

Abstract

Human papillomaviruses (HPVs) are small DNA viruses that infect the mucosa or the skin and can cause keratinocytic cancer. High-risk HPVs of genus alpha (e.g. HPV16) are the established cause of cervical and oropharyngeal cancer. Genus beta HPV (e.g. HPV8) are associated with the development of squamous cell carcinoma of the skin in Epidermodysplasia verruciformis (EV) and immunosuppressed patients. The E6 oncoproteins of HPV16 contains a PDZ binding domain, through which it interacts with cellular PDZ proteins and facilitates their degradation. However, HPV8-E6 does not encode a comparable PDZ binding domain. Irrespective of this fact, my group previously published, that HPV8-E6 can circumvent this deficit by targeting the cellular PDZ protein Syntenin-2, a protein with strong binding affinity to nuclear phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PI(4,5)P₂), through transcriptional repression (Lazic, Hufbauer et al. 2012). This study aimed to extend the knowledge on the control of Syntenin-2 gene expression and to test the hypothesis whether HPV8 targets nuclear PI(4,5)P₂. Here, it could be shown, that Syntenin-2 is expressed at high levels in differentiating and in lower amounts in keratinocytes cultured in low calcium media with a basal cell fate. HPV8-E6 led to a further reduction of Syntenin-2 expression only in cells cultured in low calcium. In the skin of patients suffering from EV, Syntenin-2 was expressed in differentiating keratinocytes of non-lesional skin, but was absent in virus positive SCC. Using 5-Aza-2'-deoxycytidine, which causes DNA demethylation, Syntenin-2 transcription was profoundly activated and fully restored in the absence and presence of HPV8-E6, implicating that E6 mediated repression of Syntenin-2 transcription is due to promoter hypermethylation. Since Syntenin-2 binds to PI(4,5)P₂, it was further tested whether the PI(4,5)P₂ metabolic pathway might govern Syntenin-2 expression. PI(4,5)P₂ is generated by the activity of phosphatidylinositol-4-phosphate-5-kinase type I (PIP5KI) or phosphatidylinositol-5-phosphate-4-kinase type II (PIP4KII). Surprisingly, transfection of siRNAs against PIP5KI and PIP4KII resulted in higher Syntenin-2 expression with the highest effect mediated by siPIP5KI α . HPV8-E6 was able to counteract siPIP4KII α , siPIP4KII β and siPIP5KI γ mediated Syntenin-2 re-expression but not siPIP5KI α .

Phospholipids regulate many aspects of cell function and their deregulation is associated with various pathophysiological disorders, including cancer. By analysing the nuclear PI(4,5)P₂ levels it could now be demonstrated, that expression of HPV8-E6 leads to a strong increase in nuclear PI(4,5)P₂ levels in undifferentiated human keratinocytes *in vitro* and in organotypic skin cultures. Interestingly, PI(4,5)P₂ specific antibodies recognised in Western blots multiple protein bands between 75-150 kDa in HPV8-E6 positive cells. Experiments using K14-HPV8-E6 transgenic mice revealed an important role of PI(4,5)P₂ upregulation in wound healing processes of the skin, which might also be relevant for HPV8 induced skin cancer development. In addition, the detection of PI(4,5)P₂ in HPV16 positive cervical intraepithelial

neoplasia and in cervical cancer suggests a specific role of PI(4,5)P₂ in oncogenic HPV associated cancers. Furthermore, HPV8-E6 was found to interfere with PI(4,5)P₂ metabolic pathway through transcriptional upregulation of PI(4,5)P₂ kinase expression and direct binding the 5-phosphatase OCRL1 (Lowe oculocerebrorenal syndrome protein) und Phosphatidylinositol (PI) . Mechanistically data suggest that increased PI(4,5)P₂ levels may influence transcriptional output of infected cells. SND1, a central cellular transcription factor, was found to be phospholipidised by PI(4,5)P₂ in HPV8-E6 positive cells. On the other hand, PI(4,5)P₂ signals are co-localised with tri-methylated lysine 4 of histone H3 (H3K4me3), a marker for active gene transcription. This work postulates nuclear PI(4,5)P₂ as a key regulator of normal skin homeostasis and the E6-PI(4,5)P₂ axis as a novel oncogenic mechanism relevant for HPV induced skin carcinogenesis.

Zusammenfassung

Humane Papillomviren (HPV) sind kleine DNA Viren, die die Schleimhaut oder verhornende Haut infizieren und Karzinombildung verursachen können. Hoch-Risiko HPV des Genus Alpha (z.B. HPV16) sind der etablierte Auslöser für zervikalen und oropharyngealen Krebs. Genus Beta Viren (z.B. HPV8) sind mit der Entwicklung von Plattenepithelkarzinomen der Haut in Epidermodysplasia verruciformis (EV) Patienten und Organtransplantatempfängern assoziiert. Das E6 Onkoprotein von HPV16 enthält eine PDZ Bindedomäne, durch welche es mit zellulären PDZ Proteinen interagiert und ihre Degradation induziert. HPV8-E6 hingegen kodiert nicht für eine vergleichbare PDZ Bindedomäne. Unabhängig dieser Tatsache hat meine Arbeitsgruppe zuvor publiziert, dass HPV8-E6 dieses Defizit umgehen kann, indem es das zelluläre PDZ Protein Syntenin-2, welches eine hohe Bindungsaffinität zu nukleärem Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PI(4,5)P₂) besitzt, transkriptionell herunterreguliert. Diese Studie zielte darauf ab, das Wissen über die Kontrolle der Genexpression von Syntenin-2 zu erweitern und die Hypothese zu untersuchen, ob HPV8 nukleäres PI(4,5)P₂ als Zielmolekül nutzt. Es konnte hier gezeigt werden, dass Syntenin-2 in differenzierten Keratinozyten stark exprimiert vorliegt, wohingegen nur eine geringe Menge in Keratinozyten mit basalen Charakteristika, die in Medium mit geringer Kalzium-Konzentration kultiviert wurden, exprimiert war. HPV8-E6 führte zu einer weiteren Reduktion der Syntenin-2 Expression nur in Zellen, welche in Kalzium reduzierten Medium kultiviert wurden. In der Haut von EV Patienten wurde Syntenin-2 nur in differenzierten Keratinozyten von nicht lesionaler Haut gefunden und fehlte in Virus-positiven Plattenepithelkarzinomen. Durch den Einsatz von 5-Aza-2'-desoxycytidin, welches die DNA demethyliert, wurde die Syntenin-2 Transkription, sowohl in Anwesenheit, als auch in Abwesenheit von HPV8-E6, komplett wiederhergestellt. Dies implizierte, dass die Promoter Hypermethylierung der Grund für die E6 vermittelte Repression der Syntenin-2 Transkription ist. Da Syntenin-2 mit der Kontrolle des nucleären PI(4,5)P₂ Metabolismus assoziiert ist, wurde getestet, ob Syntenin-2 selbst über diesen Signalweg kontrolliert wird. PI(4,5)P₂ wird entweder durch die Phosphatidylinositol-4-phosphat-5-Kinase Typ I (PIP5KI) oder die Phosphatidylinositol-5-phosphat-4-kinase Typ II (PIP4KII) generiert. Überraschenderweise resultierte die siRNA Transfektion gegen PIP5KI und PIP4KII in höheren Syntenin-2 Expressionsleveln, wobei den stärksten Effekt die siPIP5KI α hatte. HPV8-E6 war in der Lage der siPIP4KII α , siPIP4KII β und siPIP5KI γ vermittelte Syntenin-2 Reexpression entgegenzuwirken, welches bei der siPIP5KI α nicht beobachtet werden konnte.

Phospholipide regulieren viele Zellfunktionen und deren Deregulierung ist mit verschiedenen pathophysiologischen Funktionsstörungen, inklusive Krebsentstehung, assoziiert. Durch die Analyse der PI(4,5)P₂ Level konnte hier nun gezeigt werden, dass die Expression von HPV8-E6 zu einem starken Anstieg, von nukleärem PI(4,5)P₂ in undifferenzierten, humanen

Keratinozyten *in vitro* und in organotypischen Hautkulturen, führte. Interessanterweise, zeigte der PI(4,5)P₂ spezifische Antikörper im Western Blot multiple Proteinbanden zwischen 75 - 150 kDa in HPV8-E6 positiven Zellen. Experimente mit transgenen K14-HPV-8E6 Mäusen offenbarte eine wichtige Rolle für die PI(4,5)P₂ Hochregulierung im Prozess der Wundheilung der Haut, welche vermutlich auch relevant für die HPV8 induzierten Hautkarzinogenese zu sein scheint. Außerdem konnte in HPV16 positiven zervikalen, intraepithelialen Neoplasien und im zervikalen Krebs hohe Mengen von PI(4,5)P₂ detektiert werden, was eine spezifische Rolle von PI(4,5)P₂ in HPV assoziierten Karzinomen suggeriert. Interessanterweise konnte zudem gezeigt werden, dass HPV8-E6 durch transkriptionelle Hochregulation der PI(4,5)P₂ generierenden Kinasen und Bindung sowohl an die 5-Phosphatase OCRL1 (Lowe oculocerebrorenal syndrome protein) als auch an Phosphatidylinositol den PI(4,5)P₂ Metabolismus deregulieren kann. Mechanistische Daten suggerieren, dass PI(4,5)P₂ Level wahrscheinlich einen Einfluss auf transkriptionellen Output von infizierten Zellen haben. In diesem Zusammenhang konnte SND1, ein zentraler zellulärer Transkriptionsfaktor, als ein von PI(4,5)P₂ phospholipidiertes Protein in HPV8-E6 positiven Zellen identifiziert werden. Des Weiteren konnten mit PI(4,5)P₂ überlappende tri-methylierte Lysine 4 des Histon H3 (H3K4me3) Signale identifiziert werden, welche ein Marker für aktive Gentranskription darstellen. Diese Arbeit postuliert nukleäres PI(4,5)P₂ als ein Schlüsselfaktor für die normale Haut Homöostase und die funktionelle E6-PI(4,5)P₂ Verbindung als einen neuen onkogenen Mechanismus mit Relevanz für die HPV induzierte Karzinogenese.