum organotypischen Hautmodell. nTERT Zellen exprimierten in diesem Hautmodell den Leervektor pLZRS im Vergleich zu HPV8-E6, -E7 oder -E6/E7. Die Gegenfärbung der Schnitte erfolgte mit Hämatoxylin (Blaufärbung). Vergrößerung: 200x

4.2.6. Charakterisierung der Syntenin-2 Expression in humanen kutanen PEK

Um das Expressionsmuster von Syntenin-2 in Hauttumoren zu untersuchen, wurden insgesamt 16 histologisch als PEK charakterisierte Biopsien immunhistochemisch gegen Syntenin-2 gefärbt. Dabei konnte in allen Biopsien unterschiedlicher Patienten ein vergleichbares Syntenin-2 Expressionsmuster nachgewiesen werden. In den Schnittbereichen, in denen noch ein geschichtetes differenzierendes Epithel vorhanden war, konnte eine Syntenin-2 Proteinexpression detektiert werden (Abb.25, a). In den invasiven Arealen war Syntenin-2 nur in vereinzelt Inseln differenzierter Zellen zu finden. Der generelle Großteil der Tumormasse hingegen zeigte keine Syntenin-2 Protein Expression (Abb.25, b). Diese Daten lassen die Vermutung zu, dass die Syntenin-2 Expression in Keratinozyten verloren geht, wenn diese einen invasiven/immortalisierten Phänotyp entwickeln.

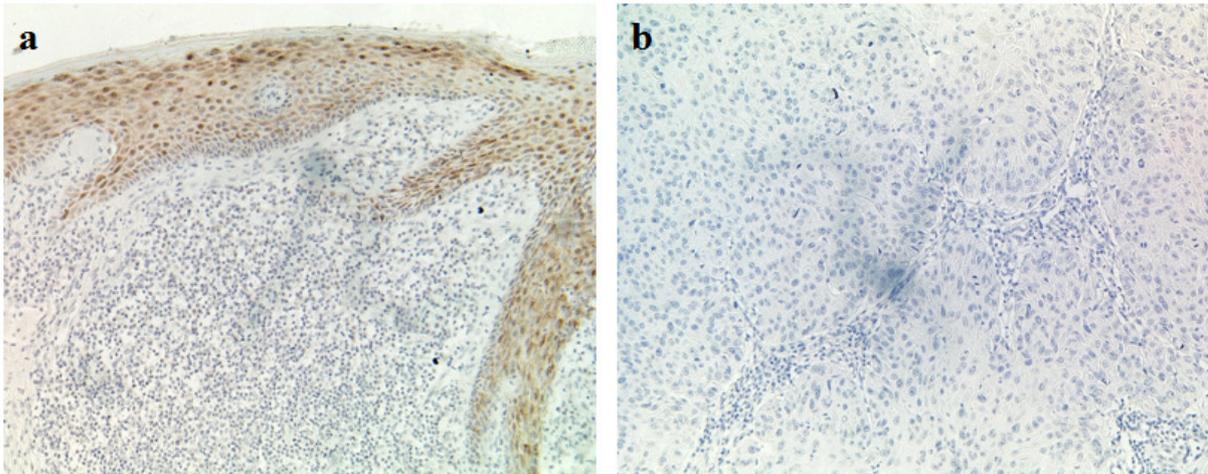


Abbildung 25: Immunhistochemischer Nachweis von Syntenin-2 in humanen PEK. Dargestellt ist die Syntenin-2 Proteinexpression (Braunfärbung) in zwei unterschiedlichen PEK. (a) Bereiche mit geschichtetem Epithel zeigten eine deutliche Syntenin-2 Färbung, wohingegen die (b) generelle Tumormasse keine Syntenin-2 Protein Expression aufwies. Vergrößerung: 200x

4.2.7. Bestimmung der Syntenin-2 mRNA Expression in immortalisierten epithelialen Zelllinien

Nachdem gezeigt werden konnte, dass HPV8-E6 zur Repression der Syntenin-2 mRNA Expression führt und die Syntenin-2 Proteinexpression in Keratinozyten verloren geht, wenn diese einen invasiven/immortalisierten Phänotyp entwickeln, wurden im Folgenden die Syntenin-2 mRNA Spiegel in verschiedenen kutanen Keratinozytenzelllinien quantifiziert. Diese Zellen exprimierten den Leervektor pLXSN oder HPV8-E6. Zum Vergleich wurden auch die zuvor beschriebenen Syntenin-2 mRNA Spiegel in primären Keratinozyten von Donor 1 und 2 gemittelt dargestellt. Im Vergleich zu diesen wurde in den spontan immortalisierten kutanen Zelllinien PM1, RTS3b und HaCaT eine niedrige Syntenin-2 Basalexpression gemessen (Abb.26). Eine zusätzliche Expression von HPV8-E6 führte zu keiner weiteren Senkung der Syntenin-2 mRNA Spiegel. Im Gegensatz dazu wurde in den durch Überexpression der katalytischen Untereinheit der Telomerase experimentell immortalisierten nTERT Zellen ein mit primären Keratinozyten vergleichbarer Syntenin-2 mRNA Spiegel nachgewiesen. In organotypischen Hautkulturen konnte bereits gezeigt werden, dass Expression von HPV8-E6 in nTERT Keratinozyten zur Repression der Syntenin-2 Proteinexpression führte (Abb.24).

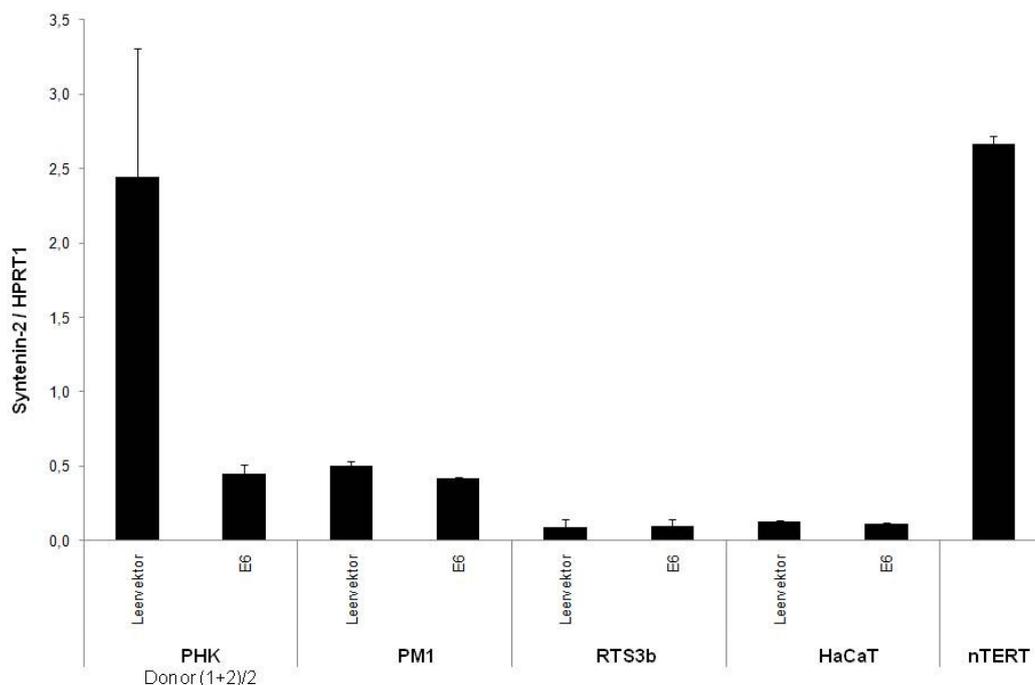


Abbildung 26: Spontan immortalisierte kutane Zelllinien weisen eine niedrige Syntenin-2 Basalexpression auf. Dargestellt sind die Ergebnisse der qRT-PCR Analysen in immortalisierten kutanen Zelllinien sowie der experimentell immortalisierten nTERT Linie im Vergleich zur Syntenin-2 mRNA Expression in primären humanen Keratinozyten (Mittelwert aus Donor 1 und 2). Die Syntenin-2 Expression wurde auf die absolute HPRT1 Expression bezogen. Die Säulen geben den Mittelwert mit Standardabweichung an.

Um die Frage zu klären, ob die Syntenin-2 mRNA Expression in der immortalisierten Zelllinie MDA-MB-231 im Vergleich zu primären Mammaepithelzellen HMEC ebenfalls erniedrigt ist, wurde Syntenin-2 auch in diesen Zellen quantifiziert. Wie für die spontan immortalisierten kutanen Keratinozyten gezeigt, wiesen auch spontan immortalisierte MDA-MB-231 Zellen im Vergleich zu den primären Zellen gleichen Ursprungs einen signifikant erniedrigten Syntenin-2 mRNA Spiegel auf. Damit konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der Syntenin-2 mRNA Expression möglicherweise einen generellen Mechanismus bei der Immortalisierung epithelialer Zellen darstellt.

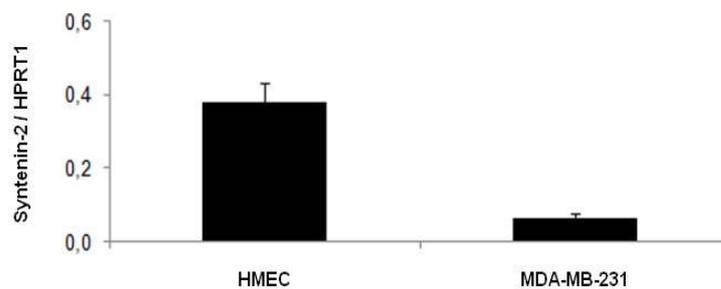


Abbildung 27: Syntenin-2 mRNA Spiegel in primären und immortalisierten Mammazellen. Der Syntenin-2 mRNA Gehalt wurde in primären HMEC sowie spontan immortalisierten MDA-MB-231 Zellen mittels qRT-PCR quantifiziert. Dargestellt ist die absolute Syntenin-2 mRNA Expression bezogen auf die HPRT1 Expression. Die Säulen geben den Mittelwert mit Standardabweichung an.

4.2.8. Syntenin-2 mRNA Expression in 5-Aza-2-Deoxycytidin behandelten Keratinozyten

Um zu überprüfen, ob die transkriptionelle Syntenin-2 Inhibition in den spontan immortalisierten RTS3b und HaCaT Zellen durch eine verstärkte Methylierung des Promotors bewerkstelligt wird, wurden diese Zellen für 3 Tage mit dem Agenz 5-Aza-2-Deoxycytidin in einer Konzentration von 10 μM behandelt. Wird die Base 5-Aza-2-Deoxycytidin anstelle des normalen Cytidins in die DNA eingebaut, so kann an dieser Stelle keine Methylierung mehr stattfinden. Anschließende qRT-PCR Analysen verdeutlichten, dass die Syntenin-2 mRNA Expression nach Behandlung um den Faktor 10 gesteigert werden konnte. Die DNA-Methylierung scheint damit in diesen Zellen eine wichtige regulatorische Funktion für die Syntenin-2 mRNA Expression zu erfüllen.

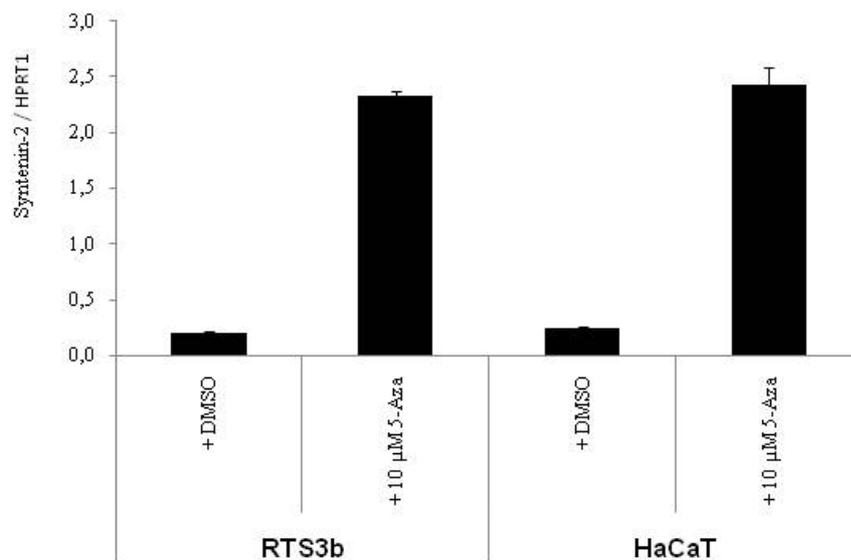


Abbildung 28: Quantifizierung der Syntenin-2 mRNA Spiegel in RTS3b und HaCaT Zellen nach 5-Aza-2-Deoxycytidin Behandlung. Die Zellen wurden für drei Tage mit 10 μM 5-Aza-2-Deoxycytidin behandelt und anschließend der Syntenin-2 mRNA Gehalt mittels qRT-PCR bestimmt. Die Expression wurde auf die absolute HPRT1 Expression normiert. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung.

Um zusätzlich einen möglichen Mechanismus der HPV8-E6 vermittelten Syntenin-2 Inhibition zu klären, wurden pLXSN und HPV8-E6 exprimierende primäre Keratinozyten ebenfalls mit 10 μM 5-Aza-2-Deoxycytidin behandelt und die Syntenin-2 mRNA Spiegel nach drei Tagen quantifiziert (Abb.29). Dabei konnte interessanterweise gezeigt werden, dass die absoluten Syntenin-2 mRNA Spiegel normiert gegen HPRT1 von ca. 3.4 in pLXSN

exprimierenden Keratinozyten nach 5-Aza-2-Deoxycytidin Behandlung auf 11.8 hochreguliert wurde. Im Vergleich dazu führte die Expression von HPV8-E6 wie erwartet zur transkriptionellen Inhibition von Syntenin-2 und 5-Aza-2-Deoxycytidin Behandlung dieser Zellen induzierte eine Aktivierung der Expression bis zu einem Wert von 4.5.

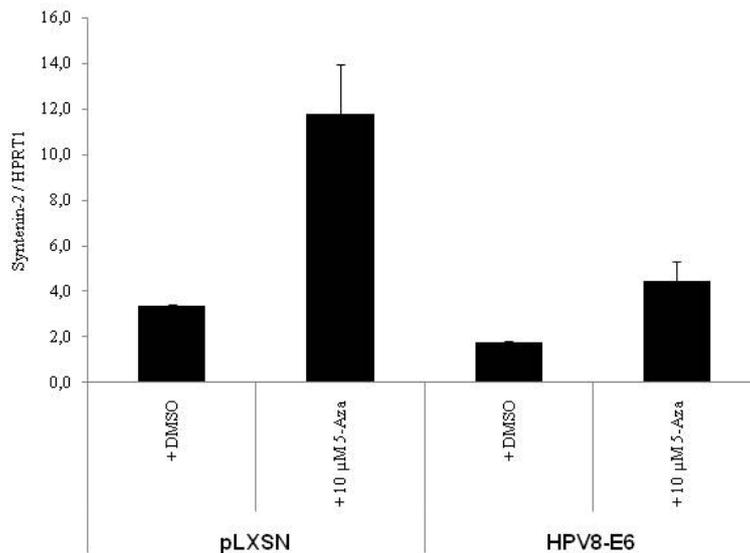


Abbildung 29: Quantifizierung der Syntenin-2 mRNA Spiegel in pLXSN und HPV8-E6 exprimierenden primären Keratinozyten nach 5-Aza-2-Deoxycytidin Behandlung. Die Zellen wurden für drei Tage mit 10 µM 5-Aza-2-Deoxycytidin behandelt und anschließend der Syntenin-2 mRNA Gehalt mittels qRT-PCR bestimmt. Die Expression wurde auf die absolute HPRT1 Expression normiert. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung.

4.2.9. Effekte des spezifischen knock-down von Syntenin-2 in primären humanen Keratinozyten

Um die biologische Bedeutung der Syntenin-2 Expression zu studieren, wurde ein stabiler knock-down in primären humanen Keratinozyten durchgeführt. Hierzu wurde eine shRNA gegen humanes Syntenin-2 in den retroviralen Vektor pSuperior kloniert. Nach Infektion primärer humaner Keratinozyten mit diesem Vektor und Selektion der positiven Klone wurden diese expandiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Kontrollkultur bis Passage 7 wuchs und dann die Proliferation einstellte und nur noch vereinzelte, differenziertere Keratinozyten beobachtet werden konnten (Abb.30, a links). Die shSyntenin-2 exprimierenden knock-down Zellen konnten in dieser Zeit für zwei weitere Passagen kultiviert werden und die Kultur bestand hauptsächlich aus kleinen, proliferierenden Keratinozyten (Abb.30, a rechts). In den shSyntenin-2 exprimierenden Keratinozyten konnte

mittels Western Blot der knock-down von Syntenin-2 bestätigt werden (Abb.30, b). Obwohl Syntenin-2 und Syntenin-1 hohe Homologien zeigen (Koroll et al. 2001), beeinträchtigte der knock-down die Syntenin-1 Expression nicht (Abb.30, b). Um zu überprüfen, ob die verlängerte Lebensspanne der shSyntenin-2 Zellen mit einer veränderten Expression des Keratinozyten-Differenzierungsmarkers Involucrin korrelierte, wurde dieser zusätzlich im Western Blot überprüft. Dabei konnte gezeigt werden, dass der spezifische knock-down von Syntenin-2 in primären Keratinozyten zu einer erniedrigten Involucrin Expression führte, die auch in HPV8-E6 exprimierenden Keratinozyten beobachtet werden konnte. Somit konnte gezeigt werden, dass die HPV8-E6 bedingte Differenzierungsstörung möglicherweise direkt über die Erniedrigung der Syntenin-2 Expression vermittelt werden kann.

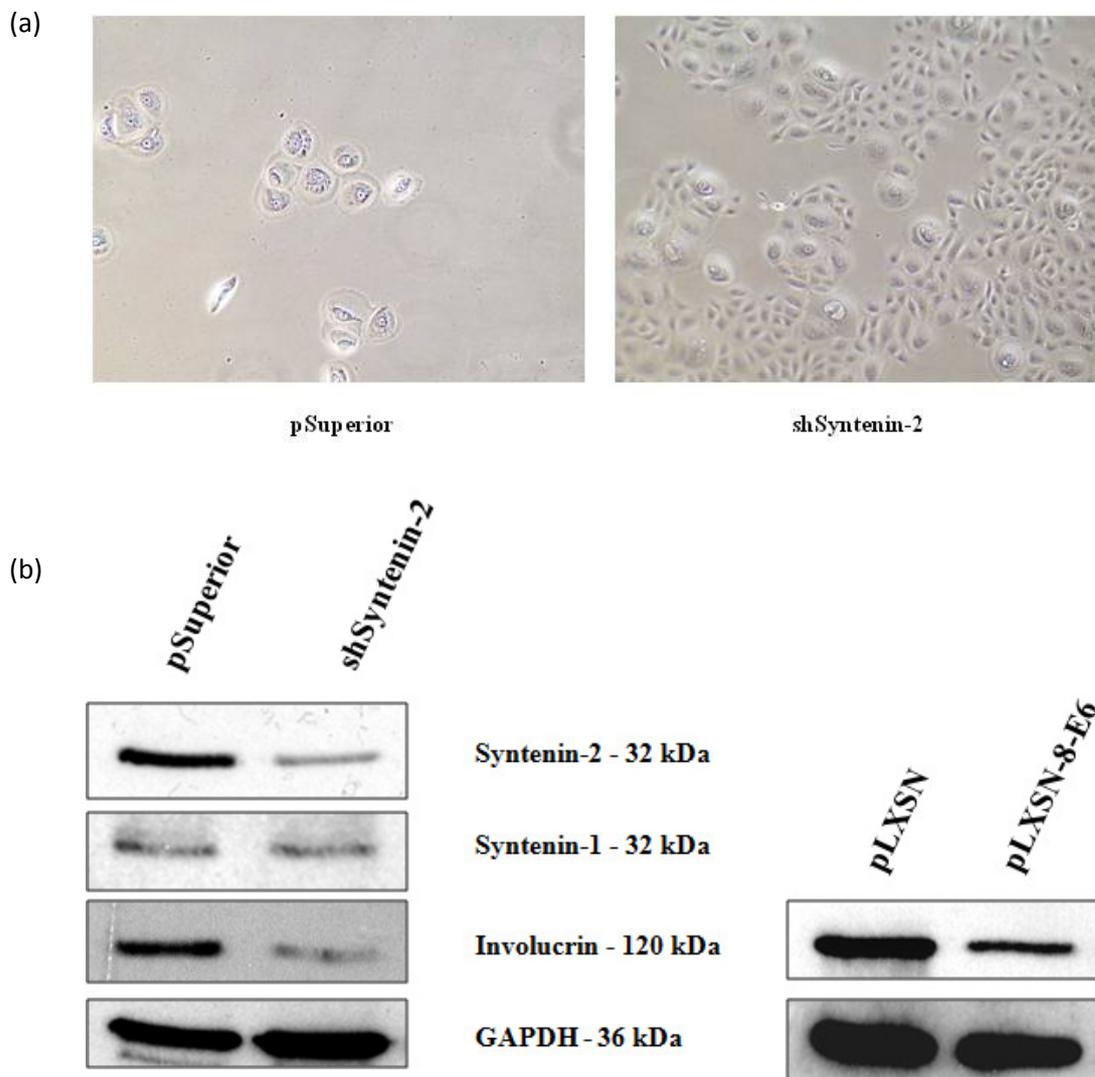


Abbildung 30: Wachstumsverhalten, Zellmorphologie und Expression von Syntenin-2 und Involucrin in Kontrollvektor und shSyntenin-2 exprimierenden primären Keratinozyten. (a) Dargestellt sind Keratinozyten der Passage 7, die den Leervektor pSuperior (links) oder sh-Syntenin-2 (rechts) exprimieren. Vergrößerung: 200x. (b) 15 µg Ganzzell-Extrakt wurden in einem 12%-igen SDS Gel aufgetrennt und anschließend mittels Western Blot Analyse für Syntenin-1, Syntenin-2 und Involucrin untersucht. Als Ladekontrolle wurde zusätzlich GAPDH nachgewiesen.

Um zu untersuchen, ob eine durch knock-down von Syntenin-2 induzierte Differenzierungsstörung sich im differenzierenden Modell widerspiegelt, wurden shSyntenin-2 exprimierende Keratinozyten im organotypischen Hautmodell getestet. Hierzu wurden die primären Keratinozyten zunächst auf einer deepidermierten humanen Dermis ausgesät und anschließend auf einem Metallgitter positioniert an der Luft-Medium-Grenze inkubiert, wodurch die Differenzierung der Keratinozyten induziert wurde (Prunieras et al. 1983). Nach 14-tägiger Inkubation bildet sich eine dreidimensionale, der natürlichen Haut sehr nahe kommende Epidermis aus. Primäre Keratinozyten, die den Leervektor exprimierten, bildeten im organotypischen Hautmodell alle Schichten der Epidermis aus beginnend mit Stratum basale über das Stratum spinosum und das Stratum granulosum bis hin zum Stratum corneum (Abb. 31, a). Die shSyntenin-2 exprimierenden Keratinozyten hingegen bildeten in diesem Modell keine geschichtete Epidermis aus (Abb.31, b). In der Histologie konnten zwar vereinzelte Keratinozyten beobachtet werden, jedoch konnten diese keine durchgängige, intakte Basalschicht ausbilden, wodurch die weitere Differenzierung der Keratinozyten unmöglich wurde. Damit konnte gezeigt werden, dass der spezifische knock-down von Syntenin-2 in primären humanen Keratinozyten im dreidimensionalen Hautmodell eine gravierende Störung der Keratinozyten Differenzierung verursacht.

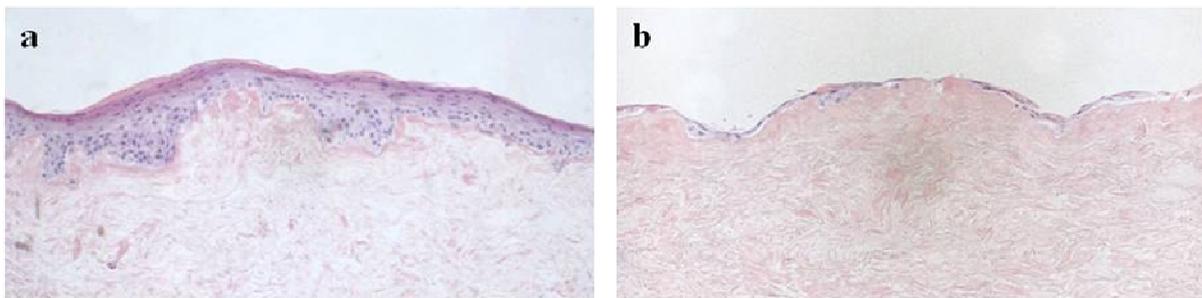


Abbildung 31: Histologie der pSuperior und shSyntenin-2 exprimierenden primären Keratinozyten im dreidimensionalen organotypischen Hautmodell. Den Leervektor pSuperior (a) oder shSyntenin-2 (b) exprimierende Keratinozyten wurden auf der Oberseite deepidermierter Dermis ausgesät. Die Keratinozyten wurden nach 14-tägiger Inkubation an der Luft-Medium-Grenze in 4% Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Dargestellt sind 4 μ m Schnitte, die mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt wurden.

5. Diskussion

Eine ätiologische Rolle humaner Papillomviren bei der Entstehung des NMHK wird bis dato kontrovers diskutiert. Die Studie von Forslund et al. (2004), in der gezeigt werden konnte, dass Hauttumoren, von denen die obersten Schichten entfernt wurden, eine signifikant erniedrigte HPV Viruslast aufweisen, spricht gegen diese Annahme. Dem gegenüber stehen die Ergebnisse von Feltkamp et al. (2003), die eine signifikant erhöhte Seroreaktivität der NMHK Patienten gegenüber HPV8 belegen konnten. Für eine ätiologische Rolle sprechen auch die Studien von Pfister et al. (2003) und Weissenborn et al. (2005), in denen gezeigt werden konnte, dass die Viruslast in den als Vorstufen von Hauttumoren betrachteten Aktinischen Keratosen signifikant erhöht ist. Im Zuge der Tumorentwicklung verbleiben nur wenige Zellen HPV positiv. Damit spielt HPV möglicherweise insbesondere während der frühen Phase der Tumorgenese eine Rolle und wird wahrscheinlich für die Aufrechterhaltung des malignen Zustands nicht mehr benötigt. Mit der Etablierung transgener Mauslinien, die die GFR von HPV8 oder nur –E6 bzw. –E2 unter der Kontrolle des humanen K14 Promotors exprimieren, konnte erstmals das onkogene Potential von HPV8 im *in vivo* Modell beschrieben werden (Schaper et al. 2005; Pfefferle et al. 2008; Marcuzzi et al. 2009). Eine einmalige UVA/B-Bestrahlung dieser Tiere reichte aus, um die Expression der HPV8 Gene zu erhöhen und die Papillomentwicklung zu induzieren (Pfefferle et al. 2008; Marcuzzi et al. 2009). Mechanische Verwundung der GFR Tiere führte ebenfalls zu einer erhöhten Transgenexpression und zur Papillomentwicklung (Hufbauer et al. 2010). Durch Tätowieren einer spezifischen siRNA gegen HPV8-E6 konnte die durch die Verwundung induzierte Papillomentwicklung in HPV8-GFR Mäusen signifikant verringert werden. Da aus Zellkulturexperimenten bekannt war, dass der E6 knock-down nach ca. 3 Tagen abnimmt, konnte daraus geschlossen werden, dass die erhöhte Expression der HPV8 Gene besonders zu den frühen Zeitpunkten entscheidend für die Papillomentwicklung in HPV8-GFR Tieren war (Hufbauer et al. 2010). Um die Kinetik der Papillomentwicklung zu frühen Zeitpunkten genauer zu studieren, wurden in dieser Arbeit 5 Wochen alte Tiere, deren Haut noch keine histologischen Besonderheiten zeigte, einmalig mit UVA/B bestrahlt. Diese Behandlung führte in FVB/n wt und HPV8-GFR Mäusen zunächst zur starken Schädigung der Epidermis. Die Regeneration der interfollikulären Epidermis wurde von Keratinozyten bewerkstelligt, die aus den Haarfollikeln einwanderten und PCNA positive, proliferierende Keratinozyten konnten zu diesem Zeitpunkt in allen Schichten der neu gebildeten Epidermis beobachtet werden. Der Prozess der Reepithelialisierung erfolgte dabei in der transgenen Maushaut schneller. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Epidermis in beiden Mauslinien bis Tag

10 einen vergleichbaren hyperproliferativen Phänotyp aufwies. Ab Tag 10 hingegen setzte in den FVB/n wt Tieren die Wundheilung ein und mit Erreichen von Tag 24 entsprach die Haut der unbehandelten Kontrolle, während sich innerhalb dieser Zeitspanne in den HPV8-GFR Tieren ein Papillom entwickelte. Die Untersuchung der PARP Expression zu späten Zeitpunkten nach UV-Bestrahlung zeigte keine Veränderungen der Apoptoserate. Die Analyse der PCNA Expression hingegen zeigte, dass in HPV8-GFR Tieren ab Tag 13 in den basalen und suprabasalen Schichten vermehrt PCNA positive Keratinozyten nachgewiesen werden konnten, so dass daraus geschlossen werden konnte, dass die HPV8 induzierte Zunahme der Keratinozyten-Proliferation wahrscheinlich die Ursache für die Papillomentwicklung in HPV8-GFR transgenen Mäusen ist.

UV-Bestrahlung führt zu einer Aktivierung des humanen K14 Promotors (Kinouchi et al. 2002), was in der HPV8-GFR Maus in einer gesteigerten Expression der frühen HPV8 Gene resultierte (Hufbauer et al. 2010). Die Untersuchung der K14 Expression in FVB/n wt Mäusen zeigte, dass auch der murine K14 Promotor durch UV aktiviert wird. Dies hat zur Folge, dass die K14 Expression während der frühen Zeitpunkte nach UV-Behandlung (1-10 Tage) signifikant ansteigt und im Zuge von Wundheilungsprozessen zwischen Tag 10 und 24 wieder auf ein normales Expressionsniveau sinkt. In der transgenen Maushaut hingegen blieben die K14 mRNA Spiegel auch zu späten Zeitpunkten nach UV signifikant erhöht, was auf eine gestörte Wundheilung hindeuten könnte (Hufbauer et al. 2010). Kommt es zur Verletzung der Epidermis, so sekretieren Keratinozyten Interleukin-1 (IL-1), welches parakrin dermale Fibroblasten und Lymphozyten aktiviert. Gleichzeitig werden Keratinozyten autokrin stimuliert, wodurch diese zur Wunde migrieren und dort proliferieren können, was in beiden Mauslinien durch PCNA positive Keratinozyten am Infundibulum nachgewiesen werden konnte. In diesem aktivierten Stadium exprimieren Keratinozyten K6 und K16 und sezernieren proinflammatorische Faktoren wie TNF- α und epidermale Wachstumsfaktoren wie TGF- α , die die Aktivierung aufrecht erhalten. Eine stark erhöhte Expression der Keratine K6 und K16 konnte bereits in HPV8-GFR positiven, primären Keratinozyten in Monolayer-Kulturen gezeigt werden, was ein Beleg für die HPV8 induzierte Aktivierung positiver Keratinozyten ist (Akgül, 2007). Während der epidermalen Wundheilung migrieren Lymphozyten zur Wunde, die bei Abschluss der Wundheilung IFN- γ sezernieren, welches parakrin den Keratinozyten das Signal vermittelt, dass die Reepithelialisierung abgeschlossen werden kann. Gleichzeitig wandern Fibroblasten zur Wunde und produzieren Komponenten der extrazellulären Matrix, die die Ausbildung einer intakten Basalmembran ermöglichen. Zusätzlich sezernieren sie TGF- β , welches parakrin den Keratinozyten das Signal vermittelt,

dass die Wundheilung hiermit abgeschlossen ist (Freedberg et al. 2001). Man kann vermuten, dass die Expression der HPV8 Onkogene durch Interaktion mit Mechanismen der Wundheilung die Keratinozyten in einem kontinuierlich aktivierten Zustand hält. Bei Wundheilung und Tumorgenese sind viele zelluläre Prozesse vergleichbar, weshalb bereits vor 40 Jahren Tumore in der Literatur als nicht heilende Wunden beschrieben wurden (Haddow 1972; Dvorak 1986).

Welchen Einfluss die Expression der HPV8 Onkogene auf die zelluläre Genexpression ausübt, ist bis heute wenig bekannt. Im Rahmen einer Kooperation mit dem DKFZ in Heidelberg wurde ein Micro Array durchgeführt, der zeigte, dass in unbehandelter HPV8-GFR Maushaut interessanterweise nur wenige zelluläre Gene durch die Expression der frühen HPV8 Gene beeinflusst werden. Ziel dieser Arbeit war es zunächst, die mittels Micro Array erhobenen Daten zu verifizieren. In diesem Zusammenhang konnte für die meisten Gene aus Tabelle 2 keine signifikante Deregulation in unbehandelter und/oder UV bestrahlter HPV8-GFR Maushaut gemessen werden, weshalb für diese Gene eine Rolle bei der HPV8 induzierten Papillomentwicklung ausgeschlossen wurde. Für *Spr2*, *StefinA* und *Dusp1* hingegen konnte die laut Micro Array vorhergesagte Tendenz einer mRNA Hochregulation in nicht-läsionaler HPV8-GFR Maushaut in qRT-PCR Analysen bestätigt werden. Für *StefinA* und *Spr2* (Micro Array Vorhersage jeweils 15x hochreguliert) wurde eine Hochregulation um den Faktor 10 bzw. 3 bestimmt, während die gemessene 4.3-fache Hochregulation der *Dusp1* mRNA Expression dem vorhergesagten Wert des Micro Arrays von ca. 3-fach entsprach. Abweichungen zum Micro Array könnten aus den unterschiedlichen experimentellen Bedingungen resultieren. Für den Micro Array wurden adulte Mäuse im Alter von 20 Wochen eingesetzt, die makroskopisch keine Hautveränderungen aufwiesen. Mikroskopische epidermale Veränderungen, z.B. eine beginnende Hyperproliferation, können in diesem Alter nicht ausgeschlossen werden. Dies könnte insbesondere die Absolutwerte der HPV8-GFR Zielgene *StefinA* und *Spr2* beeinflusst haben, die mit epidermaler Hyperproliferation assoziiert sind (Vasilopoulos et al. 2008; Pasic et al. 2009). Erfahrungswerte haben gezeigt, dass das optimale Alter der Mäuse für Bestrahlungsversuche und kinetische Analysen um 5 Wochen liegt, da der Haarzyklus zwischen der 3. und 6. Woche nach Geburt synchron verläuft (Plikus and Chuong 2008). Ab einem Alter von 6 Wochen hingegen wird der Haarzyklus asynchron, was zu Unterschieden in Fellwachstum und -dichte führt. Dies kann problematisch sein, da der Haarzyklus die Proliferation und Differenzierung der im Haarfollikel lokalisierten Keratinozyten beeinflusst (Schneider et al.

2009), weshalb ein asynchroner Haarzyklus Unterschiede in der Genexpression verursachen kann, die nicht primär auf die Expression der frühen HPV8 Gene zurückzuführen sind.

Für StefinA (Ergebnisse dieser Arbeit) und Sprr2 (Alborzi 2011) konnte gezeigt werden, dass deren Expression zu frühen Zeitpunkten nach UV-Bestrahlung (0-10 Tage) in beiden Mauslinien anstieg, aber in den HPV8-GFR transgenen Tieren kontinuierlich höher war als in den FVB/n wt Mäusen. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass die UV-induzierte Erhöhung der frühen HPV8 Gene auch nach UV-Bestrahlung einen direkten/indirekten Einfluss auf die StefinA und Sprr2 mRNA Expression ausübte. Während der Wundheilung beginnend ab Tag 10 nach UV-Bestrahlung konnten in den FVB/n wt Tieren sinkende StefinA und Sprr2 mRNA Spiegel beobachtet werden, während die anhaltende Hyperproliferation in der transgenen Maushaut mit erhöhten StefinA und Sprr2 mRNA Spiegeln korrelierte. Eine signifikant erhöhte Expression beider Gene konnte auch in einem UV-induzierten Papillom einer FVB/n wt Maus nachgewiesen werden, was darauf hindeutete, dass die mRNA Hochregulation zu späten Zeitpunkten nach UV-Bestrahlung (13-24 Tage) unabhängig von HPV8 und mit Hyperproliferation assoziiert ist. StefinA und Sprr2 sind in der Maus auf einem Abschnitt des Chromosoms 3 lokalisiert, der als *epidermal differentiation complex* (EDC) bezeichnet wird (Patel et al. 2003) und eine Rolle bei der Aufrechthaltung der epidermalen Integrität und Barrierefunktion spielt. Deregulation des EDC ist mit hyperproliferativen Hauterkrankungen des Menschen assoziiert (Pasic et al. 2009; Roberson and Bowcock 2010). Zudem ist bekannt, dass Störungen der epidermalen Barrierefunktion zu einer gesteigerten DNA-Synthese in basalen Keratinozyten führt, welche in einer Hyperplasie resultiert (Proksch et al. 1993). Demnach könnte die Deregulation von StefinA und Sprr2 zur Proliferation der Keratinozyten beigetragen haben. Für Sprr2 konnte jedoch gezeigt werden, dass die mRNA Expression in HPV8-E6 Maushaut inhibiert ist (Alborzi 2011), obwohl HPV8-E6 Mäuse im Hinblick auf die Papillomentwicklung eine Phänokopie der HPV8-GFR Tiere darstellen. Dies deutet darauf hin, dass die Deregulation von Sprr2 während der HPV8 induzierten Papillomatose nicht zwingend erforderlich ist, wohingegen StefinA in beiden transgenen Mauslinien hochreguliert war und damit vermutlich eine generelle Rolle früh bei der HPV8 induzierten Tumorentstehung spielen könnte. Interessanterweise konnte kürzlich ein anti-apoptotischer Effekt von StefinA in primären Keratinozyten demonstriert werden, in denen StefinA zur Inhibition der Caspase-3 führte. Die Haut transgener Mäuse, die konstitutiv StefinA exprimieren, war zudem resistenter gegenüber UVB-induzierter Apoptose (Takahashi et al. 2007). In der HPV8-GFR Maushaut konnte dagegen hier nach UV keine Deregulation der Apoptose nachgewiesen werden.

Das murine Ortholog der Serinprotease Kallikrein-6 wurde von Breitenbach et al. (2001) als TPA induzierbares Gen im Zwei-Stufen-Karzinogenese Modell identifiziert, in dem gezeigt werden konnte, dass die Kallikrein-6 Expression während der Tumorgenese zunimmt. Dabei führt die Expression von Kallikrein-6 zur Abspaltung der extrazellulären E-Cadherin Domäne, wodurch parakrin die normale E-Cadherin Funktion inhibiert wird, was die Migration und Invasion der Keratinozyten begünstigt (Klucky et al. 2007). Darüber hinaus ist bekannt, dass Kallikrein-6 in vielen Tumoren überexprimiert wird und eine Rolle als Tumor-Biomarker spielt (Paliouras et al. 2007). Da Kallikrein-6 demnach einen generellen Tumormarker darstellt, ist zu vermuten, dass die erhöhte mRNA Expression von Kallikrein-6 zu späten Zeitpunkten in HPV8-GFR Tieren höchstwahrscheinlich auch unabhängig von HPV8 ist.

Lipocalin-2 konnte dagegen in humanen Keratinozyten und Geweben als Zielgen von alpha und beta HPV Typen identifiziert werden (Syrjänen et al. 2010; Akgül et al. 2011). Inwiefern die Hochregulation von Lipocalin-2 und auch von Fos11 zu späten Zeitpunkten in der transgenen Maushaut unmittelbar HPV8 abhängig bzw. generell tumorspezifisch ist, muss in weiteren Arbeiten geklärt werden. Es konnte jedoch hier gezeigt werden, dass bereits in der unveränderten Maushaut Kallikrein-6 und Fos11 Zielgene für HPV8-E2 sind. Welche Bedeutung dieser Aktivierung zukommt, bleibt fraglich. Die E2 vermittelte Aktivierung der Kallikrein-6 mRNA Transkription spielt vermutlich im Kontext der Expression der gesamten frühen HPV8 Region keine entscheidende Rolle, da in HPV8-GFR Tieren keine Kallikrein-6 Überexpression gemessen werden konnte. Die Effekte der anderen HPV8 Onkogene dominieren über den E2 Effekt. Die Fos11 mRNA wurde sowohl durch HPV8-E6 als auch –E2 induziert, erreichte aber in der HPV8-GFR Maushaut einen vergleichbaren Spiegel wie in den Kontrolltieren. Da keine HPV8-E7 transgene Mauslinie etabliert ist, konnte dessen Funktion in diesem Modell nicht untersucht werden. Aufgrund der erhobenen Daten wäre eine Repression durch HPV8-E7 denkbar, die die aktivierenden Effekte der anderen Onkogene aufheben könnte.

Die Syntenin-2 Transkription wurde in den ersten Tagen nach UV-Bestrahlung reprimiert und zu späten Zeitpunkten mäßig aktiviert. Welche Bedeutung dieser Modulation der Syntenin-2 Expression zukommt, bleibt zunächst unklar, da soweit keine Funktionen von Syntenin-2 in der murinen Haut beschrieben sind. Funktionen von Syntenin-2 sind aber in humanen Zellen beschrieben, die im zweiten Teil der Diskussion näher erläutert werden.

Zusammenfassend war 13-24 Tage nach UV-Bestrahlung die Expression der zellulären Gene StefinA, Kallikrein-6, Lipocalin-2, Fos11 und Syntenin-2 deutlich aktiviert. Bei StefinA und

Spr2 wird diese Deregulation initial direkt durch HPV8 und später wahrscheinlich hauptsächlich durch den Prozess der Tumorentstehung verursacht. Die anderen zellulären Gene wurden erst zu späten Zeitpunkten bei beginnender Papillomatose vermehrt exprimiert. Da die zelluläre Genexpression auf HPRT1 und nicht auf das Keratinozyten-spezifische Keratin14 normiert wurde, das selbst durch UV reguliert wird (Hufbauer et al. 2010), war keine Unterscheidung zwischen Keratinozyten und Dermiszellen möglich. Die gemessene Hochregulation in papillomatöser Maushaut ist deshalb wahrscheinlich zum größten Teil auf die stark erhöhte Anzahl von Keratinozyten zurückzuführen und somit auf die Papillomentstehung.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die in Mäusen nach UV-Bestrahlung beobachtete auffällige Modulation der Syntenin-2 Expression in humanen Keratinozyten und insbesondere im Hinblick auf HPV untersucht. Während in der HPV8-GFR Maus eine Modulation der Syntenin-2 Expression durch das Virus nicht deutlich wurde, waren die E6 Proteine der beta HPV Typen 5, 8, 20 und 38, die in Hautkarzinomen gefunden werden, in der Lage, die Syntenin-2 Proteinexpression in humanen Keratinozyten zu inhibieren. Die E6 Proteine der HPV Typen 1 und 4, welche mit benignen Hautläsionen assoziiert sind, waren ebenso wie HPV16-E6 nicht in der Lage, die Syntenin-2 Transkription zu reprimieren.

Syntenine wurden ursprünglich als Interaktionspartner der Syndekane identifiziert, wobei sie über ihre PDZ Domänen an die zytoplasmatische Domäne der Syndekane binden (Grootjans et al. 1997). Syndekane bilden eine Familie von transmembranen Heparansulfat-Proteoglykanen, die eine Rolle als Ko-Rezeptoren spielen, aber auch an multiplen zellulären Vorgängen wie Zellwachstum, Adhäsion und Migration beteiligt sind (Couchman 2010). Syntenin-2 weist eine Sequenzidentität von 58% zu Syntenin-1 auf (Koroll et al. 2001).

Da über die Expression des Syntenin-2 in humaner Haut bislang nichts bekannt ist, wurde das Expressionsmuster im Rahmen dieser Arbeit erstmals untersucht. Dabei konnte eine differenzierungsabhängige Syntenin-2 Expression in gesunder humaner Epidermis beobachtet werden. Ein vergleichbares Expressionsmuster wurde auch in nTERT basierenden organotypischen Hautmodellen beobachtet. In diesem Modell führte die Expression von HPV8-E6 zur Inhibition der Syntenin-2 Expression und parallel zum Verlust der normalen epithelialen Schichtung. Der Verlust von Zell-Zell-Kontakten und Zellpolarität ist ein generelles Charakteristikum epithelialer Tumoren. In diesem Zusammenhang konnte nicht nur für HPV sondern auch für weitere humane Tumoviren belegt werden, dass sie gezielt PDZ

Proteine wie Dlg1 und PATJ inhibieren, die dabei eine wichtige Rolle spielen (Javier 2008; Thomas et al. 2008). Die Inhibition des PDZ Proteins Syntenin-2 könnte ebenfalls die Tumorentstehung begünstigen, da in humanen PEK unabhängig vom HPV Status Syntenin-2 nur in differenzierten Arealen zu finden war, wohingegen in nicht differenzierten, invasiven Arealen kein Syntenin-2 Protein detektiert werden konnte. Über die Funktion des Syntenin-2 ist allerdings nur wenig in der Literatur beschrieben. Obwohl Syntenin-2 und Syntenin-1 in ihren PDZ Domänen eine Sequenzidentität von 69% zeigen, binden sie nicht die gleichen zellulären Proteine. Bislang konnte für Syntenin-2 nur eine Bindung an das Tertspanin L6 Antigen nachgewiesen werden (Borrell-Pages et al. 2000). Interessanterweise binden aber beide Syntenine mit einer sehr hohen Affinität an das Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂). Dabei spielt das Syntenin-2 eine entscheidende Rolle bei der PIP₂ Verteilung in Nukleoli. Knock-down von Syntenin-2 führte in MCF-7 (Mammakarzinom-Zellen) und U2OS (Osteosarkom-Zellen) zu einer Fehlverteilung von PIP₂ in den Nukleoli und in beiden Zelllinien zur verringerten Zellteilung und gesteigerten Apoptose (Mortier et al. 2005). In primären Keratinozyten konnte für Syntenin-2 auch eine überwiegend nukleäre Lokalisation nachgewiesen werden. Der spezifische knock-down von Syntenin-2 führte jedoch im Gegensatz zu den Daten von Mortier et al. (2005) in Keratinozyten zu einer verlängerten Lebensspanne und zur Störung der Expression des Differenzierungsmarkers Involucrin und generell der Differenzierung im organotypischen Hautmodell, was beides auch in HPV8-E6 exprimierenden Keratinozyten beobachtet werden konnte (Leverrier et al. 2007, B. Akgül, persönliche Mitteilung). Damit konnte gezeigt werden, dass Expression von HPV8-E6 und knock-down von Syntenin-2 ähnliche Effekte auf primäre Keratinozyten ausüben, was den Rückschluss zulässt, dass HPV8-E6 die Störung der Differenzierung über direkte/indirekte Inhibition von Syntenin-2 bewerkstelligen könnte.

Interessanterweise waren auch in HPV16-E6 exprimierenden Keratinozyten die Syntenin-2 Proteinspiegel erniedrigt, obwohl HPV16-E6 die Syntenin-2 Transkription nicht reprimierte. HPV16-E6 erreicht die Senkung des Syntenin-2 Spiegel wahrscheinlich über Protein-Protein-Wechselwirkung mittels seines C-terminalen PDZ Bindemotivs und anschließender proteolytischer Degradation. Alpha und beta HPV Typen inhibieren somit wahrscheinlich die Expression von Syntenin-2 auf unterschiedliche Weise, erreichen aber letztendlich den gleichen Effekt in der Zelle. Ein weiteres Beispiel für unterschiedliche Regulation von zellulären Proteinen durch alpha und beta HPV Typen liefert die Modulation der p53 Aktivität. Beta HPV Typen sind im Vergleich zum genitalen HPV16 nicht in der Lage p53 zu binden und zu degradieren. Das beta HPV38 nutzt aber einen alternativen

Mechanismus über Akkumulation des p53 Antagonisten $\Delta Np73$ und inhibiert somit die Funktion des p53 (Accardi et al. 2006).

Ein grundlegender Unterschied zwischen mukosalen und kutanen Tumoren ist der Befund, dass in den mukosalen Tumoren jede Zelle mindestens eine virale DNA-Kopie enthält und die kontinuierliche Expression der Onkogene für die Aufrechterhaltung des malignen Phänotyps zwingend erforderlich ist, während in kutanen Tumoren nur vereinzelte Zellen HPV positiv sind. Die Expression der Onkogene kutaner HPV ist für die Aufrechterhaltung des malignen Zustandes nicht mehr nötig. Sie spielt, wie schon erörtert, möglicherweise eine entscheidende Rolle während der frühen Stadien der Papillomentwicklung. Vor dem Hintergrund dieser Hypothese war es interessant zu sehen, dass die heute HPV negativen, immortalen Zelllinien RTS3b und PM1 in den allerfrühesten Passagen positiv für beta HPV Typen waren (Purdie et al. 1993; Proby et al. 2000) und verglichen mit primären Keratinozyten und den experimentell immortalisierten, HPV negativen nTERT Zellen eine sehr niedrige Syntenin-2 Basalexpression aufwiesen, die durch Expression von HPV8-E6 nicht weiter erniedrigt werden konnte. Dies lässt die Spekulation zu, dass HPV in diesen Zellen in den frühen Passagen eine möglicherweise epigenetische Modifikation des Syntenin-2 Promotors ausgelöst haben könnte, die über die Passagen hinweg aufrechterhalten wurde, ohne dass das HPV Genom dafür benötigt wird. Dass der Syntenin-2 Promotor in RTS3b und auch HaCaT Zellen tatsächlich methyliert vorliegt, konnte durch 5-Aza-2-Deoxycytidin Behandlung, die die Methylierung der DNA verhindert, gezeigt werden. Diese Behandlung konnte auch in HPV8-E6 exprimierenden primären Keratinozyten die Syntenin-2 mRNA Expressionsspiegel um den Faktor 2.5 steigern. Interessanterweise führte die 5-Aza-2-Deoxycytidin Behandlung aber auch in Leervektor pLXSN exprimierenden primären Keratinozyten zu einer um den Faktor 3.5 gesteigerten Syntenin-2 mRNA Expression, was den Rückschluss zulässt, dass Methylierung des Syntenin-2 Promotors einen grundsätzlichen Regulationsmechanismus in Keratinozyten darstellt. Die Syntenin-2 Transkription konnte in pLXSN exprimierenden Zellen bis auf eine absolute Kopienzahl von 11.8 Syntenin-2 Transkripten pro einem HPRT1 Transkript gesteigert werden, wohingegen HPV8-E6 exprimierende Keratinozyten eine maximale mRNA Kopienzahl von 4.5 erreichten. Diese Beobachtung lässt zwei mögliche Interpretationen zu, die in Abbildung 32 veranschaulicht sind.

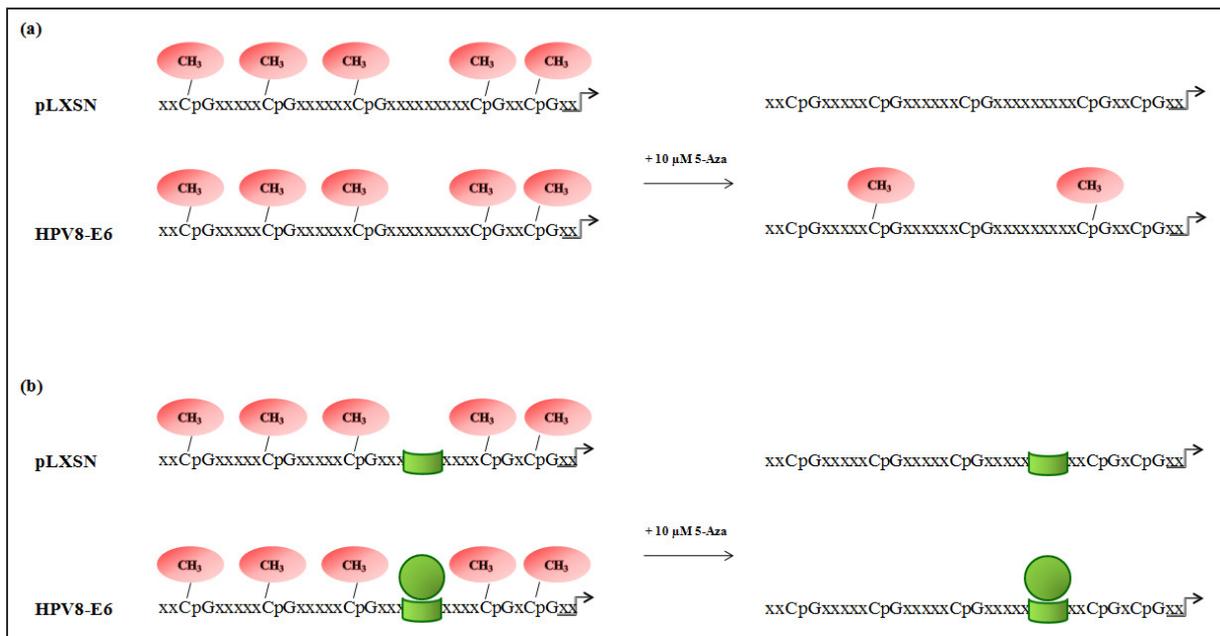


Abbildung 32: Schematische Darstellung möglicher Regulationen des Syntenin-2 Promotors in Keratinozyten. (a) HPV8-E6 verzögert die vollständige De-Methylierung des Syntenin-2 Promotors und inhibiert so die maximale mRNA Expression. (b) HPV8-E6 wechselwirkt mit einem Repressor (grüner Kreis), der am Syntenin-2 Promotor an eine spezifische Sequenz bindet (grüner Halbkreis) und die mRNA Expression zusätzlich inhibiert.

Denkbar wäre, dass HPV8-E6 einerseits die vollständige De-Methylierung des Syntenin-2 Promotors verzögert, so dass eine längere Behandlung mit 5-Aza-2-Deoxycytidin nötig wäre, um die Syntenin-2 mRNA Spiegel in 5-Aza-2-Deoxycytidin behandelten pLXSN exprimierenden Keratinozyten zu erreichen (Abb.32, a). Andererseits könnte HPV8-E6 einen Repressor an den Promotor rekrutieren, der die vollständige Aktivierung des Syntenin-2 Promotors verhindert (Abb.32, b). Diese Annahme wird von der Beobachtung unterstützt, dass Behandlung von pLXSN und HPV8-E6 exprimierenden Keratinozyten mit 5-Aza-2-Deoxycytidin in beiden Fällen zu einer um den gleichen Faktor gesteigerten Syntenin-2 mRNA Expression führte.

Während in HPV8-GFR transgenen Mäusen die beobachtete initiale Syntenin-2 Repression nach UV-Bestrahlung im Zuge der Papillomentwicklung aufgehoben wird und sogar eine Überexpression von Syntenin-2 zu späten Zeitpunkten nach UV-Bestrahlung gemessen werden konnte, konnte die Bedeutung der HPV8-E6 vermittelten Syntenin-2 Repression in primären humanen Keratinozyten mittels spezifischen knock-downs belegt werden. Nach Syntenin-2 knock-down kam es zur verlängerten Lebensspanne der Keratinozyten sowie wie bei Expression von HPV8-E6 zur Störung der Expression des Differenzierungsmarkers Involucrin in Monolayer-Kultur und der epithelialen Schichtung in organotypischen Kulturen. Dies lässt die Vermutung zu, dass HPV8-E6 die Störung der Differenzierung hauptsächlich über die direkte/indirekte Repression von Syntenin-2 erreicht.

6. Literaturverzeichnis

Accardi, R., W. Dong, A. Smet, R. Cui, A. Hautefeuille, A. S. Gabet, B. S. Sylla, L. Gissmann, P. Hainaut and M. Tommasino (2006). "Skin human papillomavirus type 38 alters p53 functions by accumulation of deltaNp73." *EMBO Rep* **7**(3): 334-340.

Akgül, B., B. Bauer, P. Zigrino, A. Storey, C. Mauch and H. Pfister (2011). "Upregulation of lipocalin-2 in human papillomavirus-positive keratinocytes and cutaneous squamous cell carcinomas." *J Gen Virol* **92**(Pt 2): 395-401.

Akgül, B., N. Bostanci, K. Westphal, I. Nindl, H. Navsaria, A. Storey and H. Pfister (2010). "Human papillomavirus 5 and 8 E6 downregulate interleukin-8 secretion in primary human keratinocytes." *J Gen Virol* **91**(Pt 4): 888-892.

Akgül, B., J. C. Cooke and A. Storey (2006). "HPV-associated skin disease." *J Pathol* **208**(2): 165-175.

Akgül, B., R. Garcia-Escudero, C. Ekechi, G. Steger, H. Navsaria, H. Pfister and A. Storey (2011). "The E2 protein of human papillomavirus type 8 increases the expression of matrix metalloproteinase-9 in human keratinocytes and organotypic skin cultures." *Med Microbiol Immunol*.

Akgül, B., R. Garcia-Escudero, L. Ghali, H. J. Pfister, P. G. Fuchs, H. Navsaria and A. Storey (2005). "The E7 protein of cutaneous human papillomavirus type 8 causes invasion of human keratinocytes into the dermis in organotypic cultures of skin." *Cancer Res* **65**(6): 2216-2223.

Akgül, B., L. Ghali, D. Davies, H. Pfister, I. M. Leigh and A. Storey (2007). "HPV8 early genes modulate differentiation and cell cycle of primary human adult keratinocytes." *Exp Dermatol* **16**(7): 590-599.

Alborzi F (2011). "Charakterisierung der SPRR Expression in HPV8 Onkogen-exprimierenden humanen Keratinozyten und murinen Hauttumoren" Diplomarbeit.

Antonsson, A., S. Karanfilovska, P. G. Lindqvist and B. G. Hansson (2003). "General acquisition of human papillomavirus infections of skin occurs in early infancy." *J Clin Microbiol* **41**(6): 2509-2514.

Arbeit, J. M., K. Munger, P. M. Howley and D. Hanahan (1994). "Progressive squamous epithelial neoplasia in K14-human papillomavirus type 16 transgenic mice." *J Virol* **68**(7): 4358-4368.

Baker CC (1993). "The genomes of papillomaviruses." In: S.J. O'Brien (Herausg.), *Genetic maps: locus maps of complex genomes*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1.134-1.146.

Baker C, Calef C. (1995). "Maps of papillomavirus mRNA transcripts. Aus: *Human papillomaviruses: a compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences*." HPV Database, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, USA.

Berkhout, R. J., J. N. Bouwes Bavinck and J. ter Schegget (2000). "Persistence of human papillomavirus DNA in benign and (pre)malignant skin lesions from renal transplant recipients." *J Clin Microbiol* **38**(6): 2087-2096.

Bernard, H. U., R. D. Burk, Z. Chen, K. van Doorslaer, H. Hausen and E. M. de Villiers (2010). "Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments." *Virology* **401**(1): 70-79.

- Birnboim, H. C. and J. Doly** (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucleic Acids Res* **7**(6): 1513-1523.
- Blumberg, B. S., H. J. Alter and S. Visnich** (1965). "A "New" Antigen in Leukemia Sera." *JAMA* **191**: 541-546.
- Borbely, A. A., M. Murvai, J. Konya, Z. Beck, L. Gergely, F. Li and G. Veress** (2006). "Effects of human papillomavirus type 16 oncoproteins on survivin gene expression." *J Gen Virol* **87**(Pt 2): 287-294.
- Borrell-Pages, M., J. Fernandez-Larrea, A. Borroto, F. Rojo, J. Baselga and J. Arribas** (2000). "The carboxy-terminal cysteine of the tetraspanin L6 antigen is required for its interaction with SITAC, a novel PDZ protein." *Mol Biol Cell* **11**(12): 4217-4225.
- Boshart, M., L. Gissmann, H. Ikenberg, A. Kleinheinz, W. Scheurlen and H. zur Hausen** (1984). "A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer." *EMBO J* **3**(5): 1151-1157.
- Bouvard, V., R. Baan, K. Straif, Y. Grosse, B. Secretan, F. El Ghissassi, L. Benbrahim-Tallaa, N. Guha, C. Freeman, L. Galichet and V. Coglianò** (2009). "A review of human carcinogens--Part B: biological agents." *Lancet Oncol* **10**(4): 321-322.
- Brehm, A., S. J. Nielsen, E. A. Miska, D. J. McCance, J. L. Reid, A. J. Bannister and T. Kouzarides** (1999). "The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth." *EMBO J* **18**(9): 2449-2458.
- Breitenbach, U., J. P. Tuckermann, C. Gebhardt, K. H. Richter, G. Furstenberger, G. Christofori and P. Angel** (2001). "Keratinocyte-specific onset of serine protease BSSP expression in experimental carcinogenesis." *J Invest Dermatol* **117**(3): 634-640.
- Chan, S. Y., S. H. Chew, K. Egawa, E. I. Grussendorf-Conen, Y. Honda, A. Rubben, K. C. Tan and H. U. Bernard** (1997). "Phylogenetic analysis of the human papillomavirus type 2 (HPV-2), HPV-27, and HPV-57 group, which is associated with common warts." *Virology* **239**(2): 296-302.
- Chang, Y., E. Cesarman, M. S. Pessin, F. Lee, J. Culpepper, D. M. Knowles and P. S. Moore** (1994). "Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma." *Science* **266**(5192): 1865-1869.
- Choo, Q. L., G. Kuo, A. J. Weiner, L. R. Overby, D. W. Bradley and M. Houghton** (1989). "Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome." *Science* **244**(4902): 359-362.
- Chow L, Broker T.** (1994). "Papillomavirus DNA replication." *Intervirolgy*, 37:150-8.
- Chow, L. T. and T. R. Broker** (1997). "In vitro experimental systems for HPV: epithelial raft cultures for investigations of viral reproduction and pathogenesis and for genetic analyses of viral proteins and regulatory sequences." *Clin Dermatol* **15**(2): 217-227.
- Chung, C. T. and R. H. Miller** (1988). "A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial cells." *Nucleic Acids Res* **16**(8): 3580.
- Clifford, G. M., J. S. Smith, M. Plummer, N. Munoz and S. Franceschi** (2003). "Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis." *Br J Cancer* **88**(1): 63-73.

- Couchman, J. R.** (2010). "Transmembrane signaling proteoglycans." *Annu Rev Cell Dev Biol* **26**: 89-114.
- Day, P. M., D. R. Lowy and J. T. Schiller** (2008). "Heparan sulfate-independent cell binding and infection with furin-precleaved papillomavirus capsids." *J Virol* **82**(24): 12565-12568.
- De Villiers EM** (2001). "Taxonomic classification of Papillomaviruses." *Papillomaviruses Report* **12**, 57-63.
- de Villiers, E. M., C. Fauquet, T. R. Broker, H. U. Bernard and H. zur Hausen** (2004). "Classification of papillomaviruses." *Virology* **324**(1): 17-27.
- de Villiers, E. M., D. Lavergne, K. McLaren and E. C. Benton** (1997). "Prevailing papillomavirus types in non-melanoma carcinomas of the skin in renal allograft recipients." *Int J Cancer* **73**(3): 356-361.
- Degenhardt, Y. Y. and S. Silverstein** (2001). "Interaction of zyxin, a focal adhesion protein, with the e6 protein from human papillomavirus type 6 results in its nuclear translocation." *J Virol* **75**(23): 11791-11802.
- DePinho, R. A.** (2000). "The age of cancer." *Nature* **408**(6809): 248-254.
- Dickson, M. A., W. C. Hahn, Y. Ino, V. Ronfard, J. Y. Wu, R. A. Weinberg, D. N. Louis, F. P. Li and J. G. Rheinwald** (2000). "Human keratinocytes that express hTERT and also bypass a p16(INK4a)-enforced mechanism that limits life span become immortal yet retain normal growth and differentiation characteristics." *Mol Cell Biol* **20**(4): 1436-1447.
- Dong, W., U. Kloz, R. Accardi, S. Caldeira, W. M. Tong, Z. Q. Wang, L. Jansen, M. Durst, B. S. Sylla, L. Gissmann and M. Tommasino** (2005). "Skin hyperproliferation and susceptibility to chemical carcinogenesis in transgenic mice expressing E6 and E7 of human papillomavirus type 38." *J Virol* **79**(23): 14899-14908.
- Doorbar, J.** (2006). "Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer." *Clin Sci (Lond)* **110**(5): 525-541.
- Doorbar, J., S. Ely, J. Sterling, C. McLean and L. Crawford** (1991). "Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network." *Nature* **352**(6338): 824-827.
- Du, J., G. G. Chen, A. C. Vlantis, P. K. Chan, R. K. Tsang and C. A. van Hasselt** (2004). "Resistance to apoptosis of HPV 16-infected laryngeal cancer cells is associated with decreased Bak and increased Bcl-2 expression." *Cancer Lett* **205**(1): 81-88.
- Dürst, M., L. Gissmann, H. Ikenberg and H. zur Hausen** (1983). "A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions." *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**(12): 3812-3815.
- Dvorak, H. F.** (1986). "Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing." *N Engl J Med* **315**(26): 1650-1659.
- Dyson, N., P. Guida, K. Munger and E. Harlow** (1992). "Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins." *J Virol* **66**(12): 6893-6902.
- Dyson, N., P. M. Howley, K. Munger and E. Harlow** (1989). "The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product." *Science* **243**(4893): 934-937.

- Epstein, M. A., B. G. Achong and Y. M. Barr** (1964). "Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma." *Lancet* **1**(7335): 702-703.
- Euvrard, S., J. Kanitakis and A. Claudy** (2003). "Skin cancers after organ transplantation." *N Engl J Med* **348**(17): 1681-1691.
- Favre, M., F. Breitburd, O. Croissant and G. Orth** (1977). "Chromatin-like structures obtained after alkaline disruption of bovine and human papillomaviruses." *J Virol* **21**(3): 1205-1209.
- Fehrmann, F. and L. A. Laimins** (2003). "Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation." *Oncogene* **22**(33): 5201-5207.
- Feltkamp, M. C., R. Broer, F. M. di Summa, L. Struijk, E. van der Meijden, B. P. Verlaan, R. G. Westendorp, J. ter Schegget, W. J. Spaan and J. N. Bouwes Bavinck** (2003). "Seroreactivity to epidermodysplasia verruciformis-related human papillomavirus types is associated with nonmelanoma skin cancer." *Cancer Res* **63**(10): 2695-2700.
- Feng, H., M. Shuda, Y. Chang and P. S. Moore** (2008). "Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma." *Science* **319**(5866): 1096-1100.
- Forslund, O., B. Lindelof, E. Hradil, P. Nordin, B. Stenquist, R. Kirnbauer, K. Slupetzky and J. Dillner** (2004). "High prevalence of cutaneous human papillomavirus DNA on the top of skin tumors but not in "Stripped" biopsies from the same tumors." *J Invest Dermatol* **123**(2): 388-394.
- Freshney R.I. and Freshney M.G.** (2002). "Culture of Epithelial Cells." Second Edition. Edited by Wiley-Liss, Inc. ISBNs: 0-471-40121-8 (Hardback).
- Freedberg, I. M., M. Tomic-Canic, M. Komine and M. Blumenberg** (2001). "Keratins and the keratinocyte activation cycle." *J Invest Dermatol* **116**(5): 633-640.
- Fuchs, P. G., T. Iftner, J. Weninger and H. Pfister** (1986). "Epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus 8: genomic sequence and comparative analysis." *J Virol* **58**(2): 626-634.
- Giampieri, S. and A. Storey** (2004). "Repair of UV-induced thymine dimers is compromised in cells expressing the E6 protein from human papillomaviruses types 5 and 18." *Br J Cancer* **90**(11): 2203-2209.
- Giri, I. and M. Yaniv** (1988). "Structural and mutational analysis of E2 trans-activating proteins of papillomaviruses reveals three distinct functional domains." *EMBO J* **7**(9): 2823-2829.
- Giuliano, A. R., J. M. Palefsky, S. Goldstone, E. D. Moreira, Jr., M. E. Penny, C. Aranda, E. Vardas, H. Moi, H. Jessen, R. Hillman, Y. H. Chang, D. Ferris, D. Rouleau, J. Bryan, J. B. Marshall, S. Vuocolo, E. Barr, D. Radley, R. M. Haupt and D. Guris** (2011). "Efficacy of quadrivalent HPV vaccine against HPV Infection and disease in males." *N Engl J Med* **364**(5): 401-411.
- Grootjans, J. J., P. Zimmermann, G. Reekmans, A. Smets, G. Degeest, J. Durr and G. David** (1997). "Syntenin, a PDZ protein that binds syndecan cytoplasmic domains." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(25): 13683-13688.
- Grossman, S. R., R. Mora and L. A. Laimins** (1989). "Intracellular localization and DNA-binding properties of human papillomavirus type 18 E6 protein expressed with a baculovirus vector." *J Virol* **63**(1): 366-374.

- Hadaschik, D., K. Hinterkeuser, M. Oldak, H. J. Pfister and S. Smola-Hess** (2003). "The Papillomavirus E2 protein binds to and synergizes with C/EBP factors involved in keratinocyte differentiation." *J Virol* **77**(9): 5253-5265.
- Haddow, A.** (1972). "Molecular repair, wound healing, and carcinogenesis: tumor production a possible overhealing?" *Adv Cancer Res* **16**: 181-234.
- Hamid, N. A., C. Brown and K. Gaston** (2009). "The regulation of cell proliferation by the papillomavirus early proteins." *Cell Mol Life Sci* **66**(10): 1700-1717.
- Harwood, C. A., T. Suretheran, J. M. McGregor, P. J. Spink, I. M. Leigh, J. Breuer and C. M. Proby** (2000). "Human papillomavirus infection and non-melanoma skin cancer in immunosuppressed and immunocompetent individuals." *J Med Virol* **61**(3): 289-297.
- Herber, R., A. Liem, H. Pitot and P. F. Lambert** (1996). "Squamous epithelial hyperplasia and carcinoma in mice transgenic for the human papillomavirus type 16 E7 oncogene." *J Virol* **70**(3): 1873-1881.
- Horvath, C. A., G. A. Boulet, V. M. Renoux, P. O. Delvenne and J. P. Bogers** (2010). "Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview." *Virol J* **7**: 11.
- Howie, H. L., R. A. Katzenellenbogen and D. A. Galloway** (2009). "Papillomavirus E6 proteins." *Virology* **384**(2): 324-334.
- Howley P.M. and Lowy D.R.** (2001). "Papillomaviruses and their replication." In: *Fields Virology*, 4th edition Raven Press, Philadelphia: 2197-2229.
- Howley P.M. and Lowy D.R.**(2007)."Papillomaviruses." In: David M. Knipe, Peter M. Howley (eds.-in-chief): *Fields' Virology*, 5. Auflage, Band 2, Philadelphia, 2299ff.
- Hufbauer, M., D. Lazic, B. Akgul, J. L. Brandsma, H. Pfister and S. J. Weissenborn** (2010). "Enhanced human papillomavirus type 8 oncogene expression levels are crucial for skin tumorigenesis in transgenic mice." *Virology* **403**(2): 128-136.
- Hughes, F. J. and M. A. Romanos** (1993). "E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ATPase." *Nucleic Acids Res* **21**(25): 5817-5823.
- Hwang, S. G., D. Lee, J. Kim, T. Seo and J. Choe** (2002). "Human papillomavirus type 16 E7 binds to E2F1 and activates E2F1-driven transcription in a retinoblastoma protein-independent manner." *J Biol Chem* **277**(4): 2923-2930.
- Iftner, T., M. Elbel, B. Schopp, T. Hiller, J. I. Loizou, K. W. Caldecott and F. Stubenrauch** (2002). "Interference of papillomavirus E6 protein with single-strand break repair by interaction with XRCC1." *EMBO J* **21**(17): 4741-4748.
- Jackson, S., C. Harwood, M. Thomas, L. Banks and A. Storey** (2000). "Role of Bak in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins." *Genes Dev* **14**(23): 3065-3073.
- Javier, R. T.** (2008). "Cell polarity proteins: common targets for tumorigenic human viruses." *Oncogene* **27**(55): 7031-7046.
- Jeckel, S., E. Huber, F. Stubenrauch and T. Iftner** (2002). "A transactivator function of cottontail rabbit papillomavirus e2 is essential for tumor induction in rabbits." *J Virol* **76**(22): 11209-11215.

- Kines, R. C., C. D. Thompson, D. R. Lowy, J. T. Schiller and P. M. Day** (2009). "The initial steps leading to papillomavirus infection occur on the basement membrane prior to cell surface binding." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(48): 20458-20463.
- Kinouchi, M., H. Takahashi, Y. Itoh, A. Ishida-Yamamoto and H. Iizuka** (2002). "Ultraviolet B irradiation increases keratin 5 and keratin 14 expression through epidermal growth factor receptor of SV40-transformed human keratinocytes." *Arch Dermatol Res* **293**(12): 634-641.
- Klucky, B., R. Mueller, I. Vogt, S. Teurich, B. Hartenstein, K. Breuhahn, C. Flechtenmacher, P. Angel and J. Hess** (2007). "Kallikrein 6 induces E-cadherin shedding and promotes cell proliferation, migration, and invasion." *Cancer Res* **67**(17): 8198-8206.
- Koroll, M., F. G. Rathjen and H. Volkmer** (2001). "The neural cell recognition molecule neurofascin interacts with syntenin-1 but not with syntenin-2, both of which reveal self-associating activity." *J Biol Chem* **276**(14): 10646-10654.
- Krubke, J., J. Kraus, H. Delius, L. Chow, T. Broker, T. Iftner and H. Pfister** (1987). "Genetic relationship among human papillomaviruses associated with benign and malignant tumours of patients with epidermodysplasia verruciformis." *J Gen Virol* **68** (Pt 12): 3091-3103.
- Krüppel, U., A. Müller-Schiffmann, S. E. Baldus, S. Smola-Hess and G. Steger** (2008). "E2 and the co-activator p300 can cooperate in activation of the human papillomavirus type 16 early promoter." *Virology* **377**(1): 151-159.
- Kumar, A., Y. Zhao, G. Meng, M. Zeng, S. Srinivasan, L. M. Delmolino, Q. Gao, G. Dimri, G. F. Weber, D. E. Wazer, H. Band and V. Band** (2002). "Human papillomavirus oncoprotein E6 inactivates the transcriptional coactivator human ADA3." *Mol Cell Biol* **22**(16): 5801-5812.
- Lagunas-Martinez, A., V. Madrid-Marina and P. Gariglio** (2010). "Modulation of apoptosis by early human papillomavirus proteins in cervical cancer." *Biochim Biophys Acta* **1805**(1): 6-16.
- Lazarczyk, M. and M. Favre** (2008). "Role of Zn²⁺ ions in host-virus interactions." *J Virol* **82**(23): 11486-11494.
- Lazarczyk, M., C. Pons, J. A. Mendoza, P. Cassonnet, Y. Jacob and M. Favre** (2008). "Regulation of cellular zinc balance as a potential mechanism of EVER-mediated protection against pathogenesis by cutaneous oncogenic human papillomaviruses." *J Exp Med* **205**(1): 35-42.
- Leverrier, S., D. Bergamaschi, L. Ghali, A. Ola, G. Warnes, B. Akgul, K. Blight, R. Garcia-Escudero, A. Penna, A. Eddaoudi and A. Storey** (2007). "Role of HPV E6 proteins in preventing UVB-induced release of pro-apoptotic factors from the mitochondria." *Apoptosis* **12**(3): 549-560.
- Lewandowsky, F. and W. Lutz** (1922). "Ein Fall einer bisher nicht beschriebenen Hauterkrankung (Epidermodysplasia verruciformis). *Arch Dermatol Syphilol* **141**: 193-203.
- Lusky, M., J. Hurwitz and Y. S. Seo** (1994). "The bovine papillomavirus E2 protein modulates the assembly of but is not stably maintained in a replication-competent multimeric E1-replication origin complex." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(19): 8895-8899.
- Madan, V., J. T. Lear and R. M. Szeimies** (2010). "Non-melanoma skin cancer." *Lancet* **375**(9715): 673-685.
- Marcuzzi, G. P., M. Hufbauer, H. U. Kasper, S. J. Weissenborn, S. Smola and H. Pfister** (2009). "Spontaneous tumour development in human papillomavirus type 8 E6 transgenic mice and rapid induction by UV-light exposure and wounding." *J Gen Virol* **90**(Pt 12): 2855-2864.

- Michel, A., A. Kopp-Schneider, H. Zentgraf, A. D. Gruber and E. M. de Villiers** (2006). "E6/E7 expression of human papillomavirus type 20 (HPV-20) and HPV-27 influences proliferation and differentiation of the skin in UV-irradiated SKH-hr1 transgenic mice." *J Virol* **80**(22): 11153-11164.
- Miller, A. D. and F. Chen** (1996). "Retrovirus packaging cells based on 10A1 murine leukemia virus for production of vectors that use multiple receptors for cell entry." *J Virol* **70**(8): 5564-5571.
- Mohr, I. J., R. Clark, S. Sun, E. J. Androphy, P. MacPherson and M. R. Botchan** (1990). "Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator." *Science* **250**(4988): 1694-1699.
- Moloney, F. J., H. Comber, P. O'Lorcain, P. O'Kelly, P. J. Conlon and G. M. Murphy** (2006). "A population-based study of skin cancer incidence and prevalence in renal transplant recipients." *Br J Dermatol* **154**(3): 498-504.
- Moody, C. A. and L. A. Laimins** (2010). "Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation." *Nat Rev Cancer* **10**(8): 550-560.
- Moore, P. S. and Y. Chang** (2010). "Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology." *Nat Rev Cancer* **10**(12): 878-889.
- Mortier, E., G. Wuytens, I. Leenaerts, F. Hannes, M. Y. Heung, G. Degeest, G. David and P. Zimmermann** (2005). "Nuclear speckles and nucleoli targeting by PIP2-PDZ domain interactions." *EMBO J* **24**(14): 2556-2565.
- Müller-Schiffmann, A., J. Beckmann and G. Steger** (2006). "The E6 protein of the cutaneous human papillomavirus type 8 can stimulate the viral early and late promoters by distinct mechanisms." *J Virol* **80**(17): 8718-8728.
- Müller, A., A. Ritzkowsky and G. Steger** (2002). "Cooperative activation of human papillomavirus type 8 gene expression by the E2 protein and the cellular coactivator p300." *J Virol* **76**(21): 11042-11053.
- Münger, K., J. R. Basile, S. Duensing, A. Eichten, S. L. Gonzalez, M. Grace and V. L. Zacny** (2001). "Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein." *Oncogene* **20**(54): 7888-7898.
- Münger, K., B. A. Werness, N. Dyson, W. C. Phelps, E. Harlow and P. M. Howley** (1989). "Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product." *EMBO J* **8**(13): 4099-4105.
- Munoz, N.** (2000). "Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence." *J Clin Virol* **19**(1-2): 1-5.
- Munoz, N., F. X. Bosch, S. de Sanjose, R. Herrero, X. Castellsague, K. V. Shah, P. J. Snijders and C. J. Meijer** (2003). "Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer." *N Engl J Med* **348**(6): 518-527.
- Oldak, M., H. Smola, M. Aumailley, F. Rivero, H. Pfister and S. Smola-Hess** (2004). "The human papillomavirus type 8 E2 protein suppresses beta4-integrin expression in primary human keratinocytes." *J Virol* **78**(19): 10738-10746.
- Palefsky, J. M.** (2010). "Human papillomavirus-related disease in men: not just a women's issue." *J Adolesc Health* **46**(4 Suppl): S12-19.

- Paliouras, M., C. Borgono and E. P. Diamandis** (2007). "Human tissue kallikreins: the cancer biomarker family." *Cancer Lett* **249**(1): 61-79.
- Pan, H. and A. E. Griep** (1995). "Temporally distinct patterns of p53-dependent and p53-independent apoptosis during mouse lens development." *Genes Dev* **9**(17): 2157-2169.
- Parkin, D. M.** (2006). "The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002." *Int J Cancer* **118**(12): 3030-3044.
- Pasic, A., J. Lipozencic, R. Ceovic and K. Kostovic** (2009). "The genetics of psoriasis--selected novelties in 2008." *Acta Dermatovenerol Croat* **17**(3): 176-181.
- Patel, D., S. M. Huang, L. A. Baglia and D. J. McCance** (1999). "The E6 protein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300." *EMBO J* **18**(18): 5061-5072.
- Patel, S., T. Kartasova and J. A. Segre** (2003). "Mouse Sprr locus: a tandem array of coordinately regulated genes." *Mamm Genome* **14**(2): 140-148.
- Pfefferle, R., G. P. Marcuzzi, B. Akgul, H. U. Kasper, F. Schulze, I. Haase, C. Wickenhauser and H. Pfister** (2008). "The human papillomavirus type 8 E2 protein induces skin tumors in transgenic mice." *J Invest Dermatol* **128**(9): 2310-2315.
- Pfister, H.** (2011). "Biologie der Epidermodysplasia-verruciformis-assoziierten HPV" In: *Der Hautarzt*. Springer Verlag: 62:17–21.
- Pfister, H.** (1984). "Biology and biochemistry of papillomaviruses." *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **99**: 111-181.
- Pfister, H.** (2003). "Chapter 8: Human papillomavirus and skin cancer." *J Natl Cancer Inst Monogr*(31): 52-56.
- Pfister H, Fuchs PG** (1987). "Papillomaviruses: Particles, genome organization and proteins." In: Syrjänen, K; Gissmann, L.; Koss, L.G. (eds.). *Papillomavirus and human disease*. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1-18.
- Pfister, H. and P. G. Fuchs** (1994). "Anatomy, taxonomy and evolution of papillomaviruses." *Intervirology* **37**(3-4): 143-149.
- Pfister, H., P. G. Fuchs, S. Majewski, S. Jablonska, I. Pniewska and M. Malejczyk** (2003). "High prevalence of epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus DNA in actinic keratoses of the immunocompetent population." *Arch Dermatol Res* **295**(7): 273-279.
- Pim, D. and L. Banks** (2010). "Interaction of viral oncoproteins with cellular target molecules: infection with high-risk vs low-risk human papillomaviruses." *APMIS* **118**(6-7): 471-493.
- Plikus, M. V. and C. M. Chuong** (2008). "Complex hair cycle domain patterns and regenerative hair waves in living rodents." *J Invest Dermatol* **128**(5): 1071-1080.
- Poiesz, B. J., F. W. Ruscetti, A. F. Gazdar, P. A. Bunn, J. D. Minna and R. C. Gallo** (1980). "Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma." *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(12): 7415-7419.
- Proby, C. M., K. J. Purdie, C. J. Sexton, P. Purkis, H. A. Navsaria, J. N. Stables and I. M. Leigh** (2000). "Spontaneous keratinocyte cell lines representing early and advanced stages of malignant transformation of the epidermis." *Exp Dermatol* **9**(2): 104-117.

- Proksch, E., W. M. Holleran, G. K. Menon, P. M. Elias and K. R. Feingold** (1993). "Barrier function regulates epidermal lipid and DNA synthesis." *Br J Dermatol* **128**(5): 473-482.
- Prunieras, M., M. Regnier and D. Woodley** (1983). "Methods for cultivation of keratinocytes with an air-liquid interface." *J Invest Dermatol* **81**(1 Suppl): 28s-33s.
- Purdie, K. J., C. J. Sexton, C. M. Proby, M. T. Glover, A. T. Williams, J. N. Stables and I. M. Leigh** (1993). "Malignant transformation of cutaneous lesions in renal allograft patients: a role for human papillomavirus." *Cancer Res* **53**(21): 5328-5333.
- Ramoz, N., L. A. Rueda, B. Bouadjar, L. S. Montoya, G. Orth and M. Favre** (2002). "Mutations in two adjacent novel genes are associated with epidermodysplasia verruciformis." *Nat Genet* **32**(4): 579-581.
- Ramoz, N., A. Taieb, L. A. Rueda, L. S. Montoya, B. Bouadjar, M. Favre and G. Orth** (2000). "Evidence for a nonallelic heterogeneity of epidermodysplasia verruciformis with two susceptibility loci mapped to chromosome regions 2p21-p24 and 17q25." *J Invest Dermatol* **114**(6): 1148-1153.
- Roberson, E. D. and A. M. Bowcock** (2010). "Psoriasis genetics: breaking the barrier." *Trends Genet* **26**(9): 415-423.
- Roberts, J. N., C. B. Buck, C. D. Thompson, R. Kines, M. Bernardo, P. L. Choyke, D. R. Lowy and J. T. Schiller** (2007). "Genital transmission of HPV in a mouse model is potentiated by nonoxynol-9 and inhibited by carrageenan." *Nat Med* **13**(7): 857-861.
- Sambrook, J., MacCallum, P. and Russell, D.** (2001). "Molecular cloning: a laboratory manual.", 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Sapp, M. and M. Bienkowska-Haba** (2009). "Viral entry mechanisms: human papillomavirus and a long journey from extracellular matrix to the nucleus." *FEBS J* **276**(24): 7206-7216.
- Schaper, I. D., G. P. Marcuzzi, S. J. Weissenborn, H. U. Kasper, V. Dries, N. Smyth, P. Fuchs and H. Pfister** (2005). "Development of skin tumors in mice transgenic for early genes of human papillomavirus type 8." *Cancer Res* **65**(4): 1394-1400.
- Scheffner, M., J. M. Huibregtse, R. D. Vierstra and P. M. Howley** (1993). "The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53." *Cell* **75**(3): 495-505.
- Scheffner, M., B. A. Werness, J. M. Huibregtse, A. J. Levine and P. M. Howley** (1990). "The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53." *Cell* **63**(6): 1129-1136.
- Schneider, M. R., R. Schmidt-Ullrich and R. Paus** (2009). "The hair follicle as a dynamic miniorgan." *Curr Biol* **19**(3): R132-142.
- Seo, Y. S., F. Muller, M. Lusky and J. Hurwitz** (1993). "Bovine papilloma virus (BPV)-encoded E1 protein contains multiple activities required for BPV DNA replication." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(2): 702-706.
- Smola-Hess S, and Pfister H** (2002). "Interaction of papillomaviral oncoproteins with cellular factors." In: Structure-function relationships of human pathogenic viruses. New York, London, Dodrecht, Boston, Moscow. Kluwer Academic/PlenumPublishers.
- Smotkin, D., H. Prokoph and F. O. Wettstein** (1989). "Oncogenic and nononcogenic human genital papillomaviruses generate the E7 mRNA by different mechanisms." *J Virol* **63**(3): 1441-1447.

- Song, S., H. C. Pitot and P. F. Lambert** (1999). "The human papillomavirus type 16 E6 gene alone is sufficient to induce carcinomas in transgenic animals." *J Virol* **73**(7): 5887-5893.
- Staples, M. P., M. Elwood, R. C. Burton, J. L. Williams, R. Marks and G. G. Giles** (2006). "Non-melanoma skin cancer in Australia: the 2002 national survey and trends since 1985." *Med J Aust* **184**(1): 6-10.
- Steger G, Ham J, Thierry F, Yaniv M.** (1993). "The E2 proteins of papillomaviruses as transcription and replication factors." In: *Virus strategies*, VCH, Weinheim; Doerfler, W. und Böhm, P (ed) 263-78.
- Steger, G., J. Ham and M. Yaniv** (1996). "E2 proteins: modulators of papillomavirus transcription and replication." *Methods Enzymol* **274**: 173-185.
- Storrs, C. H. and S. J. Silverstein** (2007). "PATJ, a tight junction-associated PDZ protein, is a novel degradation target of high-risk human papillomavirus E6 and the alternatively spliced isoform 18 E6." *J Virol* **81**(8): 4080-4090.
- Struijk, L., E. van der Meijden, S. Kazem, J. ter Schegget, F. R. de Gruijl, R. D. Steenbergen and M. C. Feltkamp** (2008). "Specific betapapillomaviruses associated with squamous cell carcinoma of the skin inhibit UVB-induced apoptosis of primary human keratinocytes." *J Gen Virol* **89**(Pt 9): 2303-2314.
- Stubenrauch, F., J. Malejczyk, P. G. Fuchs and H. Pfister** (1992). "Late promoter of human papillomavirus type 8 and its regulation." *J Virol* **66**(6): 3485-3493.
- Syrjänen, S., P. Naud, L. Sarian, S. Derchain, C. Roteli-Martins, S. Tatti, M. Branca, M. Erzen, L. S. Hammes, S. Costa, A. Longatto-Filho and K. Syrjanen** (2010). "Up-regulation of lipocalin 2 is associated with high-risk human papillomavirus and grade of cervical lesion at baseline but does not predict outcomes of infections or incident cervical intraepithelial neoplasia." *Am J Clin Pathol* **134**(1): 50-59.
- Takahashi, H., N. Komatsu, M. Ibe, A. Ishida-Yamamoto, Y. Hashimoto and H. Iizuka** (2007). "Cystatin A suppresses ultraviolet B-induced apoptosis of keratinocytes." *J Dermatol Sci* **46**(3): 179-187.
- Thomas, M., N. Narayan, D. Pim, V. Tomaic, P. Massimi, K. Nagasaka, C. Kranjec, N. Gammoh and L. Banks** (2008). "Human papillomaviruses, cervical cancer and cell polarity." *Oncogene* **27**(55): 7018-7030.
- Tinsley, J. M., C. Fisher and P. F. Searle** (1992). "Abnormalities of epidermal differentiation associated with expression of the human papillomavirus type 1 early region in transgenic mice." *J Gen Virol* **73** (Pt 5): 1251-1260.
- Todd, C., S. D. Hewitt, J. Kempenaar, K. Noz, A. J. Thody and M. Ponc** (1993). "Co-culture of human melanocytes and keratinocytes in a skin equivalent model: effect of ultraviolet radiation." *Arch Dermatol Res* **285**(8): 455-459.
- Tong, X., R. Salgia, J. L. Li, J. D. Griffin and P. M. Howley** (1997). "The bovine papillomavirus E6 protein binds to the LD motif repeats of paxillin and blocks its interaction with vinculin and the focal adhesion kinase." *J Biol Chem* **272**(52): 33373-33376.
- Underbrink, M. P., H. L. Howie, K. M. Bedard, J. I. Koop and D. A. Galloway** (2008). "E6 proteins from multiple human betapapillomavirus types degrade Bak and protect keratinocytes from apoptosis after UVB irradiation." *J Virol* **82**(21): 10408-10417.

- Vasilopoulos, Y., K. Walters, M. J. Cork, G. W. Duff, G. S. Sahoo and R. Tazi-Ahnini** (2008). "Association analysis of the skin barrier gene cystatin A at the PSORS5 locus in psoriatic patients: evidence for interaction between PSORS1 and PSORS5." *Eur J Hum Genet* **16**(8): 1002-1009.
- Walboomers, J. M., M. V. Jacobs, M. M. Manos, F. X. Bosch, J. A. Kummer, K. V. Shah, P. J. Snijders, J. Peto, C. J. Meijer and N. Munoz** (1999). "Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide." *J Pathol* **189**(1): 12-19.
- Weissenborn, S. J., M. N. De Koning, U. Wieland, W. G. Quint and H. J. Pfister** (2009). "Intrafamilial transmission and family-specific spectra of cutaneous betapapillomaviruses." *J Virol* **83**(2): 811-816.
- Weissenborn, S. J., I. Nindl, K. Purdie, C. Harwood, C. Proby, J. Breuer, S. Majewski, H. Pfister and U. Wieland** (2005). "Human papillomavirus-DNA loads in actinic keratoses exceed those in non-melanoma skin cancers." *J Invest Dermatol* **125**(1): 93-97.
- Werness, B. A., A. J. Levine and P. M. Howley** (1990). "Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53." *Science* **248**(4951): 76-79.
- Wilson, V. G., M. West, K. Woytek and D. Rangasamy** (2002). "Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features." *Virus Genes* **24**(3): 275-290.
- Yang, L., I. Mohr, E. Fouts, D. A. Lim, M. Nohaile and M. Botchan** (1993). "The E1 protein of bovine papilloma virus 1 is an ATP-dependent DNA helicase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(11): 5086-5090.
- You, J.** (2010). "Papillomavirus interaction with cellular chromatin." *Biochim Biophys Acta* **1799**(3-4): 192-199.
- Yuan, H., F. Fu, J. Zhuo, W. Wang, J. Nishitani, D. S. An, I. S. Chen and X. Liu** (2005). "Human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins upregulate c-IAP2 gene expression and confer resistance to apoptosis." *Oncogene* **24**(32): 5069-5078.
- Zhang, B., W. Chen and A. Roman** (2006). "The E7 proteins of low- and high-risk human papillomaviruses share the ability to target the pRB family member p130 for degradation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(2): 437-442.
- zur Hausen, H.** (2000). "Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis." *J Natl Cancer Inst* **92**(9): 690-698.
- zur Hausen, H.** (2002). "Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application." *Nat Rev Cancer* **2**(5): 342-350.

7. Zusammenfassung

Während die ätiologische Rolle genitaler humaner Papillomviren (HPV) bei der Entstehung des Zervixkarzinoms anerkannt ist, wird die Bedeutung der Infektion mit beta HPV Typen wie HPV8 bei der Entstehung von nicht-melanozytären Hautkrebs noch kontrovers diskutiert. Mit der Etablierung HPV8 transgener Mäuse, die die gesamte frühe Region (GFR = E1/E2/E4/E6/E7) oder nur -E6 bzw. -E2 unter der Kontrolle des humanen Keratin14 Promotors exprimieren, konnte das onkogene Potential von HPV8 *in vivo* gezeigt werden. Transgene Mäuse entwickelten spontan Hauttumoren und durch einmalige UVA/B-Bestrahlung, welche die Transgenexpression induziert, konnte die Tumorentwicklung innerhalb von drei Wochen synchronisiert werden. Um den Einfluss der HPV8 Onkogene auf die zelluläre Genexpression zu untersuchen, wurden cDNA Micro Array Analysen durchgeführt, die beim Vergleich von nicht-läsionaler HPV8-GFR mit FVB/n wt Maushaut auf eine Deregulation von 17 zellulären Genen hindeutete, von denen 14 in der quantitativen RT-PCR gemessen werden konnten. Dabei wurden StefinA, Sprr2 und Dusp1 als direkte/indirekte HPV8 Zielgene identifiziert. Um die StefinA Expression während der UV-induzierten Papillomatose zu untersuchen, wurden 5 Wochen alte Tiere einmalig bestrahlt. UV-Bestrahlung führte in beiden Mauslinien zu einem starken Anstieg der mRNA Spiegel, wobei in HPV8-GFR transgenen Mäusen bis zum Tag 10 etwas mehr StefinA mRNA gemessen werden konnte als in FVB/n wt Tieren. Im Zuge der Wundheilung beginnend zwischen 7 und 10 Tage nach UV-Bestrahlung sank in den FVB/n wt Tieren die StefinA Expression ab, während die anhaltende Hyperproliferation in HPV8-GFR Tieren mit signifikant erhöhten StefinA mRNA Spiegeln korrelierte. Durch Färbung eines UV-induzierten FVB/n wt Papilloms konnte jedoch gezeigt werden, dass die Überexpression von StefinA in Hauttumoren mit Hyperproliferation assoziiert und unabhängig von der Gegenwart der HPV8 Onkogene ist. Da StefinA aber in HPV8-GFR und -E6 transgenen Mäusen, die im Bezug auf die Papillomentwicklung eine Phänokopie der GFR Tiere darstellen, bereits in nicht-läsionaler Maushaut hochreguliert ist, könnte es auch eine Rolle früh in der HPV8 induzierten Tumorentwicklung spielen.

Während in der HPV8-GFR Maus für Syntenin-2, welches laut cDNA Micro Array Vorhersage dereguliert sein sollte, eine Modulation durch das Virus nicht deutlich wurde, konnte in primären humanen Keratinozyten eine Repression der Syntenin-2 Transkription durch HPV8-E6 gezeigt werden. Die Syntenin-2 Proteinspiegel waren in differenzierteren Keratinozyten HPV8-E6 exprimierender Monolayer-Kulturen sowie organotypischer Kulturen experimentell immortalisierter, HPV8-E6 exprimierender nTERT Keratinozyten deutlich

erniedrigt. Im Gegensatz zu differenzierten Schichten normaler humaner Epidermis konnte in invasiven Bereichen von Plattenepithelkarzinomen keine Syntenin-2 Expression nachgewiesen werden. Auch in spontan immortalisierten humanen Keratinozyten-Zelllinien waren die Syntenin-2 mRNA Spiegel signifikant erniedrigt und konnten durch HPV8-E6 nicht weiter gesenkt werden. Die biologische Signifikanz der HPV8-E6 vermittelten Syntenin-2 Repression wurde durch spezifischen knock-down in primären Keratinozyten überprüft. Nach Syntenin-2 knock-down kam es zur verlängerten Lebensspanne der primären Keratinozyten sowie wie bei Expression von HPV8-E6 zur Störung der Expression des Differenzierungsmarkers Involucrin in Monolayer-Kultur und der epithelialen Schichtung in der organotypischen Kultur. Dies lässt die Vermutung zu, dass HPV8-E6 die Störung der Differenzierung hauptsächlich über die direkte/indirekte Repression von Syntenin-2 erreicht.

8. Abstract

While an aetiological role of alpha human papillomviruses (HPV) during the development of cervix carcinoma is generally accepted, the impact of beta HPV Types, like HPV8, during the development of non-melanoma skin cancer is still a matter of debate. By establishing HPV8 transgenic mouse lines that express the complete early region (CER = E1/E2/E4/E6/E7) or only –E6 or –E2 under the control of the human keratin 14 promoter, the oncogenic potential of HPV8 could be demonstrated *in vivo*. Transgenic mice spontaneously developed skin tumors, and one UVA/B-irradiation, which induced transgene expression, was sufficient to synchronize papilloma development within three weeks. To evaluate the influence of HPV8 oncogenes on cellular gene expression, cDNA micro array analyses were performed. Comparison of non-lesional HPV8-CER and FVB/n wt skin predicted deregulation of 17 cellular genes, of which 14 could be measured in quantitative RT-PCR analyses. In doing so, StefinA, Sprr2 and Dusp1 could be identified as direct/indirect target genes of HPV8. To investigate the StefinA expression during UV-induced papilloma development, mice at an age of 5 weeks were treated once with UVA/B. UV-irradiation led to increased StefinA mRNA levels and slightly higher StefinA mRNA levels could be measured in HPV8-CER transgenic mice until day 10 post treatment when compared with FVB/n wt animals. During wound healing, which started around day 7 to 10 post treatment, StefinA mRNA expression decreased in FVB/n wt mice while its increased levels persisted in hyperproliferative HPV8-CER transgenic skin. By staining an UV-induced FVB/n wt skin tumor it could be demonstrated that the increased StefinA protein expression in skin tumors is independent of the presence of HPV8 and associated with hyperproliferation. However, the observation that StefinA is already upregulated in non-lesional skin of both HPV8-CER and –E6 transgenic mice, which are phenocopies of HPV8-CER mice in terms of papilloma development, points to a possible role of StefinA early during HPV8 induced skin tumor development.

The expression of the PDZ protein Syntenin-2, which was predicted by cDNA micro array analyses to be deregulated in transgenic skin, could not be confirmed in transgenic mice skin by quantitative RT-PCR. However, in primary human keratinocytes, Syntenin-2 was identified to be transcriptionally inhibited by HPV8-E6. The Syntenin-2 protein expression was notably reduced in both differentiated HPV8-E6 expressing keratinocytes in monolayer culture as well as in experimental immortalized, HPV8-E6 expressing nTERT keratinocytes in organotypic cultures. In contrast to differentiated normal human epidermis, Syntenin-2 protein expression could not be observed in invasive areas of squamous skin carcinomas. Spontaneously immortalized cutaneous cell lines exhibited significantly reduced Syntenin-2

mRNA levels, which could not be influenced by HPV8-E6 expression. The biological significance of Syntenin-2 downregulation in primary human keratinocytes was studied by specific knock-down within primary human keratinocytes. Syntenin-2 knock-down lead to an expanded life span of these primary keratinocytes and, as observed in HPV8-E6 expressing cells, to disrupted expression of the differentiation marker Involucrin in monolayer culture and epithelial arrangement in organotypic culture. Therefore it is tempting to speculate that HPV8-E6 might trigger disruption of differentiation mainly by direct/indirect repression of Syntenin-2.

9. Anhang

9.1. Abkürzungsverzeichnis

AD	Aktivierungsdomäne
AP-1	activator protein 1
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-Triphosphat
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
CB	Zitratpuffer
CDK	cyclin-abhängige Kinase
CIN	cervikale intraepitheliale Neoplasien
CR	conserved region
CRPV	cottontail-rabbit-papillomavirus
DAB	3,3'- Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddNTP	Didesoxynukleotide
DKFZ	Deutschen Krebsforschungszentrum
DMBA	7,12-Dimethylbenz[a]anthracen
DMEM	Dulbecco´s modified Eagle´s Medium
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid
E. coli	escherichia coli
E2BS	E2-Bindestelle
E6-AP	E6 assoziiertes Protein
EBV	Epstein-Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EV	Epidermdysplasie verruciformis
FKS	fetales Rinderkälberserum
FVB/n	Friend leukaemia virus B Mausstamm
g	Erdbeschleunigung
GFR	gesamte frühe Region
h	human
HBV/HCV	Hepatitis B/C Virus
HE	Hämatoxylin-Eosin
HPRT1	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1
HPV	humane Papillomviren
HR	Hoch-Risiko
HTLV-1	Humanes T-Zell Leukämie Virus
Hz	Hertz
ID	Identifikationsnummer
K	Keratin
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KSHV	Kaposi´s Sarcoma Herpesvirus
LB-Medium	Luria Bertani Medium
MCPyV	Merkellzell Polyomavirus
Min.	minuten
mM	millimolar
µM	micromolar
mRNA	messenger RNA
MoMuLV	Moloney-Murine-Leukemia-Virus
NCR	non-coding region
nm	Nanometer

nM	nanomolar
NMHK	nicht-melanozytärer Hautkrebs
NR	Niedrig-Risiko
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
ORF	open reading frame
ori	origin of replication
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDZ	PSD-95, Dlg, ZO-1
PEG	Polyethylenglykol
PEK	Plattenepithelkarzinom
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
pRB	Retinoblastoma-Protein
PV	Papillomviren
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
RM+	Keratinozytenmedium Rheinwald Medium
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek.	Sekunden
shRNA	hairpin RNA
siRNA	short interfering RNA
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ÜN	über Nacht
UV	ultraviolett
VLP	Virus like particles
WHO	Weltgesundheitsorganisation
wt	Wildtyp

9.2. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Herbert Pfister, für seine Unterstützung und wissenschaftliche Betreuung bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Jun.-Prof. Dr. B. Akgül für die Betreuung meiner Promotion. Seine große Bereitschaft, meine Fragen zu beantworten und fachliche Diskussionen zu führen, hat diese Arbeit durch wertvolle Hinweise und Ideen vorangetrieben. Von seiner naturwissenschaftlichen Kompetenz sowie dem hervorragenden methodischen Know-how konnte ich sehr profitieren.

Ich danke Frau Prof. Dr. S. Korsching und Herrn Prof. Dr. G. Plickert für ihre Bereitschaft die vorliegende Arbeit vor der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln zu vertreten. Weiterhin gilt mein Dank Herrn Dr. R. Kaiser, der sich dazu bereit erklärt hat, den Beisitz in meiner Disputation zu übernehmen. Außerdem möchte ich mich bei Frau Dr. G. Steger für ihre Unterstützung in allen Belangen bedanken.

Bei Frau Alexandra van Mil möchte ich mich ganz herzlich für die technische Assistenz bedanken.

Mein persönlicher Dank gilt meinem Laborkollegen Dr. M. Hufbauer für seine unermüdliche Unterstützung und seine Geduld sowohl in fachlicher aber insbesondere in freundschaftlicher Hinsicht. Für seine freundschaftliche Unterstützung und die fachlichen Diskussionen möchte ich auch Herrn Dipl.-Biol. D. Jordanovski in besonderer Weise danken. Im gleichen Zusammenhang seien auch Herr Dr. P. Marcuzzi, Frau Dipl.-Biol. S. Brüggemann, Frau Dipl.-Biol. C. Koehler und Herr Z. Tolman genannt, die zur freundlichen Arbeitsatmosphäre beigetragen haben. Auch allen anderen Mitarbeitern des Instituts, die namentlich nicht aufgeführt sind, möchte ich herzlich danken. Nicht zu letzt richte ich ein ganz besonderes Dankeschön an Herrn D. Wessler und Frau M. Junk für ihre Assistenz und unglaubliche Hilfsbereitschaft!

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Freundinnen Moni und Andrea, die mich während den langen Jahren des Studiums mit viel Humor begleitet haben.

Diese Promotionsarbeit ist meiner Familie, Dima und all denen gewidmet, die mich begleitet haben.

9.3. Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Herbert Pfister betreut worden.

Nachfolgende Teilpublikationen liegen vor:

Hufbauer M, Lazić D, Akgül B, Brandsma JL, Pfister H, Weissenborn SJ (2010): Enhanced human papillomavirus type 8 oncogene expression levels are crucial for skin tumorigenesis in transgenic mice. *Virology*. 403 (2): 128-36.

Lazić D, Alborzi F, Marcuzzi GP, Hess J, Pfister H, Akgül B (2011): Enhanced StefinA and Sprr2 expression during papilloma formation in HPV8 transgenic mice. *Accepted manuscript. Article in press. Journal of Dermatological Science*.

Hufbauer M, Lazić D, Reinartz M, Akgül B, Pfister H, Weissenborn SJ (2011): Skin tumor formation in human papillomavirus 8 transgenic mice is associated with a deregulation of oncogenic miRNAs and their tumor suppressive targets. *In revision. Journal of Dermatological Science*.

Köln, den 28. März 2011

Daliborka Lazić

Lebenslauf

Name	Daliborka Lazić
Geburtsdatum	29. Mai 1983
Nationalität	B.i.H.
März 2008 - Mai 2011	Institut für Virologie – Köln Doktorarbeit “Identifizierung zellulärer Zielgene des humanen Papillomvirus 8 (HPV8) in transgenen Mäusen und humanen Keratinozyten“
Aug 2006 – Juli 2007	Institut für Pharmakologie – Köln Diplomarbeit “Funktionelle Charakterisierung des Ergothionein-Transporters vom Huhn durch steuerbare Expression in HEK-293-Zellen“
Okt 2004 – Sep 2006	Hauptstudium Biologie – Universität zu Köln Fächer: Genetik, Biochemie, Pharmakologie
Okt 2002 – Sep 2004	Grundstudium Biologie – Universität zu Köln

Publikationen

Batsch A, Noetel A, Fork C, Urban A, Lazić D, Lucas T, Pietsch J, Lazar A, Schömig E, Gründemann D (2008): Simultaneous fitting of real-time PCR data with efficiency of amplification modeled as Gaussian function of target fluorescence. *BMC Bioinformatics*. 12; 9: 95.

Hufbauer M, Lazić D, Akgül B, Brandsma JL, Pfister H, Weissenborn SJ (2010): Enhanced human papillomavirus type 8 oncogene expression levels are crucial for skin tumorigenesis in transgenic mice. *Virology*. 403 (2): 128-36.

Lazić D, Alborzi F, Marcuzzi GP, Hess J, Pfister H, Akgül B (2011): Enhanced StefinA and Sprr2 expression during papilloma formation in HPV8 transgenic mice. *Accepted manuscript. Article in press. Journal of Dermatological Science*.

Hufbauer M, Lazić D, Reinartz M, Akgül B, Pfister H, Weissenborn SJ (2011): Skin tumor formation in human papillomavirus 8 transgenic mice is associated with a deregulation of oncogenic miRNAs and their tumor suppressive targets. *In revision. Journal of Dermatological Science*.

Nikodemus D, Lazić D, Bach M, Bauer T, Pfeiffer C, Wiltzer L, Lain E, Schömig E, Gründemann D (2011): Expression of the ergothioneine transporter *SLC22A4* in the reproductive tract of the boar and cross-species analysis of ergothioneine and glutathione in seminal plasma. *Submitted in Free Radical Research*.