

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biochemiker **Sven Bergner**

aus Jena

Tag der mündlichen Prüfung:

**Untersuchung der onkogenen Eigenschaften von
HPV16 E7, E6 und E5
bei Expression unter Kontrolle ihrer viralen Promotoren
und im Kontext des kompletten viralen Genoms in einem
organotypischen *in vitro* Modellsystem**

Gutachter:

Prof. Dr. Lutz Gissmann
(Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg)

Prof. Dr. Angel Alonso
(Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg)

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst verfasst und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Diese Dissertation wurde in dieser oder anderer Form weder bereits als Prüfungsarbeit verwendet noch einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt. An keiner anderen Stelle ist ein Prüfungsverfahren beantragt.

Heidelberg, 01. September 2011

(Sven Bergner)

Für meine Eltern und Stephanie

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	i
---------------------------	----------

ZUSAMMENFASSUNG	v
------------------------	----------

SUMMARY	vi
----------------	-----------

1 EINLEITUNG	1
---------------------	----------

1.1	Der kausale Zusammenhang von Virusinfektion und Tumorerkrankung.....	1
1.2	Phylogenie der Papillomaviren	2
1.3	Epidemiologie Humaner Papillomaviren und HPV-induzierter Pathologien.....	3
1.4	Struktur und Genomorganisation der Humanen Papillomaviren.....	6
1.5	Der Lebenszyklus von HPV	7
1.6	Von der HPV-Infektion zur Ausbildung eines Tumorleidens	10
1.7	Die viralen Proteine E7, E6, E5 und ihre onkogenen Eigenschaften	12
1.7.1	E7.....	12
1.7.2	E6.....	15
1.7.3	E5.....	16
1.8	Experimentelle Modellsysteme zur Untersuchung der HPV Biologie	18
1.9	Zielsetzung	21

2 MATERIAL und METHODEN	22
--------------------------------	-----------

2.1	Material.....	22
2.1.1	Chemikalien.....	22
2.1.2	Geräte	23
2.1.3	Software	24
2.1.4	Verbrauchsmaterialien.....	24
2.1.5	Kits.....	25
2.1.6	Enzyme	25
2.1.7	Plasmide	25
2.1.8	Oligonukleotidprimer	26
2.1.9	Bakterienstämme	27
2.1.10	Zelllinien	27
2.1.11	Puffer und Lösungen	27
2.1.12	Medien für die Kultur von Bakterien	30
2.1.13	Medien für die Kultur eukaryotischer Zellen	30
2.1.14	Medien zur Kryopräservierung eukaryotischer Zellen.....	31
2.1.15	Primäre Antikörper	31
2.1.16	Sekundäre Antikörper	32

2.2	Molekularbiologische Methoden.....	32
2.2.1	Kultur und Lagerung von Bakterien	32
2.2.2	Herstellung elektrokompeter Bakterien.....	33
2.2.3	Transformation von Bakterien durch Elektroporation.....	33
2.2.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	34
2.2.5	Isolierung von DNA aus humanen Zellen	34
2.2.6	Isolierung von RNA aus humanen Zellen	35
2.2.7	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	36
2.2.8	Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen	36
2.2.9	Ligation von DNA-Fragmenten.....	37
2.2.10	Klonierung von DNA-Fragmenten	37
2.2.11	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	37
2.2.12	Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	38
2.2.13	Ortspezifische Mutagenese.....	39
2.2.14	Agarosegelelektrophorese	39
2.2.15	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	40
2.2.16	Alkalischer Kapillar-DNA-Transfer (Southern Blot)	40
2.2.17	Radioaktive Markierung von DNA-Proben.....	41
2.2.18	Hybridisierung von DNA mit radioaktiv markierten Sonden	42
2.3	Proteinbiochemische Methoden	43
2.3.1	Herstellung von Proteinextrakten.....	43
2.3.2	Proteinkonzentrationsbestimmung	44
2.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	44
2.3.4	Coomassie-Färbung von Proteinen im Gel.....	45
2.3.5	Silberfärbung von Proteinen im Gel.....	45
2.3.6	Immunblot (Western Blot)	46
2.3.7	Densitometrische Quantifizierung von Immunblot-Analysen	47
2.4	Zellbiologische Methoden	48
2.4.1	Zellkultur	48
2.4.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	49
2.4.3	Zellzahlbestimmung	50
2.4.4	Transfektion von Zelllinien.....	50
2.4.5	Organotypische Raftkultur	51
2.4.6	Präparation der organotypischen Gewebe.....	52
2.4.7	Hämatoxylin-Eosin Färbung	53
2.4.8	Entparaffinierung und Rehydrierung von Gewebedünnschnitten.....	53
2.4.9	Immunhistochemische Untersuchung von Gewebedünnschnitten	54
2.4.10	Immunfluoreszenzfärbung von Gewebedünnschnitten	54

2.5	<i>In vitro</i> Herstellung und Analyse von Humanen Papilloma Virionen und peGFP-N1 Pseudovirionen.....	55
2.5.1	Aufreinigung und Religation des HPV16-Genoms sowie der Genommutanten.....	55
2.5.2	Transfection von 293T und 293TT Zellen.....	56
2.5.3	Extraktion von Virionen aus 293T und 293TT Zellen und Virionmaturierung	56
2.5.4	Aufreinigung der Virionen über Dichtegradientenzentrifugation	57
2.5.5	Dichtebestimmung durch Refraktionsmessung.....	58
2.5.6	Extraktion von DNA aus aufgereinigten Virionen	58
2.5.7	Infektion von 293T- und HaCaT-Zellen sowie primären Keratinozyten	58
2.5.8	Elektronenmikroskopie von <i>in vitro</i> produzierten HPV16-Virionen	59
2.6	Etablierung des <i>in vitro</i> Modells auf der Basis HPV16-tragenden CRE-LOXP-Vektorsystemen in HaCaT	59
2.6.1	Klonierung der mutierten HPV16-Genome in den loxp_HPV16_peGFP-N1-Plasmiden.....	59
2.6.2	Kotransfektion und Selektion von NIKS- und HaCaT-Zellen mit dem CRE-LOXP-Vektorsystem	59
2.6.3	Bestimmung der Gewebestärke der organotypischen Raftkulturen	60
2.6.4	BrdU-Inkorporationsassay zur Detektion proliferierender Zellen	60
2.6.5	Semi-quantitativer Multiplex-Papillomavirus-Genotypisierungsassay (MPG)	61
2.6.6	Qualitativer RT-PCR-Assay für das E6*I-Transkript von HPV16	61
2.6.7	Konfokale Laser-Scanning Fluoreszenzmikroskopie	61
2.6.8	Quantitative Analyse von p53-positiven Zellen und p53-Immunfluoreszenzintensitäten im Gewebeschnitt.....	62
2.6.9	Statistische Auswertung.....	63
3	ERGEBNISSE	64
3.1	Etablierung der <i>in vitro</i> Virionen Herstellung.....	64
3.1.1	Herstellung mutierter HPV16-Genome.....	64
3.1.2	Produktion und Aufreinigung infektiöser Virionen.....	65
3.1.3	Infektion von Targetzellen mit <i>in vitro</i> produzierten Pseudo- und HPV16-Virionen.....	67
3.2	Entwicklung eines <i>in vitro</i> Modells mittels HPV16-tragenden CRE-LOXP-Vektorsystemen in HaCaT-Raftkulturen	68
3.2.1	NIKS bilden nur unzureichend epidermale Strukturen im Raft-Modell.....	68
3.2.2	Optimierung der HaCaT-Kulturbedingungen	70
3.2.3	Etablierung des CRE-LOXP-Systems	73
3.2.4	Morphologie der HaCaT-Raftkultur.....	78
3.2.5	HaCaT Raftkulturen unterstützen den Erhalt episomaler HPV16-Genome und die virale Gentranskription	80
3.2.6	E1 ^{E4} als Marker zur Kennzeichnung der Vervollständigung des viralen Lebenszyklus	81

3.2.7	HPV16 induziert stärkeres Auswachsen der HaCaT-Raftkulturen	83
3.2.8	HPV16 induziert Proliferation in suprabasalen Zellschichten	86
3.2.9	HPV-positive Gewebe zeigen gering differenzierte Zellen in suprabasalen Bereichen	90
3.2.10	Die Präsenz von HPV16 erhöht die p53-Expression in HaCaT-Gewebekultur	93
3.2.11	Expression von pRb und p16 ^{INK4A}	97
4	<u>DISKUSSION</u>	100
4.1	Etablierung eines <i>in vitro</i> Modells auf der Basis von loxp_HP16_peGFP-N1- Vektoren in der immortalisierten Zelllinie HaCaT	101
4.2	HPV16 vermittelt ein stärkeres Auswachsen der HaCaT-Raftkultur durch eine induzierte Proliferation in suprabasalen Bereichen	105
4.3	HPV16-positive organotypische HaCaT-Raftkulturen zeigen eine veränderte Histologie und Differenzierung im <i>Stratum granulosum</i>	108
4.4	Die produktive Phase des HPV16-Lebenszyklus wird in organotypischer HaCaT-Raftkultur nicht unterstützt	110
4.5	Hyperproliferation in organotypischer HaCaT-Raftkultur basiert nicht auf der E6- und E7-vermittelten Degradation von p53 bzw. pRb	111
4.6	Gesamtbewertung des neu etablierten Modellsystems	114
4.7	Produktion infektiöser HPV16-Virionen <i>in vitro</i> und Infektion von Keratinocyten	116
	<u>QUELLEN- und LITERATURVERZEICHNIS</u>	119
	<u>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</u>	143
	<u>TABELLENVERZEICHNIS</u>	145
	<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	146
	<u>DANKSAGUNG</u>	148

ZUSAMMENFASSUNG

Das *high-risk* Humane Papillomavirus Typ 16 (HPV16) ist ursächlich verantwortlich für die Ausbildung von ca. 50% aller mehr als 500.000 jährlich auftretenden Zervixkarzinomfälle weltweit. Trotz der Einführung der hochwirksamen prophylaktischen HPV-Vakzine sind weiterhin Untersuchungen zum besseren Verständnis von Virus-Wirt-Interaktionen erforderlich, die das grundlegende Verständnis für die virusinduzierte Progression einer benignen Neoplasie hin zu der Ausbildung eines Tumors erweitern. Bis heute sind die Effekte der HPV-Proteine hauptsächlich in Modellen erforscht worden, die ein oder zwei virale Onkogene unter der Kontrolle heterologer Promotoren berücksichtigen. Aus diesem experimentellen Ansatz resultiert eine Überexpression des jeweiligen Gens und die Aufklärung kooperierender Effekte mit anderen viralen Proteinen ist ausgeschlossen. Ziel dieser Arbeit war es daher, eine Analyse der biologischen Effekte der E5, E6 und E7 Onkogene von HPV16 in einem naturnahen *in vitro* Modell genauer zu charakterisieren. Dabei sollten die Onkoproteinfunktionen aller drei Gene im Vordergrund stehen, wenn sie unter der Kontrolle ihrer viralen Promotoren im Kontext des komplett vorliegenden Genoms exprimiert werden. Hierfür gelang es, ein transfektionsbasiertes System auf Grundlage eines loxp_HP16_eGFP-N1-Vektoren zu etablieren, das bei hoher episomaler Kopienzahl eine effiziente Manifestation von HPV16 ermöglichte. Benutzt wurden neben dem Wildtyp-Genom von HPV16 auch Punktmutanten aller drei Gene, die ein gezieltes „*knock-out*“ bewirkten. Durch eine Anpassung der Kulturbedingungen konnte die immortalisierte HaCaT-Zelllinie erstmals in organotypischer Raftkultur so kultiviert werden, dass eine Unterstützung des viralen Lebenszyklus möglich wurde. Konservierte HPV16-tragende epidermale Äquivalente bildeten dabei stark dysplastische Morphologien aus, die bisher in ähnlichen Systemen aus primären Keratinozyten bzw. bei der Verwendung der NIKS-Zelllinie nicht darstellbar waren. In Konsens mit den bekannten HPV16-Charakteristiken war E7 in den vorliegenden Untersuchungen als Hauptmediator einer virusinduzierten Hyperproliferation identifizierbar. Konträr zu den allgemein anerkannten Wirkweisen von E7 und E6 resultierte hingegen die gesteigerte Proliferation nicht aus einer Degradation von pRb oder p53. Insgesamt legten sowohl die Histologie, die schwache Präsenz von E1^{E4} und der ausgebliebene Nachweis einer L1-Expression den Schluss nahe, dass die erhaltenen Gewebe einer höhergradigen *in vivo* CIN-Läsion vergleichbar sind. Diese Ergebnisse erlauben eine teilweise neue Interpretation der Effekte der HPV-Onkogene auf die Zellproliferation und -differenzierung der infizierten epithelialen Zellen. Weiterhin bietet das etablierte Modell die Möglichkeit in einem naturähnlichen System die Eigenschaften der Onkoproteine von HPV16 zu untersuchen.

SUMMARY

The high-risk Human Papilloma Virus type 16 (HPV16) is the causative etiological agent in approximately 50% of more than 500.000 cervical carcinoma cases worldwide each year. Despite the implementation of two highly effective prophylactic vaccines there is a constant need for research focused on the virus-host interaction that underlies virus induced progression from benign neoplasia to tumor development. So far the HPV protein functions were analyzed mainly by *in vitro* model systems where one or two viral oncogenes were expressed under control of heterologous promoters. The outcome of such experimental approaches is the overexpression of those genes, leaving out the elucidation of cooperative effects with other viral proteins. Therefore the aim of this thesis was the dissection from biological functions of the HPV16 oncogenes E5, E6 and E7 within an *in vitro* model reflecting near-natural conditions. Particularly the oncoprotein functions of E7, E6 and E5 when expressed under the control of their own promoter and in the presence of the complete viral genome were of special interest in this study. By establishing a transfection based system using a loxp_HP16_eGFP-N1-vector high viral episomal copy numbers could be obtained. Used for this study were the wild-type HPV16 genome and also mutated genomes holding point mutations within the oncogenes causing a specific knock-out. Through the modulation of culture conditions it was possible to actively support a viral life cycle employing organotypic raft cultures of immortalized HaCaT cells for the first time. The resulting epidermal equivalents which carried HPV16 displayed pronounced dysplastic morphology, a phenotype which is not seen to such an extent in approaches employing both primary keratinocytes and the NIKS cell line. In agreement with previously published theories the results of this study confirm that E7 is of pivotal importance for the development of a hyperproliferation upon the virus infection. Surprisingly, the results reveal that the E7 and E6 mediated increase in proliferation does not result from the degradation of pRb or p53. Due to the histological features, the fact that E1^{E4} was weakly expressed and L1 could not be detected it was suggested that the resulting *in vitro* tissues closely resemble higher grade CIN lesions *in vivo*. These results partially allow a new interpretation of the HPV16 oncogene effects on cell proliferation and differentiation within infected epithelial cells. Consequently, the *in vitro* system developed in this study will facilitate the analysis of the oncoprotein functions of HPV16 in a close to nature environment.

I EINLEITUNG

1.1 Der kausale Zusammenhang von Virusinfektion und Tumorerkrankung

Krebserkrankungen sind trotz der erheblichen Fortschritte in Diagnose und Behandlung ein großes Gesundheitsproblem, das weite Teile der Weltbevölkerung betrifft. In den Vereinigten Staaten von Amerika ist jeder 4. Verstorbene Opfer eines Tumorleidens (Jemal et al., 2010a; Jemal et al., 2010b). Die *International Agency for Research on Cancer* (IARC) der Weltgesundheitsorganisation (WHO) schätzt anhand epidemiologischer Daten die Anzahl an Krebsneuerkrankungen in der Europäischen Union im Jahre 2008 auf 2,5 Millionen und die Anzahl an Patienten mit einem tödlichen Verlauf der Erkrankung auf 1,2 Millionen (Ferlay et al., 2010). Dabei geht man heute von einem Anteil von mehr als 20% aus, bei der ein direkter Zusammenhang von Tumorgenese und biologischer Beteiligung von Viren, Bakterien oder Parasiten angenommen wird (zur Hausen, 2009b). Im Zuge dieser Erkenntnisse stufte die WHO 2009 elf Organismen, darunter 7 Virusarten, als „krebserregend“ für den Menschen ein (Gefahrenpotential Gruppe 1) (Bouvard et al., 2009). Infektionen mit den Viren: Epstein-Barr-Virus (EBV), Hepatitis-B-Virus (HBV), Hepatitis-C-Virus (HCV) bzw. *high-risk* Humane Papillomaviren (HPV) sind demnach kausal verantwortlich für die Entwicklung von ca. 12% aller menschlichen Neoplasien (Sarid and Gao, 2010).

Die Erforschung des ursächlichen Zusammenhangs zwischen einer Virusinfektion, wenn auch zu diesem Zeitpunkt noch nicht als solcher umschrieben, und der Ausbildung eines Tumors geht auf das Jahr 1911 zurück. Damals war es Peyton Rous möglich zu zeigen, dass zellfreie Filtrate von Hühnertumorextrakten eine Tumorausbildung in einem anderen Wirtstier induzieren können (Rous, 1911). Ein weiterer Nachweis gelang durch die Entdeckung virusinduzierter Warzen beim Baumwollschwanzkaninchen und deren karzinogenen Charakteristika (Shope and Hurst, 1933). Trotz dieser frühen wissenschaftlichen Durchbrüche in der Virologie blieb dieses Feld ein eher verwaister Pfad der Tumorbilogie. Erst im Jahre 1964 konnte eine Virusinfektion einer menschlichen Krebsentität zugeordnet werden. Tony Epstein und Yvonne Barr wiesen in Zellen eines Burkitt's Lymphoms elektronen-

mikroskopisch Partikel des später nach ihnen benannten Epstein-Barr-Virus nach (Epstein et al., 1964). Dieses Virus war Forschungsgegenstand zu Beginn der Forscherlaufbahn von Harald zur Hausen. Die Verleihung des Nobelpreises für Medizin im Jahre 2008 bezieht sich hingegen auf die Entdeckung der ersten HPV-Typen (Boshart et al., 1984; Durst et al., 1983; Gissmann et al., 1977; Gissmann and zur Hausen, 1976; Orth et al., 1977), den erstmals postulierten kausalen Zusammenhang zwischen der Infektion mit eben diesen Viren und der Ausbildung von Gebärmutterhalskrebs (zur Hausen, 1977) sowie der späteren Bestätigung des biologischen Zusammenhangs, auf deren Basis die Entwicklung und Einführung zweier Impfstoffe vorangetrieben wurden. Die inzwischen eingeführten Impfungen könnten erstmals einen Schutz gegen die dritthäufigste Todesursache durch Krebsleiden bei Frauen liefern.

1.2 Phylogenie der Papillomaviren

Papillomaviren infizieren das ausdifferenzierte Epithel warmblütiger Vertebraten. Die akzeptierte Klassifikation für Papillomaviren beruht auf Sequenzhomologien des hochkonservierten *open reading frames* (ORF) von L1 (Bernard et al., 2010; de Villiers et al., 2004). Die Verfügbarkeit von Weitspektrum-Primern [z.B. GP5+/6+ (de Roda Husman et al., 1995), SPF (Kleter et al., 1998)] ermöglicht die Amplifikation eines Hauptteils viraler Isolate. Anhand der L1-basierten Klassifikation lassen sich derzeit 189 Typen unterscheiden. Dies entspricht einem Zuwachs von 76 PV-Typen seit der letzten Erhebung 2004 (Bernard et al., 2010; de Villiers et al., 2004). Das Kriterium für einen neuen Typ ist ein vollständig kloniertes Genom, das sich um 10% in der Sequenz der L1 ORF vom nächsten Verwandten unterscheidet - weiter aufspalten lässt sich in Subtypen (2 - 10% Sequenzvarianz) und Varianten (< 2% Sequenzvarianz).

Die aktuelle Klassifikation beinhaltet 69 Typen, die nicht-humane Vertebraten infizieren, sowie 120 human-infektiöse Typen. Die eigenständige Familie der *Papillomaviridae* unterteilt sich in 29 Gattungen. Humane Papillomaviren werden in 5 Gattungen (Alpha, Beta, Gamma, My und Ny) eingeordnet (Bernard et al., 2010). Darüber hinaus erfolgt eine Unterteilung hinsichtlich ihrer Gewebespezifität in mukosale und kutane Typen. Dabei gehören alle mukosalen Typen zur Gattung Alpha, während kutane Typen in allen fünf Gattungen nachgewiesen wurden (Abbildung 1.1). Damit ist diese Klassifikation nur unzureichend korrelierbar mit der Biologie der einzelnen Virustypen. Ein Sequenzvergleich der deutlich heterogeneren *early* Gene hingegen ermöglicht Rückschlüsse auf die Evolution der *Papillomaviridae* und auch deren biologischen Charakteristika in Bezug auf die Einteilung in Hoch- und Niedrigrisiko-Typen (Bravo et al., 2010). Die folgenden Ausführungen sollen

vertiefte Einblicke in die Biologie der mukosalen Typen liefern, da sie den Gegenstand der eigenen Untersuchung darstellen.

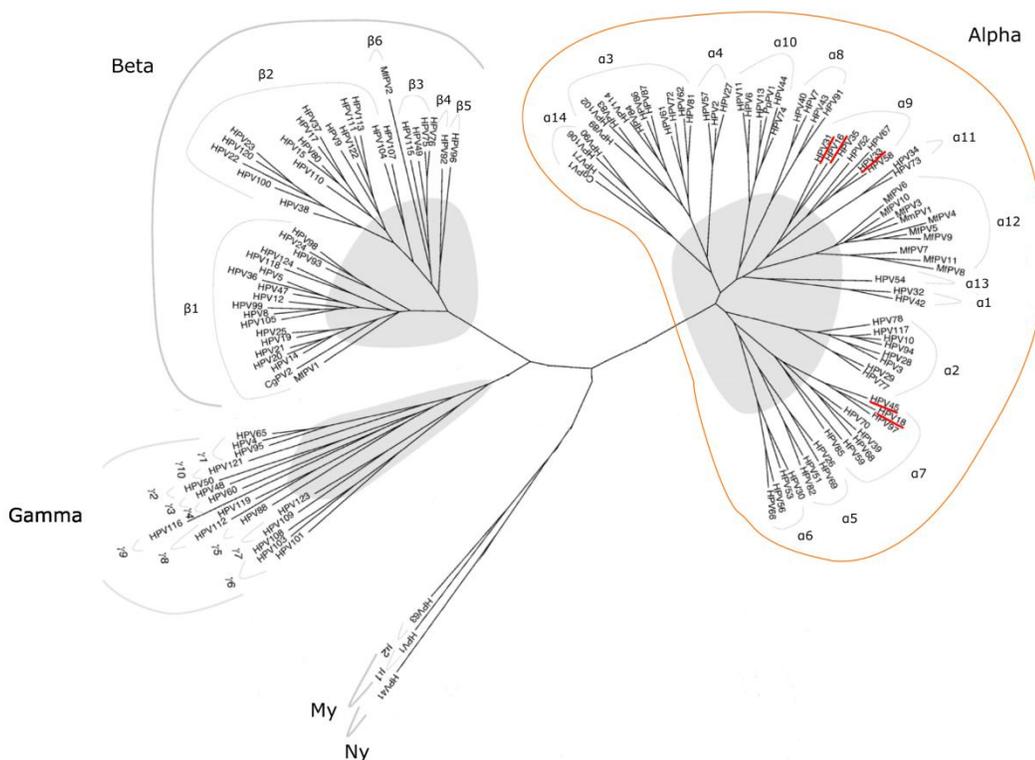


Abbildung 1.1: Phylogenetischer Baum der *Papillomaviridae*

Anerkannte Klassifikation anhand der Sequenzhomologien des ORF von L1. Hier dargestellt zur besseren Übersichtlichkeit nur die Gattungen Alpha, Beta, Gamma, My und Ny, die hauptsächlich Humane Papillomaviren subsumieren. Orangerfarben hervorgehoben wurden die Alpha Genera der mukosalen Typen, wobei die am häufigsten in zervikalen Neoplasien gefundenen Typen rot markiert wurden (vgl. auch Abbildung 1.2 B) (modifiziert nach (Bernard et al., 2010).

1.3 Epidemiologie Humaner Papillomaviren und HPV-induzierter Pathologien

Eine Infektion durch Humane Papillomaviren ist weltweit die am häufigsten sexuell übertragene Erkrankung (Lacey, 2005). Sowohl Frauen als auch Männer sind in die Übertragungskette der Infektion involviert. Dabei sind Frauen erheblich stärker von den Folgen betroffen. In den USA geht man jährlich von 6,2 Millionen Infizierten im Alter zwischen 15 und 44 Jahren aus, wobei ca. 74% der Fälle in die Altersgruppe zwischen 15 und 24 Jahren fällt (Weinstock et al., 2000). Global betrachtet, infiziert sich jeder zweite Mensch im Laufe seines Lebens mit mindestens einem genitalen HPV Typ, wobei bei Frauen bis zum 50. Lebensjahr der Anteil nahezu 80% beträgt (Steben and Duarte-Franco, 2007). Die Prävalenz zervixinfizierter Frauen mit normaler Zytologie beträgt weltweit 10,4%, mit einem höheren Anteil bis zu 31,6% (Ostafrika) in Ländern der Dritten Welt (de Sanjose et al., 2007) (Abbildung 1.2 A). Der Großteil der Infektionen ist transient und ohne pathologische Folgen.

Rund 70% der Ansteckungen werden innerhalb eines Jahres, etwa 90% innerhalb von zwei Jahren durch das Immunsystem bewältigt (Ho et al., 1998). Eine durchschnittliche Infektion besteht ca. 8 Monate lang (Giuliano, 2007).

Mukosale HPV-Infektionen verursachen zwei verschiedene Krankheitsbilder: genitale Warzen sowie Zervixkarzinome und deren Vorstufen [Zervikale Intraepitheliale Neoplasien (CIN1 – CIN3)]. In diesen Anomalien ist die HPV-Prävalenz deutlich gesteigert gegenüber der in unklinischen Personengruppen.

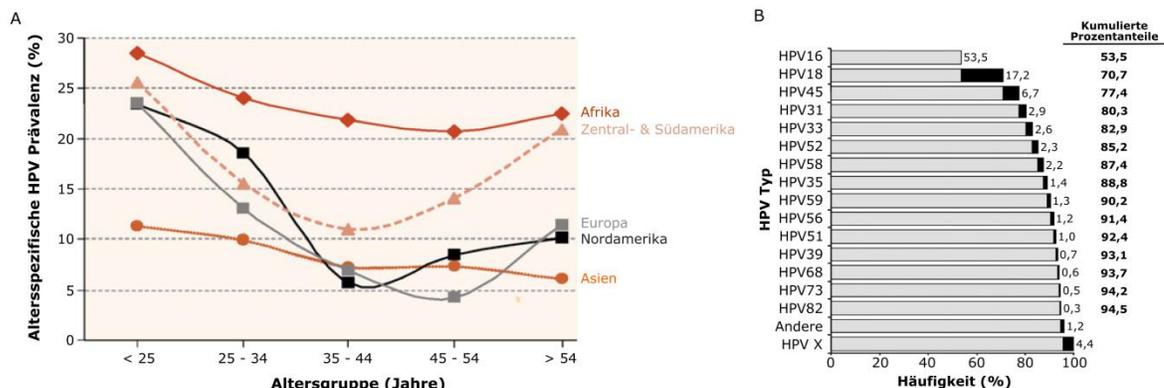


Abbildung 1.2: Häufigkeit von HPV Infektionen

A: Altersspezifische HPV Prävalenz von Frauen ohne klinische Symptomatik unterteilt in verschiedene globale Regionen. Deutlich erkennbar die hohe Infektionsrate jüngerer und damit sexuell aktiverer Frauen bis nahezu 30% (Afrika), die sich bis zu einem mittleren Alter verringert. Interessant zu bemerken der erneute Anstieg (außer Asien) ab einem Alter über 40. Die möglichen Ursachen hierfür sind noch in Diskussion (nach Bosch et al., 2008).

B: Häufigkeiten einzelner HPV Typen in invasiven Zervixkarzinomen weltweit. HPV16 ist mit einem Anteil von über 50% zusammen mit HPV18 (17,2%) ursächlich für ca. 70% all dieser Karzinome. Mit den sich anschließenden HPV45, 31, 33, 52, 58, 35 und 59 steigt der Anteil auf über 90%, was die Bedeutung möglicher weiterer Vakzine für diese Typen unterstreicht (nach Munoz et al., 2004).

Das Auftreten externer genitaler Warzen ist immer assoziiert mit einer HPV-Infektion, wobei es sich in ca. 90% um die *low-risk* Typen 6 und 11 handelt (Greer et al., 1995). Man geht davon aus, dass ungefähr 1% der sexuell aktiven Bevölkerung Nordamerikas von diesen Warzen betroffen ist und deren Behandlung einen nicht unerheblichen Teil der medizinischen Versorgungskosten verursacht (Koutsky, 1997; Steben and Duarte-Franco, 2007). Deswegen sind diese beiden Typen auch in den quadrivalenten Impfstoff Gardasil® von MSD inkludiert.

Im Falle der Zervixkarzinom-Vorstufen, den CIN-Läsionen, zeigt sich bezüglich der Infektionshäufigkeit ein stark differierendes Bild. Relativ gesicherte Daten sehen mehr als 85% der hochgradigen Läsionen (CIN3) positiv für mindestens einen HPV Typ (Smith et al., 2007b). Davon ist HPV16 mit einer Beteiligung von 45,4% weltweit [regional variierend: 51,8% (Europa) bis 33,3% (Ozeanien)] mit Abstand der häufigste. Die nächsthäufigsten Typen

sind HPV31 (8,7%) und HPV33 (7,3%). Je nach Region variieren diese Häufigkeiten jedoch stark. Dabei treten die Typen HPV18, 58 und 52 auf (Smith et al., 2007b).

Bei invasiven Zervixkarzinomen liegt eine deutlich geringere Heterogenität vor und weist HPV16 (54,4%) und HPV18 (15,4%) weltweit am verbreitetsten aus. Damit sind diese Viren ursächlich für nahezu 70% aller Tumore des Gebärmutterhalses verantwortlich. Danach folgen die Typen HPV45, 31, 33, 52 und 58 (Abbildung 1.2 B), wobei deren Häufigkeit und Ranking je nach Region variiert (Bosch et al., 2008). Dabei sind Zervixkarzinome weltweit die zweithäufigste, in Ländern der Dritten Welt sogar die häufigste Tumorart bei Frauen (Snijders et al., 2006). Für das Jahr 2007 schätzte die *American Cancer Society* (2007) die Zahl neuer Karzinomfälle auf 555.100 und der dadurch bedingten Todesfälle auf 309.800, wovon 85% in Drittweltländern vorkommen. Damit sind Zervixkarzinome die dritthäufigste krebsbedingte Todesursache bei Frauen weltweit.

Die sehr gut etablierte Screeningroutine liegt auf Grund der bekannten Kausalität von Hochrisiko-Humanpapillomavirus-Infektion und der Entwicklung von zervikalen Karzinomen naheliegenderweise auf diesen mukosalen Typen der betroffenen Organregion. Im Zuge der Einführung der Vakzine stieg die epidemiologische Datenmenge kontinuierlich an und wird mehr und mehr auch global standardisiert erfasst.

Daneben wird die Erforschung einer möglichen Beteiligung dieser Viren an der Induktion anderer Krebsarten in anderen Organen und Körperregionen vorangetrieben. Deren Ergebnisse sollen hier auch kurz erwähnt werden. Es liegt nahe, dass andere Tumorentitäten des Anogenitalbereichs ebenso HPV-assoziiert sein können. Im Falle von Penis- und Vulvakarzinomen ist die HPV-Prävalenz mit 30 - 50% bzw. ca. 50% geringer als in denen der Zervix. Bei Tumoren der Vagina und des Analbereichs (hier auch Männer) steigt sie auf bis zu 90% an (Frisch et al., 1999; Madsen et al., 2008a; Madsen et al., 2008b). Tumore des Mund- und Rachenraumes sind stark variierend zwischen 25% und 60% positiv für eine HPV-Infektion (Gillison, 2008; Psyrri and DiMaio, 2008; Weinberger et al., 2006), wobei eine Kausalität für deren Auslösung durch HP-Viren bei ca. 30% als realistisch erscheint (zur Hausen, 2009a). Lange bekannt ist das Vorhandensein von HPV-Infektionen in Hauttumoren, insbesondere in Fällen bei Bestehen der Erbkrankheit *Epidermodysplasia verruciformis* und bei Patienten nach Organtransplantationen (Übersicht in Bouwes Bavinck et al., 2001; Orth, 1986). Hier gestaltet sich die Validierung jedoch noch schwierig, da all diese Tumorentitäten selten sind und somit, verglichen mit Zervixkarzinomen, nur eine kleine Patientengruppe betreffen.

Interessant sind sie jedoch in Hinblick auf allgemeine Vorgänge der Tumorentstehung und wegen möglicher Heterogenitäten der Neoplasieinduktion durch verschiedene HPV-Typen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass HPV einen hohen Anteil bei der Entstehung infektionsbedingter Neoplasien hat. HPV gilt mit 5,2% als kausaler Faktor für jährlich 561200 Tumordiagnosen weltweit und steht damit an zweiter Stelle nach *Helicobacter pylori* (5,5%) (Parkin, 2006).

1.4 Struktur und Genomorganisation der Humanen Papillomaviren

Humane Papillomaviren sind hüllenlose DNA-Viren mit einem ikosaedrischen Kapsid ($T=7$) eines Durchmessers von 45 nm bis 55 nm, das sich aus den 2 strukturellen Proteinen L1 und L2 zusammensetzt (Abbildung 1.3 B). Das Arrangement der beiden Proteine ist bisher hinsichtlich der Anzahl von L2 Proteinen innerhalb des Kapsides nicht völlig aufgeklärt. Die maximale Zahl scheint 72 zu sein, ein L2 Protein in jedem Zentrum eines L1 Pentamers (Buck et al., 2008). Die Infektivität des Virus steigt mit der Anzahl inkorporierter L2 Moleküle (Doorbar, 2006). Die Kapside tragen ein zirkuläres doppelsträngiges Genom von ca. 8000 bp. Es kodiert auf einem Strang in gleicher Leserichtung für 8 Gene. Sie werden in 3 Regionen unterteilt: den nicht-kodierenden Bereich [*upstream regulatory region* (URR)], die *early* Gene (E) und die *late* Gene (L). Die URR beinhaltet die Bindestellen für die viralen Replikationsproteine E1 und E2 sowie den intrazellulären Transkriptionsfaktor SP1 und den Promotor der frühen viralen Transkription p97. Daran anschließend codiert die E-Region mit den E1, E2, E4, E5, E6 und E7 für alle nicht-strukturellen Proteine des Virus (Abbildung 1.3 A). Der Großteil der Plattenepithelkarzinome der Zervix weist ein in das Wirtsgenom integriertes HPV-Genom auf (Pett and Coleman, 2007). Diese Integration ist höchstwahrscheinlich die Folge von Doppelstrangbrüchen sowohl im Virus- als auch im Wirtsgenom sowie anschließender Ligationsprozesse im Laufe einer persistierenden Infektion (Winder et al., 2007). Die Strangbrüche im Virusgenom und damit die Integrationsstellen liegen hauptsächlich in den ORF von E1, E2 und E4, wodurch diese Bereiche einschließlich E5 und den Strukturgenen durch klonale Selektion verlorengehen (Dall et al., 2008). Die Integrationsstellen sind über das gesamte Wirtsgenom (mehr als 200 bisher bekannt) verteilt und fallen in mehr als 50% mit bekannten fragilen Chromosombereichen zusammen (Thorland et al., 2000). Die Konsequenz hieraus ist ein Verlust der Expressionskontrolle von E6 und E7 durch E2 (Dall et al., 2008). Dies verstärkt die onkogene Potenz dieser beiden Proteine. Hierauf wird nachfolgend näher eingegangen (Abschnitt 1.7).

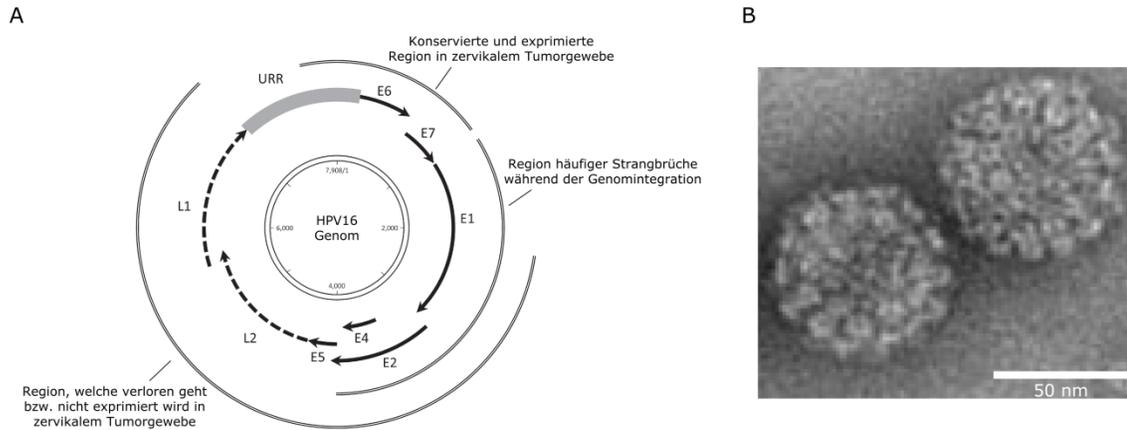


Abbildung 1.3: Genom- und Kapsidstruktur von HPV.

A: Schematische Darstellung des HPV16 Genoms. Die *early* ORF E6, E7, E1, E2, E4, E5 (schwarze Pfeile) werden entweder vom Promotor p97 oder p670 in verschiedenen Stadien der epithelialen Differenzierung exprimiert (vgl. Abschnitt 1.5). Die late ORF der Strukturproteine L1 und L2 dargestellt (gestrichelte Linie) werden nach Veränderung des Splicemusters unter Kontrolle von p670 exprimiert. Die URR (graue Box) beinhaltet 4 Bindestellen für E2, eine SP1 Bindestelle sowie die TATA-Box und den Promotor p97. Die äußeren grauen Ringe repräsentieren die genomischen Veränderungen während der Virusgenomintegration in das Wirtsgenom. (nach Burk et al., 2009)

B: Elektronenmikroskopische Aufnahme zweier Kapside von HPV16. Gut zu erkennen ist der Aufbau aus Pentameren von L1, die eine Ringstruktur bilden. Das Hauptgerüst der Virushülle wird durch 72 Pentamere erzeugt. Die Mitte jeder L1-Ringstruktur kann potentiell ein L2 enthalten. (entnommen aus Buck et al., 2005b)

1.5 Der Lebenszyklus von HPV

Humane Papillomaviren infizieren Zellen der Basalschicht. Eine Voraussetzung hierfür scheint das Auftreten von Mikrotraumata des Epithels zu sein. Weiterhin ist für die Entstehung einer Läsion die Infektion von epithelialen Stammzellen von Wichtigkeit (Egawa, 2003; Schmitt et al., 1996). Diese Zellen befinden sich an den Haarfollikeln der Haut bzw. im Bereich der Transformationszone der Zervix. Experimentelle Untersuchungen wiesen eine Reihe verschiedener Kofaktoren nach, die eine effiziente Infektion begünstigen. Heparansulfatproteoglykanen kommt dabei eine prominente Rolle bei der initialen Bindung des Virus an der Basalmembran bzw. Zelloberfläche zu (Combata et al., 2001; Giroglou et al., 2001; Johnson et al., 2009; Joyce et al., 1999). Aber auch Laminin 5 als Extrazellulär-matrixprotein scheint für die primäre Bindung von Bedeutung (Culp et al., 2006a; Culp et al., 2006b). Gegenwärtige Vorstellungen gehen davon aus, dass nach Andocken an der Zelloberfläche es zu einem aktiven Transport der Viruspartikel entlang von Actinfilopodien in Richtung des Zellkörpers kommt (Schelhaas et al., 2008; Smith et al., 2008). Danach werden sie durch Endozytose, in *clathrin-coated* Vesikeln verpackt, internalisiert (Day et al., 2003; Selinka et al., 2003). Bei der Art der Internalisierung bestehen auch Unterschiede zwischen verschiedenen Genotypen, so wird HPV31, ein naher Verwandter von HPV16, in Caveolae internalisiert

(Smith et al., 2007a). Die Aufnahme des Virus benötigt jedoch – verglichen mit anderen Virusfamilien - einen langen Zeitraum von mehreren Stunden (Culp and Christensen, 2004). Dies ist insoweit bemerkenswert, als dies untypisch für die geschilderten Endozytosewege ist. Es könnte sich daher bei HPV16 womöglich um einen bisher unbekanntem Internalisierungsweg handeln (Schiller et al., 2010), zumal neuere Inhibitionsstudien einen clathrin- und caveolinunabhängigen Weg postulieren (Spoden et al., 2008).

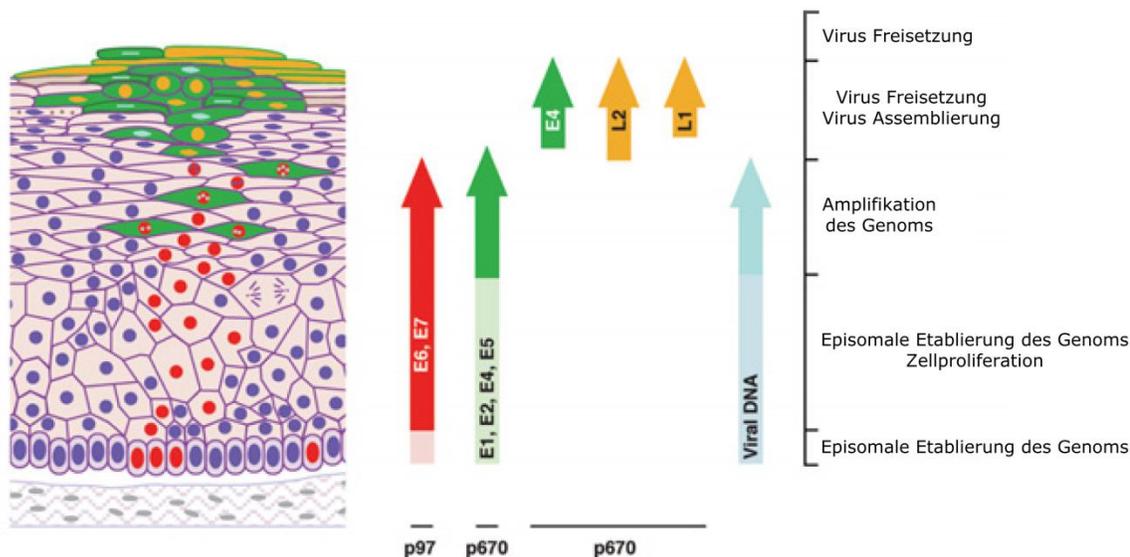


Abbildung 1.4: Der HPV Lebenszyklus.

Dargestellt ist das ausdifferenzierte mukosale Epithel mit dem entsprechenden Expressionsmuster der viralen Proteine, der jeweils aktiven Promotoren p97 und p670 und deren Funktion innerhalb des Lebenszyklus des Virus. (nach Doorbar, 2006)

Bevor es zur Internalisierung kommt, ist für eine finale Bindung der Kapside an die Zelloberfläche ein konformationelles Rearrangement von L1 und L2 erforderlich. Dies gibt den N-Terminus von L2 nach einer Spaltung durch Furin bzw. Proprotein-Konvertase 5/6 frei (Kines et al., 2009; Richards et al., 2006). Diese Vorgänge sind durch Verwendung einfach herzustellender Pseudovirionen gut untersucht. Jedoch fehlt weiterhin Klarheit über die Identität des keratinozytenspezifischen Rezeptors für die Internalisierung der Viren. *In vitro* Versuche verwiesen auf das epitheliale Zelladhäsionsmolekül $\alpha 6$ -Integrin als möglichen Kandidaten (Evander et al., 1997), wobei jedoch auch $\alpha 6$ -Integrin-defiziente Zelllinien effizient infiziert werden konnten (Shafti-Keramat et al., 2003; Sibbet et al., 2000). Innerhalb der Zellen werden die Viruspartikel bis in die späten Endosomvesikel über L1-spezifische Rezeptoren transportiert (Day et al., 2003). Hier erfolgt bereits ein partielles Auflösen und Freisetzen des HPV Genoms durch die Reduktion von Disulfidbrücken der Strukturproteine L1 und L2 (Li et al., 1998). Die durch die Furinproteolyse freigesetzten Peptide des C-Terminus von L2 besitzen dabei die Fähigkeit, Membranstrukturen aufzubrechen und so im Komplex die Virus-

DNA aus den Vesikeln auszuschleusen (Kamper et al., 2006). Der weitere Transport bis in den Kern der Wirtszelle ist bisher weitgehend unklar. L2 bleibt komplexiert mit dem Genom und bindet spezifisch über Dynein an das Mikrotubulinetzwerk der Wirtszelle, das den Komplex aktiv transportiert (Florin et al., 2006). Die Translokation in den Zellkern erfolgt jedoch nicht über einen spezifischen Rezeptor, sondern vielmehr durch den Zusammenbruch der Kernmembran während der Mitose (Darshan et al., 2004). Innerhalb des Zellkerns ist der Komplex von L2 und Genom in distinkten Bereichen der PML- und ND10-*bodies* lokalisiert (Day et al., 2004).

In infizierten Basalzellen wird durch E1 und E2 eine korrekte Replikation und Segregation der viralen DNA während der Zellteilung, sowie die episomale Etablierung mit einer Kopienzahl von 10 bis 200 aufrechterhalten. Dabei ist die Bindung des Transkriptionsfaktors E2 in der LCR ein essentieller Schritt, durch den die DNA-Helikase E1 an den Replikationsursprung rekrutiert wird. Dieser Komplex ist zu vergleichen mit den Komplexen von cdc6 und verschiedenen MCM an genomischen Replikationsursprüngen und ermöglicht somit eine virale Amplifikation, die unabhängig von der zellulären DNA-Synthese ist (Wilson et al., 2002; You et al., 2004). Es ist bislang nicht völlig aufgeklärt, ob E6 und E7 trotz einer schwachen Expression und einer induzierten proliferativen Phase zu diesem frühen Zeitpunkt in die Aufrechterhaltung der Infektion involviert sind (Zhang et al., 1999). Nichtinfizierte Zellen der Basalschicht teilen sich asymmetrisch, wobei eine Tochterzelle in dieser Schicht verbleibt, während die andere in die suprabasalen Schichten auswandert. Hier verlässt sie den Zellzyklus und startet ein Programm der terminalen Differenzierung. An deren Ende steht die ausdifferenzierte Epithelzelle, die die sichere Abgrenzung zur Umwelt und den Schutz vor pathogenen Mikroorganismen herstellt (Madison, 2003). In den oberen Schichten des Epithels werden von HP-Viren E6 und E7 gemeinsam unter der Kontrolle des p97 Promotors von einer bizistronischen mRNA exprimiert (Stacey et al., 2000). Beide Proteine können mit Mediatoren der Zellzykluskontrolle interagieren und bewirken dadurch eine Stimulierung der Proliferation (Munger et al., 2001). Auf Details dieser Funktionen wird später näher eingegangen werden (Abschnitt 1.7), da sie ebenfalls die onkogenen Eigenschaften der Proteine darstellen. Die viralen Proteine E1, E2, E4 und E5 werden desgleichen in differenzierten Zellen exprimiert und sichern den Erhalt der extrachromosmalen Kopienzahl des Virusgenoms (Middleton et al., 2003).

Die Amplifikation der viralen Genome erfolgt nur in einer Subpopulation von Zellen durch eine erhöhte Aktivität des differenzierungsabhängigen *late* Promotors p670 innerhalb des E7

open reading frames. Die erhöhte Konzentration von E1 und E2 und ihre Bindung am viralen *origin of replication* führt zu einer vermehrten Replikation der Genome, die ihrerseits wiederum als Templates für eine erhöhte Expression der beiden Proteine dienen. Alle Proteine der *early* Gene sind in diesen Prozess involviert, wobei die Expression von E6 und E7 von der Veränderung der Aktivität von p670 unverändert bleibt (Middleton et al., 2003). E5 und E4, deren Involvierung in den Replikationszyklus bisher nicht genau geklärt ist, sind ebenfalls essentiell für die Amplifikation in den differenzierten Bereichen des Epithels (Fehrmann et al., 2003; Genther et al., 2003; Peh et al., 2004). Die Replikation findet im Bereich der PML *bodies* des Zellkerns statt, die somit den Ort der Virusgenerierung darstellen (Day et al., 1998). Die strukturellen Proteine L1 und L2, ebenfalls unter der Kontrolle des *late* Promotors, werden im *Stratum granulosum* produziert. L2 rekrutiert L1 und fördert ein effektives Verpacken der DNA im Bereich der PML *bodies*, an denen die Kapside spontan assemblieren (Stauffer et al., 1998; Zhou et al., 1993). HPV sind nicht-lytische Viren. E4 fördert ein Auflösen des Keratinskeletts und damit eine Auflockerung verhornter Hautschichten (McIntosh et al., 2010; Wang et al., 2009). Die virale Freisetzung vom Gewebe geschieht anschließend durch ein Ablösen mit den oberen Keratinschichten des Epithels, wobei ihr extrazelluläres Überleben durch die Interaktion mit Keratinfragmenten gefördert wird (Bryan and Brown, 2001). Für eine neuerliche Infektion benötigt es hingegen ein Ablösen von eben diesen Strukturen. L2 ist nicht essentiell für eine korrekte Assemblierung des Viruskapsids, fördert aber seine Infektivität (Roden et al., 2001).

1.6 Von der HPV-Infektion zur Ausbildung eines Tumorleidens

Über eine Koevolution von mammalen Viren und ihren Wirten entsteht ein Gleichgewicht, in dem der Wirt keine großen Schäden im Zuge der Infektion erfährt und im Gegenzug das Virus durch die Immunantwort nur geringgradig in seiner reproduktiven Kapazität eingeschränkt wird (Marques and Carthew, 2007). Papillomaviren und ihre adaptierten Wirte haben im Laufe vieler Generationen ein derartiges Gleichgewicht erreicht (Bernard, 2005). Im vorherigen Abschnitt wurde der Verlauf einer produktiven HPV-Infektion beschrieben. Wie dargestellt, handelt es sich dabei um ein „einvernehmliches Miteinander“ von Virus und Wirtsgewebe. Das Virus braucht ein sich normal entwickelndes Gewebe, um seinen Lebenszyklus zu vollenden (Doorbar, 2005). Wie kommt es aber nun trotzdem zu einer virusinduzierten Ausbildung von Läsionen bis hin zu einer Etablierung von Zervixkarzinomen?

Vorangestellt soll hierbei erwähnt sein, dass die Progression zu einem Tumor der Zervix mit einer Inzidenz von ca. 0,03% ein sehr seltenes Ereignis ist. Dies ist besonders beachtlich, sieht man dagegen das hohe Infektionsrisiko von 80% bezogen auf eine Lebensspanne. Schätzungen gehen davon aus, dass 20% der zervikalen intraepithelialen Neoplasien des Stadiums 1 (CIN1) zu CIN2 progressieren, von denen 30% das Stadium 3 erreichen und wiederum 40% dieser Präkanzerosen zu einem Karzinom auswachsen (Burk et al., 2009). Ursprung dieses Verlaufs und der Hauptrisikofaktor ist eine persistierende Infektion über einen langen Zeitraum (Markowitz et al., 2007; Stanley, 2008). Dies spiegelt sich wider in der durchschnittlichen Spanne von 10-15 Jahren von der initialen Infektion bis zur Diagnose eines Tumors. Eine Infektion mit einem *high-risk* Typen erhält sich durchschnittlich 12 - 18 Monate und wird dann durch das Immunsystem meistens beseitigt (Richardson et al., 2003). Aber ca. 10% der Infektionsfälle kann nicht durch die Immunantwort bewältigt werden, was den oben beschriebenen Verlauf hin zur Krebsentstehung nach sich ziehen kann (Stanley, 2008). Grundlage einer persistierenden Infektion ist nämlich neben den Mechanismen des Erhalts des viralen Lebenszyklus offensichtlich die unterdrückende Modulation einer infektionsinduzierten Immunantwort durch das Virus (Bodily and Laimins, 2010). Die Infektionsbereiche an Orten von Mikroläsionen sind zugleich Bereiche hoher immunologischer Aktivität. In den initialen Schritten der Infektion „versteckt“ sich das Virus. Der viruszerstörenden Wirkung entgeht das HP-Virus durch eine ungewöhnlich lange Binde- und Internalisierungszeit von mindestens 24 Stunden (Schelhaas et al., 2008). Der späte Startpunkt der viralen Transkription kommt dann erst zum Tragen, wenn die Wundheilung weitgehend abgeschlossen und die Immunaktivität niedriger ist (Schiller et al., 2010). Ebenso trägt die virale Expression auf äußerst niedrigem Level in basalen und suprabasalen Zellen sowie eine spätere Akkumulation der Proteine in den oberen Schichten, entfernt von möglichen infiltrierenden Immunzellen, dazu bei, einer das Virus betreffenden Immunantwort zu entgehen (Frazer, 2009). Mit der Expression der *early* Gene startet deren Einfluss auf Signalwege der antiviralen Immunantwort. Wichtiger Punkt hierbei ist der Interferonsignalweg, in den E6 und E7 an verschiedenen Stellen eingreifen. E6 bindet und blockiert IRF-3, währenddessen E7 an IRF-1 bindet (Stanley, 2009). E6 blockiert ebenfalls Proteinkinase R und Tyk-2, beide Signalproteine sind Aktivatoren von Stat-1, das seinerseits der Transaktivator vieler interferoninduzierter Gene ist (Chang and Laimins, 2000; Nees et al., 2001). Beide Virusproteine inhibieren auch die Expression eines *Toll like* Rezeptors (TLR9), der wichtig ist für die Detektion doppelsträngiger DNA (Ghittoni et al., 2010). Durch HPV infizierte Keratinozyten zeigen eine deutlich reduzierte Expression verschiedener proinflammatorischer Cytokine, wie IL-1, IL-6, TNF- α und TGF- β (Arany and Tyring, 1996). Die lokale Immunsuppression wird darüber hinaus durch verstärkte Bildung des

antiinflammatorischen Cytokins IL-10 intensiviert (Mota et al., 1999). E5 ist an diesen Vorgängen verstärkend beteiligt und erhöht die Expression von Gangliosiden, die die Funktion zytotoxischer T-Zellen lokal inhibieren (Suprynowicz et al., 2008). Darüber hinaus verringert E5 die Oberflächenpräsenz von MHC-I-Molekülen an Epithelzellen und unterbindet damit eine effiziente Präsentation viraler Antigene (Ashrafi et al., 2006; Gruener et al., 2007).

Eine Reihe von Kofaktoren erhöht das Risiko an einem zervikalen Karzinom zu erkranken. Dies sind Rauchen und Passivrauchen, genitale Koinfektionen mit anderen sexuell übertragbaren Erregern wie Herpes-simplex-Viren oder Chlamydien, eine hohe Geburtenzahl sowie ein stark geschwächtes Immunsystem. Auch die Einnahme oraler Kontrazeptiva ist mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko assoziiert (Husmann and Robert-Koch-Institut, 2010).

1.7 Die viralen Proteine E7, E6, E5 und ihre onkogenen Eigenschaften

1.7.1 E7

Das E7 Protein ist ein kleines saures Polypeptid einer Größe von ca. 100 Aminosäuren. Es besitzt Sequenzhomologien in spezifischen Bereichen zum E1A-Protein von Adenoviren und zum *large tumor antigen* (TAg) des Simian-Virus 40 (SV40). Diese homologen Regionen sind verantwortlich für einen Großteil der transformierenden Eigenschaften dieser Proteine (Phelps et al., 1989; Storey et al., 1990; Vousden and Jat, 1989).

Die dreidimensionale Struktur des Proteins konnte durch NMR und Röntgenkristallographie aufgeklärt werden und zeigt einen ungefalteten N-Terminus, während der C-Terminus durch die beiden Zinkfinger motive (Cys-X-X-Cys) besonders dicht gepackt auftritt (Liu et al., 2006; Ohlenschlager et al., 2006). Diese Region dient einer möglichen Dimerisation, für die bisher aber weder ein Nachweis erbracht werden konnte, noch eine notwendige biologische Funktion zugeordnet werden konnte (Clemens et al., 1995; McIntyre et al., 1993). Der N-Terminus enthält die beiden konservierten Homologiedomänen CR1 und CR2. Ein LXCXE-Motiv bildet die pRb-Bindestelle innerhalb von CR2, dem sich eine Caseinkinase II-Phosphorylierungsstelle anschließt (Barbosa et al., 1990; Munger et al., 1989b).

E7 ist hauptsächlich nukleär lokalisiert (Nguyen et al., 2007; Ressler et al., 2007), konnte aber ebenso in zytoplasmatischen Regionen nachgewiesen werden (Smith-McCune et al., 1999). Der Kernimport verläuft über einen aktiven Importsignal-unabhängigen Ran-involvierenden Weg (Angeline et al., 2003). Für den Export verfügt E7 über eine spezifische

Zielsequenz und kann somit zwischen den Kompartimenten hin- und herwechseln (Knapp et al., 2009). Die Halbwertszeit von E7 beträgt weniger als 2 Stunden (Smotkin and Wettstein, 1987). Der Abbau erfolgt über den ubiquitinabhängigen Proteasomweg (Oh et al., 2004a; Reinstein et al., 2000).

E7 besitzt keine eigenen intrinsischen Enzymaktivitäten. Es erhält seine biologische Aktivität nur in der Interaktion mit zellulären Regulatorkomplexen, in dem es deren Funktionen verstärkt oder unterdrückt (McLaughlin-Drubin and Münger, 2009). E7 erfüllt mehrere Funktionen während des viralen Lebenszyklus, wobei sie trotz hoher Homologie virustyp-spezifisch qualitative Unterschiede aufweisen. Während bei HPV11 und 31 die Hauptfunktion der Erhalt der viralen Kopienzahl ist (Oh et al., 2004b; Thomas et al., 1999), so liegt sie für HPV16 und 18 innerhalb der produktiven Phase des Lebenszyklus (Flores et al., 2000; McLaughlin-Drubin et al., 2005). Unabhängig von diesen lebenszyklusspezifischen Funktionen ist allen Typen gleich, dass E7 eine DNA Synthese in suprabasalen, differenzierten Zellen ermöglicht. Dabei ist die Bindung an das Pocketprotein pRb und andere Proteine der Familie ausschlaggebend (Collins et al., 2005). Eine Bindung an und die Degradation der pRb-Proteine ist notwendig für den Eingriff in das Differenzierungsprogramm der Wirtszelle und bildet damit die Basis der onkogenen Charakteristik von E7. Die Bindung von pRb und der nahen verwandten Pocketproteine p107 und p130 erfolgt, wie oben erwähnt, in der N-terminalen CR2-Region. Dabei bindet E7, wie auch SV40-Tag, vorzugsweise an E2F-gebundenes pRb, das spezifisch in der G1-Phase vorliegt (Dyson et al., 1992). Diese Interaktion, an der auch C-terminale Sequenzen von E7 beteiligt sind, führt zur Destabilisierung des E2F/pRb-Komplexes und zur Degradation von pRb über die Interaktion mit dem Cullin-2-Ubiquitinligase-Komplex (Huh et al., 2007; Jones et al., 1997a; Jones et al., 1997b). Der Unterschied in der Fähigkeit zur Transformation von *low-risk* und *high-risk* HPV-Typen scheint dabei, in der Bindungsaffinität zu pRb/E2F-Komplexen zu liegen. Ein Aminosäureaustausch von Asp zu Gly bewirkt eine zehnfach reduzierte Dissoziationskonstante (Heck et al., 1992). Diese Interaktion bewirkt, wie erwähnt, die Freisetzung von E2F und die Transaktivierung entscheidender Gene des G1/S-Übergangs. Weitere Interaktionen mit E2F1 (Transkriptionsaktivator) und E2F6 (Transkriptionsrepressor) stabilisieren diesen S-phasenkompetenten Zustand infizierter Zellen (Hwang et al., 2002; McLaughlin-Drubin et al., 2008). Eine Deregelation von E2F6 könnte mit dafür verantwortlich sein, infizierte Zellen im terminalen Differenzierungsprozess aus G0 zurück in G1 zu schleusen (McLaughlin-Drubin and Münger, 2009). Diese Vorgänge sind offensichtlich entscheidend für die onkogene Funktion von E7.

Jedoch greift es auch in viele andere Prozesse der Proliferations- und Differenzierungskontrolle ein. Dies soll im Folgenden kurz dargestellt werden. Das Virusprotein E7 bindet die Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitoren p21^{CIP1} und p27^{KIP1} und unterbindet damit deren inhibierenden Eigenschaften nach ausbleibender Stimulation durch Wachstumsfaktoren, Aktivierung von p53 oder dem Verlust der Zelladhäsion der Wirtszelle (Funk et al., 1997; Zerfass-Thome et al., 1996). Ebenso kann E7 die Aktivität von Cdk2 durch eine direkte Cdk2/Cyclin A- bzw. Cyclin E-Interaktion erhöhen (Nguyen et al., 2008; Nguyen and Munger, 2008; Tommasino et al., 1993). E7 kann auch in differenzierten Zellen über die Komplexierung mit Histondeacetylasen und Histonacetyltransferasen (p300, pCAF, SRC1) und den daraus resultierenden Chromatinumwandlungen eine S-Phasenprogression vorantreiben (Baldwin et al., 2006; Longworth and Laimins, 2004).

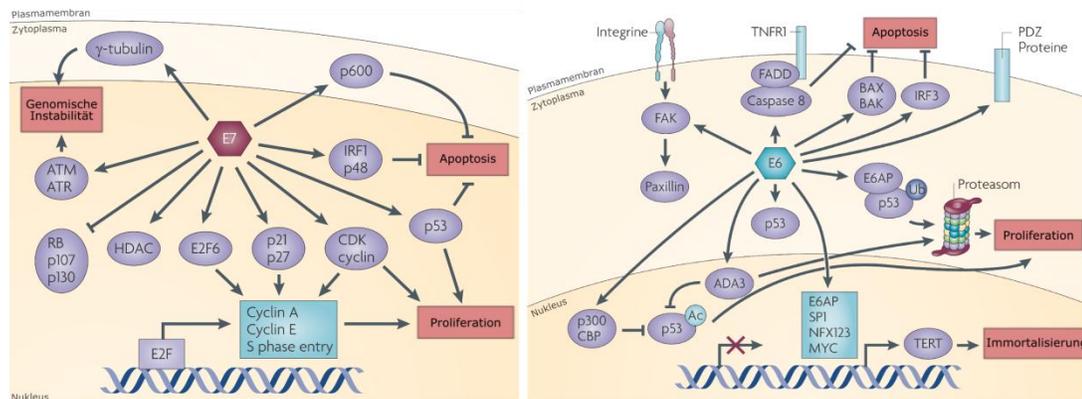


Abbildung 1.5: Intrazelluläre Interaktionspartner von E6 und E7 in der Vermittlung ihrer onkogenen Eigenschaften

Schematisch dargestellt das Netzwerk von Interaktionspartner von E7 (linke Seite) und E6 (rechte Seite) über diese hauptsächlich die onkogene Wirkung einer HPV-Infektion vermittelt wird. Dabei wird speziell die Apoptose unterbunden, die Proliferation unabhängig von externen Stimuli aktiviert, genomische Instabilität induziert und eine Immortalisierung über hTERT ermöglicht (modifiziert nach Moody and Laimins, 2010).

Besonders interessant - auch im Hinblick auf die Funktionen von E6 - ist die Stabilisierung und erhöhte Expression von p53 in E7-exprimierenden Zellen (Demers et al., 1994b; Jones and Munger, 1997; Jones et al., 1997b). Aus ihr geht jedoch keine erhöhte transkriptionelle Aktivität von p53 hervor (Jones et al., 1999). Außerdem scheint E7 mit Signalwegen zu interferieren, die durch DNA-Schädigung aktiviert werden (Demers et al., 1994a; Hickman et al., 1994). Eine Interaktion von E7 mit dem pRb-assoziierten Faktor p600 führt zu einer Deregulation von Anoikis und schützt abgelöste Zellen vor dem programmierten Zelltod (Apoptosis), was einen entscheidenden Vorgang in der viralen Transformation darstellt (DeMasi et al., 2007; DeMasi et al., 2005). E7 exprimierende epitheliale Zellen erlangen zudem eine Resistenz gegenüber den beiden Cytokinen Transformierender Wachstumsfaktor β (TGF- β) und Tumornekrosistfaktor α (TNF- α), welche eine wichtige Rolle in der

Wachstumskontrolle des Gewebes spielen (De Geest et al., 1994; Villa et al., 1992). Ebenso entscheidend in der malignen Transformation der infizierten Zelle ist die E7-induzierte chromosomale Instabilität durch die Entstehung multinumerer Centrosomen (Duensing and Duensing, 2008; Duensing and Munger, 2003a, b).

1.7.2 E6

Das zweite sehr gut charakterisierte virale Onkoprotein ist das kleine, basische E6 Protein. Es besteht im Falle von HPV16 aus 151 Aminosäuren. Ein Zinkfingermotiv jeweils am N- und C-Terminus beinhaltet zwei hochkonservierte Cys-X-X-Cys-Motive. Außerhalb dieser Bereiche sind die E6-Proteine der einzelnen HPV-Typen sehr sequenzheterogen (Bravo et al., 2010). Ein besonderes Merkmal der *high-risk* Typen ist ein vier Aminosäure (ETQL) umfassendes PDZ-Bindemotiv am C-Terminus, auf das später noch eingegangen werden soll.

E6 kooperiert mit E7 und dessen proliferationsstimulierenden Eigenschaften hauptsächlich in der Art, dass es einer p53-abhängigen Apoptoseinduktion entgegenwirkt. Dies wird durch die Komplexierung mit der Ubiquitinligase E6-AP ermöglicht, wodurch p53 einer ubiquitinvermittelten Degradation über das Proteasom zugeführt wird (Scheffner et al., 1993; Scheffner et al., 1990). Besonders interessant hierbei ist, dass diese Fähigkeit nur Hochrisiko-Typen besitzen, während die Niedrigrisiko-Typen zwar p53 binden, aber keinem Abbau zuführen (Hiller et al., 2006). Auch konnte gezeigt werden, dass durch eine Inhibierung von E6 in HPV-positiven Zellen dann Apoptose wieder initiiert ist (Butz et al., 2000). Die herausragende Rolle von p53 in der Ausbildung menschlicher Tumore (Hanahan and Weinberg, 2000) zeigt sich somit auch eindrücklich im Verlauf der HPV-induzierten zervikalen Karzinogenese. Jedoch ist die Präsenz von E6 allein nicht ausreichend, um Zellen zu immortalisieren. Vielmehr verstärkt es den Einfluss von E7 (Hawley-Nelson et al., 1989; Munger et al., 1989a). Mit dem Ausfall der zentralen Kontrollfunktion von p53 über die Genomintegrität häufen HPV-infizierte Zellen im Laufe einer persistierenden Infektion chromosomale Aberrationen an, die letztendlich bis zur malignen Entartung führen können (Thomas and Laimins, 1998).

Für E6 konnte eine Interaktion mit den Transkriptionskoaktivatoren CBP und p300 nachgewiesen werden, die unabhängig von einer Bindung an p53 die Expression p53-regulierter Gene reduziert (Patel et al., 1999). Ebenfalls p53-unabhängig erscheint der inhibierende Einfluss auf Apoptosesignalwege via Bak, das - analog zu p53 - auch einer Degradation zugeführt wird (Thomas and Banks, 1998). Antiapoptotisch wirkt sich ebenso eine stimulierte Expression der Inhibitoren c-IAP2 und Survivin via NF- κ B aus (Borbely et al.,

2006; James et al., 2006). Die Fähigkeit von E6 zur Transformation infizierter Wirtszellen wird außerdem über das bereits erwähnte PDZ-Bindemotiv vermittelt. Hierüber steuert E6 eine Degradation von Mitgliedern der Familie membranassoziierter Guanylatkinasen. Dies führt zu einem Verlust des Zell-Zell-Kontaktes und der Zellpolarität. Deletionen des PDZ-Motivs führen zu einer starken Reduktion der transformierenden Eigenschaften sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Nguyen et al., 2003; Watson et al., 2003). Unterstützt wird dieser Befund durch den Umstand, dass *low-risk* Typen (mit bekanntermaßen eingeschränkter Fähigkeit zur Transformation von Wirtszellen) nicht über ein solches Motiv verfügen. E6 aktiviert außerdem die Transkription der humanen Telomerase (hTERT) und erhält somit die Kontrolle über die Länge der Telomere und damit die Lebenspanne von Keratinozyten (Klingelhutz et al., 1996).

1.7.3 E5

Im Vergleich zu E7 und E6 ist der Wissensstand bezüglich der Funktionen und Eigenschaften von E5 geringer. Das schon umfänglich studierte E5 Protein ist jenes von HPV16, ein kleines, 83 Aminosäure umfassendes Peptid (Bubb et al., 1988), welches im Golgi-Apparat, in der perinuklearen Membran und im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert erscheint (Conrad et al., 1993; Leechanachai et al., 1992; Oetke et al., 2000). Auffälligstes Merkmal des Proteins, besonders von E5 der *high-risk* Typen, ist die starke Hydrophobizität in drei Clustern. Diese Proteinanteile besitzen jeweils eine alphahelikale Struktur und damit die Transmembranelemente für eine Lokalisation in den eben aufgeführten Kompartimentmembranen (Alonso and Reed, 2002). Ebenso wie die Proteine E6 und E7 besitzt auch E5 keine intrinsische Enzymaktivität und vermittelt seine Funktionen ausschließlich über die Interaktion mit intrazellulären Proteinen und Proteinkomplexen (Bravo and Alonso, 2004).

Erste Hinweise auf eine mögliche onkogene Eigenschaft ergaben sich aus Studien mit E5 des *Bovine Papillomavirus* (BPV). Dieses Molekül stellt eines der kleinsten bekannten, unabhängig translatierten Proteine dar und ist das kleinste bekannte Onkoprotein (Übersicht in Talbert-Slagle and DiMaio, 2009). Lange umstritten, ob E5 der Humanen Papillomaviren auch den Status eines Onkoproteins erfüllt, lassen die Studien der letzten Jahre den Schluss zu, dass E5 eine gleichwertige, wenn nicht sogar eine höhere Bedeutung als E6 in der zervikalen Karzinogenese zukommt (Maufort et al., 2010). Woraus ergibt sich dieser Bedeutungswandel in der onkogenen Einstufung? Schon früh konnte gezeigt werden, dass E5 fähig ist, Mausfibroblasten und Keratinozyten in Zellkulturmodellen zu transformieren sowie der Immortalisierung dieser Zellen durch HPV16 E6 und E7 zuzuarbeiten (Bouvard et al., 1994; Stoppler et al., 1996; Straight et al., 1993). Eine Vielzahl von Mechanismen ist in diese E5-

vermittelten Prozesse involviert. Zentrales Target ist hierfür die Modulation des EGFR-Signalweges. *In vivo* Studien transgener Mäuse zeigten die Wichtigkeit eines intakten EGFR in E5-induzierten Hyperplasien und spontanen Hauttumoren (Williams et al., 2005). E5 bindet die 16 kDa Untereinheit der vakuolären ATPase und inhibiert damit die Azidifizierung der Endosomen. Dies wirkt einer Degradation internalisierter EGFR-Rezeptoren entgegen und führt zu einem erhöhten Recycling dieser transmembranalen Proteine in die Zellmembran (DiMaio and Mattoon, 2001; Straight et al., 1995). Neben diesem Effekt auf die Anzahl aktiver Rezeptoren an der Zelloberfläche kann E5 direkt die Tätigkeit des Signalweges entscheidend prägen und somit die Aktivität von EGFR, MAPK p38 und ERK1/2 in EGF-abhängiger und -unabhängiger Weise erhöhen (Crusius et al., 1998; Crusius et al., 2000; Pim et al., 1992). Die Aktivierung findet über zwei unterschiedliche Wege statt, zum einen über einen Proteinkinase-C-abhängigen und zum anderen über einen Rezeptortyrosinkinase-involvierten Weg (Crusius et al., 1997; Gu and Matlashewski, 1995). Dadurch entsteht eine erhöhte Transkription von *immediate early genes* wie *c-fos* und *c-jun*, die dann die Expression von Genen der Zellzyklusprogression regulieren (Chen et al., 1996). Auch hat E5 Einfluss auf das Signalling via G-Protein-gekoppelter Rezeptoren wie dem Endothelinrezeptor (ET_A) (Venuti et al., 1998). Die Beeinflussung der zentralen Signalwege über die EGFR-angeschlossenen Mediatoren hat weitreichende Folgen in der Biologie der infizierten Zellen. So erscheint Cyclooxygenase-2 (COX-2) überexprimiert in CIN-Läsionen und Zervixkarzinomen und steht für Radio- und Chemiotherapieresistenz und damit als schlechter Prognosemarker für den Patienten (Ferrandina et al., 2002). Bekanntermaßen unterliegt COX-2 auch einer Regulation durch E6 und E7 (Subbaramaiah and Dannenberg, 2007). E5 ist ebenfalls in der Lage, über EGFR zu NF- κ B und AP-1 eine erhöhte COX-2 Expression zu initiieren (Kim et al., 2009). Die erhöhten COX-2 Aktivitäten führen zu einem erhöhten Prostaglandin-E₂-Level, einem Gewebshormon und wichtigem Vermittler von Inflammationssignalwegen, die ebenfalls in Zellproliferation, Invasion und Angiogenese involviert sind (Greenhough et al., 2009). Letzteres geschieht über eine transkriptionelle Aktivierung der VEGF Expression via ERK1/2 und über den PI3K-Akt-Weg (Kim et al., 2006).

Zwei weitere von den soeben beschriebenen Vorgängen unabhängige Funktionen tragen zum onkogenen Gesamtpotential von E5 bei: ein positiver Effekt auf die G1/S-Transition und die Inhibierung von Apoptose. Der Einfluß auf den Zellzyklus geschieht, ähnlich wie bei E7, durch die Reduktion der Tumorsuppressoren p21 und p27. Die Verringerung von p21 ist dabei auf Transkriptionsebene und die von p27 durch die Reduktion seiner Halbwertszeit auf Proteinebene reguliert (Pedroza-Saavedra et al., 2010; Tsao et al., 1996). Die Unterdrückung

extrinsischer Apoptoseinduktion erfolgt durch die Modulation der Fas-Expression und DISC-Formation via TRAIL (Kabsch and Alonso, 2002).

1.8 Experimentelle Modellsysteme zur Untersuchung der HPV Biologie

Die Untersuchung der HPV Biologie unter *in vitro* Bedingungen gestaltet sich in vielerlei Hinsicht schwierig und stellt damit besondere Anforderungen an die Etablierung von experimentellen Modellsystemen. Dies ist den spezifischen Anforderungen geschuldet, die Papillomaviren an ihre Wirtszellen stellen. So repliziert das Virus ausschließlich in Keratinozyten und dies hauptsächlich in solchen in undifferenziertem Status. Demgegenüber ist der virale Lebenszyklus strikt an das Differenzierungsprogramm der Keratinozyten gebunden, um die virale Genexpression unter der Kontrolle der viralen Promotoren zu vollziehen. Da Modellsysteme, die diese eben beschriebenen Anforderungen erfüllen, einen sehr hohen labortechnischen Aufwand bedingen, stammt der Großteil der uns heute zur Verfügung stehenden biologischen Daten aus experimentellen Ansätzen unzulänglicher Vereinfachung. Die wesentlichen Bedingungen der natürlichen HPV-Infektion werden unzureichend widerspiegelt. Zumeist wurde der Fokus auf die Untersuchung der beiden Hauptonkogene E6 und E7 gelegt, die isoliert oder in Kombination, unter der Kontrolle heterologer Promotoren in Zellen überexprimiert wurden. Dabei wurden derartige Arbeiten hauptsächlich in Zellkulturmodellen durchgeführt, die die Prozesse der Differenzierung in Zusammenhang mit der viralen Genexpression außer Acht lassen.

Der folgende Abschnitt soll nun kurz umreißen, welche Modelle bisher Eingang in die Erforschung der Papillomavirusinfektion unter naturnahen Bedingungen gefunden haben. Hierzu gehören vorrangig natürliche Tiermodelle. Sie demonstrieren hauptsächlich die Beteiligung der Papillomaviren im Zusammenspiel mit genetischen und umweltbedingten Kofaktoren bei der Tumorentstehung (Übersicht in Campo, 2002). Vertiefte Einblicke in diese komplexen Vorgänge wurden durch Untersuchungen der bovinen Papillomaviren (BPV) erreicht. Ähnlich der HPV induzieren BPV unterschiedlicher Typen sowohl Warzen als auch Neoplasien in verschiedenen Organen: BPV4 im Gastrointestinaltrakt, BPV1, 5 und 6 am Euter bzw. Penis, BPV1 und 2 der Harnblase von Rindern (Campo, 1997). Interessant ist hierbei die Korrelierbarkeit einer infektionsbedingten Tumorinduktion in Kombination mit Nahrungszusammensetzung und Immunsuppression, mit einer guten Übertragbarkeit der Erkenntnisse auf die Rolle von HPV-Infektion und Genese des Speiseröhrenkarzinoms (de Villiers et al., 1999). Das Modell der Infektion mit *Cotton tail rabbit* Papillomaviren (CRPV) des Baumwollschwanzkaninchens (*Sylvilagus*) gilt für das Austesten antiviraler, immu-

potenzierender und immuntherapeutischer Strategien für Papillomavirusinfektionen und die Untersuchung der Entwicklung von Hauttumoren als besonders gut geeignet (Christensen, 2005).

Zellkulturmodelle zur Untersuchung von HPV-Infektionen und deren onkogene Folgen unter naturnahen Bedingungen sind bisher selten geblieben. Da auch die Einschleusung von HPV-DNA sowohl mittels adenoviraler Infektion oder Transfektion sich auf Grund geringer Effizienz und Selektierbarkeit in Keratinozyten schwierig gestaltet, basierten erste *in vivo*-ähnliche Modelle auf Zellen, welche von HPV-positiven Neoplasien isoliert wurden. Dabei handelte es sich um Zellen mit episomalen Kopien von HPV6, HPV11, HPV31b, HPV18 und HPV16. Ein weiterer Fortschritt wurde dadurch erreicht, diese Zellen als Xenograftmodelle auf Nacktmäusen zu etablieren. Hierdurch war es möglich, das differenzierungsabhängige Transkriptom mit dem der Monolayerkultur zu vergleichen. Ebenfalls gelang es hierbei, den Lebenszyklus bis hin zur Expression der Strukturproteine L1 und L2 abzubilden (Howett et al., 1997; Stanley et al., 1989; Sterling et al., 1990).

Seit Anfang der 1980er Jahre ist es möglich, menschliche Haut *in vitro* als organotypische Raftkultur zu züchten und damit die Differenzierung von Keratinozyten abzubilden (Asselineau and Prunieras, 1984; Bell et al., 1983). Diese Entwicklung floss in die HPV-Forschung ein und ermöglichte auch erstmals die Produktion von Virionen des Typs 11 und 31b *in vitro* (Dollard et al., 1992; Meyers et al., 1992). Dabei wurden, wie bei den Xenograftmodellen, explantierte HPV-tragende Plattenepithelkarzinomzellen verwendet (Rader et al., 1990). Aber immer häufiger kamen auch mit HPV16 und HPV18 immortalisierte, primäre Keratinozyten (Durst et al., 1987; Pirisi et al., 1988) im Raftsystem zum Einsatz. Mit diesen Zellkultursystemen konnte eine neoplastische Charakteristik von Vorstufen und Karzinomen *in vitro* abgebildet werden (Blanton et al., 1991; Hurlin et al., 1991; McCance et al., 1988). Die Gruppe von Laimonis Laimins präparierte erstmals Raftkulturen aus transfizierten, primären Keratinozyten. Hierzu verwendeten sie das rezirkularisierte Genom von HPV31b in Kombination mit einem resistenztragenden Plasmiden. Im Vergleich mit Kulturen aus der etablierten Zelllinie CIN612, welche HPV31b episomal trägt, zeigten sich sowohl morphologische Unterschiede als auch Differenzen bezüglich der Expression der Kapsidproteine (Frattini et al., 1996). Da die von Frattini et al. (1996) verwendete Lipofektion eine eher ineffiziente Methode zu Einschleusung von Fremd-DNA in Keratinozyten darstellt, wurden verschiedene Konstrukte amphotrophischer retroviraler Vektoren entwickelt (Blanton et al., 1992; Cheng et al., 1995; Woodworth et al., 1992). Dieser Zugang erwies sich als deutlich

effizienter in der erreichten Transduktionsrate, blieb mit Inserts von max. 5 kb aber auf partielle Humanpapillomasequenzen beschränkt. Eine Annäherung an die natürlichen viralen Gegebenheiten wurde durch Konstrukte der E6 und E7 ORF unter Einfluss der eigenen Kontroll- und Promotorregionen erreicht (Cheng et al., 1995). Damit konnten erstmals die differenzierungsabhängigen Funktionen von HPV, insbesondere deren Onkoproteine E6 und E7, nachgewiesen und so die Daten aus Monolayerexperimenten bestätigt werden.

Trotz der beschriebenen Bemühungen *in vitro* ein naturnahes Umfeld der HPV-Infektion abzubilden, ist die generierte Erkenntnismenge daraus verschwindend im Vergleich zu den stark vereinfachten Systemen, die zu Beginn dieses Abschnittes erwähnt wurden. Die Modelle mit karzinomexplantierten, HPV-tragenden Zelllinien besitzen den Nachteil, dass diese Zellen einen vorgeschalteten, bereits abgelaufenen selektiven Immortalisierungsprozess durchlaufen haben. Es ist also nur möglich, das Ergebnis der HPV-Funktion zu untersuchen und nicht die Wirkmechanismen, die hinter ihnen stehen. Ebenso erlaubt ihre Verwendung keine Manipulation der HPV-Genome, da die Zellen bereits das HPV-Genom tragen. Bisher wurde keines der beschriebenen *in vitro* Modelle dazu genutzt, eine dezitierte Beschreibung der Funktionen eines der viralen Proteine bei gleichzeitiger Anwesenheit der anderen viralen Proteine zu erbringen. Dies könnte tiefere Einblicke in die kooperativen Wirkmechanismen der HPV-Proteine sowohl bezüglich des viralen Lebenszyklus als auch bei der Induktion neoplastischer Veränderungen ermöglichen.

1.9 Zielsetzung

Weltweit können derzeit ca. 20% aller Tumorfälle einem Infektionserreger zugeordnet werden, der für die Neoplasie ursächlich ist bzw. eine permissive Rolle bei ihrer Entstehung spielt (Bouvard et al., 2009; Zur Hausen and Fox, 2006). Innerhalb der bisher identifizierten Erreger sind die *high-risk* HPV-Typen mit ca. 30% eine bedeutsame Gruppe (Sarid and Gao, 2010). Auch wenn die Einführung der beiden Vakzine Gardasil® und Cervarix™ gegen die häufigsten zervixkarzinom-assoziierten HPV-Typen 16 und 18 vor Infektion und Ausbildung von genitalen Warzen und CIN-Läsionen schützen (Übersicht in Stanley, 2007), ist innerhalb der nächsten 20 Jahre nicht mit einer deutlichen Verringerung der Inzidenz zervikaler Karzinome zu rechnen (Nieto et al., 2010). Daneben zeigen epidemiologische Studien eine Beteiligung verschiedener anderer HPV-Typen bei der Entstehung von z.B. Hauttumoren und Tumoren des Kopf- und Halsbereiches (Akgul et al., 2006; Psyrri and DiMaio, 2008). Daher ist es weiterhin bedeutsam, die Biologie einer HPV-Infektion sowie die Wirkmechanismen der viralen Proteine zu untersuchen, um damit auch Therapieansätze für bestehende Infektionen und Tumorbehandlungen ableiten zu können.

Der bislang deutlich überwiegende Teil an Erkenntnissen, speziell bezüglich E6 und E7, stammt aus Experimentensystemen, in denen die Proteine unter Kontrolle eines heterologen Promotors in einer Zelllinie überexprimiert werden. Derartige Modelle korrespondieren allerdings nur marginal mit einer natürlichen HPV-Infektion und reflektieren dabei lediglich die späten Phasen der neoplastischen Veränderung nach HPV-Integration ins Wirtsgenom.

Für die Etablierung eines den natürlichen Bedingungen einer HPV-Infektion angenäherten *in vitro* Modelles war es daher Ziel dieser Arbeit, die onkogenen Eigenschaften von HPV16 E7, E6 und E5 bei einer Expression unter Kontrolle der viralen Promotoren und im Kontext des als komplett vorliegenden Genoms, d.h. ohne artifizielle Überexpression, zu untersuchen. Hierzu sollten HPV16-Genome als Stoppmutanten dieser 3 Gene, sowie eine Doppelmutante für E6 und E7 hergestellt werden. Weiterführend war es Ziel, die so veränderten Genome mittels *in vitro* produzierter HPV16-Virionen in Targetzellen einzuschleusen. Um die differenzierungsabhängige Aktivität der viralen Promotoren als entscheidendes Merkmal der natürlichen HPV-Infektion und der daraus resultierenden Expression der Virusproteine zu ermöglichen, sollten die HPV16-tragenden Zellen in organotypischer Raftkultur als epidermale Äquivalente realisiert und nachfolgend analysiert werden.

2 MATERIAL und METHODEN

Das folgende Kapitel orientiert sich in seiner Abfolge am Verlauf des Projektes. Um eine bessere Übersicht und einen anschaulicheren Vollzug der in dieser Arbeit etablierten Methoden zu ermöglichen, werden vorangestellt die allgemein verwendeten Materialien und Methoden aufgeführt. Nachfolgend werden die *in vitro* Virionen-Produktion sowie die Herstellung der Raft-Kulturen aus HPV16-Genom-tragenden NIKS und HaCaT-Zellen im Detail entsprechend des zeitlichen Verlaufs der Arbeiten im Labor beschrieben.

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Die Versuche der vorliegenden Arbeit, welche im Folgenden beschrieben werden, wurden in einem molekularbiologischen Labor der Sicherheitsstufe 2 mit einer dafür üblicher Ausstattung durchgeführt. Geräte und Chemikalien, die zur Grundausrüstung eines Labors gehören, werden deshalb nicht im Einzelnen aufgeführt. Die benutzten Chemikalien wurden im Reinheitsgrad p.A. von den aufgeführten Firmen AppliChem (Darmstadt), Fluka (Buchs, Schweiz), Gerbu (Gaiberg), Gibco (Karlsruhe), Invitrogen (Carlsbad, USA), J.T. Baker (Deventer, Niederlande), Merck (Darmstadt), PAA (Pasching, Österreich), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Steinheim), Thermo Scientific (Rockford, USA) und VWR (Briare, Frankreich) bezogen und Lösungen, soweit nicht anders beschrieben, mit ddH₂O angesetzt. Bei Verwendung von speziellen Geräten und Chemikalien, deren Verwendung das Versuchergebnis beeinflussen kann, wird auf Hersteller bzw. Bezugsquelle hingewiesen.

2.1.2 Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Abbe-Refraktometer		Carl Zeiss AG, Oberkochen
Agarosegelkammer		AGS, Heidelberg
Analysewaage	Kern EW 620	Kern & Sohn, Balingen
Bakterienschüttler	TR 125	Infors, Bottmingen (Schweiz)
Brutschrank		Labotect, Göttingen
Elektroporationsgerät	Gene Pulser II	BioRad, München
Elektrophorese-Netzgerät	PowerPac 1000	BioRad, München
Entwicklungsmaschine	AGFA Classic E.O.S.	AGFA, Köln
	AGFA Curix 60	AGFA, Belgien
Feinstwaage	AB104-S/PH	Mettler Toledo, (Schweiz)
Halbtrocken-Elektroblotter		Cti GmbH, Idstein
	Transblot SD	BioRad, München
Heizblock	Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Hybridisierungssofen	PerfectBlot	PeqLab, Erlangen
Kryomikrotom	Leica CM1950	Leica Mikrosystems, Wetzlar
Magnetrührer / Heizplatte	IKAMAG RET	IKA Labortechnik, Staufen
Mikro-Dismembrator U		B. Braun Biotech, Melsungen
Mikroskope	Leica DM LB2	Leica Mikrosystems, Wetzlar
	Leica Leitz DMR	Leica Mikrosystems, Wetzlar
	Leica TCS SP	Leica Mikrosystems, Wetzlar
	Zeiss LSM 710 ConfoCor 3	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikrotom	RM2235	Leica Mikrosystems, Wetzlar
PCR-Maschine	MJ Mini	BioRad, München
pH-Meter	PB-11	Sartorius AG, Göttingen
Schüttelplatte	Heidolph Duomax 1030	Heidolph, Schwabach
Spektrometer	Nanodrop ND-1000	Thermo Scientific, Wilmington (USA)
	Ultrospec 3100 pro	Amersham Biosciences, Freiburg
Sterilwerkbank	BSB 4A	Gelair Flow Laboratories, Opera (Italien)
Ultrazentrifugen	(UZ a) Beckmann XL 70	Beckmann,
	(UZ b) Sorvall Dicovery 90 SE	Thermo Electron Corporation
	(UZ c) Sorvall RC28S	Thermo Electron Corporation
	(UZ d) Sorvall RC5C	Thermo Electron Corporation
Ultrazentrifugen Rotoren	HB-6 (UZ c, UZ d)	Thermo Electron Corporation,
	SLA 3000 (UZ d)	Thermo Electron Corporation
	SW41Ti (UZ a, UZ b)	Beckmann,
	SW60Ti (UZ b)	Thermo Electron Corporation,
UV Crosslinker	UV Stratalinker 2400	Stratagene, La Jolla (USA)
Vortexer	Reax 1 DR	Heidolph, Schwabach
Wasserbad	Julabo PC	
Zählkammer	Neubauer	Migge, Heidelberg
Zentrifugen	(TZ a) Tischzentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
	(TZ b) Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
	(ZZ) Zellkulturzentrifuge 03400	Heraeus Christ, Osterode

2.1.3 Software

Software	Hersteller
Endnote X2.0	Thomson Reuters, USA
ImageJ 1.45 (WCIF-ImageJ collection)	Rasband, 1997-2004, NIH, Bethesda (USA)
Inkscape 0.48	OpenSource
Microsoft® Office Professional 2007	Microsoft® Corporation, USA
PerlPrimer	Marshall, 2004
SigmaStat 3.5	Systat Software GmbH, Erkrath
SimVector 4.6	PREMIER Biosoft, USA
ZEN 2009 LE	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
BioCoat™ Deep Well Platten (6er well)	BD Biosciences, USA
Chemilumineszenzfilm (Hyperfilm™ ECL)	GE Healthcare, UK
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Diagnostics, Mannheim
Deckgläser	VWR International, Darmstadt
Einfrierbox für Zellen	Nalgene®, USA
Elektroporationsküvetten	Invitrogen, Niederlande
Fluoprep™ Eindeckmedium	bioMérieux®, Nürtingen
Kryo-Röhrchen	Nalgene®, USA
MaXtract™ High Density Tubes (1,5 mL)	Qiagen, USA
Nylonmembran (GeneScreen Plus®)	DuPont®, USA
Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen
Objektträger SuperFrost® Plus	Menzel, Braunschweig
Parafilm	Pechiney, USA
Pasteurpipetten	WU, Mainz
Petrischalen	Greiner Bio-One, Österreich
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Diagnostics, Mannheim
Pipettenspitzen (gestopft)	Starlab GmbH, Ahrensburg
Pipettenspitzen Ultratip (1000 µL, 200 µL, 10 µL)	Greiner Bio-One, Österreich
Plastikpipetten (5 mL, 10 mL, 25 mL)	BD Labware, USA
Plastikröhrchen 15 mL	BD Labware, USA
Plastikröhrchen 50 mL	BD Labware, USA
PVDF-Membran Immobilon-P	Millipore, USA
Qiashredder Säulen	Qiagen, Hilden
Reaktionsgefäße (0,5 mL; 1,5 mL)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße Protein low bind (1,5 mL)	Eppendorf, Hamburg
Skalpelle	Feather Safety Razor, Japan
Spitzenfilter steril (0,2 µm Porengröße)	Greiner Bio-One, Österreich
Transwell® Permeable Inserts (Ø 24 mm)	Corning Inc., USA
Zellkulturflaschen (75 cm ² , 150 cm ²)	TPP®, Schweiz
Zellkulturschalen (Ø 10 cm, Ø 15 cm)	Sarstedt, USA
Zellkulturschalen 6er well	TPP®, Schweiz
Zellschaber	Corning Inc., USA
Zellschaber mit Gelenk	Sarstedt, USA

2.1.5 Kits

Kit	Hersteller
BCA™ Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Rockford (USA)
CalPhos Mammalian Transfection Kit	Clontech, Saint-Germain-en-Laye (Frankreich)
Dako EnVision™ + System-HRP (DAB)	Dako, Carpinteria (USA)
DC Protein Assay	BioRad, München
DNeasy® Tissue Kit	Qiagen, Hilden
Endofree Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
iScript One Step RT-PCR Kit	Bio-Rad, München
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QuikChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, La Jolla (USA)
Rediprime II DNA labeling Kit	GE Healthcare, München
RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden
SilverQuest Silver Staining Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Western Lightning® Plus-ECL	Perkin Elmer LAS, Rodgau-Jügesheim
Zuppy™ Plasmid Miniprep Kit	Zymo Research, Freiburg
Zymoclean Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research, Freiburg

2.1.6 Enzyme

Restriktionsenzyme und DNA-modifizierende Enzyme, sowie die dazugehörigen Puffer wurden bei MBI Fermentas (St. Leon-Rot) oder New England Biolabs (Frankfurt am Main) bezogen.

2.1.7 Plasmide

Name	Beschreibung	Quelle
E5_pBluKS	Subfragment von HPV16, kloniert über SpeI in pBlueskriptKS, Amp ^R , 6069 bp, für Mutagenese PCR	diese Arbeit
E6/E7_pBluKS	Subfragment von HPV16, beinhaltet die ORF von E6 und E7, kloniert über PstI in pBlueskriptKS, Amp ^R , 4737 bp, für Mutagenese PCR	diese Arbeit
HPV16_pBluescribe (Klon 114/2)	vollständiges HPV16 Genom über BamHI in pBlueskriptKS, Amp ^R , 10866 bp, zur bakteriellen Amplifikation	Prof. Dr. M. Dürst, FSU Jena
HPV16_pBluKS	vollständiges HPV16 Genom über BamHI in pBlueskriptKS, Amp ^R , 10866 bp, zur bakteriellen Amplifikation	diese Arbeit
loxp_HPVP16 ^{E5} _eGFP-N1	Vektor auf Basis von p/HPV16/eGFP-N1, Stopp-Mutante von E5, Kan ^R , Neo ^R , ~ 12,6 kb	diese Arbeit
loxp_HPVP16 ^{E6} _eGFP-N1	Stopp-Mutante von E6	diese Arbeit

Name	Beschreibung	Quelle
loxp_HPV16 ^{E7} -_eGFP-N1	Stopp-Mutante von E7	diese Arbeit
loxp_HPV16 ^{E6/E7} -_eGFP-N1	Stopp-Mutante von E6 und E7	diese Arbeit
myc-Cre	Expressionsplasmid Cre Rekombinase unter der Kontrolle des myc-Promotors	diese Arbeit
p16L1L2	Expressionsplasmid sowohl von L1 als auch L2, kodonoptimiert, Amp ^R , 10,8 kb	PD Dr. M. Müller, DKFZ Heidelberg
peGFP-N1	Expressionsplasmid von eGFP unter Kontrolle des CMV-Promotors, Kan ^R , Neo ^R , 4,7 kb	BD Biosciences, Heidelberg
p/HPV16/eGFP-N1	HPV16 flankiert von 2 loxp Erkennungssequenzen, kloniert in das Rückrat von peGFP-N1, Kan ^R , Neo ^R , ~ 12,6 kb	Prof. Dr. J. Lee, Iowa (USA)

2.1.8 Oligonukleotidprimer

PCR / RT-PCR / nested PCR	
Name	Sequenz 5' - 3'
HPV16 LCR fwd.	CTGCTTGCCAACCATTC
HPV16 LCR rev.	GTTGCTTGTAATGTGTAACCC
β-Globin fwd.	GTTGGCCAATCTACTCCCAG
β-Globin rev.	CAACTTCATCCACGTTCCACC
E1 [^] E4 fwd.	ATCCTGCAGCAGCAACGAAGTATC
E1 [^] E4 rev.	GTAAATGCAGTGAGGATTGGAGCA
E1 [^] E4 fwd. nested	CCTGAAATTAATTAGGCAGCACTTGG
E1 [^] E4 rev. nested	GTTTCCGGTGTCTGGCTCTGAT
β -Actin fwd.	AGCCATGTACGTTGCTATCC
β-Actin rev.	TTGCGTACAGGTCCTTTC
Ortspezifische Mutagenese	
Name	Sequenz 5' - 3'
E5stopp fwd.	GTCTATATGACA TAA CTTGATACTGCATCCACAACATTACTGGCGTGC *
E5stopp rev.	GCACGCCAGTAATGTTGTGGATGCAGTATCAAG TTA TGTCATATAGAC *
E6stopp fwd.	GCACAAAAG TGA ACTGCAATGTTTCAGGACCCAC *
E6stopp rev.	GTGGGTCCCTGAAACATTGCAGT TC ACTTTTGGTGC *
E7stopp fwd.	CGTAGAGAAAACCCAGCTGTAATCATGCAT TA AGATACACCTAC *
E7stopp rev.	GTAGGTGTATCT TA ATGCATGATTACAGCTGGGTTTCTCTACG *
Sequenzierung	
Name	Sequenz 5' - 3'
E5seq.	ATGATAGTGAATGGCAACG
E6E7seq.	TAAAACCTAAGGGCGTAAC

* fett markiert veränderte Kodon, größer hervorgehoben eingeführte Basensubstitution

2.1.9 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Hersteller
Dh5 α	fhuA2 Δ (argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ 80 Δ (lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17	Invitrogen, Karlsruhe
HB101 α	hsd20(rB-, mB-), recA13, rpsL20, leu, proA2	Invitrogen, Karlsruhe
JM109	endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (rk-, mk+), relA1, supE44, Δ (lac-proAB), [F' traD36, proAB, laqIqZ Δ M15]	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.10 Zelllinien

Name	Charakteristika	Quelle
293T	humane, epitheliale Nierenzelllinie, exprimiert das große T-Antigen von SV40	ATCC-LGC, UK
293TT	humane, epitheliale Nierenzelllinie, exprimiert 2 Kopien des großen T- Antigen von SV40	Freundlicherweise von PD. Dr. M. Müller (DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellt
Hela	zervikale Adenokarzinomzelllinie, HPV18 positiv	Freundlicherweise von Prof. Dr. Hoppe-Seyler (DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellt
HaCaT	spontan immortalisierte Zelllinie humaner Keratinozyten	Freundlicherweise von Prof. Dr. P. Boukamp (DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellt
NHEK	Primäre humane Keratinozyten von neonataler Vorhaut verschiedener Donoren	PromoCell, Heidelberg
NIH/3T3	embryonale Mausfibroblasten (Swiss albino)	Freundlicherweise von Prof. Dr. EM. deVilliers (DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellt
NIKS	spontan immortalisierte Zelllinie humaner Keratinozyten	Freundlicherweise von PD. Dr. I. Nindl (DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellt

2.1.11 Puffer und Lösungen

Immunhistochemie / Immunfluoreszenz	
Antikörperverdünnungspuffer (DAKO, Santa Cruz)	1 % (w/v) BSA 0,05 % (v/v) Tween 20 in PBS
Antikörperverdünnungspuffer (Cell Signaling)	1,5 % (v/v) Normales Ziegen Serum 0,3 % (v/v) Triton X-100 in PBS

Immunhistochemie / Immunfluoreszenz

Blockpuffer (Santa Cruz)	5 % (w/v) Normales Ziegen Serum 0,05 % (v/v) Tween 20 in PBS
Blockpuffer (Cell Signaling)	1 % (w/v) BSA 0,05 % (v/v) Tween 20 in PBS
PBS-T Waschpuffer	0.01 M PBS, 0.05 % Tween 20
TBS-T Waschpuffer	0,05 mol/L Tris-HCl, 0,3 mol/L NaCl, 0,1% Tween 20

Zellkultur

Adenine (18 mM)	121,0 mg Adenine gelöst in 50 mL 0,05 N HCl für 1 h steril filtriert, aliquotiert, gelagert bei -20°C
5-Bromo-2- Deoxyuridin (BrdU) Stock (1000x)	50 mg/mL in PBS Steril filtriert, aliquotiert, gelagert bei -20°C
Choleratoxin Stock (10 µM)	1,0 mg Choleratoxin gelöst in 1,2 mL ddH ₂ O gelagert bei 4°C
Choleratoxin (10 nM)	50,0 µl Choleratoxin Stock 50,0 mL HBES 0,1% BSA steril filtriert, aliquotiert, gelagert bei 4°C
Earles salts	128,0 g NaCl 8,0 g KCl 74,0 g NaHCO ₃ 2,5 g NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O 4,0 g MgSO ₄ · 6H ₂ O 2,0 mg FeNO ₃ · 9H ₂ O 0,1 g Phenolrot aufgefüllt auf 2 L mit ddH ₂ O, steril filtriert
EGF Stock (100 µg/mL)	1,0 mg EGF gelöst in 10 mL ddH ₂ O gelagert bei -20°C
EGF (1 µg/mL)	1,0 mL EGF Stock 99,0 mL HBES 0,1% BSA steril filtriert, aliquotiert, gelagert bei -20°C
FKS	hitzeinaktiviert bei 56°C für 30 min aliquotiert, gelagert bei -20°C

Zellkultur	
HBES	2,5 ml 1 M HEPES Puffer 10,0 ml Earles salts
Hydrocortisone Stock (5 mg/mL)	25,0 mg Hydrocortisone gelöst in 5,0 mL eiskaltem Ethanol (100%) gelagert bei -20°C
Hydrocortisone (40 µg/mL)	0,8 mL Hydrocortisone Stock 100,0 mL HBES 5% FKS steril filtriert, aliquotiert, gelagert bei -20°C
Kollagen I (Rattenschwanz)	4,0 mg/mL in 0,02 N Essigsäure
Neutralisierungspuffer	2,2 g NaHCO ₃ 4,8 g HEPES aufgefüllt auf 100 mL 50 mM NaOH, steril filtriert
PBS-EDTA	0,05% (w/v) EDTA in PBS autoklaviert

Southern Blot und radioaktive Hybridisierung	
Depurinierungspuffer	0,25 M HCl
Denaturierungspuffer	0,4 M NaOH 1,5 M NaCl
Neutralisierungspuffer	1,5 M NaCl 0,5 M Tris pH 7,5
20 x SSC, pH 7,0	3 M NaCl 0,3 M tri-Natriumcitrat·2H ₂ O
TNE	50mM Tris (pH 7.5) 140mM NaCl 5mM EDTA
Stopppuffer	2% TNE 0.1% BPB (w/v) 0.5% Blue Dextran (w/v)
Prähybridisierungspuffer	50 mM NaH ₂ P0 ₄ , pH 6.4 1% (w/v) SDS 1% Denhardt's solution 5% SSC 0.1 mg/ml tRNA
Hybridisierungspuffer	gleich Prähybridisierungspuffer
Waschpuffer	2x SSC 0.1% SDS (w/v)

Southern Blot und radioaktive Hybridisierung

50% Denhardt's solution	1% (w/v) Ficoll 400
	1% (w/v) Polyvinylpyrrolidone
	1% (w/v) BSA

2.1.12 Medien für die Kultur von Bakterien

Medium	Zusammensetzung
10 x TB-Phosphat	23,1 g KH_2PO_4 125,4 g K_2HPO_4 aufgefüllt auf 1 L mit ddH_2O
LB Medium	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl pH 7,0 aufgefüllt auf 1 L mit ddH_2O
LB Agar	LB Medium 1,5 % (w/v) Agar
TB Medium	12 g Trypton 24 g Hefeextrakt 4 ml Glycerol aufgefüllt auf 900 mL ddH_2O vor der Verwendung Zugabe von 100 mL 10 x TB-Phosphat
NZY+ Broth	10 g Casein Hydrolysat 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl pH 7,5 aufgefüllt auf 1 L mit ddH_2O vor der Verwendung Zugabe von 12,5 mL 1 M MgCl_2 12,5 mL 1 M MgSO_4 10,0 mL 2 M Glukose
Für die Selektion	Kanamycin 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicillin 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$

2.1.13 Medien für die Kultur eukaryotischer Zellen

Medium	Zusammensetzung	Zelllinien
10 x DMEM	DMEM 10-facher Konzentration	NIH3T3 beinhaltende Kollagenmatrix für organotypische Raftkultur von NIKS- und HaCaT-Zellen
DMEM	DMEM / 1 g/L Glc / 2 mM L-Gln 10% FCS 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung	HaCaT

Medium	Zusammensetzung	Zelllinien
DMEM +	DMEM / 4,5 g/L Glc / 2 mM L-Gln 10% FCS 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung	NIH3T3, 293T, 293TT, HaCaT
KGM 2	Keratinocyte Growth Medium 2 1x SupplementMix 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung	Primäre Keratinozyten, HaCaT
FAD	520 ml Ham's F-12 medium 200 ml DMEM 40 ml FCS 8 ml 0,8 µg/ml Hydrocortisone 8 ml 0,83 µg/ml Cholera toxin 8 ml 18 mM Adenine 8 ml 1 µg/ml EGF 400 µl 10 mg/ml Insulin 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung	NIKS, organotypische Raftkultur von NIKS, NHEK und HaCaT

2.1.14 Medien zur Kryopräservierung eukaryotischer Zellen

Zelllinie	Einfriermedium
HaCaT	DMEM + 20% FCS + 10% Glycerol
NIKS	FAD + 20% Glycerol
293T, 293TT, NIH3T3	DMEM + 5% DMSO
NHEK	Cryo-SFM (PromoCell, Heidelberg)

2.1.15 Primäre Antikörper

Antigen	Klon / Isotyp	Firma	Verdünnung (Anwendung *)
β-Actin (C4)	Maus, monoklonal	MP Biomedicals	1:15000 (WB)
BrdU (BU33)	Maus, monoklonal	Sigma-Aldrich	1:1000 (IF, IHC)
GFP	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling	1:1000 (WB)
Histon H3	Kaninchen polyclonal	Biozol, Eching	1:10000 (WB)
Involucrin (SY5)	Maus, monoklonal	Sigma-Aldrich	1:1000 (WB), 1:250 (IF)
p16 ^{INK4A} (G175-405)	Maus, monoklonal	BD Pharmingen	1:250 (WB), 1:25 (IF, IHC)
p53 (7F5)	Kaninchen, monoklonal	Cell Signaling	1:1000 (WB), 1:200 (IF)
pRb (4H1)	Maus, monoklonal	Cell Signaling	1:2000 (WB), 1:100 (IF)
L1	Maus, monoklonal	Freundlicherweise von PD. Dr. M. Müller	1:10 (IF), 1:2500 (WB)
L1	Maus, monoklonal	BD Pharmingen	1:10 – 1:50 (IHC)

Antigen	Klon / Isotyp	Firma	Verdünnung (Anwendung *)
Zytokeratin 14	Kaninchen, polyklonal	SIGMA	1:5000 (WB), 1:1000 (IF)

* ... WB: Western Blot, IF: Immunfluoreszenz, IHC: Immunhistochemie

2.1.16 Sekundäre Antikörper

Antigen (Stock)	Klon / Isotyp	Firma	Verdünnung (Anwendung *)
anti-Kaninchen-IgG-HRP	Ziege, polyklonal, anti-IgG	Upstate, 12-348	1:10000 (WB)
anti-Maus-IgG-HRP	Ziege, polyklonal, anti-IgG	Upstate, 12-349	1:10000 (WB)
anti-Kaninchen-Alexa488	Ziege, polyklonal, anti-IgG	Invitrogen	1:900 (IF)
anti-Maus-Alexa488	Ziege, polyklonal, anti-IgG	Invitrogen	1:900 (IF)
anti-Kaninchen-Alexa594	Ziege, polyklonal, anti-IgG	Invitrogen	1:900 (IF)
anti-Maus-Alexa594	Ziege, polyklonal, anti-IgG	Invitrogen	1:900 (IF)

* ... WB: Western Blot, IF: Immunfluoreszenz

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Kultur und Lagerung von Bakterien

Bakterienkulturen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit hauptsächlich zur Amplifikation von Plasmid-DNA eingesetzt. In einem Nebenprojekt kamen sie auch für die Expression und Aufreinigung der viralen Proteine E6 und E7 zum Einsatz. Bakterien wurden für die Selektion von Einzelklonen auf soliden LB-Agarplatten angezogen und für die Amplifikation in 250 mL bis 1 L Flüssigkultur von LB- oder TB-Nährmedium gehalten. Die Kulturzeit betrug dabei zwischen 12 h und 18 h bei einer Temperatur von 37°C. Zum Erhalt von Einzelklonen wurden transformierte Bakterienkulturen mittels eines Drigalskispatels auf einer Agarplatte mit präsentem Selektionsantibiotikum (Kanamycin, Ampicillin) ausgestrichen. Die Flüssigkulturen wurden mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte bzw. aus einer Glycerinkultur angeimpft. Eine Langzeitlagerung von Bakterienklonen erfolgte als Agarstab oder Glycerinkultur. Für ersteres wurden Kryoröhrchen zu einem Drittel mit

LB-Agar (0,6 % w/v) befüllt und nach dem Aushärten Einzelkolonien mittels sterilem Zahnstocher in die Kryoröhrchen überführt (Einstechen in den LB-Agar). Die Lagerung erfolgte bei 4°C. Für die Herstellung von Glycerinkulturen wurden 0,5 mL frische Bakterienkultur mit 0,5 mL Glycerinlösung (65% Glycerin / 0,1 M MgSO₄ / 25 mM TrisHCl) sorgfältig gemischt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgt bei -70°C.

2.2.2 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Die Bakterienkultur zur Herstellung elektrokompetenter Bakterien wurde durch die Inokulation von 15 mL Vorkultur in 500 mL LB-Medium und einer Inkubation bei 37°C rotierend bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,7 gewonnen. Anschließend wurde diese Kultur auf Eis 15 min inkubiert. Die Bakterien wurden in 2 Zentrifugenflaschen überführt und ein Pellet der Bakterien durch Zentrifugation bei 4°C mit einem SLA3000-Rotor 5 min bei 6000 x g erhalten. Nachfolgend wurde das Pellet einmal mit 500 mL eiskaltem ddH₂O und zweimal mit 20 mL eiskaltem 10%igem Glycerin gewaschen. Final wurden die Bakterien in 2,5 mL eiskalten 10%igem Glycerin aufgenommen und Aliquote sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.2.3 Transformation von Bakterien durch Elektroporation

Das Einschleusen fremder DNA in Bakterien erfolgt bei dieser Methode durch den kurzen Aufschluss der bakteriellen Zellmembran durch einen Elektropuls (2,5 kV, 25 µF, 200 Ω). Hierzu wurden 40 µl elektrokompetente Bakterien auf Eis aufgetaut, mit 1 – 2 µL eines Ligationsansatzes bzw. 50 – 200 ng Plasmid-DNA vermischt und in eine auf Eis gekühlte Elektroporationsküvette transferiert. Die Transformation erfolgte durch den oben aufgeführten Impuls. Der Transformationsansatz wurde in 1 mL auf 37°C vorgewärmtem LB-Medium ohne Antibiotika aufgenommen und eine Stunde bei 37°C und 225 Upm inkubiert. Dies erlaubt die Rekonstitution der Zellmembran und die Expression der Antibiotikaresistenz. Abschließend wurden die Bakterienkulturen abzentrifugiert, in 100 – 200 µL LB-Medium aufgenommen, auf Agar mit entsprechender Selektion (Kanamycin, Ampicillin) ausplattiert und über Nacht (min. 10 h) bei 37°C inkubiert.

2.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Mini-Präparation

Im Falle von DNA-Präparationen aus Mini-Bakterienkulturen (< 5 mL), zumeist für die Kontrolle neu generierte Plasmidklone, kamen entweder der QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen) bzw. der Zuppy™ Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research) zum Einsatz. Dabei wurde nach den jeweiligen Herstellerprotokollen verfahren.

Maxi-Präparation

Nach der Amplifikation eines entsprechenden Plasmiden in Bakterienkulturen von 250 mL bis zu 1 L, die für eine Verwendung in subsequenten Experimenten in eukaryotischer Zellkultur vorgesehen waren, wurde der Endofree® Plasmid Maxi Kit (Qiagen) verwendet. Dies geschah wiederum nach den Angaben des Herstellerprotokolls.

2.2.5 Isolierung von DNA aus humanen Zellen

Gesamt-DNA aus humanen Zellen

Zellen aus Monolayer-Kultur wurden entsprechend ihres Kultivierungsprotokolls (2.4.1) von der Kulturschale geerntet und zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet bei -80°C bis zur Verwendung gelagert bzw. die DNA sofort unter Verwendung des DNeasy Tissue Kit nach Herstellerangaben isoliert.

Niedermolekulare DNA aus humanen Zellen (Hirt-Extraktion)

Die Methode diente in der vorliegenden Arbeit spezifisch HPV16-DNA aus infizierten HaCaT-Zellen für eine nachfolgende Dot-Blot-Southern Analyse zu extrahieren. Dabei kam ein vereinfachtes Protokoll unter hinzuziehen des QIAprep® Spin Miniprep Kit nach (Ziegler et al. (2004) zur Anwendung. Hierfür wurden die Zellen in der Kulturschale einmal mit eiskaltem PBS gewaschen, 500 µL (10 cm Schale) P1/P2-Mix (1:1) des Qiagen Kits direkt auf die Schale gegeben und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Zellen abgeschabt, in ein 1,5 mL Eppendorf Tube überführt und mit 20 µL Proteinase K (800 µg/mL) bei 55°C für 1-2 h inkubiert. Zur Präzipitation wurden Puffer N3 hinzugegeben und vorsichtig gemixt und weitere 5 min auf Eis gehalten. Das Präzipitat wurde bei 13000 Upm für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde in eine Qiagen-Säule transferiert und für 1 min bei 13000 Upm zentrifugiert. Die Säule wurde nach den Angaben des Qiagen-Protokolls gewaschen und die DNA eluiert.

Gesamt-DNA aus organotypischer Raftkultur

Nach dem Auswachsen des organotypischen Epidermalgewebes wurde dieses vorsichtig von der darunterliegenden Kollagenmatrix befreit. Das Gewebe wurde in ein 1,5 mL Eppendorf-Gefäß überführt und sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Bis zur Isolation der DNA wurde das Probenmaterial bei -80°C gelagert. Bevor die Extraktion nach Herstellerangaben anhand des DNeasy Tissue Kits erfolgte, wurden die tiefgefrorenen Gewebeproben für ca. 10 min auf Raumtemperatur äquilibriert und wenn notwendig größere Gewebestücke mit einem Skalpell zugeschnitten. Die Lyse des Gewebes durch eine Inkubation in 180 μL ATL Puffer und 20 μL Proteinase K (600 mAU/ml) erfolgte auf Grund der Robustheit des Gewebes immer für mind. 12 h bei 55°C über Nacht. Die DNA wurde durch 2 Elutionsschritte gewonnen.

2.2.6 Isolierung von RNA aus humanen Zellen

Gesamt-RNA aus humanen Zellen

Zellen aus Monolayer-Kultur wurden entsprechend ihres Kultivierungsprotokolls (2.4.1) von der Kulturschale geerntet und zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde sofort für die Extraktion der RNA aufgearbeitet. Die Isolierung erfolgte nach dem Protokoll des RNeasy Mini Kit. Hierbei wurde immer ein zusätzlicher DNA-Verdau durch DNase I auf den Säulen ebenfalls nach Herstellerangaben durchgeführt. Dieser sollte mögliche Kreuzkontamination durch HPV16-DNA unterbinden werden, welche inhibierend nachfolgende Transkriptionsanalysen beeinflussen hätte können. Isolierte RNA wurde bei -80°C gelagert.

Gesamt-RNA aus organotypischer Raftkultur

Nach dem Auswachsen des organotypischen Epidermalgewebes wurde dieses vorsichtig von der darunterliegenden Kollagenmatrix befreit. Alle erhaltenen Gewebeproben wurden zuerst für die Stabilisierung der RNA mit RNAlater Stabilization Reagent (Qiagen) behandelt. Hierzu wurden Kryoröhrchen mit 500 μL RNAlater befüllt und die zugeschnittenen epidermalen Gewebeproben sofort in diese Röhrchen überführt. Nach einer Inkubation von 24 h in RNAlater wurden die Gewebe in ein 1,5 mL Eppendorf-Gefäß überführt und sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Bis zur Isolation der DNA wurde das Probenmaterial bei -80°C gelagert. Die Extraktion der RNA erfolgte nach Herstellerangaben des RNeasy Mini Kits. Mit der Ausnahme, dass zur Homogenisierung des Gewebes ein Mikro-Dismembrator

nach dem Protokoll von Reno et al. (1997) Einsatz fand. Hierzu wurden mit einer Mahlkugel bestückte, PTFE-beschichtete Dismembratorschüttelbehälter in flüssigem Stickstoff vorgekühlt. Die tiefgefrorene Gewebeprobe wurde schnell in diese überführt und bei 2000 Upm für 1 min homogenisiert. Das erhaltene Gewebepulver wurde in RLT-Puffer aufgenommen und die Aufarbeitungsprozedur nach Angaben des Kits fortgeführt. Auch hier wurde ein zusätzlicher DNA-Verdau durch DNase I durchgeführt. Isolierte RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.2.7 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Eine Bestimmung von Konzentration und Reinheit Lösungen von DNA und RNA ist mittels Absorptionsspektrometrie der Wellenlängen $\lambda=260$ und $\lambda=280$ möglich. Die Absorption wurde in der vorliegenden Arbeit mit dem Nanodrop ND-1000 gemessen. Quotienten der $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ zwischen 1,8 und 2,0 bestimmt reine DNA. Die Konzentration der Lösung ergibt sich aus:

$$\text{dsDNA} = A_{260\text{nm}} \times 50 \mu\text{g/mL} \quad \text{RNA} = A_{260\text{nm}} \times 33 \mu\text{g/mL}$$

2.2.8 Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen des Typs II schneiden innerhalb spezifischer Erkennungssequenzen doppelsträngige DNA. Dies kann für die Analyse von DNA als auch für die Klonierung von DNA-Fragmenten verwendet werden. Die Restriktion der DNA erfolgte in Reaktionsansätzen mit einer oder auch zwei Endonukleasen nach Protokollangaben des Herstellers in entsprechendem Puffer und bei 37°C für 1 – 24 h. Ein Reaktionsansatz entsprach folgendem typischen Schema:

1 – 10 μg	DNA
5 μL	10x Enzympuffer
5 - 10 U	Restriktionsendonuklease
auf 50 μL	ddH ₂ O

Bei einer weiteren Aufarbeitung und Bedarf wurden die Restriktionsendonukleasen durch eine Inkubation bei 65°C – 85°C hitzeinaktiviert. Der Verdau wurde durch Agarosegelelektrophorese kontrolliert.

2.2.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation erfolgte bei einem Molverhältnis von linearisierten Plasmiden zu Insert-DNA zwischen 1:3 und 1:8 bei einer eingesetzten Menge Vektor-DNA von 50 - 150 ng. Dieses Gemisch wurde zusammen mit T4-DNA-Ligase inkubiert. Ein typischer Ligationsansatz erfolgte nach folgendem Schema:

50 – 150 ng	Plasmid-DNA
x ng	Insert-DNA
2 µL	10x T4-DNA-Ligase Puffer
5 U	T4-DNA-Ligase Puffer
auf 20 µL	ddH ₂ O

Die Ligationsreaktion erfolgte über Nacht bei 16°C. Für die Transformation in elektrokompente *E.coli* wurden anschließend 1 µL des Ansatzes verwendet (Abschnitt 2.2.3).

2.2.10 Klonierung von DNA-Fragmenten

Zu klonierende DNA-Fragmente und die jeweiligen Zielvektoren wurden mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen zur Bildung kompatibler Enden behandelt (Abschnitt 2.2.8), anschließend mittels Agarosegelelektrophorese separiert (Abschnitt 2.2.14) und aus dem Gel aufgereinigt (Abschnitt 2.2.15). Durch eine Ligationsreaktion wurden die kompatiblen Enden von Zielvektor und Insert verbunden (Abschnitt 2.2.9). Das erhaltene Klonierungsprodukt wurde in elektrokompente *E.coli* (HB101, DH5α oder JM109) transformiert (Abschnitt 2.2.3) und als Bakterien Minikultur (< 5 mL) amplifiziert. Zur Kontrolle der Klonierung wurde das erhaltene Produkt entweder von GATC Biotech AG (Konstanz) sequenziert oder die erhaltene DNA durch einen Restriktionsverdau mit anderen als den zur Klonierung verwendeten Endonukleasen anhand der erhaltenen Fragmentlängen analysiert.

2.2.11 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion diente in der vorliegenden Arbeit zum einem dem Nachweis von episomal etabliertem HPV16 in transfizierten Zellen und zum anderen gespleißter E1[^]E4 mRNA in HPV16-infizierten und –transfizierten Zellen über die Amplifikation entsprechender cDNA. Alle PCR-Reagenzien wurde von Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen. Ein typischer PCR-Ansatz sah folgendermaßen aus:

10 ng	zelluläre DNA
5,00 µL	10 x Taq buffer (ohne MgCl ₂)
1,00 µL	10 mM dNTP mix
1,00 µL	Primer_fwd (10 µM)
1,00 µL	Primer_rev (10 µM)
4,00 µL	25 mM MgCl ₂
1,25 µL	Taq Polymerase (1 U/µl)
auf 50 µL	ddH ₂ O

Das Reaktionsprogramm bestehend aus den Stufen DNA-Denaturierung, Primerhybridisierung und Primerelongation entsprach folgendem Schema:

95°C	3 min	1x
95°C	30 s	
°C abhängig von Primer TM	30 s	28 – 40x
72°C	30 s	
72°C	5 min	1x

Die PCR erfolgte in einem MJ Mini Personal Cycler (BioRad, München).

2.2.12 Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

RT-PCR wurde in der Analyse von sowohl HPV16-Virionen infizierter HaCaT- und NHEK-Zellen als auch loxp_HP16_eGFP-N1 transfizierter HaCaT und NIKS zur Detektion gespleißter E1^{E4} mRNA als Nachweis einer aktiven viralen Transkription verwendet. Hierfür wurde der iScript One Step RT-PCR Kit verwendet. Er gewährleistete die cDNA-Synthese von extrahierter, zellulärer Gesamt-RNA (2.2.6) und eine anschließende spezifische Amplifikation in einem Reaktionsansatz. Dieser wurde nach dem Protokoll des Kits auf Eis zusammen mit spezifischen Primern für E1^{E4} (2.1.8) pipettiert. Als interne Kontrolle wurde β -Actin mit spezifischen Primern amplifiziert (2.1.8). Für den Nachweis von E1^{E4} mRNA infizierter Zellen wurden bis zu 2 µg Gesamt-RNA in der Reaktion eingesetzt, bei transfizierten Zellen 250 ng. Die Reaktion fand unter den folgenden Bedingungen in einem MJ Mini Personal Cycler statt:

50°C	10 min	1x
95°C	5 min	1x
95°C	15 s	
60°C	30 s	32x
72°C	30 s	
72°C	3 min	1x

Die amplifizierten DNA-Produkte (E1^{E4} & β -Actin) wurden vereinigt und zusammen in einem 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt (0). Die Visualisierung erfolgte unter UV-Licht.

Bei infizierten HaCaT- und NHEK-Zellen war es für einen Nachweis von E1^{E4} erforderlich, eine nested-PCR der RT-PCR anzuschließen. Hierfür wurde ein Primerpaar mit Hilfe der PerlPrimer Software (Marshall, 2004) erstellt, welches innerhalb des amplifizierten Bereiches der RT-PCR lag [E1^{E4} nested (2.1.8)]. Für die nested-PCR wurden 5% – 20% der RT-PCR eingesetzt. Das Reaktionsschema sah folgendermaßen aus:

95°C	3 min	1x
95°C	30 s	
60°C	30 s	32 – 40x
72°C	30 s	
72°C	3 min	1x

Die amplifizierten DNA-Produkte (E1^{E4} & β -Actin) wurden vereinigt und zusammen in einem 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt (2.2.14). Die Visualisierung erfolgte unter UV-Licht.

2.2.13 Ortspezifische Mutagenese

Die Einschleusung von Stopp-Codons in die ORF von E5, E6 und E7 erfolgte PCR-basiert unter Verwendung des QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, USA). Hierzu wurden Primer nach den Angaben des Herstellerprotokolls mit Hilfe der Software SimVector (Premier Biosoft, USA) ausgewählt und nochmals mittels PerlPrimer auf Sekundärstrukturen und Schmelztemperatur kontrolliert. Die so designten Primer wurden bei Eurofins MWG (Ebersberg) synthetisiert. Je nach Primer wurden 1 oder 2 Basensubstitutionen (2.1.8) für die Einschleusung eines Stopp-Kodons benötigt. Die PCR-Reaktion, der *DpnI*-Verdau der Ausgangs-DNA, Transformation und Selektion der hochkompetenten XL10-Gold *E.coli* erfolgte nach dem Protokoll der Kits. Die extrahierte Plasmid-DNA aus Minikulturen der erhaltenen Klone wurde von GATC Biotech AG (Konstanz) sequenziert und auf die Präsenz der Basensubstitutionen hin untersucht.

2.2.14 Agarosegelelektrophorese

Zur Analyse und Präparation von DNA-Fragmenten wurden diese mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Ihre Auftrennungsgeschwindigkeit verhält sich dabei umgekehrt proportional zu ihrer Fragmentgröße und beruht auf ihrer stark negativen Ladung. Die Auftrennung der DNA kann mit der Wahl der Agarosekonzentration spezifisch auf die

Fragmentgröße eingestellt werden. In der vorliegenden Arbeit variierte sie hauptsächlich zwischen 0,8% (> 6kb) und 1,5% (< 1 kb). Zur Herstellung des Gels wurde die entsprechende Menge (w/v) Agarose (*low melting* Agarose im Fall präparativer Gele) mit 1x TAE in der Mikrowelle aufgeköcht. Nach dem Abkühlen wurde die homogene Lösung mit 0,3 µg/mL (0,1 µg/mL präparative Gele) versetzt, in eine Gelgießkammer der gewünschten Größe verbracht und ein Gelkamm eingesetzt. Die Proben wurden mit 10x Ladepuffer versetzt, gut gemischt sowie kurz abzentrifugiert und anschließend das erstarrte Gel in 1x TAE-Puffer beladen. Die Laufzeit betrug je nach Gelgröße und angelegter Spannung (80 – 120 V) zwischen 45 min und 120 min (präparative Gele bei 4°C). Als Größenstandard fungierten 100 bp oder 1 kb DNA ladder. Die Auftrennung der DNA-Fragmente konnte unter UV-Licht über das interkalierende Ethidiumbromid verfolgt werden.

2.2.15 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Je nach Größe der zu präparierenden DNA-Fragmente wurden verschiedene Agarosegele verwendet. Für die Aufreinigung von kleineren PCR-Produkten und Restriktionsfragmenten (< 4kb) wurden normale Agarosegele eingesetzt. Bei größeren DNA-Fragmenten, speziell bei der Aufarbeitung des HPV16-Genoms, hingegen wurde Agarose eines niederen Schmelzpunktes (*low melting* Agarose) gewählt. Nach dem Auftrennen der DNA im Gel, wurden die Fragmente entsprechender Größe mit Hilfe einer Visualisierung auf dem UV-Tisch mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß (1,5 mL) überführt. Die Aufarbeitung erfolgte anhand des *Zymoclean Gel DNA Recovery Kits* nach Angaben des Herstellers. Leichte Modifikationen wurden eingeführt, wenn es einer hohen Rückgewinnungsquote der DNA bedurfte. Dabei wurde zum Binden der DNA die Agarosesuspension zweimal über die Säulen aufgereinigt. Die Elution erfolgte mit auf 65°C vorgewärmten Puffer (ddH₂O, TE), welcher 1 min auf der Säule inkubierte. Auch dieser Schritt wurde zweimal wiederholt.

2.2.16 Alkalischer Kapillar-DNA-Transfer (Southern Blot)

Direkt nach dem Gellauf und der Aufnahme des Geles unter UV-Licht wurde das Agarosegel kurz in ddH₂O gespült. Für eine partielle Depurinierung der DNA, die zu einem besseren Transfer größerer DNA-Fragmente (> 4 kb) beiträgt, wurde 10 min in 0,25 M HCl inkubiert. Anschließend wurde kurz in ddH₂O gewaschen und die DNA mit Denaturierungspuffer für 2 x 15 min denaturiert. Die Neutralisierung erfolgte mit 1,5 M NaCl

/ 0,5 M Tris pH 7,5 für 25 min. All diese Prozesse konnten durch den Farbumschlag des Bromphenolblaus aus dem DNA Ladepuffer von blau nach gelb und zurück nach blau kontrolliert werden. Während der Neutralisierung wurden 6 Whatmann Filterpapiere und eine Hybond-N⁺ Nylonmembran auf die Größe des Geles zugeschnitten. Die Nylonmembran wurde mit ddH₂O für 5 min befeuchtet und wie auch die Filterpapiere anschließend in 10 x SSC für mindestens 15 min äquilibriert.

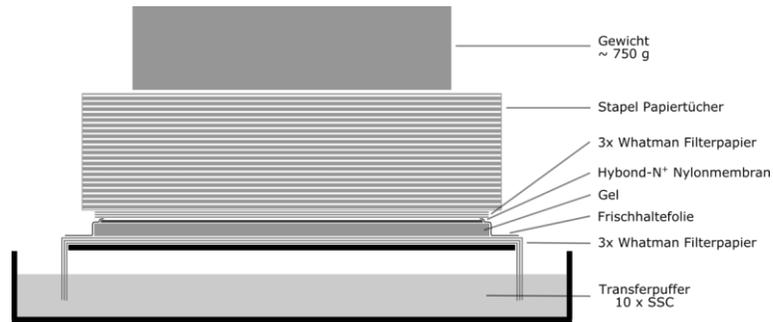


Abbildung 2.1: Schematischer Aufbau Southern Blot

Das Schema stellt den Aufbau des alkalischen Kapillar-DNA-Transfers dar, wie er in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde.

Der Aufbau des Blottes erfolgte wie im Bild zu sehen (Abbildung 2.1), er wurde mit ca. 750 g beschwert und der Transfer erfolgte über Nacht. Während des Transfers wird die DNA durch den hochmolaren Salzpuffer aus dem Agarosegel gelöst und durch den Kapillarfluss auf die Nylonmembran übertragen. Aufgrund der positiven Ladung der Membran bindet die DNA stark an diese. Nach dem Blot wurden die Geltaschen und die DNA Marker auf der Membran markiert. Die DNA wurde durch UV-B *crosslinking* mit 1200 kJ kovalent an die Membran gebunden und diese abschließend luftgetrocknet.

2.2.17 Radioaktive Markierung von DNA-Proben

Die radioaktive Markierung der eingesetzten Sonden (HPV16, hAlu) erfolgte nach den Herstellerangaben des Protokolls des *Rediprime II DNA labeling Kits* (GE Healthcare, München). Hierzu wurden die aufgereinigten dsDNA-Fragmente auf eine finale Konzentration von 0,55 ng/ μ L in DNase-freiem Wasser verdünnt und für 5 min bei 95°C inkubiert. Die auf diese Weise denaturierte DNA wurde auf Eis für 5 min abgekühlt und abzentrifugiert. Jeweils 45 μ L wurden in ein Reaktionsgefäß mit *Rediprime II reaction mixture* überführt sowie 5 μ L (50 μ Ci) von [α -³²P]dCTP hinzugefügt und gut vermischt. Die Markierungsreaktion erfolgte bei 37°C für 30 min. Der Stopp der Reaktion wurde durch die Zugabe von 20 μ L Stopppuffer erzielt. Parallel zur Markierungsreaktion wurde eine entsprechende Menge an MicroSpin G-25

Säulen (GE Healthcare, München) zur Aufreinigung der markierten Sonden via Gelfiltration nach Herstellerangaben vorbereitet. Zur Äquilibration der Säulen wurden 200 μ L 1% TNE Puffer aufgebracht und kurz abzentrifugiert. Vor dem Aufbringen der Markierungsreaktion wurde diese nach Zugabe des Stopppuffers mit 75 μ L 1% TNE gemischt und auf die Säule transferiert. Die Aufreinigung erfolgte durch einen Zentrifugationsschritt bei 3000 Upm für 1 min. Die inkorporierte Radioaktivität wurde durch die Entnahme eines Aliquoten bestimmt. Die Sonden wurden entweder sofort für die Hybridisierung verwendet oder bei 4°C bis maximal 3 Tage gelagert.

2.2.18 Hybridisierung von DNA mit radioaktiv markierten Sonden

Die Detektion spezifischer DNA-Sequenzen auf einem Southern Blot erfordert hochstringente Hybridisierungstemperaturen, wie im vorliegenden Fall von 68°C. Die luftgetrockneten, DNA-tragenden Membranen wurden hierfür in eine Hybridisierungsflasche überführt und vorsichtig gewässert. Für eine Reduzierung möglichen Hybridisierungshintergrundes wurden die Membranen mit Prähybridisierungspuffer (5 mL kleine Flaschen, 10 mL große Flaschen) rotierend bei 68°C für mindestens 1 h äquilibriert. Danach wurde der Puffer durch auf 68°C vorgewärmten Hybridisierungspuffer ersetzt, welcher eine entsprechende Menge radioaktiver Sonde enthielt. Die Sonde wurde vor ihrer Zugabe mit 0,2 M NaOH (finale Konzentration) für 10 min denaturiert. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 68°C: Am Folgetag wurde die Hybridisierungslösung abgenommen und konnte für weitere Verwendungen innerhalb der Halbwertszeit von [α -³²P]dCTP bis zu 14 Tagen gelagert werden. Die Membran wurde abschließend mit Waschpuffer [2x SSC; 0.1% SDS (w/v)] weiterhin sehr stringent bei 68°C dreimal für 30 min gewaschen. Danach wurde die Membran luftgetrocknet und in Frischhaltefolie verpackt.

Aufnahme der Hybridisierungssignale mittels Autoradiographie

Die in Folie verpackten Blots wurden in eine Autoradiographiekassette überführt. Bei bekannt schwachen Signalen wurde zusätzlich eine Verstärkerfolie mit aufgelegt. Die Aufnahme erfolgte mittels eines *BioMax[®] Maximum Resolution (MR) Autoradiography* Films (Kodak, Stuttgart), welcher abhängig von den Signalintensitäten 24 h bis 7 Tage bei -80°C exponiert wurde. Der Film wurde mit der automatischen Entwicklungsmaschine Curix 60 (AGFA, Belgien) entwickelt.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Herstellung von Proteinextrakten

RIPA-Extrakte

RIPA-Puffer ist einer der bewährtesten und gebräuchlichsten Lysepuffer zum Aufschluss von kultivierten Zellen. Er ist kompatibel mit vielen nachfolgenden Methoden der Proteinanalyse. Zum Aufschluss der Zellen wurden adhärent wachsende Zellen von der Kulturschale/-flasche abgelöst (Abschnitt 2.4.1), in ein 15 mL Falcon-Tube überführt und zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde anschließend in RIPA-Puffer resuspendiert und auf Eis bei 4°C für 20 min inkubiert. Das erhaltene Lysat wurde zur Aufreinigung von Zelldebris in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß transferiert und 15 min bei 14000 Upm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 1,5 mL *protein low bind* Tube überführt. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration (Abschnitt 2.3.2) wurden 5 µL oder 10 µL Lysat abgenommen. Die Lagerung der so gewonnen Extrakte erfolgte bei -80°C.

SDS-Extrakte

Die Gesamtzellproteinextraktion mittels SDS-Puffer zeichnet sich durch eine einfache und schnelle Anwendung direkt auf dem Kulturgefäß aus. Außerdem eignen sich SDS-Extrakte optimal für eine lange Verwendung, da sie aufgrund der hohen SDS-Konzentration inert sind gegenüber Proteindegradation auch bei häufigem Auftauen und Einfrieren. Vor der Lyse der Zellen wurden diese zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden entsprechend der Kulturfläche 500 µL (10 cm Schale) bzw. 200 µL (*6well*-Platte) auf 95°C erhitzter 1%ige SDS-Lösung hinzugegeben und kurz inkubiert. Die Zellen wurden nach dem Abschaben in eine QIAshredder-Säule überführt und zweimal 1 min bei 14000 Upm zentrifugiert, wobei die zelluläre DNA geschert wurde. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration (Abschnitt 2.3.2) wurden 5 µL oder 10 µL Lysat abgenommen. Die Lagerung der so gewonnen Extrakte erfolgte bei -80°C.

RIPA-Extrakte aus organotypischer Raftkultur

Nach dem Auswachsen des organotypischen Epidermalgewebes wurde dieses vorsichtig von der darunterliegenden Kollagenmatrix befreit. Die Gewebe wurden in ein 1,5 mL Eppendorf-Gefäß überführt und sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Bis zur Proteinextraktion wurde das Probenmaterial bei -80°C gelagert. Eine Homogenisierung des Gewebes erfolgte mit Hilfe eines Mikro-Dismembrators nach dem Protokoll von Reno et al.

(1997). Hierzu wurden mit einer Mahlkugel bestückte, PTFE-beschichtete Dismembrator-schüttelbehälter in flüssigem Stickstoff vorgekühlt. Die tiefgefrorene Gewebeprobe wurde schnell in diese überführt und bei 2000 Upm für 1 min homogenisiert. Das erhaltene Gewebepulver wurde in RIPA-Puffer aufgenommen und die Aufarbeitungsprozedur wie oben beschrieben für Zellen aus einfacher Zellkultur fortgeführt. Die so erhaltenen Proteinextrakte wurden bei -80°C bis zu einer weiteren Verwendung gelagert.

2.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Der Gehalt an Protein von zellulären Extrakten wurde anhand des Bio-Rad *DC Protein Assays* bestimmt. Dieser beruht auf der Folinreaktion nach Lowry et al. (1951). In einer zweistufigen Reaktion komplexieren im ersten Schritt Peptidbindungen der Proteine in alkalischer Lösung mit Kupfer(II)-Ionen, während diese in der zweiten Stufe das Folin-Reagenz reduzieren, wobei ein blauer Farbstoff entsteht. Dieser kann bei einer Wellenlänge von 750 nm ausgemessen werden, da die Intensität in einem definierten Bereich linear mit dem Proteingehalt steigt. 5 μL oder 10 μL erhaltenen Proteinextraktes wurden mit ddH_2O auf 45 μL aufgefüllt und mit 255 μL eines Gemisches von Reagent A und Reagent S (50:1) versetzt und anschließend unter Vortexen mit 2 mL Reagent B gemischt. Die Farbreaktion erfolgte während einer Inkubation von 20 min bei Raumtemperatur. Die Absorption wurde bei 750 nm im Spektralphotometer gemessen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte im Vergleich zu einer Kalibrierungsgerade erhalten von einer Verdünnungsreihe von bovinem Plasma γ -Globulin.

2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE erlaubt die Auftrennung von Proteinen im Gel umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Molekularmasse. Um dies zu ermöglichen und den Einfluss der Sekundär- und Tertiärstruktur zu löschen, werden Disulfidbrücken durch Mercaptoethanol denaturiert und die Eigenladung der Proteine durch die Anlagerung des SDS abgeschirmt. Unterschiedliche Verhältnisse von Acrylamid und Bisacrylamid bewirken dabei unterschiedliche Vernetzungsgrade des Gels und damit unterschiedlich scharfe Auftrennungsbereiche in Bezug auf die Molekülgröße. Hauptsächlich kamen in dieser Arbeit 4 - 12%ige NuPAGE Novex Bis-Tris Gradientenfertiggele (Invitrogen, Karlsruhe) zum Einsatz. Die Proteinproben wurden als jeweils gleiche Gesamtvolumina mit 4x LDS *Sample Buffer* und 10x *Reducing Agent* versetzt, 10 min bei 70°C denaturiert, kurz zentrifugiert (TZ,

11000 Upm, 1 min) und auf das Gel aufgetragen. Der Lauf erfolgte beginnend bei 80 V für 30 min, gefolgt von ca. 1,5 h bei 150 V in einer *XCell SureLock* Mini-Elektrophoresekammer befüllt mit MOPS-Puffer, dem in der oberen Kammer 500 µL NuPAGE Antioxidant hinzugegeben waren. Als Molekulargewichtsmarker wurde *ColorPlus Prestained Protein Ladder* (NEBiolabs, Frankfurt am Main) verwendet. Alle anderen Gele basierten auf der modifizierten Methode nach Lämmli (Laemmli, 1970). Die Auftrennung der Proteine ereignet sich in diesen Gelen in 2 Stufen. Eine Konzentrierung der Proteine erfolgt in einem 4,5%igen Sammelgel, während die Auftrennung in einem 7,5%igen bis 12,5%igem Trenngel erfolgt. Der Prozentanteil Bisacrylamid bestimmt dabei die Porengröße, welche der Molekulargröße der Proteine angepasst ist. Die Lösungen wurden entsprechend der Tabelle jeweils frisch präpariert, die Polymerisation mit APS und TEMED gestartet und die Lösungen beginnend mit dem Sammelgel zwischen die Glasplatten gegossen. Das Sammelgel wurde bis zum Abschluss der Polymerisation mit Isopropanol überschichtet (ca. 45 min), danach wurde dieser vorsichtig abgegossen und Reste mit *Whatman* Filterpapier (Schleicher & Schüll, Dassel) abgezogen. Auf das Trenngel wurde abschließend das Sammelgel gegossen, der Probenkamm eingesetzt und mit Klammern fixiert. Nachdem auch dieser Teil vollständig ausgehärtet war, konnte das Gel verwendet werden, oder bei 4°C verpackt in Folie gelagert werden.

2.3.4 Coomassie-Färbung von Proteinen im Gel

Für die Färbung der Proteine wurde das *GelCode™ Blue Stain Reagent* (Thermo-Scientific, Schwerte) verwendet. Hierzu wurden Gele nach dem Lauf in ddH₂O abgespült und 3 x 15 min mit ddH₂O gewaschen. Das Gel wurde für 30 min mit der Färbelösung auf Basis des kolloidalen Farbstoffes Coomassie G-250 schwenkend inkubiert. Nach einem Abspülen der Färbelösung mit ddH₂O wurde das Gel unter mehrmaligen Wechsel von ddH₂O bis zu einem deutlichen hervortreten der Proteinbanden entfärbt (ca. 1 h).

2.3.5 Silberfärbung von Proteinen im Gel

Auch bei einer hohen Sensitivität der Coomassie-Färbung mit dem *GelCode™ Blue Stain Reagent* im Nanogrammbereich (Abschnitt 2.3.4) ist die Silberfärbung noch sensitiver (bis zu 30fach). Sowohl Polyacrylamidgele als auch NuPAGE- Gradientenfertiggele wurden nach Protokollangaben des Herstellers mit dem *SilverQuest Silver Staining Kit* angefärbt. Voran wurde das Gel mit ddH₂O kurz gespült, anschließend 20 min mit 100 mL Fixierlösung fixiert und 10 min mit 30% EtOH gewaschen. Nach erfolgter 10 minütiger Inkubation mit 100 mL

Sensitivierungslösung wurde nochmals 10 min mit 30% EtOH und 10 min mit ddH₂O gewaschen. Nach einer Färbung mit 100 mL Färbelösung für 15 min wurde 1 min mit ddH₂O gewaschen. In Folge wurde das Gel 3 – 7 min mit 100 mL Entwicklerlösung inkubiert bis eine gewünschte Intensität erreicht war. Daraufhin wurde mit 10 mL Stopplösung die Färbereaktion unterbrochen. Abschließend wurde das Gel 10 min in ddH₂O gewaschen. Für eine Lagerung des Gels wurde es in Folie eingeschweißt.

2.3.6 Immunblot (Western Blot)

Das Verfahren des Western Blots ermöglicht den Transfer von in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteinen auf eine PVDF-Membran, was eine subsequeute immunologische Detektion dieser gestattet. Hierzu wurden PVDF-Membran und Whatman-Filterpapiere auf die Größe des Geles zugeschnitten. Die PVDF-Membran wurde für 20 s in Methanol aktiviert, ausgiebig mit ddH₂O gewaschen und ebenso wie die Filterpapiere in EMBL-Transferpuffer 20 min äquilibriert. Das Gel wurde nach dem Lauf ebenfalls ausgiebig mit ddH₂O gewaschen und 20 min in EMBL-Puffer präinkubiert. Der Aufbau des Blottes erfolgte nach folgendem Schema:

Kathode (-)
1 Whatman-Filterpapier (1,5 mm)
Gel
PVDF-Membran
1 Whatman-Filterpapier (1,5 mm)
Anode (+)

Der Transfer erfolgte im „*semi-dry*“-Verfahren bei 20 V für 1 h – 1 h 50 min abhängig von dem Molekulargewicht des später zu detektierenden Proteins. Die Membran wurde nach dem Transfer in Waschpuffer gewaschen und zur Maskierung unspezifischer Membranwechselwirkungen 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C mit Blockpuffer (auf PBS- oder TBS-Basis) nach den Herstellerangaben des primären Antikörpers inkubiert. Für die spezifische, immunologische Detektion des interessierenden Proteins wurde der Erstantikörper in Blockpuffer verdünnt und je nach bekannter Stärke des erhaltenen Signals für 1 - 2 h bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht auf der Membran inkubiert. Für einen sparsamen Einsatz der Antikörperlösung wurden die Membranen entweder in Folie eingeschweißt und schüttelnd inkubiert, oder die Membranen wurden in einen 15 mL Falcon Tube überführt und rotierend mit der Antikörperlösung inkubiert. Für eine mehrmalige Verwendung der Antikörperlösung wurde diese nach der Verwendung bei -20°C eingefroren. Dabei konnte auf das sehr giftige Natriumazid verzichtet werden. Die Membran wurde nach der Inkubation kurz

mit Waschpuffer gespült und anschließend 2 x 15 min und 3 x 5 min mit Waschpuffer gewaschen. Der HRP-gekoppelte Zweitantikörper entsprechender Verdünnung in Blockpuffer wurde für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde wiederum kurz mit Waschpuffer gespült und anschließend 2 x 15 min und 3 x 5 min mit Waschpuffer sowie 1 x 5 min mit PBS bzw. TBS (entsprechend dem verwendeten Waschpuffer) gewaschen. Mittels Chemilumineszenz wurden die Protein-Antikörper-Komplexe auf der Membran sichtbar gemacht. Hierzu wurde die Membran für 30 s mit 5 mL *Western Lightning Plus-ECL* behandelt und abschließend ein Autoradiographiefilm je nach Signalstärke 1 s bis 30 min innerhalb einer Expositionskartusche auf der Membran exponiert. Der Film wurde anschließend entwickelt in einer AGFA Classic E.O.S. Entwicklungsmaschine.

Entfernung von Antikörperkomplexen von der Blotmembran

Um einen Immunblot mehrmals bezüglich unterschiedlicher Proteine untersuchen zu können, bedarf es einer Entfernung der Erstantikörper-Zweitantikörper-Komplexe von der Membran. In der vorliegenden Arbeit kamen mehrere Methoden zum Einsatz. Hauptsächlich wurde aber ein einfaches Protokoll mit 0,2 M NaOH verwendet. Dazu wurde der zuvor exponierte Blot mit ddH₂O 5 min gewaschen und dann mit 0,2 M NaOH für 5 min gestrippt. Nach abschließendem Waschen für 5 min mit ddH₂O und 2 x 5 min Waschpuffer wurde die Membran erneut geblockt und wie oben beschrieben mit einem anderen Erstantikörper inkubiert.

2.3.7 Densitometrische Quantifizierung von Immunblot-Analysen

Für eine Auswertung der Immundetektion wurden die exponierten Filme in hoher Auflösung und ohne Manipulation seitens der Scansoftware aufgenommen. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit der ImageJ-Software (Rasband, 1997-2004). Die Signalintensität der erhaltenen Proteinbanden wurde unter Subtraktion des Hintergrundwertes gemessen. Proteinbanden wurden quantitativ miteinander verglichen. Die Unterschiede aus 3 unabhängigen Experimenten wurden mittels einseitiger ANOVA-Analyse (Software SigmaStat 3.5) auf statistische Signifikanz hin überprüft.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Zellkultur

Bei allen verwendeten Zelllinien handelte es sich um adhärenz wachsende Zellen, deren Kultivierung bei 37°C und einer 5%igen CO₂-Atmosphäre erfolgte. Zellspezifische Kultureigenschaften werden in den folgenden Abschnitten dargestellt.

Kultur von 293T-, 293TT- und NIH3T3-Zellen

293TT-, 293T-, NIH3T3-Zellen wurden in DMEM mit hohem Glucosegehalt (4500 mg/l), 10% fötalem Kälberserum und 1% Penicillin und Streptomycin Antibiotika gehalten. Alle Zellen wurden bei einer Konfluenz von maximal 80% geteilt. Hierzu wurde das Medium abgesaugt, mit PBS/0,05% EDTA gewaschen, die Zellen mit Trypsin/EDTA überdeckt und 5 - 8 min inkubiert. Anschließend wurde die Trypsin-Reaktion mit frischem DMEM Medium gestoppt, die Zellen resuspendiert und je nach Bedarf 1:3 bis 1:15 geteilt. NIH3T3-Zellen wurden bis zu Passage 20 verwendet und danach neue Zellen niederer Passage aufgetaut.

Kultur von HaCaT-Zellen

HaCaT-Zellen wurden in 2 verschiedenen Medien gehalten: zum einen in DMEM mit hohem Glucosegehalt (4500 mg/l), 10% fötalem Kälberserum und zum anderen in komplettem KGM2-Medium jeweils mit 1% Penicillin und Streptomycin Antibiotika. KGM2 hat eine keratinozytenspezifischere Zusammensetzung als DMEM, wodurch die Zellen eine Morphologie zeigen, die normalen Keratinozyten stärker entspricht. Ebenfalls befinden sich die Zellen in einem niedrigeren Differenzierungsgrad, was entscheidend ist für die weitere Verwendung dieser Zellen in dreidimensionaler Kultur. Bei HaCaT Zellen, die in DMEM kultiviert wurden, erfolgte das Teilen ca. 3 Tage nach Erreichen der Konfluenz. Somit wurde sichergestellt, dass keine Selektion zu Gunsten schnell proliferierender Zellen der Mischkultur erfolgte. Die Zellen in KGM2 wurden bei einer Konfluenz von ca. 80% geteilt, dies verhinderte die Induktion von Differenzierung durch Erreichen der Konfluenz. Hierzu wurde das Medium abgesaugt, mit PBS/0,05% EDTA gewaschen und für 18 Minuten mit PBS/0,05% EDTA inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA überdeckt und weitere 5 bis 7 Minuten bis zum Ablösen inkubiert. Die Trypsin-Reaktion wurde mit frischem DMEM Medium gestoppt, die Zellen resuspendiert und je nach Bedarf 1:3 bis 1:10 geteilt. Der geringe Serumgehalt des KGM2 Mediums erforderte eine Aufnahme der Zellen in

DMEM. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (1000 Upm, 3 min) und in KGM2 Medium aufgenommen und neu ausplattiert.

Kultur von NIKS-Zellen

NIKS-Zellen wachsen in FAD-Medium auf einer Schicht von NIH3T3 Mausfibroblasten, die zuvor durch Bestrahlung (30 Gy) oder Behandlung mit Mitomycin C (4 µg/mL) mitotisch inaktiviert wurden. 12 bis 24 Stunden vor dem Passagieren der NIKS-Zellen wurden $1,5 \times 10^5$ Zellen/cm² behandelte Fibroblasten ausgesät. Zum Teilen der NIKS-Zellen wurden die Fibroblasten nach einer Behandlung von 5 min mit PBS/0,05% EDTA abgespült und die NIKS-Zellen durch 8 minütige Inkubation mit Trypsin/EDTA abgelöst. Die Zellen wurden in DMEM aufgenommen, abzentrifugiert und in FAD Medium im entsprechendem Verhältnis neu ausgesät.

Kultur von primären Keratinozyten (NHEK)

Primäre Keratinozyten wurden entsprechend den Herstellerangaben (PromoCell, Heidelberg) in KGM2 Medium kultiviert. Für Subkultivierungen bzw. Ernten der Zellen wurde das DetachKit des Herstellers verwendet. Die Zellen wurden ca. 14 Tage und bzw. nicht länger als 15 Verdopplungszyklen in Kultur gehalten.

2.4.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

24 h Stunden vor dem Einfrieren wurde das Medium für eine Proliferationsstimulation gewechselt und die Zellen bei einer Konfluenz von 80% bis 90% trypsiniert. Anschließend wurden die Zellen bei 1000 Upm für 3 min pelletiert und in der gewünschten Konzentration in Einfriermedium resuspendiert. Bei DMSO-haltigem Einfriermedium wurden die Zellen zuerst in 50% des Endvolumens der gewünschten Zellkonzentration in normalem Medium aufgenommen. Zur Vermeidung eines starken osmotischen Schockes wurde dann tropfenweise das Einfriermedium hinzugegeben. 1 mL der Zellsuspension wurde in 2 mL Kryoröhrchen überführt und in einem Nalgene-Freezer über Nacht bei -80°C langsam eingefroren und zum längerfristigen Präservieren in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert. In der Tabelle in Abschnitt 2.1.14 sind die Einfriermedien der einzelnen Zelltypen aufgeführt. Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen aus flüssigem Stickstoff entnommen und sofort in einem 37°C Wasserbad die Zellsuspension aufgetaut und in Kulturmedium aufgenommen. Daraufhin wurden die Zellen zentrifugiert in frischem Medium ausplattiert.

2.4.3 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop. Es wurden jeweils 4 Großquadrate ausgezählt. Die Zellzahl ergibt sich daraus nach folgender Formel:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Mittelwert der Zellzahl pro Großquadrat} \times 10000$$

2.4.4 Transfektion von Zelllinien

Eine Reihe von verschiedenen Transfektionsmethoden wurde im Rahmen dieser vorliegenden Arbeit ausgetestet. Hauptsächlich kamen aber Lipofektion mit Fugene[®] HD (Roche, Mannheim) bzw. Lipofectamine[™] 2000 (Invitrogen[™], Darmstadt) sowie Kalziumphosphat-Transfektion unter Verwendung des CalPhos Mammalian Transfection Kits (Clontech, Frankreich) zum Einsatz.

Transfektion von 293T- und 293T⁺T-Zellen

Lipofectamine[™] 2000 sowie die Kalziumphosphat-Methode fanden ihre Verwendung in der Transfektion von 293T bzw. 293T⁺T-Zellen in der *in vitro* Virionen-Herstellung. Bei der Verwendung von Lipofectamine[™] 2000 wurde zunächst ein DNA-Lipofectamine-Komplex hergestellt. Dies geschah nach Angaben des Herstellerprotokolls. Für die Verdünnungen wurde Opti-MEM[®] Minimalmedium (Invitrogen[™], Darmstadt) verwendet. Die 80 – 90%ig konfluente Zellkultur wurden mit dem Transfektionsansatz 4 – 6 h inkubiert und anschließend das Medium gewechselt.

Auch bei der Verwendung des CalPhos Mammalian Transfection Kits wurde nach den Vorgaben des Herstellers verfahren. Die 80 – 90%ig konfluente Zellkultur wurden mit dem Transfektionsansatz 6 h inkubiert und anschließend das Medium gewechselt. Alle genauen Angaben in Bezug auf die *in vitro* Virionen-Produktion finden sich im Abschnitt 2.5.2.

Transfektion von HaCaT- und NIKS-Zellen

Für die Transfektion von Keratinozyten mit Fugene[®] HD wurden nach den Angaben des Herstellers optimale Bedingungen für die verwendete DNA-Menge und das Verhältnis von DNA zu Fugene[®] HD-Reagenz ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) ausgetestet. Die genauen Bedingungen bezüglich der Kotransfektion von loxp_HP16_peGFP-N1 und myc-Cre finden sich in Abschnitt 2.6.2.

2.4.5 Organotypische Raftkultur

Organotypische Raftkultur ist die Standardmethode für die Untersuchung von Keratinozytendifferenzierung *in vitro*. In einem ersten Schritt wird eine Kollagen-Fibroblasten-Matrix als dermales Äquivalent, auf welchem später die Keratinozyten wachsen sollen, präpariert. Hierzu wurde die gewünschte Menge NIH3T3 Mausfibroblasten ($2,5 \times 10^5$ /mL für NHEK und NIKS, 5×10^5 /mL für HaCaT) in 0,25 mL/Raft 10x DMEM resuspendiert, mit weiteren 0,25 mL unter Vermeidung von Luftblasen 10x Rekonstitutionspuffer gemischt und anschließend homogen in 2 mL einer Lösung von Rattenschwanzkollagen (4 mg/ml) aufgenommen. Für einen besseren Ansatz unter Vermeidung von Luftblasen wurden Ansätze für mindestens 4 Rafts angesetzt, wobei auf Grund der Zähflüssigkeit immer das Volumen für eine Raft extra einkalkuliert wurde. Je 2,5 mL dieser Suspension wurden in 24 mm Transwell Einsätze einer 6 Loch Kulturschale überführt und zur Aushärtung für 30 -60 min im 37°C Brutschrank inkubiert. Abschließend wurden in den äußeren Raum 3 mL und auf die Kollagenmatrix 2 mL FAD Medium gegeben. Die Matrizen werden so 2 - 4 Tage kultiviert, um ein Auswachsen der Fibroblasten und deren Produktion von Wachstumsfaktoren zu gewährleisten.

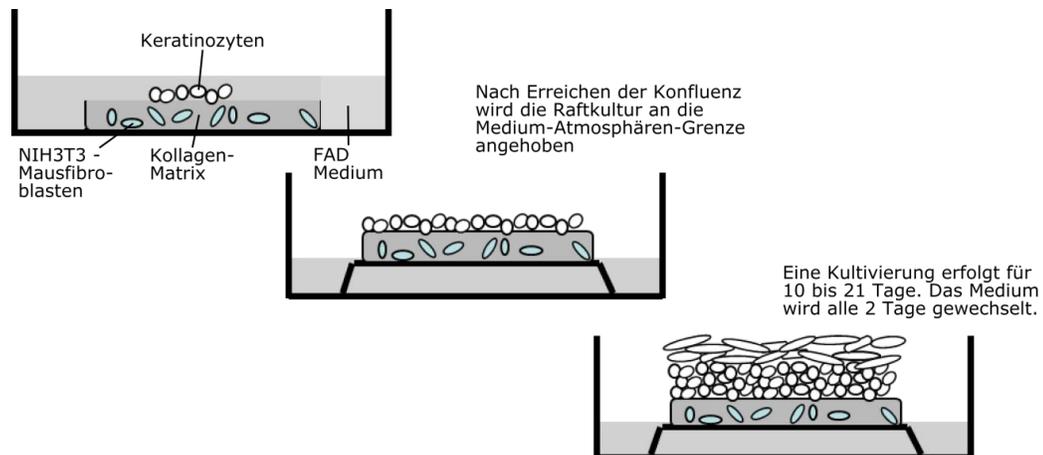


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der organotypischen Raftkultur

Zum Aussäen der Keratinozyten wurde neues Medium in die äußere Schale gegeben, das Medium auf der Matrix entfernt und darauf $1,6$ bis $3,0 \times 10^5$ Zellen/cm² in 2 mL FAD Medium gegeben. Die Zellen wurden auf diese Weise 2 – 4 Tage bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert. Danach wurden die *Transwell*-Einsätze in *Deep well* Kulturplatten überführt, das Medium auf der Matrix entfernt und der äußere Bereich mit 14 mL FAD Medium befüllt. Die Zellen wachsen somit an der Grenze von Medium und umgebender

Atmosphäre und werden nur aus dem unteren Reservoir durch Diffusion mit Medium versorgt. Das Medium wurde alle 2 Tage gewechselt und die Raft so für 10 (NHEK), 14 (NIKS) oder 21 Tage (HaCaT) in Kultur gehalten.

2.4.6 Präparation der organotypischen Gewebe

Fixieren

Nach Abschluss der im vorigen Abschnitt angegebenen Wachstumsdauer wurden die Gewebe zusammen mit der unterliegenden Kollagenmatrix vorsichtig aus dem *Transwell*-Einsatz ausgeschnitten und die tragende Membran, auf welcher die Raft auflag, entfernt. Je nach Verwendung wurde das Gewebe in kleinere Proben mit einem Skalpell zugeschnitten. Für unfixierte Frischgewebeschnitte wurde die Proben sofort in Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound Einbettmedium überführt und in flüssigem Stickstoff für ca. 1 min tiefgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Für eine folgende Paraffineinbettung des Gewebes wurde die Proben in PBS gepuffertem Formalin (10%ig) über Nacht fixiert.

Einbettung in Paraffin und Anfertigung von Mikrotomgewebeschnitten

Für die Einbettung in Paraffin wurden die fixierten Proben in folgender Weise vollständig entwässert:

70% EtOH	1 h
96% EtOH	1 h
96% EtOH	1 h
100% EtOH	30 min
100% EtOH	30 min
100% EtOH	30 min
100% EtOH	45 min
Aceton	1 h
Aceton	1 h
Paraffin (flüssig)	30 min
Paraffin (flüssig)	40 min
Paraffin (flüssig)	30 min

Abschließend wurde das Gewebe in einem Blockschälchen mit Paraffin senkrecht eingegossen. Wenn gesamte Raftkulturen zur Aufarbeitung kamen, wurden diese in 3 bis 4 ca. gleichbreite Streifen mit einem Skalpell geschnitten. Diese Streifen wurden dann parallel zueinander eingebettet. Dies ergab beim Anfertigen der Schnitte dann eine Präsenz von Querschnitten aus unterschiedlichen Regionen der Raft auf einem Objektträger.

Die Anfertigung von 5 µm dicken Mikrotomschnitten erfolgte mit einem gekühlten Leica-Mikrotom RM2235 (Leica Microsystems, Wetzlar). Die Schnitte wurde auf SuperFrost® Plus

Objektträger (Menzel, Braunschweig) aufgebracht. Überschüssiges Wasser wurde mit Filterpapier vorsichtig abgezogen und auf einer Heizplatte bei 45°C vorgetrocknet. Abschließend wurde sie für mind. 6 h in einem Trockenofen ausgetrocknet. Im weiteren Verlauf wurden die Schnitte hauptsächlich durch das Pathologische Institut des Universitätsklinikums Heidelberg aufbereitet.

2.4.7 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Für eine histologische Bewertung der erhaltenen Gewebe wurden diese mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Hämatoxylin färbt dabei nukleäre Strukturen bläulich, während Eosin das Zytoplasma rötlich färbt. Hierfür müssen die Gewebeschnitte zuerst rehydriert werden. Dies geschieht mit einer aufsteigenden Alkoholreihe, insgesamt nach folgender Prozedur:

Xylol	2 x 5 min
100% EtOH	2 x kurz
96% EtOH	1 x kurz
70% EtOH	1 x kurz
ddH ₂ O	1 x kurz
Hämatoxylin	3 min
HCl 0,1%	kurz
fließendes Leitungswasser	5 min
Eosin	30 s
Essigsäure 0,02%	kurz
70% EtOH	1 x kurz
96% EtOH	1 x kurz
100% EtOH	1 x kurz
Xylol	1 x kurz

Die Schnitte wurden dann mit Eindeckmedium und einem Deckgläschen überschichtet.

2.4.8 Entparaffinierung und Rehydrierung von Gewebedünnschnitten

In Vorbereitung immunhistochemischer Analysen und Immunfluoreszenzfärbungen wurden die auf Objektträger aufgezogenen Dünnschnitte einer Stärke von 5 µm entparaffinisiert und rehydriert. Dies geschah über folgende Alkoholreihe und Waschstritte:

Xylol	2 x 3 min	
Xylol/EtOH (1:1)	3 min	Entparaffinierung
100% EtOH	2 x 3 min	
<hr/>		
96% EtOH	3 min	
70% EtOH	3 min	Rehydrierung
50% EtOH	3 min	
Leitungswasser (laufend)	5 min	

2.4.9 Immunhistochemische Untersuchung von Gewebedünnschnitten

Für die Immunhistochemie wurden 5 µm dicke Schnitte der Paraffin-eingebetteten Raftkulturen verwendet. Zu Beginn wurden diese Schnitte entparaffiniert und rehydriert (2.4.8). Ausgenommen der Behandlung für die Detektion von BrdU wurden alle Gewebeschnitte mit dem DAKO Puffer (Tris/EDTA, pH 9,0) für 20 Minuten in einem Dampfgerar vorbehandelt. Dies ermöglicht die Öffnung der durch den Fixierungsprozess maskierten Antigene innerhalb des Gewebes. Danach wurden die Objektträger verbleibend im DAKO Puffer langsam für 20 min in einem Wasserbad abgekühlt und anschließend 2 x 5 min mit PBS gewaschen. Alle weiteren Schritte wurden, wie im Handbuch des DAKO EnVision Kits beschrieben, durchgeführt. Die endogene Peroxidase wurde mit der Peroxidase Block Solution für 5 min bei Raumtemperatur geblockt. Anschließend wurde der Primärantikörper in der ausgetesteten Verdünnung aufgetragen und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, es wurde 3 x 5 min mit TBS-T Puffer gewaschen. Der gekoppelte sekundäre Antikörper wurde für 30 min bei Raumtemperatur aufgebracht und wiederum 3 x 5 min mit TBS-T Puffer gewaschen.

Immunhistochemische Detektion von BrdU

Da BrdU ein nukleares, DNA assoziiertes Antigen ist, benötigt es eine abgewandelte Vorbehandlung, hauptsächlich um eine Denaturierung der DNA zu ermöglichen. Hierzu wurden die Schnitte wie oben beschrieben entparaffinisert und rehydriert. Daran anschließend erfolgte die DNA-Denaturierung durch 2 M HCl für 30 min bei 37°C. Die Schnitte wurden neutralisiert durch 2 x 5min in Boratpuffer pH 9,0 und 2 x 5 minütiges Waschen in PBS. Die Auflockerung des Gewebes wurde durch die Behandlung mit Trypsin/EDTA für 20 min bei 37°C erreicht. Danach wurde ebenfalls 2 x 5 min mit PBS gewaschen. Anschließend wurde weiter nach dem Protokoll des DAKO EnVision Kits verfahren.

2.4.10 Immunfluoreszenzfärbung von Gewebedünnschnitten

Für die Immunfluoreszenzfärbungen wurden 5 µm dicke Schnitte der Paraffin-eingebetteten Raftkulturen verwendet. Zu Beginn wurden diese Schnitte entparaffiniert und rehydriert (2.4.8). Bezüglich der Protokolle sowie der Wasch- und Antikörperverdünnungspuffer (2.1.11) wurde sich an die Angaben der Hersteller des jeweiligen Antikörpers gehalten. Die Inkubation mit dem Erstantikörper entsprechender Verdünnung (2.1.15) erfolgte über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer. Die Inkubation mit dem korrespondierenden

Zweitantikörper (2.1.16) bei Raumtemperatur für 1 h. Für eine Gegenfärbung der Zellkerne wurde vor dem letzten Waschschrift 5 min mit 1,0 µg/mL DAPI in PBS inkubiert.

2.5 *In vitro* Herstellung und Analyse von Humanen Papilloma Virionen und peGFP-N1 Pseudovirionen

Die Etablierung dieser Methode in unserem Labor und nachfolgende Analyseanwendungen erfolgten auf der Grundlage des Protokolls von Buck et al. (2004).

2.5.1 *Aufreinigung und Religation des HPV16-Genoms sowie der Genommutanten*

Das vollständige HPV16-Genom lag über die BamHI Schnittstelle kloniert im pBluescribe Vektor vor (Klon 114/B). Da große Mengen der HPV16-DNA benötigt wurden und pBluescribe nur ein *low copy* Plasmid ist, wurde das Genom zu Beginn in pBluescriptKS (Fermentas, St. Leon-Rot) einen *high copy* Plasmiden ebenfalls über BamHI kloniert (2.2.10). Dieses Plasmidkonstrukt wurde für den weiteren Verlauf der Arbeit verwendet. Das lineare HPV16-Genom wurde über eben diese BamHI Schnittstellen durch folgenden Reaktionsansatz aus dem Plasmidrückrat entlassen:

HPV16_pKS (1,4 µg/µL)	8,9	µL
BamHI Puffer (10x)	5,0	µL
BamHI (10 U/µL)	1,0	µL
ddH ₂ O	35,1	µL
	50,0	µL

Wegen der hohen Menge benötigter DNA wurden jeweils 20 dieser Reaktionen angesetzt. Im Anschluss wurden die Ansätze in einem *low melting* Agarose Gel aufgetrennt (2.2.14), das lineare HPV16-Genom aus dem Gel aufgereinigt (2.2.15) und der DNA Gehalt der Lösung bestimmt (2.2.7). Für die Religation des HPV16-Genoms wurden verschiedene Reaktionsansätze ausgetestet mit unterschiedlichen DNA-Konzentrationen, eingesetzten T4-Ligaseeinheiten und Inkubationszeiten. Folgend ist der Ansatz mit den besten Ergebnissen aufgeführt:

HPV16 linear (40 ng/µl)	50,0	µL
T4 Ligase Puffer (10x)	20,0	µL
T4 Ligase (5 U/µl)	2,0	µL
ddH ₂ O	128,0	µL
	200,0	µL

Die Ligation erfolgte bei 16°C für mindestens 16 Stunden. Die DNA wurde mit 1 Volumen 7,5 M Ammoniumacetat und 2 Volumen Isopropanol für 10 min bei Raumtemperatur gefällt und 10 min und 10000 Upm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 ml 80% Ethanol gewaschen, nochmals zentrifugiert und in 200 µL TE Puffer aufgenommen.

2.5.2 *Transfection von 293T und 293TT Zellen*

293T und 293TT Zellen wurden über 2 unterschiedliche Methoden transfiziert: zum einen über Lipofection mit Lipofectamine2000 und zum anderen über die Kalziumphosphat Methode (2.4.4). Für beide Methoden wurden 16 – 24 h vor der Transfektion 9×10^6 Zellen in einer 75 cm² Kulturflasche ausplattiert. Das Medium enthielt weder Hygromycin B noch Antibiotika. Für die Transfektion wurden 13 µg des L1/L2-Expressionsplasmiden p16L1L2 sowie die gleiche Menge an aufgereinigter, rezirkularisierter HPV16-DNA verwendet. Für die Produktion von Pseudovirionen wurden dementsprechend 13 µg des peGFP-N1 Plasmiden eingesetzt. Die Präparierung der Transfektionsansätze und die Zugabe zu den Zellen erfolgten nach den jeweiligen Herstellerprotokollen. Die Zellen wurden mit den Transfektionsansätzen 4 – 6 h inkubiert und anschließend das Medium zu entsprechendem normalem DMEM (2.1.13) gewechselt. Von diesem Zeitpunkt wurde aseptisch gearbeitet und es kamen nur noch Einwegplastikartikel zum Einsatz, welche nach der Verwendung gründlich mit Incidin® Plus gewaschen wurden. Nach einer Wachstumsphase über Nacht wurden die Zellen, je nach Dichte der Kultur 1:2 oder 1:3 geteilt. Zirka 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet.

2.5.3 *Extraktion von Virionen aus 293T und 293TT Zellen und Virionmaturierung*

24 Stunden nachdem die Zellen geteilt wurden, erfolgte ihre Kollektion in 15 mL Falcon-Röhrchen. Die Zellen wurden gezählt und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 500 µL DPBS-Mg aufgenommen und in ein silikonisiertes 2 ml Kryoröhrchen überführt. Das Falcon-Röhrchen wurde nochmals mit 500 µL DPBS-Mg gewaschen und diese mit den ersten 500 µL vereinigt. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert und in einer Konzentration von 1×10^8 Zellen/mL in DPBS-Mg mit 0,25% Brij58, 0,3% Benzonase, und 2 U/100 µL Exonuklease resuspendiert. Später wurden die beiden Nukleasen nicht mehr im Lysepuffer verwendet und somit eine Enkapsidierung zellulärer DNA-Fragmente verhindert. Diese Zellyse-Suspension wurde 24 Stunden bei 37°C inkubiert, um die Zellen vollständig aufzuschließen und den Virionen die Möglichkeit zu geben, in ihre natürliche ikosaedrische

Struktur zu maturieren (Buck et al., 2005b). In den ersten Stunden wurde dabei mehrmals die Zellsuspension gut gemischt. Nach Ablauf der 24 Stunden wurde das Zelllysate für 10 min auf Eis abgekühlt und Zelldebris im Anschluss durch Zentrifugation bei 10000 Upm und 4°C für 10 min pelletiert. Der Überstand wurde in eines neues Reaktionsgefäß überführt. Das erhaltene Pellet wurde nochmals mit 250 µL DPBS gewaschen und rezentrifugiert. Der Überstand wurde mit dem aus dem ersten Extraktionsschritt vereint. Es folgte ein nochmaliger Zentrifugationsschritt bei 10000 Upm und 4°C für 10 min um letzte Zelldebris zu entfernen. Der Überstand wurde auf einen linearen OptiPrep™-Gradienten geladen.

2.5.4 Aufreinigung der Virionen über Dichtegradientenzentrifugation

Zur Aufreinigung der Virionen wurde ein linearer OptiPrep™-Dichtegradient mit Hilfe eines Gradientenformers durch Unterschichten vorgefertigt. OptiPrep™ (Sigma-Aldrich, Steinheim) ist eine 60%ige wässrige Lösung einer Dichte von 1,32 g/cm³ auf Basis des Röntgenkontrastmittels Iodixanol. Für die Aufreinigung von Virionen eignet es sich besonders, da es keine Toxizität auf mammale Zellen hat und es damit keiner weiteren Aufreinigung der erhaltenen Fraktionen des Dichtegradienten bedarf (Hermens et al., 1999). Als Ausgangslösungen zur Präparation des Gradienten wurde OptiPrep™ mit DPBS/0,8 M NaCl auf 27% (v/v) und 39% (v/v) verdünnt. In das 13,2 mL Zentrifugenröhrchen für den SW41Ti-Rotor wurde ein 3 mL „Kissen“ von 46% OptiPrep™/DPBS vorgelegt. Dies diente zur Verkleinerung des Gradienten und damit einer geringeren Verdünnung der Virionenaufreinigung. In diese so vorbereiteten Zentrifugenröhrchen wurden 27% (v/v) und 39% (v/v) OptiPrep™/DPBS mit Hilfe eines Gradientenformers durch Unterschichten eingefüllt. Die korrekte Etablierung eines linearen Gradienten wurde anhand der Kontrolle der Refraktionsindizes (2.5.5) verschiedener Bereiche des Gradienten kontrolliert. Die Gradienten wurden 8,5 h bei 38000 Upm (SW41Ti-Rotor, Beckmann Coulter) und 16°C zentrifugiert. Nachfolgend der Zentrifugation wurde vorsichtig das Zentrifugenröhrchen am Boden punktiert und die Fraktionen mittels einer Vakuumpumpe gesammelt. Das 3 mL „Kissen“ wurde verworfen. Fraktionen eines Volumens von ca. 500 µL wurden in *Protein low bind Tubes* (Eppendorf, Hamburg) gesammelt. Die Lagerung der Fraktionen erfolgte bei -80°C. Jeweils 10 µL jeder Fraktion wurden für die Analyse mittels SDS-PAGE (2.3.3) und Western Blot (2.3.6) auf Präsenz von L1 untersucht.

2.5.5 Dichtebestimmung durch Refraktionsmessung

Hierbei ist die Ablenkung des einfallenden Lichtes ein Maß für die Brechungseigenschaften einer Lösung in einem Refraktometer. Aus dem Refraktionsindex kann die Dichte der Lösung berechnet nach folgender Formel:

$$\text{Dichte } \rho = (10,5416 \times n \text{ (gemessener Index)} - 13,059) \text{ g/cm}^3$$

Für den hier verwendeten OptiPrep™-Dichtegradienten wurde eine Eichkurve anhand der Dichte und Brechungsindices von 46%, 39%, 33%, 27% und 21% OptiPrep™/DPBS erstellt. Mittels diesem war es im Anschluss möglich, für die gewonnenen Fraktionen die Dichte anhand der Refraktion zu bestimmen.

2.5.6 Extraktion von DNA aus aufgereinigten Virionen

Für die Extraktion wurden 100 µL Virionenfraktion in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt, mit 10 µL 0,5 M EDTA und 2,5 mL Proteinase K (800 µg/mL) gemischt und 30 min bei 56°C inkubiert. Danach wurden 5 µL 10% SDS hinzugegeben und weitere 30 min bei 56°C inkubiert. Das Lysat wurde mit 10 ng eines 1 kB großen Fragment von pBlueskriptKS (erhalten durch BspHI-Verdau) markiert. Dies ermöglichte später eine Einschätzung der Aufreinigungseffizienz. Das Lysat wurde in ein MaXtract™ High Density Tube (1,5 mL) überführt. Die weitere Aufreinigung folgte dem normalen Protokoll einer Phenol:Chloroform-DNA Aufreinigung. Die MaXtract™-Reaktionsgefäße erlauben dabei eine einfache Bearbeitung der wässrigen Phase in einem Tube über die gesamte Fällung hinweg. Am Ende wurde die wässrige Phase in ein neues Tube überführt, 2 µL *Pellet Paint*® *Co-Precipitant* sowie 2,6 Volumen 95% EtOH hinzugegeben und über Nacht bei 4°C die DNA gefällt. Ein DNA-Pellet wurde durch Zentrifugation bei 14000 Upm für 1 h und Raumtemperatur erhalten. Abschließend wurde einmal mit 70% EtOH gewaschen und das Pellet in 40 µL TE-Puffer aufgenommen. Für das weitere Vorgehen wurde die gewonnene DNA im Agarosegel aufgetrennt (2.2.14) und mittels Southern Blot (2.2.16) und radioaktiver Hybridisierung (2.2.18) analysiert.

2.5.7 Infektion von 293T- und HaCaT-Zellen sowie primären Keratinozyten

Eine Infektion von Zellen erfolgte mit unterschiedlichen Mengen der erhaltenen Virionenfraktionen (1 µL – 200 µL) mit dem höchsten Gehalt an L1-Protein. Hierzu wurde subkonfluenten als auch konfluenten Zellkulturen in 6-well-Platten die jeweilige Menge

Virionen in 1 mL frischem Kulturmedium hinzugegeben und für mindestens 12 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde das Medium abgenommen, zweimal mit PBS gewaschen, 2 mL frisches Medium hinzugegeben und weitere 48 h bis zur jeweiligen Analyse weiterkultiviert. Die Auswertung einer aktiven Infektion erfolgte für Pseudovirionen anhand der eGFP-Fluoreszenz oder der Expression von GFP im Western Blot (2.3.6), für eine Infektion mit HPV16-Virionen anhand der Präsenz von E1^{E4}-Transkripten mittels RT-PCR (2.2.12).

2.5.8 Elektronenmikroskopie von *in vitro* produzierten HPV16-Virionen

In Vorbereitung zur Elektronenmikroskopie wurden 50 µL OptiPrep-Fraktionen auf einem Rundfilter (Porengröße 0,22 µm) gegen PBS über Nacht dialysiert. Die Probenvorbereitung und Mikroskopie erfolgte in der Zentralen Einheit für Mikroskopie des DKFZ, Heidelberg durch Herrn Dr. K. Richter. Die Virionen wurden auf ein karbonummanteltes Probengitter aufgebracht und mit 2% Uranylacetat gefärbt. Die negativ kontrastierten Virionen wurden mittels eines Transmissionselektronenmikroskops (Phillips CM200 FEG) bei 200 kV, einer 40000fachen Vergrößerung durch eine 2k × 2k CCD-Kamera aufgenommen.

2.6 Etablierung des *in vitro* Modells auf der Basis HPV16-tragenden CRE-LOXP-Vektorsystemen in HaCaT

2.6.1 Klonierung der mutierten HPV16-Genome in den *loxp*_HPV16_*peGFP-N1*-Plasmiden

Den Ausgangsvektor erhielten wir von Prof. Dr. J. Lee. Aufgrund der uns nicht zur Verfügung stehenden Sequenz und der nicht mehr möglichen Nutzung der *SphI*-Schnittstelle des Gesamtvektors, wurde der Vektor nach den Angaben von Lee et al. (2004) neu kloniert (2.2.10) und dabei die für die *in vitro* Virionen-Produktion hergestellten HPV16-Genommutanten verwendet. Abschließend wurde die Präsenz der Basensubstitutionen im Gesamtvektor nochmals mittels Sequenzierung durch die Firma GATC Biotech AG (Konstanz) verifiziert.

2.6.2 Kotransfektion und Selektion von NIKS- und HaCaT-Zellen mit dem CRE-LOXP-Vektorsystem

Zu Beginn wurden mit anhand einer einfachen Transfektion des *peGFP-N1* Plasmiden verschiedene Transfektionsreagenzien ausgetestet für die Einschleusung von Fremd-DNA in Keratinozyten ausgetestet. Hierbei zeigte Fugene[®] HD die besten Ergebnisse sowohl in NIKS als auch HaCaT bei einem Verhältnis Fugene[®] HD : DNA von 3,5:1 (µl:µg). Die Austestung

der optimalen DNA-Menge für eine Transfektion in Kulturen einer 10 cm Schale ergab 12 µg DNA. Bei der Kotransfektion von myc-Cre zusammen mit den loxp_HPVI6_eGFP-N1-Plasmiden ergab sich ein optimales Verhältnis von 5:1 (µg:µg), was einem Molverhältnis von 2:1 entsprach. In Vorbereitung aller Experimente basierend auf dem CRE-LOXP-System wurden daraufhin 24 h vor der Transfektion $1,8 \times 10^6$ Zellen auf 10 cm Schalen ausplattiert. Zwei Stunden vor der Transfektion wurde das KGM2 durch 5 mL frisches ersetzt. Der Transfektionsansatz wurde nach den Herstellerangaben mit den ausgetesteten Parametern mit 2 µg myc-Cre, 10 µg loxP_HPVI6_peGFP-N1 und 42 µl Fugene[®] HD in einem Gesamtvolumen von 500 µL mit serumfreien KGM2 angesetzt. Für die Transfektion von NIKS wurden 2 h vor der Transfektion die Feederzellen entfernt (2.4.1) und 12 h nach der Transfektion 8×10^5 neue Feederzellen wieder hinzugefügt.

Die Selektion mit G418 erfolgte im Falle der NIKS mit 100 µg/mL, für HaCaT unter den optimierten Kulturbedingungen mit 50 µg/mL für ca. 60 h. Abschließend wurden die Zellen neu ausplattiert und für weitere 2 Tage zur Regeneration kultiviert, bevor sie als organotypische Raftkultur (2.4.5) weiterkultiviert wurden.

2.6.3 Bestimmung der Gewebestärke der organotypischen Raftkulturen

Zur Analyse wurden mindestens von 2 verschiedenen Kulturen jeder Mutante und den Kontrollen, jeweils 3 verschiedene H/E-gefärbte Schnitte mit 9 Sichtfeldern 10facher Vergrößerung ausgemessen. Zuvor wurde das Durchlichtmikroskop Leica DM LB2 mit einem Objektisch-Mikrometer kalibriert. Die Analyse erfolgte im Vektorgrafikprogramm Inkscape 0.48 in dem in die erhaltenen Bilder jedes Sichtfeldes an 4 Meßpunkten Querschnittsgeraden eingefügt und ihre Länge ins Verhältnis zum Maßbalken gesetzt wurden. Die statistische Auswertung erfolgte mit SigmaStat 3.5.

2.6.4 BrdU-Inkorporationsassay zur Detektion proliferierender Zellen

Zur Detektion proliferierender Zellen diente die Inkorporation des Nukleotidanalogs BrdU in die zelluläre DNA von Zellen, die die S-Phase des Zellzyklus durchlaufen. Hierzu wurde 12 h vor dem Aufarbeiten der organotypischen Raftkulturen dem FAD-Kulturmedium BrdU einer finalen Konzentration von 50 µg/mL zugegeben. Die Detektion von BrdU erfolgte mittels eines monoklonalen Antikörpers in der Immunhistochemie (2.4.9). Zur Analyse wurden in mindestens 2 verschiedenen Kulturen jeder Mutante und den Kontrollen, jeweils 3 verschiedene Schnitte mit 9 Sichtfeldern 5facher Vergrößerung die BrdU-positiven Zellen im

basalen Bereich und im suprabasalen Bereich des Gewebes ausgezählt. Dabei wurde aufgrund der dysplastischen Morphologie der HPV-positiven Raftkulturen die Grenze des Basalbereiches bei 3 Zellreihen oberhalb der Basallamina gesetzt. Zur Veranschaulichung der Ergebnisse wurde der Quotient aus BrdU-positiven Zellen im suprabasalen Bereich (S) zu BrdU-positiven Zellen im basalen Bereich (B) gebildet (S/B-Quotient). Die Unterschiede wurden mittels einseitiger ANOVA-Analyse (Software SigmaStat 3.5) auf statistische Signifikanz hin überprüft.

2.6.5 *Semi-quantitativer Multiplex-Papillomavirus-Genotypisierungssassay (MPG)*

Der MPG-Assay (Schmitt et al., J Clin Microbiol 2006; 2008) amplifiziert HPV DNA mittels PCR auf Basis der Weitspektrum-Primer BSGP5+/6+, wobei der reverse GP6+-Primer biotinyliert ist. Als interne DNA-Qualitätskontrolle fungiert β -Globin. Der aus der PCR erhaltene biotinylierte Strang wird anschließend mit spezifischen Oligonukleotidproben, die mit fluoreszenzmarkierten Polystyrenbeads gekoppelt sind, in einem Luminex-Gerät detektiert. Für die PCR wurden 10 μ l aus organotypischer Raftkultur extrahierter DNA (2.2.5) verwendet. Für die oben beschriebene Hybridisierung kamen 10 μ l des PCR-Produktes zum Einsatz. Der Assay wurde freundlicherweise von G. Halec in der Arbeitsgruppe von PD. Dr. M. Pawlita (DKFZ, Heidelberg) durchgeführt. Die Abschätzung der HPV16-Genomkopienzahl erfolgte anhand einer externen Standardkurve.

2.6.6 *Qualitativer RT-PCR-Assay für das E6*I-Transkript von HPV16*

Dieser RT-PCR-Assay beruht auf dem gleichen Prinzip wie der zuvor beschriebene MPG-Assay mit einer fluoreszenzbasierten Detektion im Luminex-Gerät. Verschiedene Spleißvarianten von E6 sind eine verbreitete Charakteristik von *high risk* HPV-Typen. Der RT-PCR-Assay wurde von G. Halec entwickelt und freundlicherweise für die vorliegende Arbeit von ihr durchgeführt. Für die RT-PCR wurden 1 μ l aus organotypischer Raftkultur extrahierter, DNase behandelter RNA (2.2.6) verwendet. 10 μ l der RT-PCR-Produkte wurden anschließend für die Hybridisierung und Luminex-Analyse eingesetzt. Als interne positive RNA-Qualitätskontrolle diente Ubiquitin C.

2.6.7 *Konfokale Laser-Scanning Fluoreszenzmikroskopie*

Die Fluoreszenzfärbungen der Gewebeschnitte organotypischer Raftkulturen (2.4.10) wurden mit Hilfe eines konfokalen Laser-scanning-Mikroskops LSM710 (Carl Zeiss

MicroImaging GmbH, Jena) analysiert und aufgenommen. Dabei wurde immer das Ölimmersionsobjektiv 40facher Vergrößerung verwendet (EC Plan-Neofluar 40x/1.30 Oil DIC M27). Mit diesem Objektiv wurde ein Ausschnitt von 353.90 μm x 353.90 μm erfasst. Alle Aufnahmen erfolgten als Z-Stapel von 10 Ebenen über annähernd die gesamte Schnittdicke von ca. 5 μm . Somit entsprachen die Abstände zwischen den einzelnen Z-Ebenen ca. 0,3 - 0,45 μm . Für die nachfolgende Aufarbeitung der erhaltenen Bilder wurde die ImageJ-Software (Rasband, 1997-2004) verwendet. Die Darstellung der Bilder wurde je nach Verwendung entweder als durchschnittliche oder als summierte Intensität über den Z-Stapel vollzogen. Die Methode ist jeweils unter den entsprechenden Ergebnissen aufgeführt.

2.6.8 Quantitative Analyse von p53-positiven Zellen und p53-Immunfluoreszenzintensitäten im Gewebeschnitt

Für eine vergleichende quantitative Analyse der p53-Expression in verschiedenen Raftkulturen über Immunfluoreszenz wurden die Schnitte einer Serie immer zusammen aufgearbeitet. Für die konfokale Fluoreszenzmikroskopie wurde eine Einstellung gesucht, die für alle zu untersuchenden Färbungen eine einheitliche Darstellung der Intensität der spezifischen Signale sowie einen geringen Hintergrund ermöglichte. Die Aufnahme der Färbungen erfolgte dann wie oben beschrieben (2.6.7). In ImageJ wurden die erhaltenen Z-Stapel-Immunfluoreszenzaufnahmen zu einer summierten Immunfluoreszenzaufnahme des gesamten Z-Stapels umgewandelt.

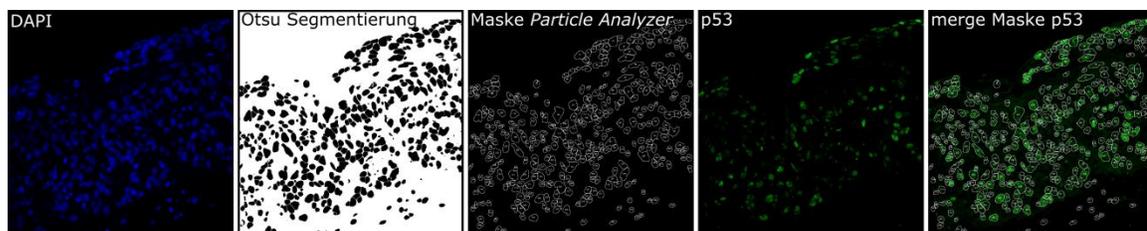


Abbildung 2.3: Aufarbeitung von Fluoreszenzbildern für eine quantitative Analyse

Erster Schritt der Analyse war eine Segmentation des erhaltenen Bildes der DAPI-Zellkernfärbung. Hierzu wurde der Otsu-Algorithmus (Otsu, 1979), der als Plugin für ImageJ vorliegt, verwendet. Das daraus erhaltene Bild (Abbildung 2.3) diente als Maske für das *Particle Analyzer*-Plugin von ImageJ. Mit diesem wurden die Zellkernfläche, die Anzahl der Zellkerne pro Sichtfeld und ihre mittlere Fluoreszenzintensität bezüglich p53 bestimmt.

2.6.9 *Statistische Auswertung*

Die statistische Auswertung erhaltener quantitativer Daten erfolgte mit Hilfe der SigmaStat 3.5-Software (Systat Software GmbH, Erkrath). Die Analyse erfolgte zuerst immer als einseitige ANOVA um die statistische Signifikanz der Unterschiede der Gruppen festzustellen. Für eine paarweise Gegenüberstellung einzelner Gruppen wurden in Abhängigkeit von der Präsenz einer Normalverteilung bzw. gleicher Varianzen entsprechende Verfahren nachgeschaltet. Diese sind bei den Ergebnissen explizit aufgeführt.

3 ERGEBNISSE

Übergeordnetes Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung eines Systems zur Untersuchung der Funktionen der Onkoproteine E5, E6 und E7 von HPV16. Diese viralen Proteine sollten unter der Kontrolle ihrer eigenen Promotoren p670 bzw. p97 und aus dem Kontext des vollständig vorhandenen Genoms exprimiert werden. Dabei galt es, zwei Hürden zu überwinden: zum einen den effizienten Transfer von HPV16-Genomen, einschließlich mutierter Genome in Targetzellen (primäre Keratinozyten, immortalisierte Keratinozyten wie NIKS und HaCaT) zu realisieren und zum anderen die Ausbildung eines differenzierten Epitheliums aus eben diesen HPV-Episom-tragenden Keratinozyten zu erreichen.

Dieses Kapitel soll sich, ähnlich dem Kapitel „Material und Methoden“, an der Entwicklung des vorliegenden Projektes orientieren. Dazu soll die Evolution beginnend mit der Nutzbarmachung der *in vitro* Virionen Produktion bis zur Etablierung eines Cre-LoxP Systems in HaCaT-Zellen und deren Kultur in dreidimensionaler Raftkultur beschrieben werden.

3.1 Etablierung der *in vitro* Virionen Herstellung

3.1.1 Herstellung mutierter HPV16-Genome

Ausgehend von einem klonierten HPV16-Genom (freundlicherweise bereitgestellt von Prof. Dr. M. Dürst, Jena, Klon 114/B) wurden 4 mutierte Genome hergestellt. Diesen Mutanten wurde innerhalb der ersten 5 Codons der ORF von E5, E6 und E7 sowie bei der Doppelmutante jeweils in E6 und E7 ein Stopp-Codon eingefügt. Diese geschah mittels Mutagenese-PCR. Zur Vermeidung PCR-basierter Fehler in anderen Bereichen des Genoms wurden Subfragmente in pBluescriptKS Vektoren kloniert, um somit die Länge der PCR-Läufe zu verringern. Positive Klone wurden durch Sequenzierung auf Richtigkeit überprüft und die Fragmente in die Ausgangsgenome zurückkloniert. Die Verwendung der Genome für die *in vitro* Virionen-Produktion in 293T bzw. 293T⁺-Zellen erforderte die Verwendung von rezirkularisierten Genomen. Dazu wurden die HPV16-Sequenzen durch die BamHI-Schnittstelle aus dem Vektorrückgrat entlassen, über Gelelektrophorese aufgetrennt und aus

dem Agarosegel aufgereinigt. Verschiedene Techniken für die Aufreinigung wurden ausgetestet, um eine möglichst effektive Produktionsrate bei der Gewinnung von Genomen zu gewährleisten. Dabei stellte sich eine Kombination aus Auftrennung in einem 0,8%igen *Low Melting* Agarose Gel und Aufarbeitung mit dem Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit als optimal heraus. Hiermit wurde eine relativ hohe Wiedergewinnungsrate von ca. 50% der Ausgangsmenge DNA mit einem geringen Verschmutzungsgrad an verbleibender Agarose, die den folgenden Religationsprozess inhibierte, erreicht. Beste Ergebnisse bei der Rezirkularisierung ergaben sich bei einer Konzentration von kleiner 50 ng/μL und Anwesenheit von 2 U/mL T4 DNA Ligase (Fermentas). Trotzdem wurde nur ein Bruchteil als monomeres zirkulares Genom zurückgewonnen. Ein Teil blieb unligiert bzw. formte Polykonkatemere. Die finale Effizienz der Herstellung zirkulärer HPV-Genome, bezogen auf die Ausgangsmenge an Plasmid-DNA, lag damit unter 10%.

3.1.2 Produktion und Aufreinigung infektiöser Virionen

Die Entwicklung eines Neutralisationsassays für infektiöse HP-Pseudovirionen durch die Gruppe von John T. Schiller (Buck et al., 2004, 2005a) und die Weiterentwicklung hin zur Herstellung infektiöser HP-Virionen des Typs 16 und 31 (Pyeon et al., 2005; Smith et al., 2007a) eröffnete eine neue Möglichkeit für die Erforschung der HPV-Biologie. Diese Methode wurde in unserem Labor etabliert, um sie für die Untersuchung mutierter HPV16-Genome nutzbar zu machen.

Das System basiert auf der Kotransfektion eines Expressionsvektors für die Kapsidproteine L1 und L2 mit humanisierter Codonnutzung unter der Kontrolle des SV40-Promotors in Kombination mit dem rezirkularisierten HPV16-Genom in 293T- bzw. 293TT-Zellen. Innerhalb der Zellen kommt es zu einer Zusammenlagerung der Kapside und damit der Umhüllung des Genoms. Dem Aufschluss der Zellen folgt eine Inkubation des Zellysates bei 37°C für 24 Stunden. In dieser Zeit maturieren die Virionenhüllen (Buck et al., 2005b). Zur Aufreinigung der Viruspartikel wird das Zellysate über einen linearen Iodixanol-Gradienten (Optiprep-Gradienten) eines Dichtebereiches von ca. 1,14 g/cm³ bis ca. 1,20 g/cm³ aufgetrennt. Die Fraktionen wurden durch Immunoblot gegen L1 sowie Southern Blot und Hybridisierung von HPV16 nach dem höchsten Anteil an Virionen untersucht.

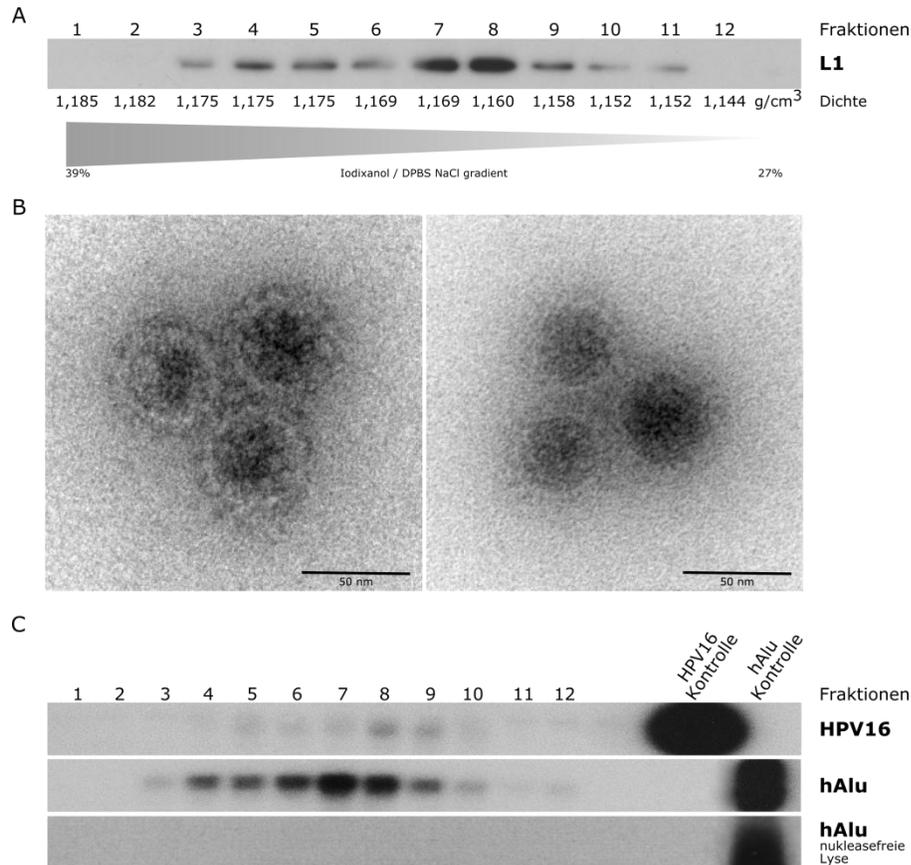


Abbildung 3.1: Virionenfraktionen und EM Struktur

A: Western Blot Analyse der erhaltenen Virionenfraktionen von hoher (1) hinzu niederer Dichte (12). Die Fraktionen entsprachen jeweils 500 µl aus einem Gesamtvolumen des Gradienten von 7 ml. Für die Elektrophorese wurden jeweils 10 µl jeder Fraktion verwendet.

B: Elektronenmikroskopische Aufnahmen präparierter Virionen als Negativfärbung.

C: Southern Blot-Analyse der enkapsidierten DNA produzierter Virionen. Die enkapsidierte DNA wurde aus den erhaltenen Virionen extrahiert und nach dem Southern Blot mit spezifischen radioaktiv markierten Proben detektiert: oberes Bild HPV16, mittleres Bild humane Alu-DNA-Sequenzen (hAlu), beides aus Virionenaufreinigungen nach der Zelllyse folgend dem Protokoll von Buck et al. (2004). Das untere Bild zeigt den Southern Blot und die Detektion von hAlu-Sequenzen nach einer angepassten Virionenaufreinigung ohne Nukleasen im Zellysepuffer.

Die Fraktionen einer Dichte zwischen 1,16 g/cm³ und 1,17 g/cm³ (Fraktionen 7, 8 und 9) enthielten den höchsten Anteil an L1 Protein übereinstimmend mit den stärksten Signalen von HPV16-DNA (Fraktion 8 und 9) (Abbildung 3.1 A & C). Durch den Vergleich mit einer Verdünnungsreihe aufgereinigtem L1-Proteins (freundlicherweise von Frau Dr. L. Schädlich zur Verfügung gestellt) in einem Silber-gefärbten Gel konnte der Virustiter dieser Fraktionen bestimmt werden. Die Titer lagen über 3 Virionenpräparationen zwischen 9 x 10⁷/µL und 4 x 10⁸/µL. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten die strukturelle Integrität der Partikel. Die Virionen zeigen die typische eicosahedrische Form (Abbildung 3.1 B). Deutlich war der Aufbau aus Kapsomeren zu erkennen. Die Kapsidgröße lag bei ca. 50 nm. Bilder aus verschiedenen Bereichen des Gradienten unterschieden sich nur geringfügig voneinander. Aus

den Fraktionen geringer Dichte (Fraktionen 10 – 12) konnten keine Bilder von Virionen erhalten werden. Bei der Analyse der enkapsidierten DNA war bereits im Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel eine sehr hohe Menge im Größenbereich um 8 kb auffällig. Anhand der Detektion mit radioaktiv markierten Sonden konnte auf dem Southern Blot gezeigt werden, dass der Hauptteil dieser DNA genomischen Ursprungs der 293T Zellen war. Im weiteren Verlauf konnte die Enkapsidierung zelluläre DNA durch einer Veränderung des Lysepuffers ohne Nukleasen unterbunden werden (Abbildung 3.1 C).

3.1.3 Infektion von Targetzellen mit in vitro produzierten Pseudo- und HPV16-Virionen

Um zu testen, inwieweit die produzierten Virionen auch infektiös waren, wurden verschiedene Mengen an aufgereinigter Virionpräparation dazu genutzt, Zellen zu infizieren. Als erste Kontrollen der Produktion und Aufreinigung dienten Pseudovirionen, die ein peGFP-Plasmid trugen. Mit diesen wurden 293T bzw. HaCaT-Zellen infiziert. Bei der Anwendung auf 293-Zellen konnte mit nur 1 μ l der Fraktion höchster L1-Menge eine sehr hohe Transduktionsrate erreicht werden (Abbildung 3.2).

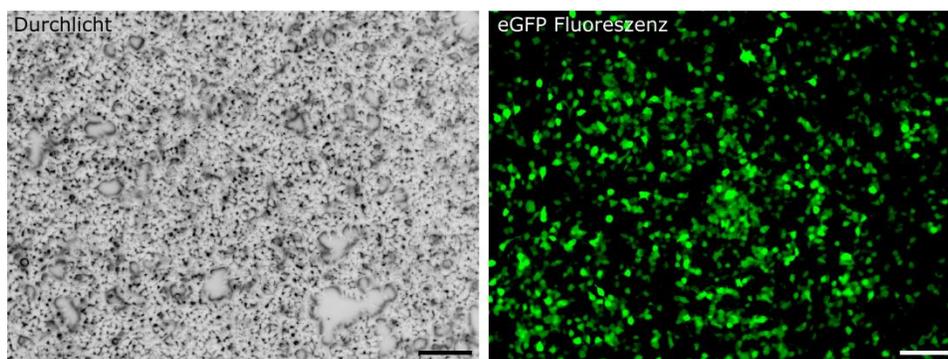


Abbildung 3.2: GFP Fluoreszenz peGFP-N1-Pseudovirionen infizierter 293TT Zellen

293TT Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen der Virusfraktion mit dem höchsten L1-Gehalt infiziert. Exemplarisch hier gezeigt die Verwendung von 5 μ l Virusfraktion und Infektion für 4 Stunden in 500 μ l serumfreien Medium. Maßbalken entspricht 50 μ m.

Dieses Bild konnte in HaCaT-Zellen nicht bestätigt werden. Hier waren nur vereinzelt Zellen mit GFP-Expression nachzuweisen. Die Immunoblotanalyse zeigte eine steigende Expression mit der Erhöhung der eingesetzten Fraktionsmenge (Daten nicht dargestellt). Als natürliches Zielmodell der Infektion mit HPV16-Virionen dienten primäre Keratinozyten und HaCaT-Zellen. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen beginnend mit 5 μ l bis maximal 100 μ l der erhaltenen Virusfraktion höchsten L1-Gehaltes infiziert. Für das Readout wurde 4 Tage nach der Infektion die RNA aus den Zellen extrahiert und über RT-PCR das *early spliced* Transkript E1^{E4} detektiert. In HaCaT konnte bei einem hohen Einsatz an aufgereinigter RNA, cDNA und hoher Zykluszahl die Transkription nur nach Nested-PCR

gezeigt werden. Dabei war ein leichter Anstieg der Transkriptmenge mit anwachsender Virionenmenge festzustellen. Bei primären Keratinozyten konnte trotz erhöhter Virionenmenge für die Infektion, eingesetzter RNA für die RT-PCR sowie einer Erhöhung der Zykluszahl keine Transkription und damit keine Infektion nachgewiesen werden. Desgleichen erbrachten veränderte Infektionsbedingungen mit höherer Konfluenz der Zellkultur und ein Binden der Virionen bei 4°C für 30 Minuten keine besseren Ergebnisse.

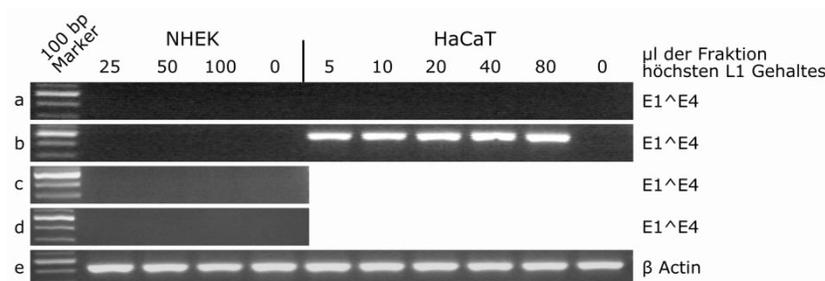


Abbildung 3.3: Nachweis aktiver Infektion von Keratinozyten durch HPV16-Virionen mittels E1^{E4} RT-PCR.

Für die RT-PCR des frühen Transkripts E1^{E4} wurden jeweils 1 µg extrahierter mRNA von NHEK bzw. HaCaT Zellen verwendet, die zuvor mit unterschiedlichen Mengen (5 µl bis 100 µl) derjenigen Virusfraktion infiziert wurden, die den höchsten L1-Gehalt im Western Blot aufwiesen. **a:** einfache RT-PCR mit äußerem Primerpaar, 32 Zyklen; **b:** nested PCR inneres Primerpaar, Einsatz von 5% des RT-PCR Ansatzes, 32 Zyklen; **c:** nested PCR, Einsatz von 10% der RT-PCR, 36 Zyklen; **d:** nested-PCR, Einsatz von 20% der RT-PCR, 40 Zyklen; **e:** Kontrolle β-Actin, RT-PCR 1 µg mRNA, 32 Zyklen

3.2 Entwicklung eines *in vitro* Modells mittels HPV16-tragenden CRE-LOXP-Vektorsystemen in HaCaT-Raftkulturen

3.2.1 NIKS bilden nur unzureichend epidermale Strukturen im Raft-Modell

Es erscheint wichtig schon hier darzustellen, dass NIKS nur unzureichend epidermale Strukturen bei der Verwendung von transfizierten Zellen im Raft-Modell bilden, da es die Zwangsläufigkeit der folgenden Abschnitte hin zu der finalen Verwendung der HaCaT-Zelllinie begründet. Zudem wird dadurch plausibel, warum alle weiteren Ergebnisse spezifisch für die HaCaT-Zelllinie dargestellt werden.

Als Ersatz für primäre Keratinozyten, besonders bei der Herstellung von hautähnlichen 3D-Modellen *in vitro*, wird die immortalisierte Zelllinie NIKS auf Grund ihres konservierten Differenzierungspotentials in der HPV-Forschung sehr häufig verwendet (Allen-Hoffmann et al., 2000; Flores et al., 2000; Hoffmann et al., 2006; Nakahara et al., 2005). Auch in dem vorliegenden Projekt wurden alle Etablierungsschritte zunächst mit NIKS durchgeführt (vergleiche 3.2.3). Wie in den folgenden Abschnitten ausführlicher beschrieben wird, wurden Zellen mit einer Kombination des entsprechenden loxp-HPV16-peGFP-N1-Plasmids, des

myc-Cre-Expressionsplasmids und Fugene[®] HD im Verhältnis 5 : 1 : 3,5 (m/m/V) transfiziert. Dies entsprach einem Molverhältnis der Plasmiden von 2 : 1. Die Zellen wurden anschließend selektioniert und auf dermalen Äquivalenten aus Kollagen I und Mausfibroblasten mit einer Dichte von 2×10^5 Zellen/cm² ausplattiert und bis zu 100%iger Konfluenz (max. 2 Tage) in FAD-Medium kultiviert. Danach erfolgte das Anheben der Kultur an die Medium-Atmosphären-Interphase. Nach 14 Tagen wurde die Raft-Kultur mindestens 24 Stunden in Formalin fixiert und abschließend in Paraffin eingebettet. Für die Histologie wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt.

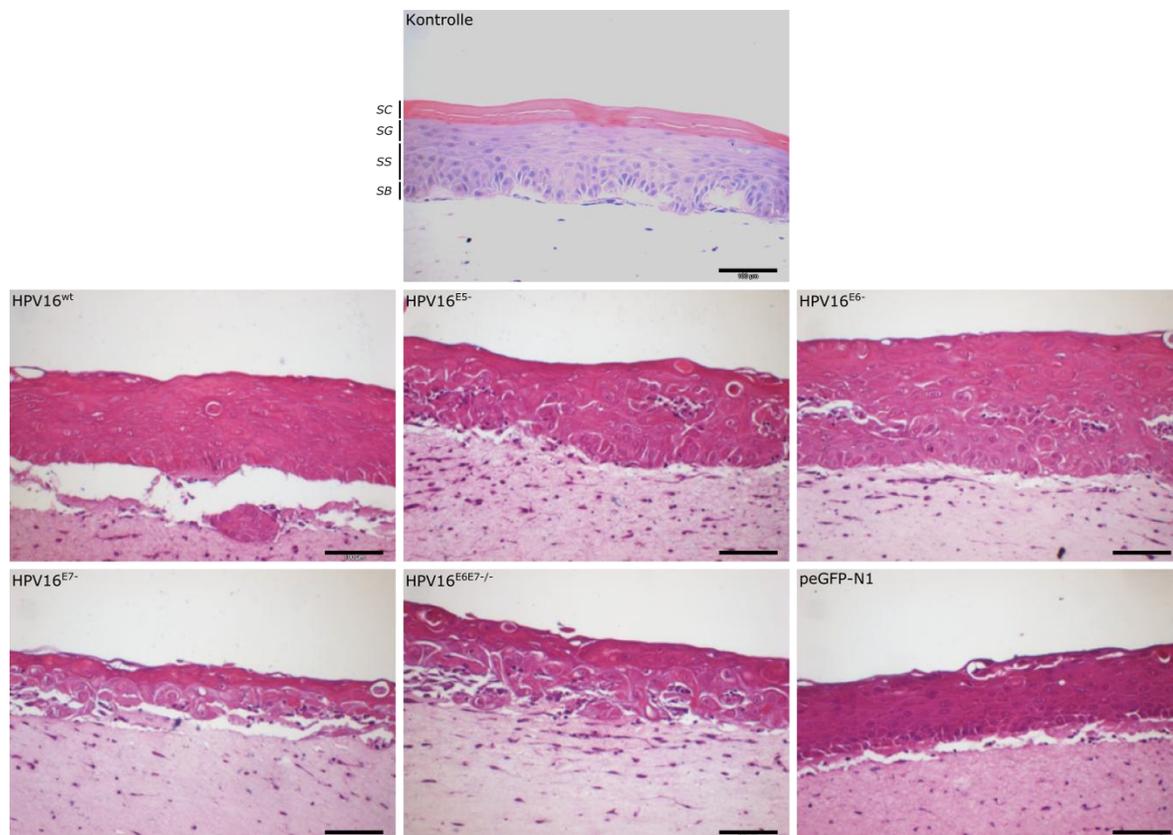


Abbildung 3.4: Histologie HPV-positiver NIKS Raft-Kulturen

Nicht-transfizierte sowie transfizierte und selektionierte NIKS-Zellen wurden mit einer Dichte von 2×10^5 Zellen/cm² auf dermalen Äquivalenten aus Kollagen I (Rattenschwanz) und Mausfibroblasten (NIH3T3) ausgesät, bis zu einer geschlossenen Zellschicht (max. 2 Tage) unter FAD-Medium inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen an der Medium-Atmosphären-Grenze 14 Tage kultiviert. Die Rafts wurden zur Aufarbeitung in 10% Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und 5 µm Mikrotomschnitte mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. SB *Stratum basale*, SS *Stratum spinosum*, SG *Stratum granulosum*, SC *Stratum corneum*. Maßbalken entspricht 100 µm.

Abbildung 3.4 zeigt ausgewählte Beispiele der erhaltenen Hautmodelle. Das obere Bild repräsentiert die Null-Kontrolle nicht-transfizierter NIKS, die sehr gut eine normale Hautmorphologie aufwies. Deutlich war der Basalbereich (*Stratum basale*, SC), bestehend aus einer Zellschicht, in der die Zellkörper größer erschienen als im oberen Bereich des Gewebes und palisadenartig aufgereiht waren, zu erkennen. Das *Stratum spinosum* (SS) und das *Stratum*

granulosum (SG) bauten sich jeweils aus ca. 4 bzw. 2 Zellschichten auf. Das abschließende *Stratum corneum* (SC), deutlich als Keratinschicht erkennbar, umfasste ca. $\frac{1}{4}$ des Gesamtgewebes. Im Gegensatz hierzu war die Morphologie aller Raft-Kulturen von transfizierten Zellen ungeordnet und lies keine Differenzierung der einzelnen Schichten zu. Ein *Stratum corneum* war in keinem Fall ausgebildet. Zudem handelte es sich bei den erhaltenen Geweben um sehr inhomogene Kulturen. Über den gesamten Querschnitt einer Gewebekultur waren verschiedenste Morphologien ausgebildet. Die Auswahl der oben dargestellten Bilder (Abbildung 3.4) repräsentiert die Bereiche, die am ehesten einer Hautmorphologie entsprachen. Der Großteil aller Kulturen war dem hier gezeigten Bild der HPV16^{E7}-Mutante gleich mit einem sehr aufgelockerten Zellverband, der kaum 4 Zellschichten überstieg. Auffällig war ebenfalls eine erhöhte Ansammlung von Mausfibroblasten unterhalb der Basallamina bis hin zu einer Infiltration in das Hautgewebe, wie bei HPV16^{E5} erkennbar.

3.2.2 Optimierung der HaCaT-Kulturbedingungen

Da eine epidermisähnliche Ausbildung von Raft-Kulturen bei Verwendung eines transfektionsbasierten Ansatzes für NIKS-Zellen ausblieb, wurde als Alternative eine Etablierung mit HaCaT-Zellen präferiert. Dazu war initial eine Optimierung der Wachstumsbedingungen dieser Zellen als Monolayer-Kultur erforderlich. Dafür wurde an vier essentiellen Stellen Veränderungen in den Kulturbedingungen vorgenommen, die hinsichtlich einer keratinozytenspezifischen Entwicklung der HaCaT-Zellen ungünstig eingestellt waren. Als erstes wurden Zellen einer sehr frühen Passage (33) des Originalisolates verwendet [freundlicherweise von Prof. Dr. P. Boukamp zur Verfügung gestellt (Boukamp et al., 1988)]. Diese Zellen wurden in DMEM/10% FCS/1,8 mM Calcium gehalten, ca. alle 10 Tage gesplittet bzw. frühestens 3 Tage nach dem Erreichen 100%iger Konfluenz subkultiviert. Dies ermöglichte den Erhalt der „HaCaT-Mischkultur“ und beugte einer positiven Selektion hinzu hochproliferativen Zellfraktionen vor (mündliche Absprache des Kulturprotokolls mit Prof. Dr. Boukamp). Bereits hier war ein deutlicher Unterschied der Morphologie im Vergleich mit Zellen nach sehr hoher Passagerate (>100) zu erkennen. Sie erschienen nun größer und deutlicher voneinander abgegrenzt. Diese Zellen bis maximal Passage 40 dienten als Stockkultur für alle weiteren Verfahren. Für die Experimente wurden Zellen in Wachstumsbedingungen überführt, die der Kultivierung primärer Keratinozyten entsprachen und nachfolgend weiter modifiziert.

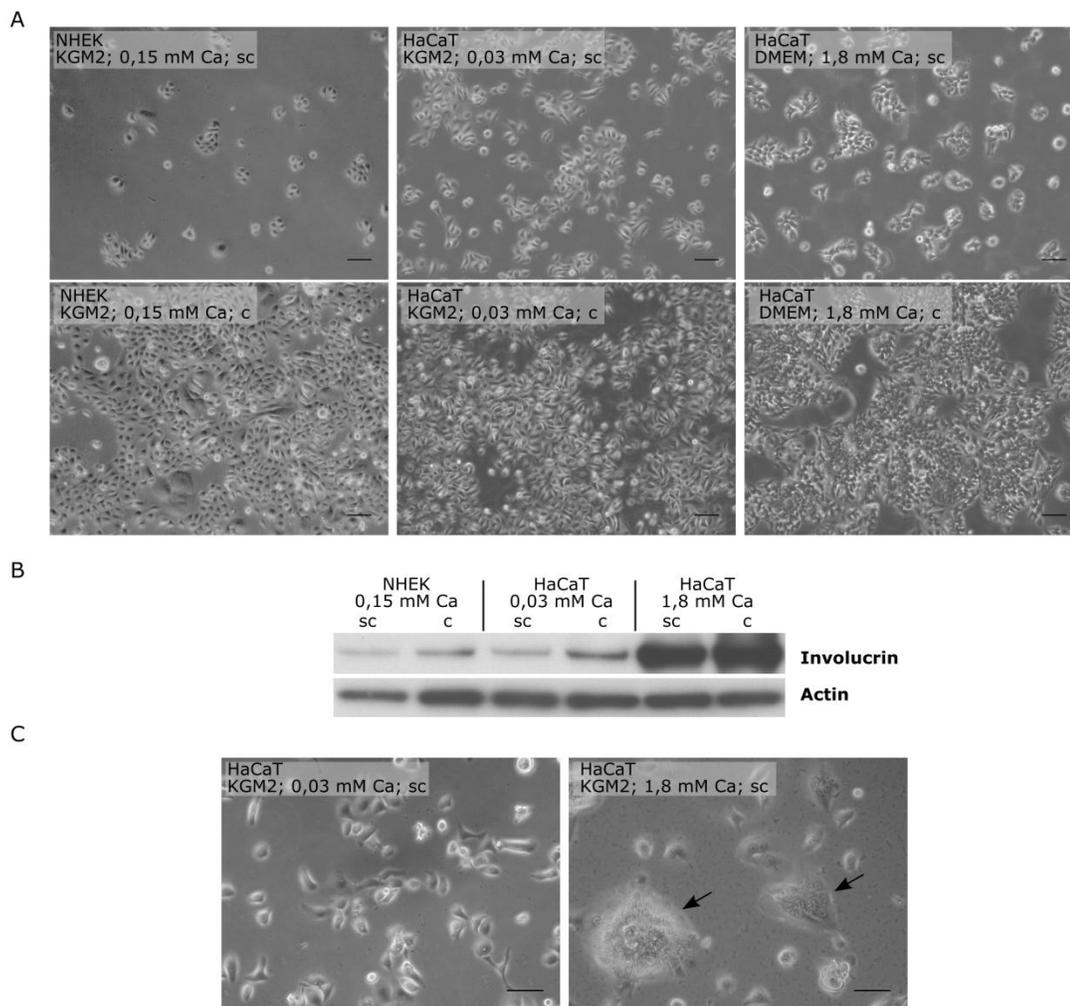


Abbildung 3.5: Einfluß der Kulturbedingungen auf den Differenzierungsgrad von HaCaT

A: Durchlichtaufnahmen von HaCaT Zellen kultiviert in unterschiedlichen Medien mit verschiedenen Kalziumkonzentrationen (Vergrößerung 10x). Der Vergleich zeigt von links nach rechts als Referenz NHEK in KGM2 mit 0,15 mM CaCl₂, HaCaT ebenfalls in KGM2 Medium mit niedrigstem Kalziumgehalt und HaCaT unter Standardkulturbedingungen in DMEM mit 1,8 mM CaCl₂. Jeweils untereinander befinden sich die entsprechenden Bilder bei niedriger Zelldichte (sc) und bei hoher Zelldichte (c). Maßbalken 25 µm.

B: Veränderung der Expression des Differenzierungsmarkers Involucrin. Dargestellt als Western-Blot-Analyse von 10 µg SDS-Zellextrakt in Abhängigkeit von der Kalziumkonzentration des Mediums und der Konfluenz der Kultur. NHEK dienen wiederum als Referenz für primäre Keratinozyten.

C: Erhöhung des Ca-Gehaltes induziert Auswachsen als Foci. HaCaT Zellen wurden wie beschrieben unter den angepassten Bedingungen kultiviert. Anschließend wurde die Kalziumkonzentration des KGM2 Mediums auf 1,8 mM (entsprechend der von DMEM Medium) erhöht. Die Zellen bildeten fortan keine einheitliche Monolayer-Kultur mehr, sondern wuchsen als Foci aus (markiert mit Pfeilen, rechtes Bild). Maßbalken 25 µm.

Primäres Ziel dieser Optimierung der Kulturbedingungen war es, den Differenzierungsgrad zu beeinflussen. Zwei Faktoren, die differenzierungsinduzierend wirken, sind hierbei maßgeblich bei der Kultur als Monolayer zu beachten: die Kalziumkonzentration und die optimale Anzahl an Zell-Zell-Kontakten (Deyrieux and Wilson, 2007). HaCaT-Zellen wurden fortan statt in DMEM in spezifischem Keratinozytenmedium [Keratinozyte Growth Medium 2

(KGM2), PromoCell GmbH, Heidelberg] kultiviert. Dieses Medium weist eine Zusammensetzung auf, die für die Zucht von primären Hautzellen optimiert wurde. Die Kalziumkonzentration des Mediums beträgt üblicherweise 0,15 mM und wurde nochmals auf 0,03 mM reduziert (nach Deyrieux and Wilson, 2007). Ebenfalls wurde das Erreichen von 100%iger Konfluenz unterbunden indem die Kultur bei maximal 80% geteilt wurde. Wie Abbildung 3.5 A darstellt, waren HaCaT Zellen im Medium mit hoher Kalziumkonzentration relativ klein und besaßen eine flache Zellform. Zellen in KGM2 hingegen waren deutlich größer und wiesen eine rundere und erhabene Struktur auf. Ebenfalls grenzten sich die Zellen in 0,03 mM CaCl_2 durch größere Interzellularräume auffällig voneinander ab. Somit bewirkten die Änderungen der Kulturbedingungen einen drastischen Morphologiewechsel der HaCaT Zellen, die sich phänotypisch kaum noch von primären Keratinozyten unterschieden (Abbildung 3.5 A).

Anhand des Differenzierungsmarkers Involucrin, dessen Expressionsgrad die Reifung von Keratinozyten kennzeichnet (primäre Zellen zeigen niedrige, ausdifferenzierte Keratinozyten hingegen hohe Expression), konnte der Einfluss der Kulturbedingungen auf die unterschiedliche Entwicklung von HaCaT-Zellen auf Proteinebene nachgewiesen werden. So wiesen Zellen, die unter hoher Kalziumkonzentration (1,8 mM in DMEM) gehalten wurden, eine sehr hohen Proteingehalt von Involucrin auf. Hingegen zeigten Zellen in niedriger Kalziumkonzentration einen erniedrigten Involucringehalt. Da die Standardkultivierung jeweils bei hoher Konzentration erfolgt, befinden sich diese Zellen in einem hohen Differenzierungsstatus. Das ist durch die Überführung in KGM2 und zusätzlich deutlicher Reduktion von Kalzium umkehrbar. Die Menge an Involucrin ist dann der von primären Keratinozyten sehr ähnlich. Ebenfalls bemerkenswert ist der Expressionsanstieg bei Erreichen einer hohen Dichte der Monolayer-Kultur (Abbildung 3.5 B).

Noch drastischer fiel die Veränderung des Differenzierungsgrades bei veränderten Kulturbedingungen auf, wenn wenig differenzierte HaCaT-Zellen erneut einer hohen Kalziumkonzentration ausgesetzt wurden. Dazu wurde dem optimierten Kulturmedium (KGM2, 0,03 mM Ca) 24 Stunden nach Ausplattierung von $1,5 \times 10^4$ Zellen/ cm^2 Kalzium bis zu einer finalen Konzentration von 1,8 mM (normalem DMEM entsprechend) zugefügt. Bereits nach 12 Stunden wurden folgende Veränderungen sichtbar. Vereinzelt wachsende Zellen erschienen unverändert in ihrer Morphologie, während solche in Zellgruppen und damit hoher Anzahl von Zell-Zell-Kontakten die reguläre eindimensionale Kultur verließen und als Foci auswuchsen. Damit ging auch eine Veränderung der Zellgestalt hinzu geringerer Größe

und inhomogener Struktur einher (Abbildung 3.5, rechtes Bild, Pfeilmarkierungen). Diese Veränderungen manifestierten sich innerhalb der nächsten 24 Stunden weiter und waren nicht reversibel, bestanden also auch bei erneuter Reduktion der Kalziumkonzentration im Medium weiter (Daten nicht dargestellt).

3.2.3 Etablierung des CRE-LOXP-Systems

Zwei bisher nicht befriedigend gelöste Probleme hemmen den Erkenntnisfortschritt im Rahmen der HPV-Forschung, bei der ein *in vitro* System genutzt werden soll, das die natürliche Situation der viralen Infektion bzw. der viralen Proteinfunktionen realisieren soll. Zum einen ist die Expression der viralen Proteine streng verknüpft mit dem Differenzierungsprozess der Wirtszellen und zum anderen gestaltet sich die Etablierung episomaler Virusgenome in einer großen Fraktion der Zellen einer Kultur schwierig. Letzteres konnte bisher nur dadurch umgangen werden, indem die Fähigkeit von *high-risk* HPV ausgenutzt wurde, die Lebensspanne primärer Keratinozyten zu verlängern oder sie zu immortalisieren.

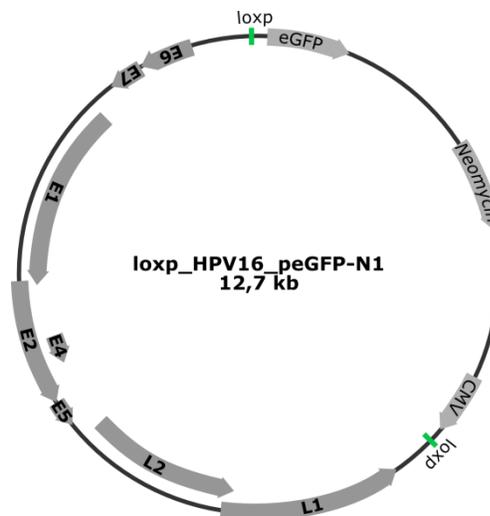


Abbildung 3.6: Plasmidkarte von loxp_HP16_peGFP-N1

Das Plasmid setzt sich aus 2 Hauptbestandteilen zusammen, dem HPV16-Genom (bzw. deren verschiedene Mutanten) und dem peGFP-N1 Rückgrat. Das HPV16-Genom ist an der *SphI*-Schnittstelle in der LCR geöffnet. Hier ist es zwischen zwei 34 Basenpaare bestehenden loxp-Erkennungssequenzen (grün markiert) kloniert. Die Position der loxp-Sequenzen interferiert dabei nicht mit Bindestellen oder dem Promotor p97 in der LCR. Das so modifizierte HPV-Genom ist in reverser Orientierung in den peGFP-N1-Vektor eingebunden. Damit stehen die viralen Gene im unrekombinierten Zustand des Plasmiden nicht unter der Kontrolle des CMV-Promotors von peGFP-N1. Außerdem trennt das HPV16-Genom den ORF von eGFP vom Einfluss des CMV-Promotors.

Da die vorliegende Arbeit aber die Verwendung mutierter HPV16-Genome einschließen sollte, die über die Fähigkeit der Lebensverlängerung bzw. Immortalisierung nicht mehr verfügten, war ein anderer Ansatz für die Etablierung von HPV16-Episomen in großer Anzahl erforderlich. Hierfür bot sich die Cre/LoxP-Methode an. Die Arbeitsgruppe Lee verwendete

erstmals ein Cre/LoxP-System auf der Basis von 2 adenoviraler Shuttle-Vektoren, welches die Schwierigkeit sehr geringer Transfektionsraten in Keratinozyten umging. Ein Vektor trägt dabei das HPV16-Genom flankiert von 2 LoxP-Sequenzen in reverser Orientierung zum CMV-Promotor vor und dem eGFP-ORF hinter diesen. Der andere Vektor den *open reading frame* für die Cre-Rekombinase ebenfalls unter der Kontrolle eines CMV-Promotors. Nach Transduktion in die Keratinozyten bewirkt die Rekombinase das Ausschneiden und die intrazelluläre, homologe Rekombination der Sequenzen, die von LoxP eingeschlossen werden. Das Rekombinationsereignis lässt sich anhand der Expression von GFP verfolgen. Das HPV-Genom persistiert somit in den infizierten Zellen als Episom (Lee et al., 2004). Um dieses System nutzen zu können, musste es in der Art modifiziert werden, dass es möglich war, auch mutierte Genome mit hoher Effizienz und hoher Kopienzahl in Keratinozyten zu etablieren. Als Grundlage für diesen Ansatz wurde ein Zwischenprodukt der Klonierung des Ad/HPV16/eGFP gewählt, das uns freundlicherweise von Dr. Lee zur Verfügung gestellt wurde. Dieses Plasmid bestand aus dem Grundgerüst des peGFP-N1-Vektors in das das beidseits durch loxP flankierte HPV16-Genom kloniert war. Der entscheidende Vorteil bei der Verwendung dieses Vektors besteht in der Möglichkeit zur Selektion durch eine vorhandene Neomycin-Resistenz auf dem peGFP-N1-Plasmid.

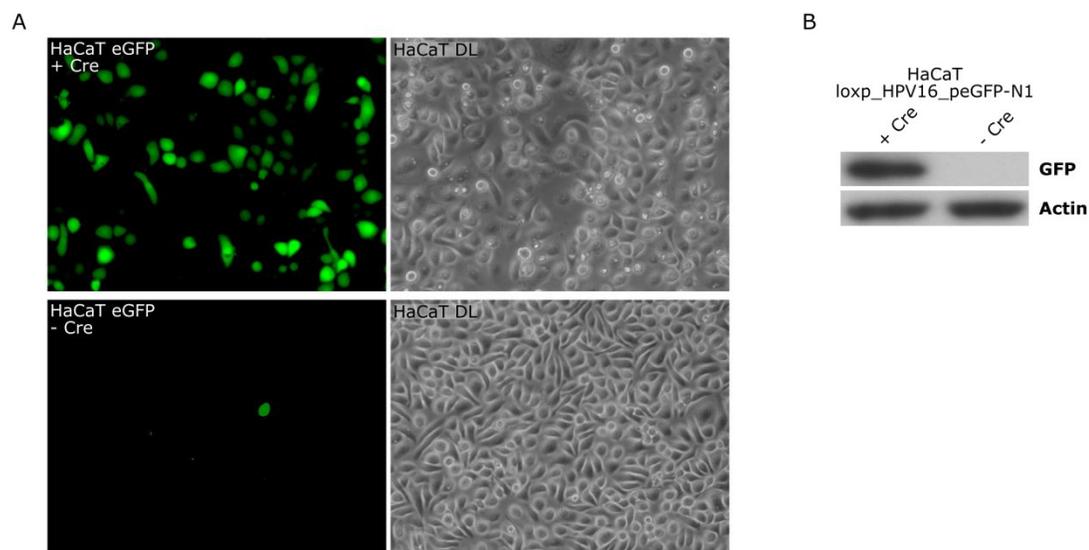


Abbildung 3.7: GFP Expression nach Rekombination des loxp_HP16_peGFP-N1 Vektors in HaCaT
A: eGFP Fluoreszenz nach intrazellulärer Rekombination des Plasmiden. 32 Stunden nach erfolgter Transfektion mit 10 µg loxp_HP16^{wt}_peGFP-N1, 2 µg myc-Cre, 42 µl Fugene HD wurden die Zellen am Durchlichtfluoreszenzmikroskop begutachtet. DL = Durchlicht, Objektiv 20x.

B: Nachweis der Rekombination durch eGFP-Expression im Western Blot. Jeweils 10 µg SDS-Zellextrakt gewonnen 32 Stunden nach Transfektion aus Zellen kotransfiziert mit Rekombinase (+ Cre) bzw. ohne Rekombinase (- Cre).

Wir klonierten die bereits vorhandenen HPV16-Genommutanten in dieses Konstrukt und verifizierten das Vorhandensein der entsprechenden Stopp-Kodons nochmals durch Sequenzierung. Die Klone wurden dann in rekombinationsinhibierte (*recA*⁻) JM109 *E. coli* Bakterien zur Amplifikation transformiert. Trotz *recA*⁻ zeigten die Präparationen der Plasmide jedoch geringfügige Verunreinigungen rekombinierter peGFP-N1-Plasmide. Anschließend wurden die Bedingungen für eine Kotransfektion von loxP_HP16_peGFP-N1-Plasmid und myc-Cre-Plasmid optimiert. Dies erfolgte wegen der eGFP-Expression nach Rekombination durch eine einfache visuelle Begutachtung. Insgesamt wurden verschiedene Transfektionsreagenzien (Fugene[®] 6, Lipofectamine2000, Transfect Plus, Superfect) ausgetestet, wobei Fugene[®] HD die besten Ergebnisse erbrachte. Weiterhin wurde auch das optimale Verhältnis der beiden Plasmide zueinander und zur Menge Transfektionsreagenz verifiziert. Optimal für eine Transfektion von NIKS als auch HaCaT war das Verhältnis Fugene[®] HD : DNA von 3,5 : 1 (μl : μg) und von myc-Cre : loxP_HP16_peGFP-N1 von 5:1 (μg : μg), entsprechend einem Molverhältnis von 2 : 1. Für alle weiterführenden Experimente wurden 24 Stunden vor der Transfektion $1,8 \times 10^6$ Zellen auf 10 cm Schalen ausplattiert. Zwei Stunden vor der Transfektion wurde das Medium durch 5 mL frisches ersetzt und danach die Zellen mit 2 μg myc-Cre, 10 μg loxP_HP16_peGFP-N1 und 42 μl Fugene HD in 500 μL serumfreien KGM2 behandelt. Auf diese Weise konnte eine Transfektionseffizienz von bis zu 50% erreicht werden. Wie in Abbildung 3.7 A ersichtlich, wurde eine effiziente Transfektion anhand der Expression von eGFP nach erfolgter Rekombination durch Cre, hier in einer nicht selektionierten Kultur, nachgewiesen. Auch bei fehlender Cre waren sehr vereinzelt eGFP-positive Zellen vorhanden. Dies ist auf die bereits erwähnten Verunreinigungen der DNA-Präparationen zurückzuführen. Im Western Blot zeigte sich nochmals deutlicher die GFP-Expression nach erfolgter Rekombination (Abbildung 3.7 B). Die Expression von GFP war frühestens ca. 24 Stunden nach Transfektion schwach nachweisbar und erreichte innerhalb von ca. 48 Stunden ein Maximum. Deshalb wurde mit der Selektion 48 - 54 h nach der Transfektion begonnen. Dabei fiel ein weiteres Phänomen der veränderten Kulturbedingungen für HaCaT auf: Die üblicherweise erforderliche Konzentration von 1 mg/mL G418 zur Selektion konnte auf 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ reduziert werden, so wie bei primären Keratinozyten üblich. Die Selektionsdauer betrug ca. 60 Stunden. Trotz dieser deutlichen Reduktion waren danach etwa die gleiche Anzahl vitaler GFP-negativer Zellen und abgelöster GFP-positiver Zellen zu erkennen. Die selektionierten Zellen wurden nach dieser Zeit neu ausplattiert und für weitere 2 Tage kultiviert, um eine Regeneration zu gewährleisten.

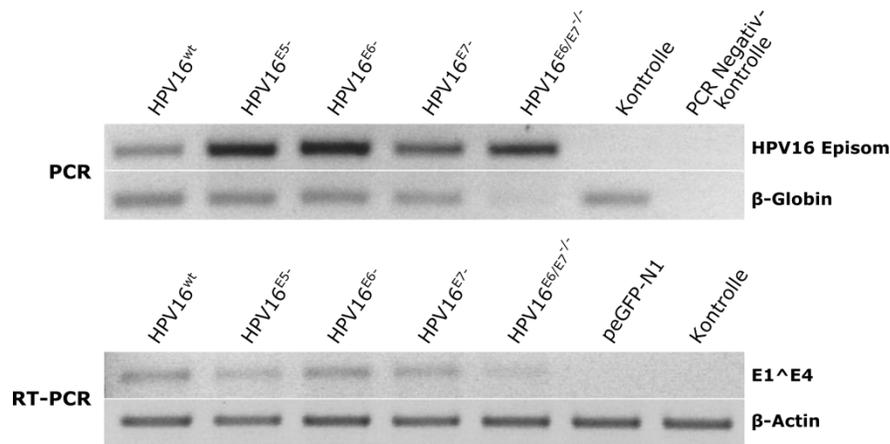


Abbildung 3.8: Nachweis von episomaler HPV16-DNA und früher HPV16-Transkripte
PCR: Die PCR wurde mit 10 ng Gesamt-DNA durchgeführt. Für HPV16 mit 28 und für β -Globin mit 40 Zyklen. Aufgetragen wurden jeweils 10% der PCR-Reaktion.
RT-PCR: Die RT-PCR wurde mit 250 ng RNA durchgeführt und sowohl für E1^{E4} und für β -Globin mit 36 Zyklen durchgeführt. Aufgetragen wurden jeweils 50% der RT-PCR-Reaktion.

Die Etablierung episomaler Genome und der Start der viralen Transkription wurden durch PCR bzw. RT-PCR nachgewiesen. Dazu wurde aus selektionierten Kulturen die DNA bzw. RNA extrahiert. Der Nachweis episomaler Genome von HPV16 erfolgte mittels spezifischer Primer der LCR-Region an 10 ng extrahierter Gesamt-DNA. Als interne Kontrolle fungierte das Gen für β -Globin. Wie aus Abbildung 3.8 hervorgeht, waren allen transfizierten und selektionierten Zellen positiv für HPV16. Wenn man berücksichtigt, dass mit 28 Zyklen deutlich weniger Zyklen nötig waren, um das HPV16-Genom nachzuweisen als β -Globin (40 Zyklen), konnte davon ausgegangen werden, dass durchschnittlich mehr als 2 HPV-Kopien pro Zelle vorhanden waren. Die Kontrolle war immer negativ. Die Aktivierung einer Transkription der *early* Gene von HPV wurde mit spezifischen Primern für die *spliced* Form von E1^{E4} nachgewiesen. Sowohl HPV16^{wt} als auch alle Mutanten zeigten Transkripte auf einem relativ hohen Niveau (Abbildung 3.8). Dieses lag deutlich höher als bei der Infektion mit HPV16-Virionen (vergleiche Abbildung 3.3).

Weiterhin wurden die Kulturen auch auf Proteinebene hinsichtlich möglicher früher Veränderungen untersucht. Als Marker für Präsenz und Funktion der Onkoproteine wurden pRb, p53 und p16 gewählt. Der Differenzierungsstatus nach Transfektion wurde durch Involucrin und K14 erfasst. Die Zellen wurden in gleicher Weise behandelt und kultiviert wie für die Gewinnung von DNA und RNA beschrieben. Die Proteine wurden als RIPA-Extrakte gewonnen. Bezüglich der Differenzierungsmarker waren kaum Unterschiede zwischen den einzelnen Kulturen nachweisbar. Die Expression von K14 blieb gleich, während bei Involucrin

ein leichter Anstieg der Proteinmenge aller transfizierten Zellen gegenüber der Kontrolle auftrat (Abbildung 3.9 A).

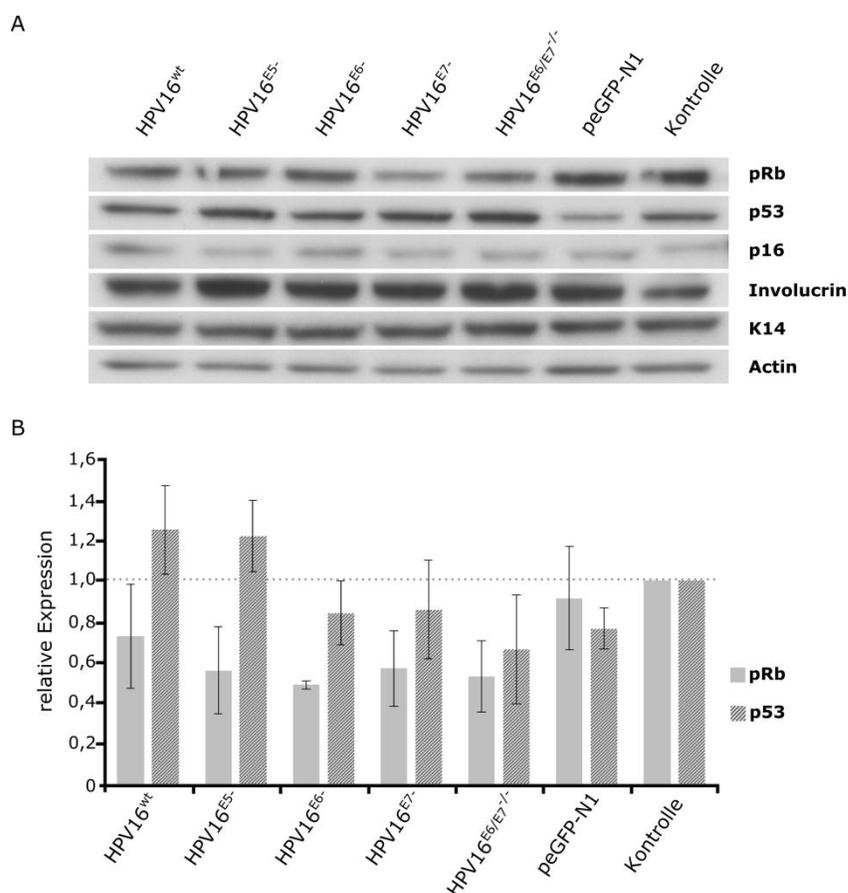


Abbildung 3.9: Nachweis von Markern von Differenzierung und HPV-Funktion in HPV16-positiver HaCaT-Monolayer-Kultur

A: Western Blot-Analyse HPV16-positiver HaCaT bezüglich K14, Involucrin, p16, p53 und pRb. Die Zellen wurden wie im vorliegenden Abschnitt beschrieben als Triplikate transfiziert und selektiert. Nach weiteren 3 Tagen Expansion wurden mit RIPA-Puffer die Proteinextrakte hergestellt und jeweils 25 µg Protein aufgetragen.

B: Densitometrische Auswertung der Expression von pRb und p53. Die Blots aus jeweils unabhängigen Triplikaten wurden mit der Software ImageJ (Rasband, 1997-2004) densitometrisch quantifiziert und auf β-Actin normalisiert. Dargestellt sind die auf die Kontrolle normierten Mittelwerte ± Stabw einer Aktivierung (> 1) bzw. Reduktion (< 1).

Der CDK-Inhibitor p16 ist üblicherweise in HPV-positiven Tumorzellen bzw. Zelllinien wie HeLa stark erhöht. Dies war jedoch in den hier analysierten Zellen nicht der Fall. Das schwache Expressionsniveau war bei den Zellen mit HPV16^{wt}, allen Mutanten, der mock-Kontrolle peGFP-N1 sowie der Kontrolle übereinstimmend. Bei den Hauptmarkern der viralen Onkoproteinfunktion p53 und pRb ergab sich ein weniger eindeutiges Bild. Insgesamt waren die Unterschiede beider Proteine in allen HPV-positiven Zellen im Vergleich mit den Kontrollen im Immunblot jedoch nur minimal (Abbildung 3.9 A) und nicht signifikant gegenüber der Kontrolle verändert (Abbildung 3.9 B).

3.2.4 Morphologie der HaCaT-Raftkultur

Wie bereits in Abschnitt 2.5 beschrieben, ist der Lebenszyklus aller Humanen Papillomaviren untrennbar verknüpft mit dem Differenzierungsprozess des infizierten Epitheliums. Deshalb ist es für den hier gewählten Ansatz notwendig, diesen Zusammenhang in einem *in vitro* Modell abzubilden. Die Kulturbedingungen, um mit Keratinozyten verschiedener Herkunft ein Hautmodell herzustellen, sind bereits seit langem bekannt und wurden auch häufig für die Untersuchung des HPV-Lebenszyklus eingesetzt (siehe Einleitung 2.8). Das Gros der Forschungsergebnisse wurde allerdings auf der Basis von Modellen aus Zelllinien gewonnen, in denen die Proteinfunktionen ohne Einbezug der verschiedenen Stufen der Epitheldifferenzierung analysiert wurden.

Als Keratinozytenmodelle werden routinemäßig hauptsächlich 3 verschiedene Zelltypen verwendet. Die beste Abbildung der natürlichen Abläufe gelingt mit primären Keratinozyten verschiedener Ursprünge. Jedoch hat die Verwendung primärer Keratinozyten für eine alleinige Nutzung im Labor den gravierenden Nachteil einer eingeschränkten Verfügbarkeit und sehr aufwendigen Pflege. Deshalb ist der Einsatz von spontan immortalisierte Zelllinien, die wesentliche Merkmale der natürlichen Abläufe aufweisen, für die Effektivierung der Forschungsarbeit erforderlich. Gegenwärtig bieten sich hierfür die beiden spontan immortalisierte Zelllinien NIKS und HaCaT an. Letztere unterscheiden sich von primären Keratinozyten in ihrer veränderten Fähigkeit zur Differenzierung und in den immanenten genetischen Aberrationen. Beide Zelllinien kamen in der vorliegenden Arbeit vorrangig zur Anwendung.

Für NIKS Zellen bestehen ausführliche Protokolle zur Ausbildung von dreidimensionaler, organotypischer Raftkultur, da diese Zellen ein deutlich ausgeprägtes Differenzierungspotential trotz Immortalisierung beibehalten haben (Allen-Hoffmann et al., 2000). Ihre Verwendung in diesem hier beschriebenen transfektionsbasierten System konnte jedoch nicht etabliert werden (Abschnitt 3.2.1). Das Ausrichten auf die HaCaT-Zelllinie war daher zwangsläufig erforderlich. Bei diesen Zellen ergab sich jedoch die methodische Herausforderung, dass sie auf Grund ihres eingeschränkten Differenzierungspotentials bisher äußerst selten in 3D-Kulturen verwendet wurden. Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Breitkreutz wiesen allerdings darauf hin, dass auch HaCaT Zellen durch geeignete Anpassung der Kulturbedingungen in die Lage versetzt werden können, als differenziertes Gewebe auszuwachsen (Breitkreutz et al., 1998; Schoop et al., 1999). Durch weitere Modifikationen des Protokolls von Schoop *et al.* in Kombination mit den Anpassungen der Kulturbedingungen in Monolayer (Abschnitt 3.2.2)

war es nun möglich, aus HaCaT-Zellen Raftkulturen zu erhalten, die in Ausdifferenzierung und Morphologie denen von NIKS weitgehend entsprachen (Abbildung 3.10).



Abbildung 3.10: Vergleichende Histologie der Raft-Kulturen von HaCaT, NIKS sowie primären Keratinozyten (NHEK)

Die angegebenen Keratinozyten wurden auf dermalen Äquivalenten bestehend aus einer Kollagen I Matrix und Fibroblasten (NIH3T3, Maus) ausgesät und an der Luft-Medium-Grenze über 10 – 21 Tage kultiviert. Anschließend wurden die Kulturen in 10% Formamid fixiert und in Paraffin eingebettet. 5 µm dicke Schnitte wurden mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Maßbalken entspricht 100 µm.

Die entscheidenden Bedingungen sollen hier nochmal kurz zusammengefasst dargestellt werden (weitere Details siehe Abschnitt 2.4.5). Als dermales Äquivalent diente eine Matrix aus Rattenschwanzkollagen des Typs I, in der dermale Fibroblasten (NIH3T3) der Maus auswachsen. Diese wurden in unterschiedlicher Dichte für primäre Keratinozyten (NHEK) und NIKS einerseits ($2,5 \times 10^5/\text{mL}$) und HaCaT ($5 \times 10^5/\text{mL}$) andererseits eingesetzt. Um Auswachsen und Produktion von Wachstumsfaktoren hinreichend zu ermöglichen, wurden die NIH3T3-Zellen für 4 Tage in der Kollagenmatrix in FAD-Medium kultiviert. Anschließend wurden die jeweiligen Keratinozyten mit einer Dichte von $2 \times 10^5/\text{cm}^2$ aufgebracht. Es erfolgte eine weitere Inkubation von 2 - 3 Tagen, um eine konfluente Keratinozytenschicht zu erreichen, bevor die Rafts an die Interphase von Medium und Luft angehoben wurden. Kultiviert wurden die Gewebe für unterschiedliche Zeiträume: NHEK für 10 Tage, NIKS für 14 Tage und HaCaT für 21 Tage.

Abbildung 3.10 zeigt einen den Vergleich von HaCaT, NIKS und primären Keratinozyten (NHEK) als Raftkultur. Zu erkennen ist, dass alle Kulturen annähernd die gleiche Stärke aufwiesen. Dabei entsprach wiesen die Raftkulturen trotz der unterschiedlichen Wachstumsdauer (10 – 21 Tage) auch eine übereinstimmende durchschnittliche Anzahl von 6 – 9 Zellschichten auf. Alle 3 Kulturen bildeten auch eine deutlich abgezeichnete Basalzellschicht mit ausgeprägter Polarisierung der Zellen aus. Die Unterschiede in der HaCaT-Kultur zu den anderen beiden Systemen bestanden in einer schwächeren morphologischen Unterscheidung der Zellen des *Stratum spinosum* zu denen des *Stratum*

granulosum und einer weniger starken Ausbildung der Parakeratinschicht des *Stratum corneum*. Auffällig war auch die partielle Vakuolisierung der Zellen aller Schichten.

Somit waren grundsätzlich die Voraussetzungen geschaffen worden, HaCaT-Raftkulturen als Basis eines naturnahen *in vitro* HPV-Modells zu nutzen.

3.2.5 HaCaT Raftkulturen unterstützen den Erhalt episomaler HPV16-Genome und die virale Gentranskription

Auf der Basis der Optimierungen zur Nutzung von HaCaT-Zellen als epidermales Modell konnten auch HPV16-positive Zellen als Raftkulturen kultiviert werden. Sie wurden dazu nach Transfektion und Selektion 2 Tage in normalem KGM2-Medium zur Regeneration kultiviert, bevor sie mit einer Dichte von 2×10^5 Zellen/cm² auf die dermalen Äquivalente aufgebracht wurden. Die Rafts wurden dann für 21 Tage kultiviert. Der Nachweis etablierter HPV16-Genome und viraler Transkription im Gewebe erfolgte mittels eines semi-quantitativen Multiplex Papillomavirus Genotypisierung (MPG) Assays (Schmitt et al., 2006; Schmitt et al., 2008) bzw. eines qualitativen RT-PCR Assays für E6*I. Für die PCR wurden 10 µl DNA-Extrakt verwendet und anschließend 10 µl dieser Reaktion für die Hybridisierung und Multiplex-Analyse. Als interne DNA-Kontrolle fungierte β-Globin. Die Abschätzung der viralen Kopienzahl pro Reaktion erfolgte anhand einer externen Standardkurve.

Tabelle 3.1: Semiquantitativer MPG-Assay und qualitative RT-PCR zum Nachweis viraler Episome und viraler Transkription

Alle Hybridisierungsergebnisse sind als mittlere Fluoreszenzintensitäten oberhalb des Grenzwertes unspezifischer Signale dargestellt. Als interne Kontrollen dienten β-Globin für die DNA und Ubiquitin C für die RNA. Im Falle von β-Globin sind die Signale reziprok zu denen für HPV16 auf Grund kompetitiver Reaktionseffekte. Die virale Kopienzahl entspricht einer Abschätzung auf Grundlage einer externen Standardkurve.

Sample	DNA			RNA	
	HPV16	β-Globin	Kopienzahl	E6*I	Ubiquitin C
Null	155	805	1 - 10	0	728
HPV16 ^{wt}	2034	1	10 ⁶ - 10 ⁷	225	1001
HPV16 ^{E5-}	1793	33	10 ⁵ - 10 ⁶	362	882
HPV16 ^{E6-}	1961	9	10 ⁶ - 10 ⁷	366	861
HPV16 ^{E7-}	1839	17	10 ⁶ - 10 ⁷	199	975
HPV16 ^{E6E7-/-}	1668	0	10 ⁵ - 10 ⁶	200	896
peGFP-N1	750	1001	10 - 100	0	679

In Tabelle 3.1 wird ersichtlich, dass alle erhaltenen Gewebe positiv für HPV16 waren. Sowohl die Kontrolle als auch die Mock-Kontrolle zeigten unerwartet positive Signale für HPV. Im Falle des nicht-transfizierten Gewebes ließ die mittlere Fluoreszenz auf eine Kopienzahl in der Reaktion von max. 10 schließen, wohingegen bei peGFP-N1 mit 750 bis zu 100 Kopien anzunehmen waren. Diese beiden Werte lagen aber deutlich unter denen aus

Gewebe transfizierter HaCaT-Zellen und konnten auf Grund der negativen Ergebnisse für das E6*I-Transkript als falsch positiv gewertet werden. Wie erwähnt, waren alle transfizierten Gewebe stark positiv für HPV16. Die Werte von HPV16^{wt} mit 2034, HPV16^{E6-} mit 1961 und HPV16^{E7-} mit 1839 lassen Kopienzahlen zwischen 10⁶ und 10⁷ vermuten. Bei HPV16^{E5-} mit 1793 und HPV16^{E6E7-/-} mit 1668 lag diese Abschätzung um den Faktor 10 niedriger. All diese Kulturen waren ebenfalls positiv für das gespleißte frühe Transkript E6*I, dessen Signale positiv mit der hohen HPV16-Kopienzahl korrelierten.

3.2.6 E1[^]E4 als Marker zur Kennzeichnung der Vervollständigung des viralen Lebenszyklus

Eines der Probleme in der HPV-Forschung ist das Fehlen hochreaktiver, spezifischer Antikörper gegen die frühen viralen Proteine, die eine Detektion auf *in vivo* ähnlichem Expressionslevel erlauben. Zwar stehen Antikörper gegen E7 der Typen 11, 16 und 18 zur Verfügung. Diese konnten bei Immunfluoreszenz und Immunoblot bisher aber nur in der Zelllinie HeLa bzw. Neoplasien bei vorliegender Überexpression des Onkoproteins nach Integration ins Wirtsgenom erfolgreich verwendet werden. Mit dem Einsatz eines spezifischen Antikörpers gegen das E1[^]E4 Protein ist es jedoch möglich die Präsenz viraler Proteinexpression unter *in vivo* Bedingungen nachzuweisen (Doorbar et al., 1992).

E1[^]E4 ist eine Splice-Variante des E4 Proteins, die die ersten 5 Codons des Replikationsproteins E1 beinhaltet. Es ist das am stärksten exprimierte der viralen Transkripte mit einem Anteil von über 80%. Das Protein wird im gesamten Bereich des infizierten Epitheliums exprimiert, akkumuliert aber hauptsächlich in den oberen Schichten und damit in der späten Phase des viralen Lebenszyklus. Es geht der Expression der Strukturproteine L1 und L2 voraus. Die Beteiligung des Proteins in Vorgänge des Lebenszyklus sind nicht vollständig verstanden. Es ist jedoch offensichtlich an der Auflockerung des Keratinfilamentnetzwerk beteiligt und damit für die Freisetzung und Infektiosität der neu gebildeten Viruspartikel bedeutsam (McIntosh et al., 2010).

Um herauszufinden, inwieweit das organotypische Kulturmodell auf Basis der immortalisierten Zelllinie HaCaT, den viralen Lebenszyklus unterstützt, wurde die Detektion der E1[^]E4-Expression genutzt. Hierzu wurden 5 µm dicke Schnitte 21 Tage gewachsener, formalinfixierter und paraffineingebetteter Raftkulturen von HPV16^{wt}, aller Mutanten und der Kontrollen durch den Antikörper TVG405 gegen E1[^]E4 mittels Immunfluoreszenz gefärbt.

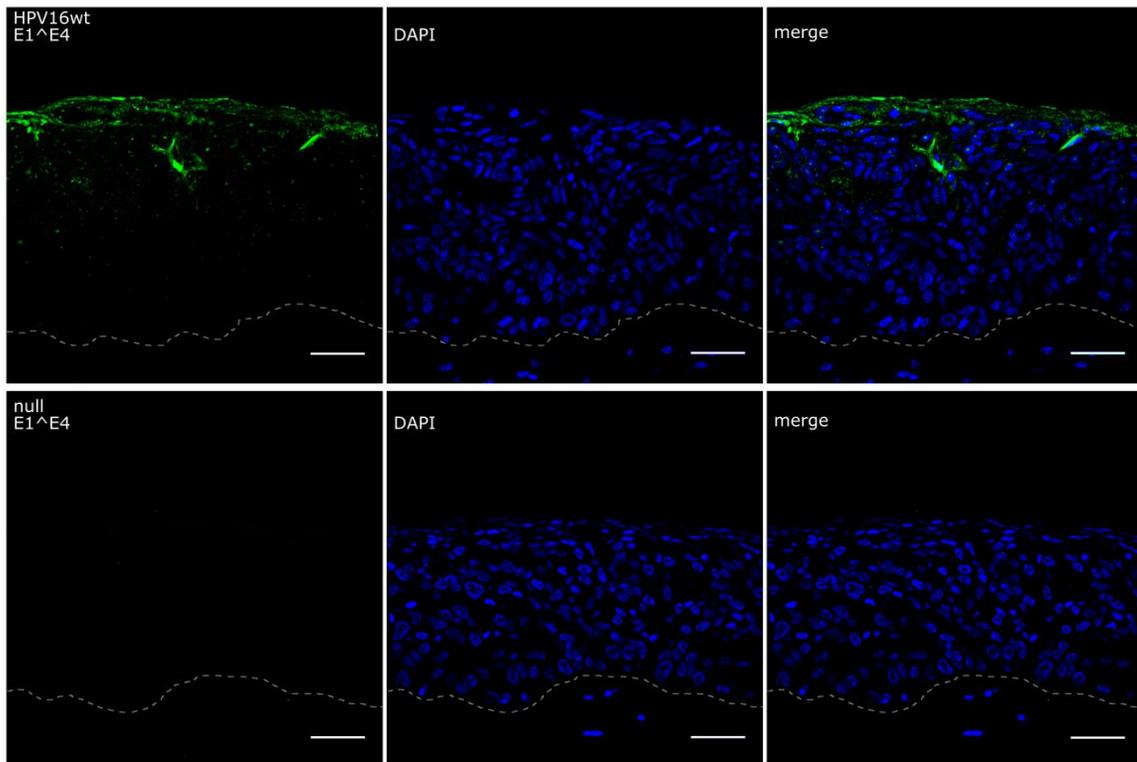


Abbildung 3.11: E1^{E4}-Nachweis als Marker der Vervollständigung des Lebenszyklus in der HaCaT-Raftkultur

Immunfluoreszenzfärbung gegen E1^{E4} (grün) und DAPI (blau) an 5 µm dicken Schnitten formalinfixierter und paraffineingebetteter HaCaT-Raftkultur. Aufgenommen als Z-Achsen-Projektion von 10 Schichtaufnahmen. Hier dargestellt als Summe der Intensitäten aller Schichtaufnahmen. Vergrößerung 40x, Maßbalken entspricht 50 µm.

Eine deutliche Expression des Proteins erschien dabei nur in den HPV16^{wt}-Kulturen. Hier zeigte sich die Expression in den oberen Bereichen der Rafts schwach in den Zellkernen. Dabei verstärkte sich das Signal in den obersten Regionen und akkumulierte hauptsächlich zytoplasmatisch. Die Expression war jedoch nicht homogen über den gesamten Bereich eines Schnittes vorhanden, sondern trat punktuell in kleinen Bereichen auf. Dies war in 2 der 3 untersuchten Kulturen und jeweils in verschiedenen Schnitten reproduzierbar. Ein sehr schwach positives Signal zeigten die Kulturen von HPV16^{E5-}. Dieses konnte allerdings nicht reproduziert werden. Alle anderen Mutanten sowie die Kontrollen blieben negativ für E1^{E4}. Ein Nachweis des Proteins im Western Blot blieb ohne Ergebnis. Ebenso konnte L1 als Protein der späten Phase des produktiven, viralen Lebenszyklus weder in der Immunfluoreszenz oder Immunhistochemie, noch im Western Blot nachgewiesen werden.

3.2.7 HPV16 induziert stärkeres Auswachsen der HaCaT-Raftkulturen

Für eine vergleichende histologische Analyse wurden die Gewebe, wie unter Abschnitt 3.2.1 bereits für die NIKS-Kulturen beschrieben, aufgearbeitet. Im Gegensatz zu NIKS-Kulturen (Abbildung 3.4) konnten mit HaCaT-Zellen für alle transfizierten Zellen epidermale Äquivalente erhalten werden (Abbildung 3.12). Sie waren über den Großteil ihrer Fläche von ca. 4,5 cm² morphologisch homogen. Aber im Vergleich zur Kontrolle zeigten alle Kulturen aus transfizierten Zellen ein stärker variierendes Bild und eine geringer strukturierte Morphologie. Die Basalzellschicht erschien weniger gut zu den oberen Schichten abgegrenzt und war nur schwach palisadenartig aufgebaut. Dazu waren die einzelnen morphologischen Schichten nur schwer voneinander zu differenzieren. Dies lag in der stark ausgeprägten Hyperkeratinisierung begründet, auffällig durch eine starke Eosinfärbung, die in allen Bereichen der Rafts vorhanden war. Dieses Merkmal war jedoch weniger stark in der Doppelmutante HPV16^{E6/E7-/-} sowie der Mock-Kontrolle peGFP-N1 ausgeprägt. Dadurch trat bei diesen beiden Geweben ein abgegrenzteres *Stratum corneum* hervor, das dem der Kontrolle annähernd entsprach. Besonders ausgeprägt und häufig zeigten sich bei HPV16^{wt}- und HPV16^{E5}-Kulturen eindrehende Zellpopulationen, die bis in die obersten Bereiche des Gewebes reichten und einen basalzellähnlichen Phänotyp aufwiesen (Abbildung 3.12, Pfeilmarkierungen). Diese Zellen zeigten charakteristisch hyperchromatische Zellkerne großen Querschnitts und entsprechen damit Koilozyten. Auch in den anderen HPV-positiven Rafts waren solche Strukturen erkennbar, jedoch nicht in solch starker Ausprägung und nicht mit einer vergleichbar hohen Anzahl im *Stratum corneum*. Die Kulturen der E5-Mutante waren am stärksten dysmorph strukturiert mit basalzellähnlichen Einfaltungen, großer Varianz der Raftstärke (siehe nächster Abschnitt), hohem Grad von Vakuolisierung und Aufbrechen der Gesamtstruktur. Insgesamt spiegelten am ehesten die Rafts von HPV16^{E7}- und der Doppelmutante HPV16^{E6/E7-/-} die Struktur der Kontrolle wieder. Ebenfalls auffällig war die beträchtliche Varianz im Querschnitt der einzelnen Kulturen, wie es auch anhand der präsentierten Beispiele deutlich hervorgeht (Abbildung 3.12). Um dies zu quantifizieren, wurden von mindestens 2 verschiedenen Kulturen jeder Mutante und den Kontrollen, jeweils 3 verschiedene Schnitte mit 4 Messpunkten aus 3 Sichtfeldern (10fache Vergrößerung) ausgemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.13 zusammengefasst. Die Kontrolle wies eine mittlere Gewebedicke von 138 µm (126 µm/154 µm) auf. Mit Ausnahme der HPV16^{E7}-Mutante wiesen alle anderen Kulturen einen größeren Querschnitt auf. Das epidermale Äquivalent von HPV16^{wt} war mit mittleren 207 µm (201 µm/225 µm) ca. 50% stärker ausgeprägt als die Kontrolle. HPV16^{E5} zeigte eine starke Varianz innerhalb der einzelnen

Kulturen und bildete die Rafts mit den stärksten Querschnitten bei einem Mittel von 217 μm (188 μm /261 μm) aus, die teilweise > 300 μm erreichten.

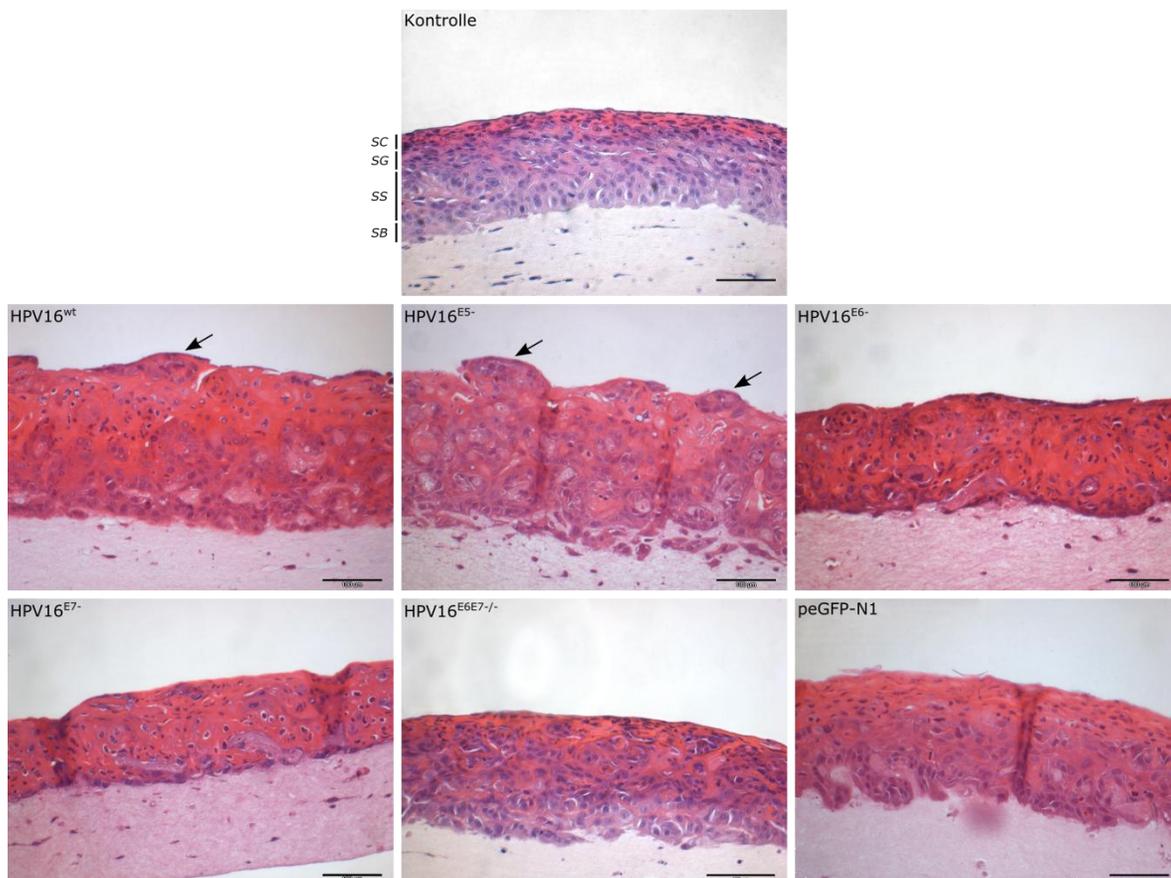


Abbildung 3.12: Histologie HPV-positiver HaCaT Raft-Kulturen

Die Gewebe wurden für 21 Tage kultiviert mit Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. 5 μm starke Schnitte wurden mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Die Pfeile markieren Zellpopulationen der obersten Zellschichten mit basalzellähnlichem Phänotyp. Maßbalken entspricht 100 μm .

Demgegenüber war bei der E7-Mutante im Vergleich mit allen HPV-positiven Kulturen eine deutliche Verringerung der Raftdicke auf 134 μm (100 μm /165 μm) zu verzeichnen. Diese lag im Größenbereich der Kontrolle. Die E6-Mutante mit durchschnittlichen 201 μm (143 μm /221 μm) sowie die E6/E7-Doppelmutante mit 169 μm (153 μm /180 μm) wiesen Querschnitte zwischen den beiden Extremen auf. Die peGFP-N1-Kontrolle wies ebenfalls eine mäßige Zunahme der Strukturdicke um ca. 33% auf 180 μm (166 μm /191 μm) im Vergleich zur Kontrolle auf. Die aufgeführte Tabelle 3.2 präsentiert zusammenfassend die Daten numerisch und liefert damit den detaillierten Vergleich der einzelnen Gewebe zueinander. Im Folgenden sollen einige auffällige Fakten aufgeführt werden. So beträgt die deutliche Zunahme der Gewebestärke bei HPV16^{wt} und HPV16^{E5-/-} im Mittel 69 μm bzw. 79 μm , wobei sie sich statistisch nicht voneinander unterscheiden.

Tabelle 3.2: Quantifizierung des Gewebequerschnittsdicke in Abhängigkeit der viralen Onkoproteinexpression

Die Gewebedicke der unterschiedlichen Kulturen wurde ausgemessen wie bei Abbildung beschrieben. Die Daten entsprechen den Durchschnitten von mind. 18 Datenpunkten (N) bezüglich mind. 2 unabhängiger Raftkulturen. Ein Datenpunkt entspricht dem Mittelwert aus 4 Messpunkten eines Sichtfeldes.

	Median	Q25	Q75	N
Kontrolle	137,8 µm	126,4 µm	154,2 µm	26
HPV16^{wt}	206,6 µm	201,4 µm	225,0 µm	18
HPV16^{E5-}	217,0 µm	188,4 µm	261,8 µm	24
HPV16^{E6-}	201,4 µm	142,7 µm	221,2 µm	27
HPV16^{E7-}	134,0 µm	100,0 µm	165,3 µm	18
HPV16^{E6E7-/-}	169,4 µm	153,2 µm	180,1 µm	18
peGFP-N1	179,9 µm	166,3 µm	191,8 µm	27

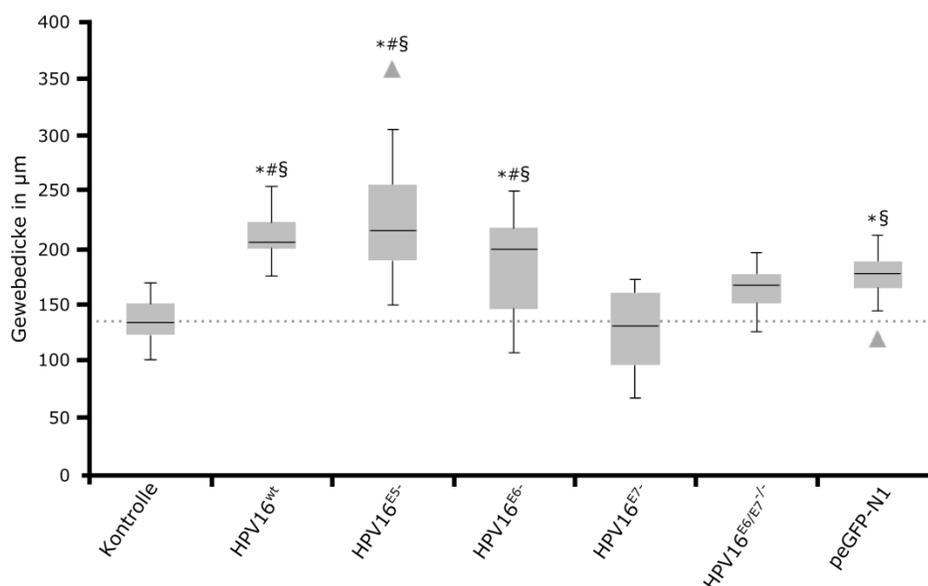


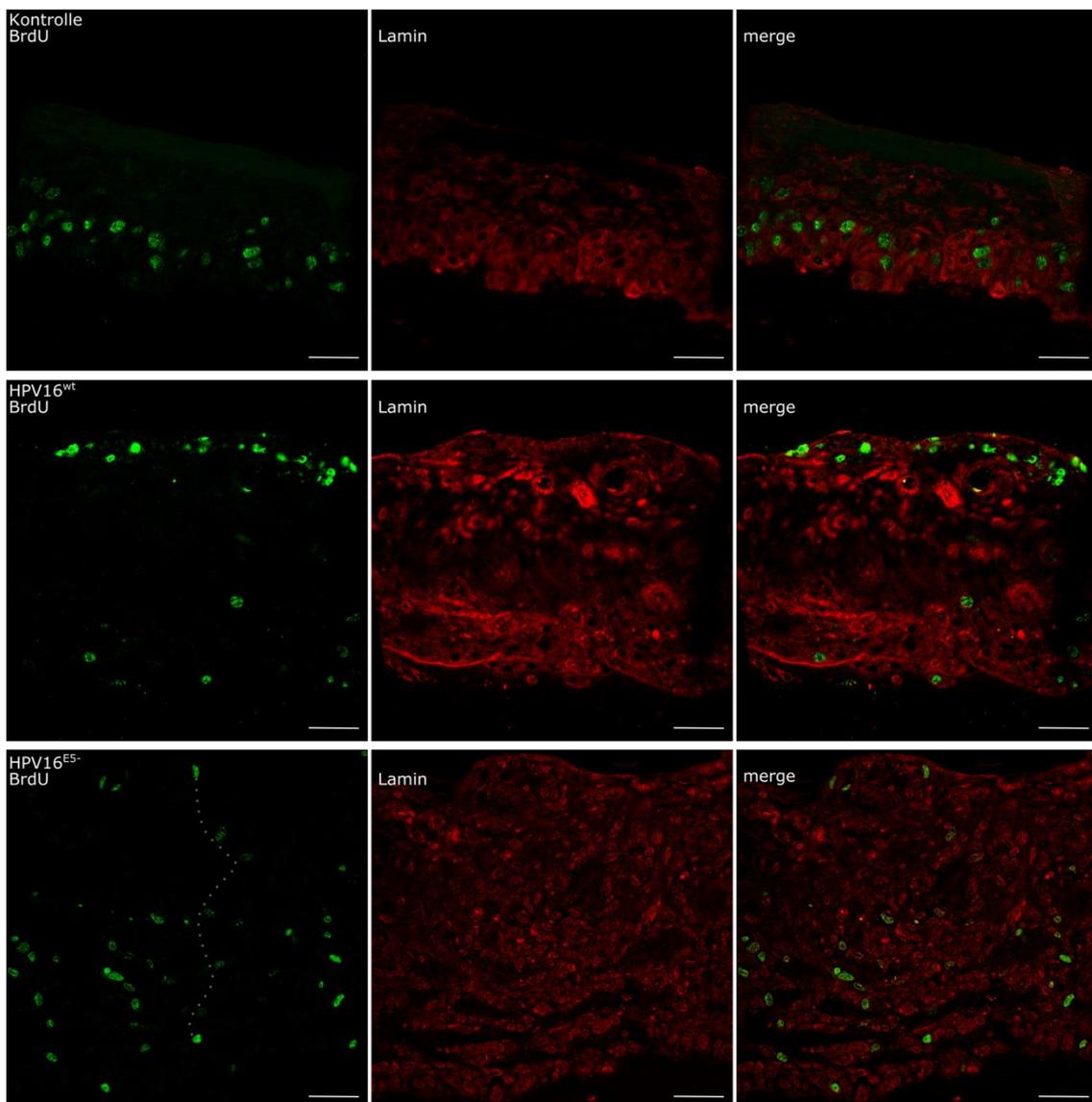
Abbildung 3.13: Gewebedicke in Abhängigkeit der viralen Onkoproteinexpression

Zur Analyse wurden von mindestens 2 verschiedenen Kulturen jeder Mutante und den Kontrollen, jeweils 3 verschiedene Schnitte aus 3 Sichtfeldern 10facher Vergrößerung ausgemessen. 4 Messpunkte aus jedem Sichtfeld gingen als Durchschnittswert in die Analyse ein. Die Unterschiede wurden mittels Bonferroni-Dunn-Test auf ihre Signifikanz getestet. * $p < 0,05$ zur Kontrolle, # $p < 0,05$ zu peGFP-N1, § $p < 0,05$ zu HPV16^{E7-}, ▲ Extremwerte

Weiterhin zeigt sich, wie schon deutlich im Boxplot wird, die stetige Abnahme der Gewebedicke mit dem Verlust der jeweiligen Onkoproteinexpression von E6 und E7. Dabei wird deutlich, dass nicht, wie primär vermutet, die Doppelmutante von E6/E7 den Endpunkt darstellte, sondern das Gewebe von HPV16^{E7-}. Der Querschnitt beider unterscheidet sich dabei nicht mehr statistisch zueinander und ebenfalls nicht zur Kontrolle.

3.2.8 HPV16 induziert Proliferation in suprabasalen Zellschichten

Als weiteren indirekten Nachweis für das Vorhandensein viraler Genexpression wurde der Zellzyklusstatus der Zellen in den Raft-Kulturen untersucht. Eine bekannte Funktion von E7 ist die Fähigkeit, über die Inhibition von pRb betroffene Zellen aus der G₀-Phase zurück in einen aktiven Zellzyklusmodus zu überführen (McLaughlin-Drubin and Münger, 2009). Um zu überprüfen, ob wir dies in unserem Modell mit mutierten Genomen nachweisen können bzw. ob unterschiedliche Einflüsse durch die andersgeartete Komposition der anwesenden viralen Proteine wahrzunehmen waren, markierten wir die zelluläre DNA mit dem Nukleotidanalogue BrdU. Hierzu wurde dieser Marker in einer finalen Konzentration von 50 µg/mL dem Kulturmedium 12 Stunden vor der Entnahme der Rafts zugesetzt. Der Nachweis erfolgte abschließend durch Immunhistochemie bzw. Immunfluoreszenz.



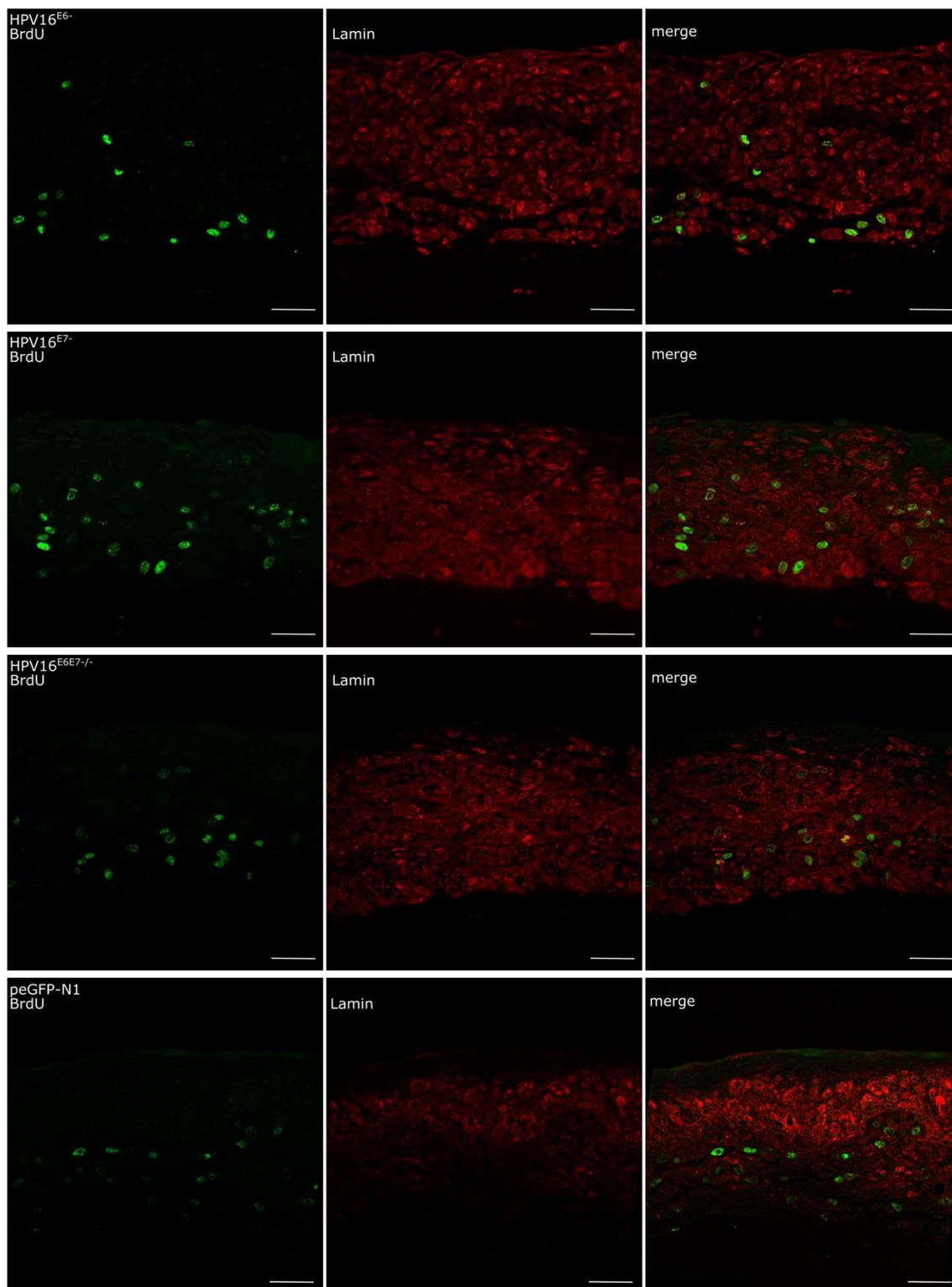


Abbildung 3.14: Nachweis proliferierender Zellen in suprabasalen Bereichen HPV-positiver Gewebe

Für die Analyse der S-Phasen-Kompetenz von Zellen in suprabasalen Schichten wurde dem Kulturmedium 12 Stunden vor der Entnahme der Gewebe das Nukleotidanalog BrdU (50 µg/mL) zugegeben. Der Nachweis der Inkorporation des Nukleotids erfolgte durch einen monoklonalen Anti-BrdU Antikörper (grün). Als Gegenfärbung fungierte der Kernmembranmarke Lamin A (rot). Aufnahmen wurden als Z-Projektionen von 10 Schichten gewonnen. Dargestellt ist hierbei die durchschnittliche Intensität. Die eingefügte gepunktete Linie bei HPV16^{E5-} hebt beispielhaft die Aufreihung BrdU-positiver Zellen bis ins *Stratum granulosum* hervor. Vergrößerung 40x, Maßbalken entspricht 50 µm.

In Abbildung 3.14 ist deutlich zu erkennen, dass in der Null-Kontrolle BrdU-positive Zellen ausschließlich im basalen Bereich der Rafts auftraten. Ebenso zeigte sich dies bei der Mock-Kontrolle peGFP-N1 und in HPV16-positiven Rafts der Mutanten HPV16^{E7-} und HPV16^{E6/E7-/-}. Für die Rafts von HPV16^{wt}, HPV16^{E6-} und HPV16^{E5-} waren darüber hinaus Zellen in apikalere Gewebeschichten positiv für BrdU. Auffällig hierbei war die Ansammlung der Zellen in Strukturen, die bereits in den HE-Färbungen mit ihrer einschussartigen Morphologie mit größeren Zellkörpern sowie -kernen erkennbar waren, die der Gestalt von Basalzellen sehr ähnlich schienen. In vielen Bereichen zog sich dabei eine Reihe von BrdU-positiven Zellen von der Basalschicht bis in die obersten granularen Schichten, während umliegende Zellen negativ blieben (Abbildung 3.14, beispielhaft HPV16^{E5-} durch gepunktete Linie markiert). Dabei waren solche Muster nicht homogen über das gesamte Gewebe verteilt, sondern waren auf umgrenzte Bereiche beschränkt.

Da die Struktur der HaCaT-Raftkulturen ungeordneter erschien als die von NIKS-Keratinocyten (Abbildung 3.12), wurde die strukturelle Zuordnung formalisiert, wobei die Grenze für basale Zellen bei 3 Zellschichten oberhalb der Basallamina festgelegt wurde. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.15 dargestellt. Die NIKS-Raftkulturen wurden in die Auswertung einbezogen, weil per se nicht bekannt war, in wieweit HaCaT-Zellen modifizierte Zellzykluseigenschaften aufweisen, die Einfluss auf die Auswirkungen der HPV-Mutanteninfektion haben können.

Tabelle 3.3: Quantifizierung proliferierender Zellen anhand anti-BrdU Immunhistochemie

Zur Analyse wurden von mindestens 2 verschiedenen Kulturen jeder Mutante und den Kontrollen, jeweils 3 verschiedene Schnitte mit 9 Sichtfeldern 5facher Vergrößerung ausgemessen. Die Ergebnisse sind als S/B-Quotienten BrdU-positiver Zellen im basalen Bereich zu Zellen im suprabasalen Bereich dargestellt.

	S/B-Quotient			
	Median	Q25	Q75	N
Kontrolle	0,17	0,12	0,23	25
HPV16^{wt}	1,15	0,92	1,35	18
HPV16^{E5-}	0,77	0,67	1,10	23
HPV16^{E6-}	0,67	0,57	0,78	27
HPV16^{E7-}	0,28	0,10	0,50	18
HPV16^{E6E7-/-}	0,18	0,10	0,27	18
peGFP-N1	0,24	0,16	0,31	27

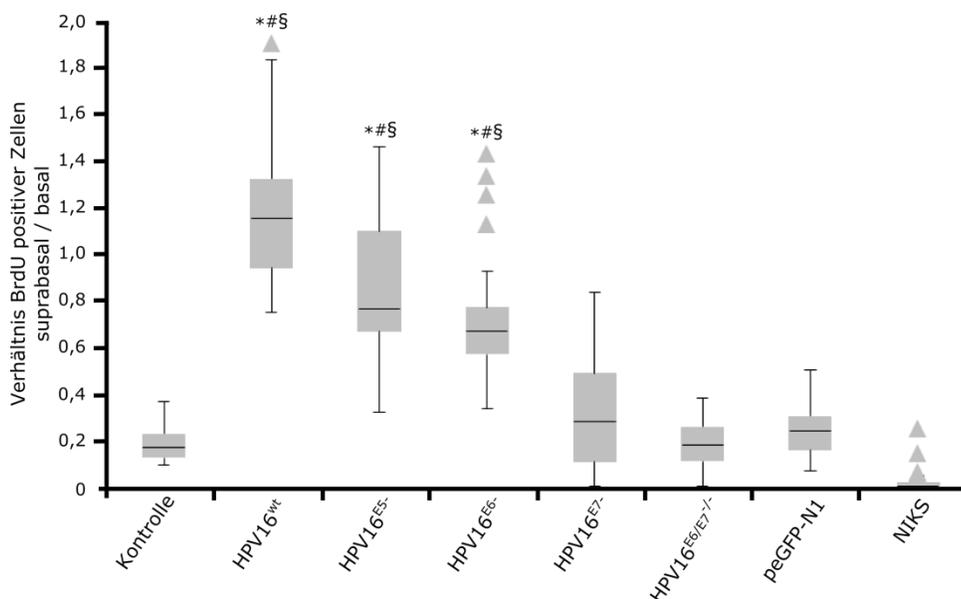


Abbildung 3.15: Verhältnis proliferierender Zellen in suprabasalen zu denen in basalen Zellschichten (S/B-Quotient)

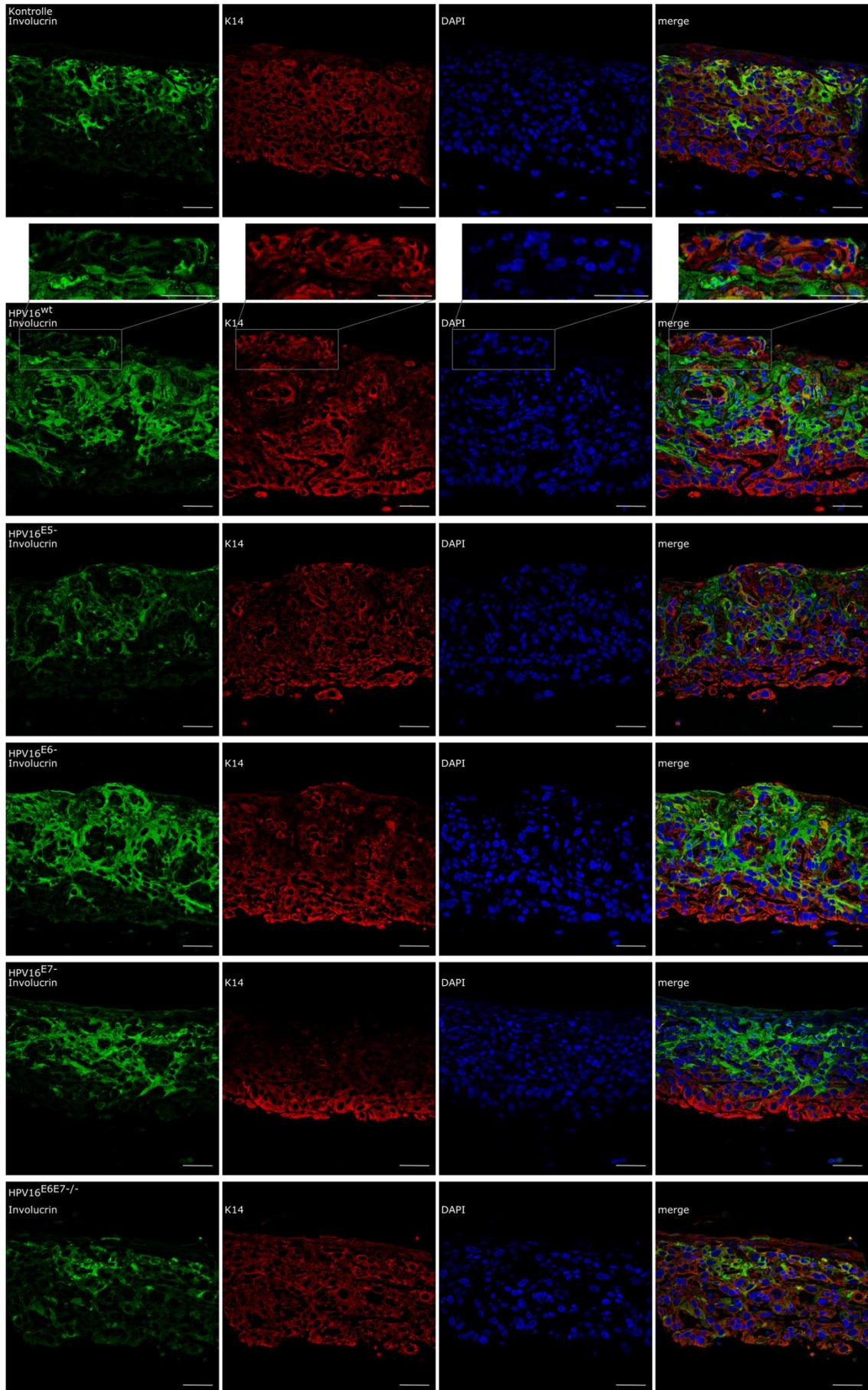
Zur Analyse wurden wie bei Tabelle 3.3 beschrieben der Quotient BrdU-positiver und somit proliferierender Zellen gebildet. Die Unterschiede wurden mittels Kruskal-Wallis-Test auf ihre Signifikanz getestet.* $p < 0,05$ zur Kontrolle, # $p < 0,05$ zu peGFP-N1, § $p < 0,05$ zu HPV16^{E6/E7}-/-, ▲ Extremwerte.

Dabei wird deutlich, dass HaCaT-Raftkulturen mit einem mittleren Quotienten von 0,17 (0,12/0,23) einen höheren Anteil S-Phasen-aktiver Zellen in nicht basalen Bereichen als NIKS aufweisen und damit das Auftreten S-Phasen-aktiver Zellen nicht allein auf die Basalschicht beschränkt war. Tabelle 3.3 und Abbildung 3.15 zeigen, dass die Anwesenheit von HPV16^{wt} eine erhebliche Zunahme BrdU-positiver Zellen in suprabasalen Bereichen bewirkte. Die Anzahl überstieg die derer in basalen Regionen verdeutlicht durch einen mittleren S/B-Quotienten von 1,15 (0,91/1,35). Bei allen HPV16-Mutanten war die Anzahl proliferierender suprabasaler Zellen geringer als in den basalen Zellschichten. Der S/B-Quotient wies eine graduelle Abnahme auf und sank bei der Doppelmutante HPV16^{E6/E7}-/- mit 0,18 (0,10/0,27) auf das Niveau der Kontrolle. HPV16^{E5} zeigte ähnlich, wie schon bezüglich des Querschnitts der Raftkultur ein sehr inhomogenes Bild mit einer breiten Streuung des S/B-Quotienten bei einem mittleren Wert von 0,77 (0,67/1,10). Die weiteren genauen Werte lagen für HPV16^{E6} bei 0,67 (0,57/0,78), für HPV16^{E7} bei 0,28 (0,10/0,27) und für peGFP-N1 bei 0,24 (0,16/0,31).

3.2.9 HPV-positive Gewebe zeigen gering differenzierte Zellen in suprabasalen Bereichen

Epithelien können anhand des Expressionsmusters verschiedener Keratine und weiterer Proteine des Zellnetzwerkes hinsichtlich ihres Differenzierungsgrades charakterisiert werden. Insbesondere können diese Proteine als Marker für die Bestimmung eines hyperproliferativen Status im Zuge einer neoplastischen Veränderung herangezogen werden. In der vorliegenden Untersuchung wurden Keratin 14 (K14) und Involucrin zur Beschreibung der organotypischen Raftkulturen genutzt. Keratin 14 ist spezifisch für Basalzellen komplexer Epithelien und verweist auf einen undifferenzierten Status der Keratinozyten. Involucrin wird hingegen im Zuge der terminalen Differenzierung in den Suprabasalschichten des Epithels exprimiert. Hier sorgt es durch die Vernetzung mit Proteinen der Zellmembran für die Erhöhung einer mechanischen Stabilität des Epithels.

Um zu untersuchen, inwieweit der Differenzierungsprozess innerhalb der Raftkulturen durch die Anwesenheit von HPV16 und der Expression der Onkoproteine verändert wird, wurden 5 µm dicke Schnitte der formalinfixierten und Paraffin-eingebetteten Kulturen gegen die beiden Differenzierungsmarker K14 und Involucrin durch Immunfluoreszenz gefärbt. Als Kontrolle diente wiederum eine Kultur von NIKS (Abbildung 3.16, untere Bildreihe), in der eine Zweiteilung der Färbung der Raftkultur deutlich wurde. Die Basalschicht zeigte eine starke Färbung für Keratin 14, die in Richtung der oberen Schichten sich abschwächte. Involucrin hingegen wies eine schwache Färbung der Basalschicht auf und eine starke Färbung der oberen Schichten mit einem Maximum im *Stratum granulosum*. Das *Stratum corneum* blieb für beide Marker negativ. Die Nullkontrolle der HaCaT-Rafts zeigte ein ähnliches Bild. Die Verteilung beider Marker entsprach der der NIKS-Kultur, wobei die Expression von Involucrin erst zu einem späteren Zeitpunkt in höheren Schichten einsetzte und nicht in gleichem Maße homogen erschien. Die Immunfluoreszenz für K14 war einheitlich über den gesamten Bereich hinweg ausgeprägt, wies jedoch eine etwas intensivere Färbung der Basalschicht in denjenigen Zellbereichen auf, die direkt an die Basallamina angrenzten. Die Verteilung von Involucrin korrelierte in allen HPV-positiven Kulturen größtenteils positiv mit dem Differenzierungsprozess hinzu den apikalen Schichten des Gewebes. Nur wenige Zellen des Basalbereiches zeigten eine starke Expression. Die hier abgebildeten zum Teil deutlichen Intensitätsunterschiede für Involucrin zwischen den Geweben muss dabei eher technischen Ursachen zugeschrieben werden, da sie auch innerhalb eines jeweiligen Gewebeschnittes auftraten.



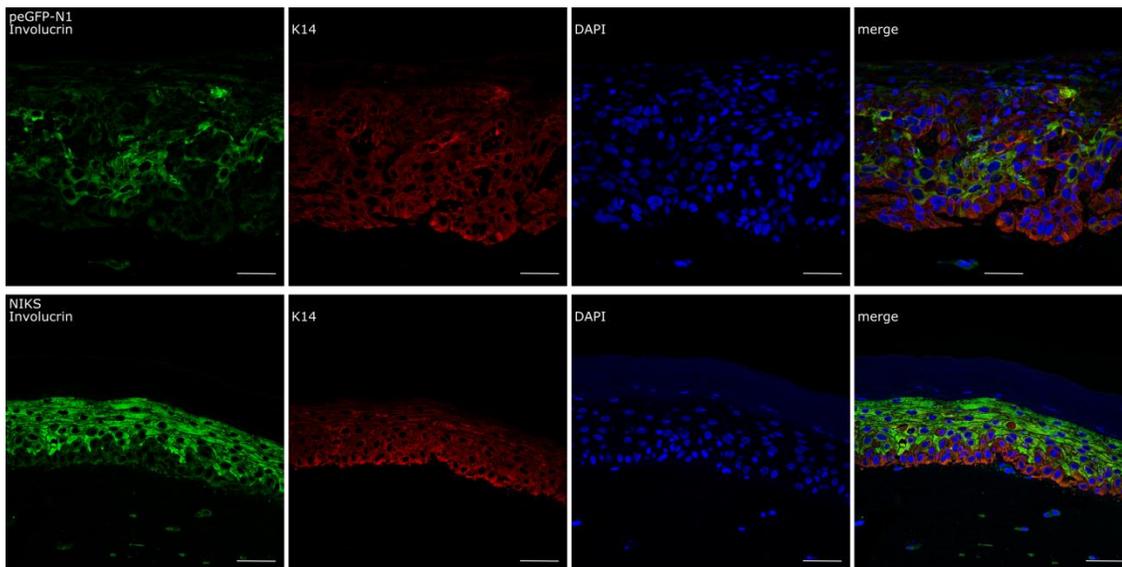


Abbildung 3.16: Nachweis undifferenzierter Zellpopulationen in suprabasalen Bereichen von HPV-positiven Raftkulturen

In Paraffin eingebettete 5 µm Schnitte der verschiedenen Raft-Kulturen wurden mittels Immunfluoreszenz anhand monoklonaler Antikörper, gerichtet gegen Involucrin (grün) und K14 (rot), analysiert. Für HPV16^{wt} wurden für eine bessere Darstellung spezielle Bereiche mit hoher K14 Expression bei gleichzeitig nur geringen Involucrin-Signalen vergrößert dargestellt. Maßbalken entspricht 50 µm.

Strukturelle Unterschiede in der Expression von K14 und Involucrin traten hingegen in verschiedenen Schnitten aus unabhängigen Geweben deutlich hervor. Besonders in den Geweben von HPV16^{wt}, HPV16^{E5-} und HPV16^{E6-} wurden Formationen in den oberen Schichten sichtbar, die durch eine geringe Färbung für Involucrin bei ungewöhnlich starker K14-Expression auffielen (Abbildung 3.16, Ausschnitte HPV16^{wt}). Diese stimmten in Form und Ausprägung mit Strukturen des *Stratum granulosum* überein, die bereits in der HE-Färbung durch ihren basalzellartigen Phänotyp auffällig waren (Abbildung 3.12, Pfeilmarkierungen). Der Verlust der Expression von E7 führte zu einer Struktur, die mit einer starken Expression von K14, beschränkt hauptsächlich auf die Basalzellen sowie homogen verteiltem Involucrin in den oberen Schichten, sehr der Kontrolle glich. Ein weitgehend übereinstimmendes Bild fand sich auch bei der Doppelmutante für E6 und E7.

In der Western Blot-Analyse der Gewebe konnten diese strukturellen Veränderungen in der Präsenz von Involucrin und Zytokeratin 14 nicht als globale Unterschiede in der Proteinexpression nachgewiesen werden (Abbildung 3.17). Als schwache Tendenz war nur eine leicht erhöhte Proteinexpression in allen HPV-positiven Kulturen zu erkennen. Daher waren die gegensätzliche Menge beider Proteine in Regionen der oberen Gewebeschichten, nur auf eben solche speziellen Strukturen beschränkt anzunehmen.

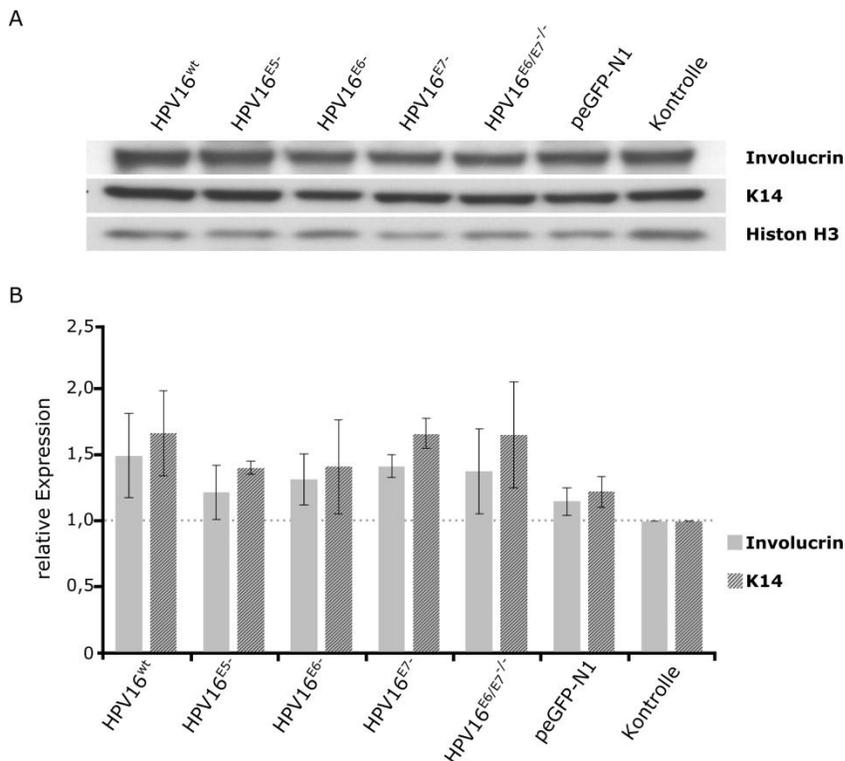
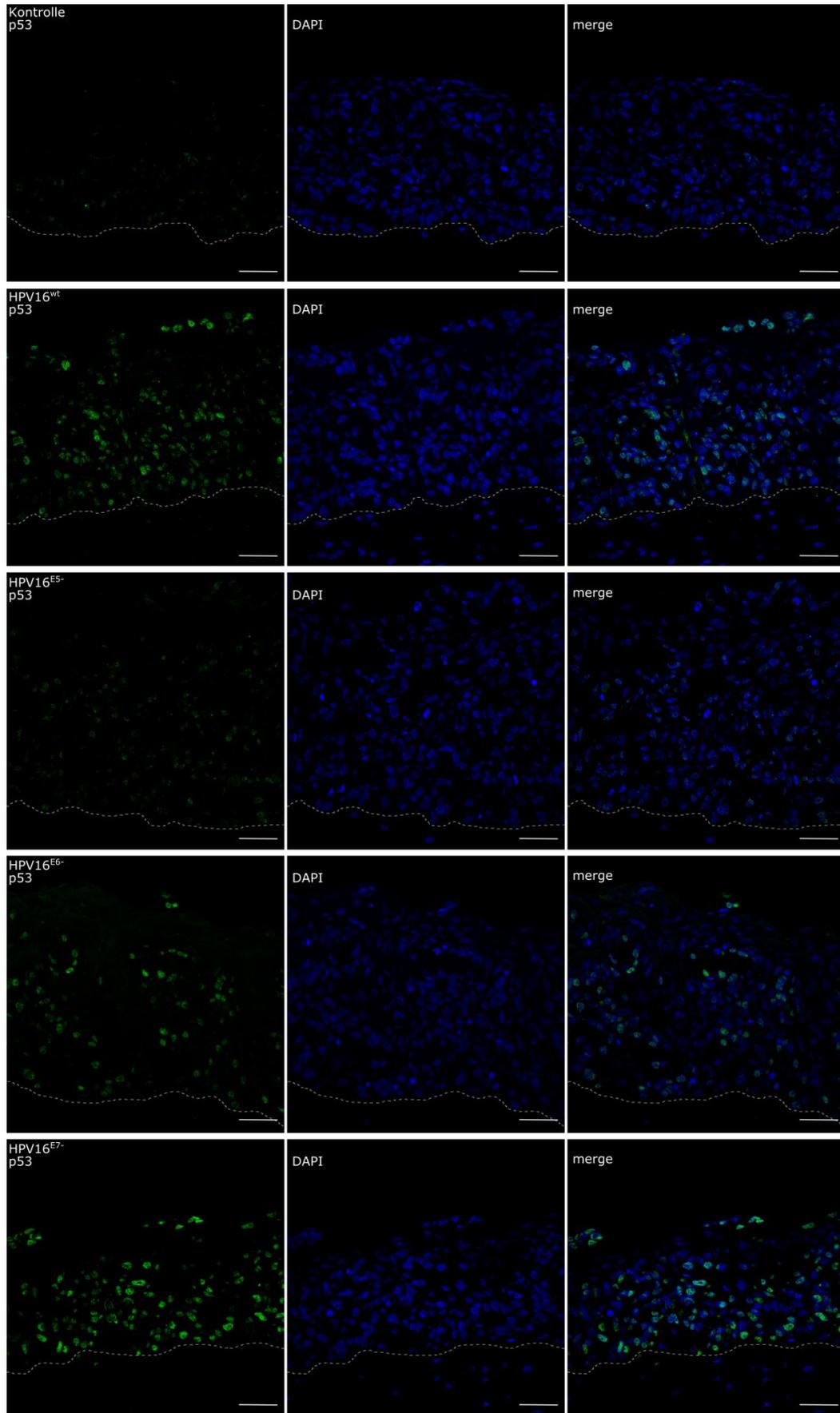


Abbildung 3.17: Involucrin und K14 zeigen global keine Veränderung in ihrer Expression

Aus Gewebe von jeweils 3 unabhängigen Raftkulturen jeder HPV-Mutante und den beiden Kontrollen wurden die Proteine extrahiert. 25 µg wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot Involucrin und K14 mit monoklonalen Antikörper detektiert. Als Referenzkontrolle diente Histon H3. Die densitometrische Quantifizierung erfolgte mit der Software von ImageJ (Rasband, 1997-2004). Die Daten sind auf Histon H3 normalisiert und auf die Kontrolle normiert Mittelwerte ± Stabw dargestellt. Die statistische Auswertung via Anova-Analyse ergab keine Signifikanz der schwach erkennbaren Unterschiede.

3.2.10 Die Präsenz von HPV16 erhöht die p53-Expression in HaCaT-Gewebekultur

Die zwei intrazellulären Hauptangriffspunkte für die HPV-Onkoproteine E6 und E7 sind p53 bzw. pRb, deren Funktion durch eine erhöhte Degradation inhibiert wird. Beide Proteine sollten hier als weitere Marker zur Bestätigung der Funktionstüchtigkeit des etablierten Systems dienen. Als erstes wurden die intrazellulären p53-Mengen via Immunofluoreszenz analysiert. Die Aufnahmen erfolgten als Z-Achsen-Projektionen, wobei in Abbildung 3.18 die Summe der Fluoreszenzintensitäten dargestellt ist. HPV16^{wt} zeigte eine deutliche Zunahme p53 positiver Zellen im Gewebe sowohl gegenüber der Kontrolle als auch der mock-Kontrolle peGFP-N1. Dabei wiesen die positiven Zellen auch eine erhöhte Expression von p53 auf (Abbildung 3.19).



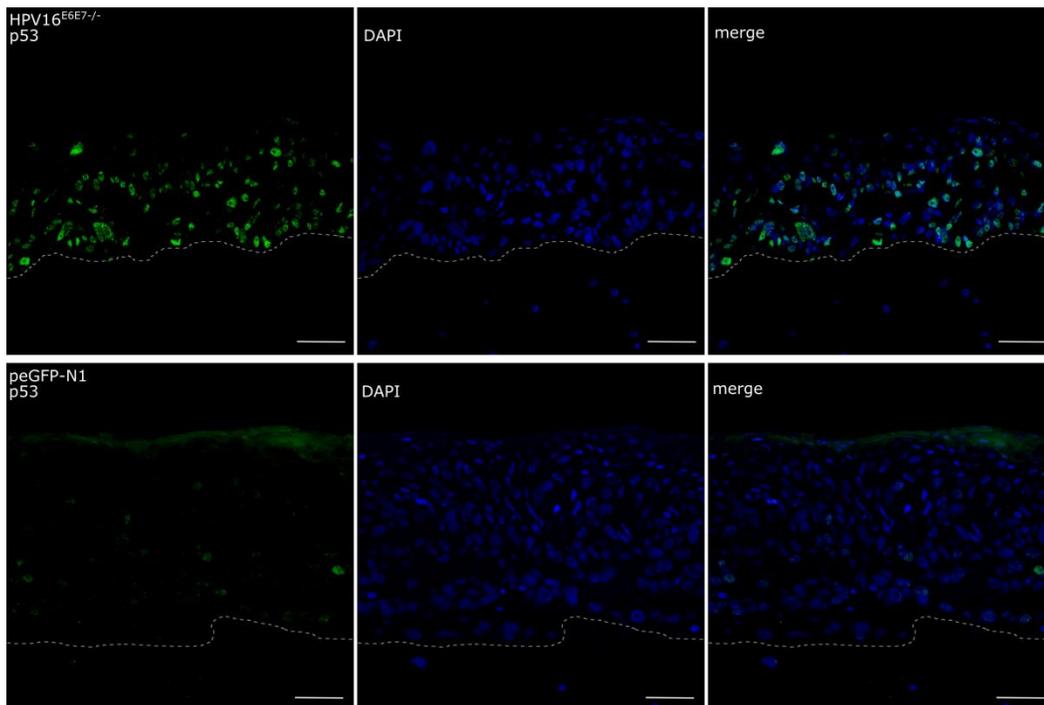


Abbildung 3.18: Nachweis erhöhter p53 Expression in HPV-positivem Gewebe mittels Immunfluoreszenz

Immunfluoreszenzfärbung paraffineingebetteter 5 μ m Schnitte der verschiedenen Raft-Kulturen via monoklonalem Antikörper gerichtet gegen p53. Für alle Färbungen wurden die gleichen Mikroskopeinstellungen verwendet, um neben strukturellen auch quantitative Aussagen treffen zu können. Die Aufnahmen erfolgten als z-Achsen-Projektion über 10 Ebenen jeden Schnittes. Dargestellt hier jeweils als Summe der Intensitäten über die z-Achse von p53 (grün), Zellkerngefärbung DAPI (blau) und der Überlagerung beider Ebenen (merge). Quantifizierung ist dargestellt in Abbildung 3.19. Maßbalken entspricht 50 μ m.

Alle Mutanten verhielten sich in ähnlicher Weise und zeigten gegenüber beiden Kontrollen einen deutlich gesteigerten Anteil p53 exprimierender Zellen höherer Intensität. Eine Ausnahme bildete dabei HPV16^{E5-} in deren Gewebe die Zellen nur schwach p53 positiv erschienen, aber wiederum in sehr großer Anzahl. Für eine bessere Objektivierung der erhaltenen Bilder wurden diese bezüglich der einzelnen Fluoreszenzintensitäten und der Anzahl p53-positiver Zellen quantifiziert. Dabei bestätigte sich die Verteilung der p53 Proteinmenge im Gewebe. Alle HPV-positiven Kulturen zeigten einen erhöhten Anteil von Zellen mit p53. Im Falle von HPV16^{wt} sind es durchschnittlich 58%, bei HPV16^{E5-} 61%, HPV^{E6-} 56% und bei HPV16^{E6/E7-/-} 71%. Dem gegenüber sind die Anteile bei der Kontrolle mit 26% und der Mock-Kontrolle peGFP-N1 mit 41% deutlich geringer. Für HPV16^{E7-} konnten keine Daten erhalten werden, da es nicht möglich war, einheitlich qualitativ hochwertige Aufnahmen zu reproduzieren.

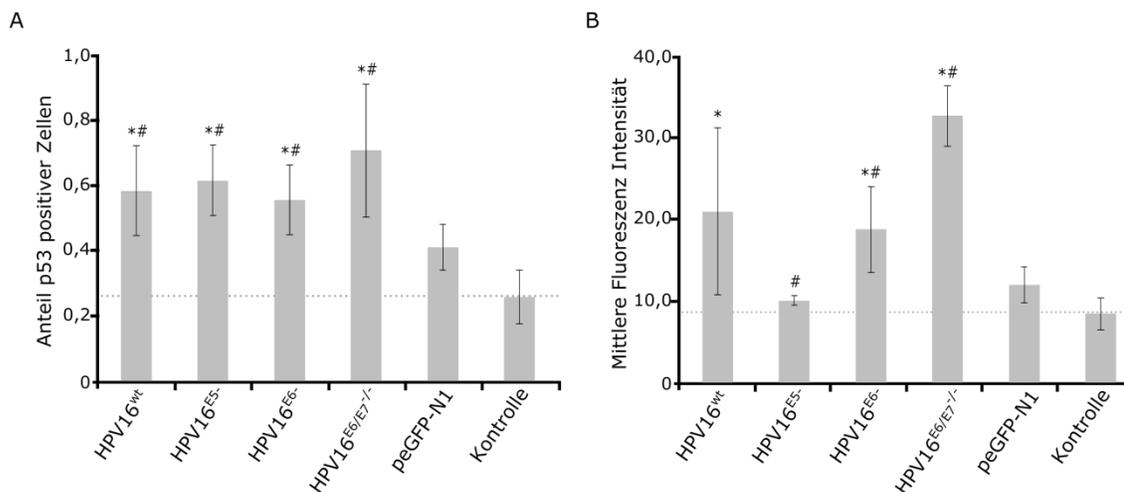


Abbildung 3.19: Quantifizierung erhöhter p53 Expression in HPV-positivem Gewebe mittels Immunfluoreszenz

A: Anteil p53-positiver Zellen. Die Auswertung erfolgte anhand der Bilder, welche die Summe der Intensitäten über 10 z-axiale Ebenen darstellten. Mittels der ImageJ Software (Rasband, 1997-2004) wurden der DAPI-Kanal als Maske aller Zellkerne verwendet, um im p53-Kanal die spezifischen Fluoreszenzsignale auszumessen (genauer siehe 2.6.8). Alle Werte oberhalb des Hintergrunds wurden gezählt und der Anteil an der Gesamtzellzahl ermittelt. Unterschiede wurden mittels Holm-Sidak-Test auf ihre Signifikanz getestet. * $p < 0,001$ zur Kontrolle, # $p < 0,001$ zu peGFP-N1.

B: Mittlere Fluoreszenzintensitäten (MFI) p53-positiver Zellen. Die Auswertung erfolgte wie unter A beschrieben. Die Daten repräsentieren die MFI über die Gesamtfläche eines jeden positiven Zellkernes. Unterschiede wurden mittels Kruskal-Wallis-Test * $p < 0,05$ zur Kontrolle bzw. U-Test # $p < 0,05$ zu peGFP-N1 auf ihre Signifikanz getestet.

In der Betrachtung der mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) für p53 war erkennbar, dass neben dem Anteil p53-positiver Zellen auch deren Signalintensitäten erhöht erschienen. Ausnahme bildete hierbei HPV16^{E5-} mit einem MFI von durchschnittlich 10,0, welcher im Bereich der Kontrolle mit 8,4 und der von peGFP-N1 mit 11,9 lag. HPV16^{wt} fiel durch eine breite Streuung um einen mittleren Wert von 20,9 auf. Ebenso verhielt es sich bei HPV16^{E6-} um einen mittleren Wert von 18,7. HPV16^{E6/E7-/-} zeigt eine hohe p53 Präsenz mit einem MFI von 32,6. Im Immunblot zeigten sich diese Ergebnisse nochmals deutlicher. Bis auf HPV16^{E6-}, mit einer p53-Menge auf dem Niveau der beiden Kontrollen, zeigten alle anderen HPV-positiven Gewebe eine erhöhte p53 Expression. Diese war, wie im Fall von HPV16^{wt} bis zu 23fach im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Die im Western Blot erhaltenen Werte für HPV16^{E6-} korrelierten damit nicht mit denen aus der Immunfluoreszenz, wo weder bezüglich des Anteils p53-positiver Zellen noch in Bezug auf die MFI-Werte signifikante Differenzen zu z.B. HPV16^{wt} auffielen.

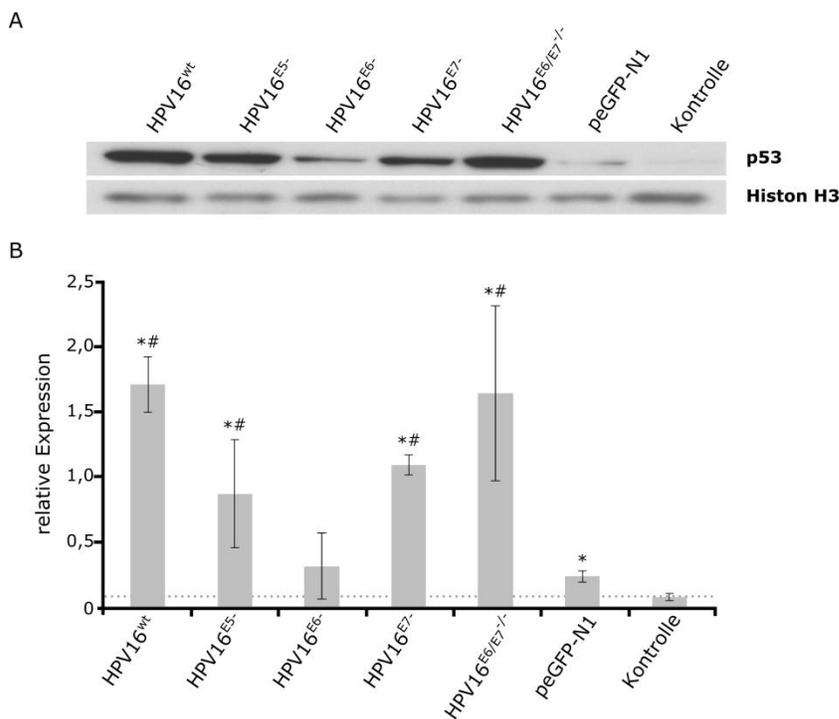


Abbildung 3.20: Erhöhte p53 Expression in HPV-positivem Gewebe

Aus Gewebe von jeweils 3 unabhängigen Raftkulturen jeder HPV-Mutante und den beiden Kontrollen wurden die Proteine extrahiert. 25 µg wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot p53 mit einem monoklonalen Antikörper detektiert. Als Referenzkontrolle diente Histon H3. Die densitometrische Quantifizierung erfolgte mit der Software von ImageJ (Rasband, 1997-2004). Unterschiede wurden mittels t-Test auf ihre Signifikanz getestet: * p < 0,05 zur Kontrolle; # p < 0,05 zu peGFP-N1.

Zusammenfassend waren 3 Ergebnisse hervorzuheben. In allen HPV-tragenden Geweben war die Anzahl p53-positiver Zellen deutlich erhöht gegenüber den Kontrollen. Die Gewebe mit HPV16^{E5} zeigten in der Immunfluoreszenz und im Western Blot deutlich geringere p53 Proteinmengen im Vergleich zum HPV16-Wildtyp. Hingegen war in den Raftkulturen von HPV16^{E6/E7}-/- sowohl der Anteil p53-positiver Zellen, als auch ihre p53-Expression in Immunfluoreszenz und Immunblot auf gleichem bis leicht erhöhtem Niveau im Vergleich zu Kulturen des Wildtyps.

3.2.11 Expression von pRb und p16^{INK4A}

E6 und E7 komplementieren ihre jeweiligen Funktionen zur onkogenen Transformation. E6 verhindert in infizierten Zellen die Induktion von Apoptose über die Interaktion mit p53, dessen Expression im vorigen Abschnitt untersucht wurde. Damit ermöglicht E6 das Überleben der Zellen, welche durch E7 und dessen Inhibition der Zellzykluskontrolle durch pRb einer erhöhten DNA-Replikation und unkontrolliertem Wachstum ausgesetzt sind (Übersicht in McLaughlin-Drubin and Münger, 2009). E7 erreicht dies durch eine Destabilisierung von pRb über eine erhöhte proteasomale Degradation (Jones et al., 1997b).

Die Inaktivierung von pRb löst die negative Feedbackkontrolle der Expression von p16 auf. Die Folge ist eine p16-Überexpression, welche als ein prognostischer Marker hochgradiger CIN-Läsionen verwendet werden kann (Übersicht in Wentzensen and von Knebel Doeberitz, 2007).

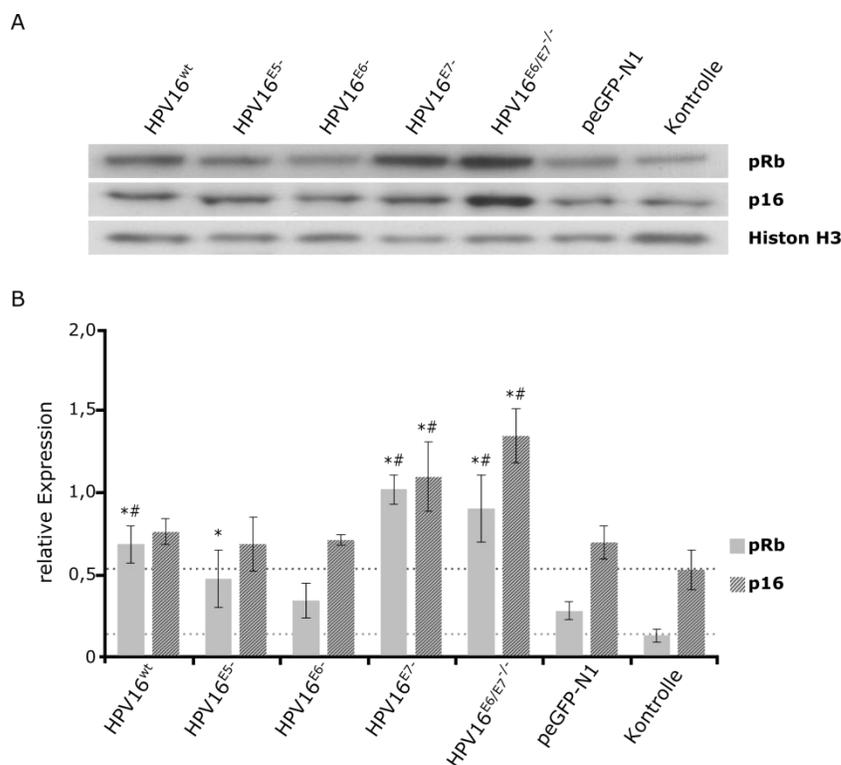


Abbildung 3.21: Erhöhte Expression von pRb und p16 in Gewebe der HPV16 E7-Mutanten

Aus Gewebe von jeweils 3 unabhängigen Raftkulturen jeder HPV-Mutante und den beiden Kontrollen wurden die Proteine extrahiert. 25 µg wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot pRb und p16 mit monoklonalen Antikörper detektiert. Als Referenzkontrolle diente Histone H3. Die densitometrische Quantifizierung erfolgte mit der Software von ImageJ (Rasband, 1997-2004). Die dargestellten Werte sind auf Histone H3 normalisiert. Die Daten wurden statistisch via Anova-Analyse ausgewertet und mittels Holm-Sidak-Verfahren Unterschiede auf ihre Signifikanz getestet. * p < 0,002 zur Kontrolle, # p < 0,002 zu peGFP-N1.

Beide Proteine wurden hinsichtlich ihrer Expression auch in den erhaltenen Raftkulturen dieser Arbeit untersucht. Auffällig für pRb als auch p16 war eine erhöhte Expression in den E7-defizienten Kulturen HPV16^{E7-} und HPV16^{E6/E7-/-}. Für pRb entsprach dies einer bis zu 8fach erhöhten Proteinmenge während p16 eine maximal 2,5fache Erhöhung gegenüber der Kontrolle aufwies (Abbildung 3.21). Auch war die Expressionserhöhung in beiden E7-Mutanten gegenüber den anderen HPV-positiven Kulturen erhöht, wenn auch in einem reduzierteren Ausmaß. Für pRb zeigte sich eine Tendenz reduzierter Expression in den Kulturen von HPV16^{E6-} und HPV16^{E5-} im Vergleich zu HPV16^{wt}. Dabei blieb die Proteinmenge von p16 auf dem Niveau der Kontrolle und der mock-Kontrolle peGFP-N1. Zusammenfassend ließ sich nur ein erhöhtes p16-Expressionsniveau, wie in hochgradigen

CIN-Läsionen, in denjenigen Kulturen feststellen, welche den Mediator einer solchen Überexpression nämlich E7 nicht exprimieren. Auf der anderen Seite war auch keine Reduktion von pRb nachzuvollziehen. In allen HPV-positiven Kulturen erschienen erhöhte Proteinmengen von pRb.

4 DISKUSSION

Innerhalb der nächsten 20 Jahre ist trotz der Einführung der beiden Impfstoffe gegen die häufigsten HPV-Typen 16 und 18 nicht mit einer deutlichen Verringerung der Inzidenz zervikaler Karzinome zu rechnen (Nieto et al., 2010). Auch zeichnet sich der Einfluss unterschiedlicher HPV-Typen bei der Entstehung von z.B. Hauttumoren und Tumoren des Kopf- und Halsbereiches deutlicher ab (Akgul et al., 2006; Psyrri and DiMaio, 2008). Beide Erhebungen legen nahe, dass es weiterhin bedeutsam ist, die Biologie von HPV-Infektionen sowie die Wirkmechanismen der viralen Proteine detailliert aufzuklären, um geeignete Therapieansätze für spezifische Infektionen und Tumorbehandlungen zu finden.

Bisher stammt der überwiegende Teil der Erkenntnisse, speziell für E6 und E7, aus Experimentssystemen, die eher die späten Phasen der Tumorentstehung und -manifestation reflektieren. Dazu werden Proteine unter der Kontrolle eines heterologen Promotors in einer Zelllinie überexprimiert, vergleichbar der natürlichen Situation nach einer HPV-Integration ins Wirtsgenom. Für die Untersuchung der frühen Phasen der Entstehung HPV-induzierter Neoplasien ist es jedoch von größerer Bedeutung das Virus in seiner Gesamtheit zu betrachten und dabei speziell das Zusammenwirken der einzelnen Proteine zu kennzeichnen, wenn sie unter der Kontrolle ihrer eigenen Promotoren stehen. Die virale Promotoraktivität und Proteinexpression benötigen die Differenzierung des virustragenden Epithels und können daher nicht in einer zweidimensionalen Zellkultur abgebildet werden (Lee, 2007). Obwohl die Verfahrensweise, epitheliales Gewebe *in vitro* herzustellen, seit langem bekannt ist (Asselineau and Prunieras, 1984) und auch früh Anwendung in der HPV-Forschung fand (Arany and Tyring, 1996; Bedell et al., 1991; McCance et al., 1988; Stanley et al., 1989), ist es dem hohen Aufwand der Methode geschuldet, dass sie bislang nur sporadisch verwendet wurde.

Die vorliegende Arbeit widmete sich der Entwicklung eines *in vitro* Modells, das die Untersuchung der Funktionen der HPV16-Proteine E7, E6 und E5 in einem naturnahen Kontext abzubilden ermöglicht. Hierbei gelang es erstmals den viralen HPV16-Lebenszyklus in einer immortalisierten Zelllinie, den HaCaT, zu etablieren und Genommutanten für die drei Onkoproteine in organotypischer Raftkultur zu untersuchen.

4.1 Etablierung eines *in vitro* Modells auf der Basis von loxp_HPVI6_peGFP-N1-Vektoren in der immortalisierten Zelllinie HaCaT

Der erste Ansatz auf dem Weg zur Realisierung eines *in vitro* Modells zur Untersuchung der Funktionen der HPV16-Proteine E7, E6 und E5 in einem naturnahen Kontext strebte eine Übernahme von *in vitro* Virionen-Produktion (Buck et al., 2004, 2005a) zur effizienten und naturnahen Einschleusung von HPV16 und HPV16-Genommutanten in Keratinozyten an. Dies blieb unter den getesteten Bedingungen jedoch unzureichend (Abschnitt 3.1.3). Die Gründe hierfür sind inzwischen bekannt und werden später ausführlicher diskutiert (Abschnitt 4.7). In Folge der nicht möglichen Verwendung von HPV16-Virionen war die Ausarbeitung einer grundsätzlich anderen experimentellen Basis erforderlich.

Die natürlichen Wirtszellen für eine HPV-Infektion sind Keratinozyten. Für deren *in vitro* Manipulation durch das Einbringen von Fremd-DNA ist Transduktion mittels retroviraler Vektoren der Goldstandard (Mathor et al., 1996). Diese Methode bleibt aber beschränkt auf DNA-Fragmente kleiner und mittlerer Größe bis maximal 7,5 kb (Verma and Somia, 1997) und schließt damit das Einschleusen vollständiger HPV16-Genome (7,9 kb) aus. Alternativ dazu wurde die Entwicklung adenoviraler Vektoren - speziell für Gentherapieansätze - auch in Bezug auf Hauterkrankungen vorangetrieben (Flotte and Carter, 1995). Dieses Vorgehen verbindet eine hohe Transduktionseffizienz bei geringer Toxizität mit der Möglichkeit, sehr große Konstrukte in epitheliale Zellen einzuschleusen (Braun-Falco et al., 1999). Folgerichtig wurde die adenovirale Transduktion in Kombination mit intrazellulärer Rekombination auf Basis eines Cre/LoxP-peGFP-Vektorensystems erstmals auch dazu verwendet, hoch effizient HPV16 episomal in primäre Keratinozyten einzubringen (Lee et al., 2004). Dieses System wurde deshalb, in abgewandelter Form, als neue methodische Grundlage für die *in vitro* Funktionsanalyse der HPV16-Proteine E7, E6 und E5 gewählt. Dabei sollte der Nutzen der intrazellulären Rekombination verbunden werden, mit der Möglichkeit einer chemischen Selektion HPV-positiver Klone. Eine solche Selektion war im ursprünglichen adenoviralen System auf Grund eines fehlenden Resistenzgens auf den Vektoren nicht möglich (Lee et al., 2004). Deshalb war eine unmittelbare Übernahme des methodischen Ablaufes ausgeschlossen. Die verwendeten Konstrukte für HPV16^{wt} und der 4 Mutanten HPV16^{E7-}, HPV16^{E6-}, HPV16^{E5-} und HPV16^{E6/E7-/-} wurden daher in der Weise verändert, dass der adenovirale Anteil eliminiert wurde, der Anteil des peGFP-N1-Plasmids mit der Neomycin-Resistenzkassette aber vollständig erhalten blieb (Abbildung 3.6). Die jeweiligen HPV16-Varianten waren über zwei LoxP-Erkennungssequenzen in reverser Orientierung in den peGFP-N1-Plasmiden kloniert (Abbildung 3.6). Das ca. 50 bp umfassende Insert, welches die 34 bp lange LoxP-

Erkennungssequenz und Teile der MCS des Plasmids pBluescriptKS enthielt, lag im nach der Rekombination rezirkularisierten HPV16-Genom in der LCR. Die LCR spielt bekanntermaßen eine entscheidende Rolle in der viralen Replikation (Fontaine et al., 2000; Sibbet et al., 1995; Smola-Hess et al., 2001). Der Bereich des Inserts jedoch zeigte in klinischen Isolaten eine hohe Sequenzvarianz (Chen et al., 1997; Smits et al., 1994; Tornesello et al., 1997), woraus geschlussfolgert wurde, dass derartige Veränderungen keinen funktionalen Einfluss ausüben sollten (Lee et al., 2004).

Aus diesem neu strukturierten Transfektionsvektor ergaben sich folgende Vorteile. Die Notwendigkeit HPV-Genome in einem aufwendigen und wenig effizienten Verfahren aufzureinigen und zu rezirkularisieren (Abschnitt 3.1.1) entfällt, da sie nach der Transfektion durch die Cre-Rekombinase intrazellulär gebildet werden. Erfolgreich transfizierte Zellen lassen sich nachfolgend durch die Präsenz von GFP visuell nachweisen (wie im Ursprungssystem auch) und mittels Neomycin-Resistenz selektionieren. Jedoch erwies es sich als nachteilig, dass eine Kotransfektion des loxp_HP16_peGFP-N1-Plasmids zusammen mit dem myc-Cre-Plasmid erforderlich wurde. Transfektion gilt bei Keratinozyten jedoch grundsätzlich als wenig effizientes Verfahren zur Einschleusung von Virusgenomen und hat zudem den negativen Nebeneffekt einer differenzierungsinduzierenden Wirkung (Distler et al., 2005). Wir konnten allerdings durch Anpassung der HaCaT-Kulturbedingungen die Effizienz der Transfektion mit einem Anteil zwischen 25% und 50% GFP-positiver Zellen (Abbildung 3.7 A) deutlich steigern gegenüber einer Rate von 5 – 10% im Falle adenoviraler Infektion (Lee et al., 2004). Darüber hinaus konnte der Effekt transfektionsinduzierter Differenzierung durch eine starke Reduktion der Kalziumkonzentration im Kulturmedium deutlich minimiert werden (Vergleich Abbildung 3.9 A zu Abbildung 3.5 B). Eine frühe virale Gentranskription war, vergleicht man sie mit den Mengen an E1^{E4} mRNA nach der Infektion mit HPV16-Virionen (Abbildung 3.3), auf deutlich höherem Niveau nachzuweisen (Abbildung 3.8). Die Episode von HPV16^{wt} und der Onkogenmutanten etablierten sich in hoher Kopienzahl nach abgeschlossener intrazellulärer Rekombination (Abbildung 3.8). Diese episodale Manifestierung hoher Anzahl blieb dabei über einen Zeitraum von 4 Wochen und der Kultivierung als organotypische Raftkultur in HaCaT-Zellen stabil (Tabelle 3.1).

Somit ist neben der Verwendung HPV-tragender Keratinozyten, die aus *in vivo* Läsionen gewonnen wurden, und der Immortalisierung primärer Keratinozyten in Folge von Transfektion mit *high risk* HPV-Genomen (Frattini et al., 1997; Frattini et al., 1996; Meyers et al., 1997), die Nutzung des hier etablierten transfektionsbasierten loxp_HP16_peGFP-N1-

Systems ein dritter und vergleichsweise effizienter Weg für die *in vitro* Untersuchung der Funktionen der HPV16-Proteine in einem naturnahen Kontext. Letzteres schließt zudem die Möglichkeit der Manipulation des HPV-Genoms, insbesondere die Verwendung von Onkoproteinmutanten ein. Damit war der erste entscheidende Schritt zur Funktionsanalyse tumorbiologisch interessierender Proteine von HPV16, das effiziente Einschleusen von relevanten HPV-Genomen in kultivierbare Keratinozyten, erreicht.

Der zweite Etablierungsschritt galt der Bereitstellung eines naturnahen Umfeldes, das den HPV-Lebenszyklus möglichst adäquat unterstützen kann. Wie bereits weiter oben erwähnt, kann die organotypische Raftkultur (Asselineau and Prunieras, 1984) dies bis hin zu der Produktion infektiöser HPV-Virionen gewährleisten (Campo, 2002). Hierfür wurden zu Beginn derartiger Untersuchungen etablierte Zelllinien aus CIN-Läsionen oder Zervixkarzinomen verwendet, die Infektionen der HPV-Typen 11, 16, 31 und 59 aufwiesen (Bonnez et al., 1998; Lehr et al., 2003; Meyers et al., 1992; Ozburn, 2002b; Sterling et al., 1990). Parallel dazu wurde auch begonnen primäre Keratinozyten mit HPV-Genomen zu transfizieren, was erstmals den Einsatz gentechnisch veränderter HPV-Typen ermöglichte (Frattoni et al., 1997; Frattoni et al., 1996; McLaughlin-Drubin et al., 2003; Meyers et al., 2002; Meyers et al., 1997). Letzteres System sollte auch für das eigene Vorgehen übernommen werden. Dabei sollte in der Etablierungsphase die immortalisierte Keratinozytenzelllinie NIKS (Allen-Hoffmann et al., 2000) wegen der einfacheren und kostengünstigeren Nutzbarkeit verwendet werden. Die Zelllinie wurde bereits mehrfach auf Grund ihres hohen Differenzierungspotentials in organotypischer Raftkultur in Kombination mit HPV als Ersatz für primäre Keratinozyten angewendet (Flores et al., 2000; Flores et al., 1999; Genther et al., 2003; Nakahara et al., 2005; Zehbe et al., 2009). In den eigenen Untersuchungen war es jedoch nicht möglich, ein vielschichtiges, differenziertes Epithel aus Zellen zu erhalten, die mit loxp_HP16_peGFP-N1-Vektoren transfiziert wurden. Dies war höchstwahrscheinlich dem Umstand geschuldet, dass die Transfektion eine starke Induktion zu terminaler Differenzierung hervorrief. Dieser Effekt war bereits in der Monolayer-Kultur am Nachweis eines Morphologiewechsels der Zellen erkennbar. In der Raftkultur manifestierte es sich in einer nur sehr schwachen Ausprägung von dermalen Strukturen mit wenigen Zellschichten (2 – 5), die keine weitere strukturelle Unterscheidung ermöglichten (Abbildung 3.4). Eine Unterbindung dieses Effektes wäre durch eine starke Reduktion des Kalziumgehaltes im Kulturmedium gegebenenfalls erreichbar gewesen (vgl. HaCaT Abbildung 3.5 B) (Flores et al., 1999). Jedoch konnte eine Überprüfung im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wegen

fehlender kalziumfreier Komponenten für das Kulturmedium FAD nicht vorgenommen werden.

Als Alternative zu den nicht verwendbaren NIKS-Zellen (s.o.) zur Etablierung eines *in vitro* Systems mit naturnahen Eigenschaften bei technisch einfacher und kostengünstiger Umsetzung bot sich die Testung der immortalisierten Zelllinie HaCaT an. Obwohl diese Zelllinie bekanntermaßen ein geringeres Differenzierungspotential als primäre Keratinozyten und NIKS aufweist (Allen-Hoffmann et al., 2000; Boukamp et al., 1988; Deyrieux and Wilson, 2007), kann sie aber trotzdem in dreidimensionaler Zellkultur verwendet werden (Breitkreutz et al., 1998; Schoop et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde durch gezielte Anpassung der Kulturbedingungen der Monolayer-Kultur erreicht, dass sich Morphologie und Differenzierungsstatus der HaCaT-Zellen deutlich derer primärer Zellen annäherte (Abbildung 3.5 A & B). Nachfolgend konnte das auch in organotypischen Raftkulturen erreicht werden (Abbildung 3.10). Die Raftkulturen bildeten dabei eine Morphologie aus, die sich nur geringfügig durch den Transfektionsprozess beeinflusst zeigte. Das wurde besonders im Vergleich mit der Mock-Kontrolle peGFP-N1 transfizierter HaCaT-Raftkulturen deutlich. So entsprach die Struktur der Raftkulturen bis auf ein weniger ausgeprägtes *Stratum corneum* sowie eine leichte Hyperkeratinisierung weitgehend der Struktur der Kontrolle.

Die HaCaT-Zelllinie wurde in der HPV-Forschung bisher hauptsächlich in Monolayer-Kultur verwendet und kam nur in selten organotypischer Raftkultur bei der Untersuchung der Funktion von HPV16 E5 zum Einsatz (Tomakidi et al., 2000a, b). Jedoch wurde bislang für diese Zelllinie nicht der Nachweis erbracht, dass der HPV-Lebenszyklus unterstützt wird und unter Verwendung des Gesamtgenoms von HPV16 und der Expression der viralen Gene unter der Kontrolle ihrer eigenen Promotoren ein naturnahes *in vitro* Modell etabliert werden kann. In den Raftkulturen der vorliegenden Untersuchungen konnte von HPV16^{wt} und allen Mutanten die episomale Etablierung von HPV16 in hoher Kopienzahl bestätigt werden (Tabelle 3.1). Da sich die Genomkopienzahl im angewandten MPG-Assay jedoch auf eine externe Standardkurve beziehen, ist eine direkte Korrelation zu einer Kopienzahl pro Zelle nicht möglich (Schmitt et al., 2008). Bei Kopienzahlen zwischen 10^5 und 10^7 pro PCR-Reaktion (Tabelle 3.1) kann aber davon ausgegangen werden, dass die Anzahl etablierter Episome pro Zelle (im Bereich von 10 – 200) in etwa der Anzahl derer natürlicher Infektionen entspricht (Gray et al., 2010; Stanley et al., 1989). Der Nachweis hoher E6*I-Transkriptmengen im qualitativen RT-PCR-Assay (Tabelle 3.1), die Genomkopienzahlen > 1000 vermuten lassen, unterstützen diese Annahme. In Übereinstimmung mit Flores et al. und McLaughlin-Drubin et

al. bestätigt es die Unabhängigkeit einer episomalen Etablierung des Virusgenoms von der Expression von E7 und E6 (Flores et al., 2000; McLaughlin-Drubin et al., 2005).

Die Präsenz von E6 und E7 mRNA ist ein Hauptcharakteristikum zervikaler Plattenepithelkarzinome (zur Hausen, 1991). Zu der E6/E7 *full length* mRNA existieren mit E6*I und E6*II zwei gespleißte Transkripte von HPV16 in zervikalen Neoplasien (McNicol et al., 1995; Sherman et al., 1992; Shirasawa et al., 1991). Neben der Präsenz von *high-risk* HPV-DNA erhöht eine nachweisbar aktive E6*I Transkriptionsaktivität die Spezifität für die Detektion einer CIN-Läsion (Sotlar et al., 2004). Bezieht man diese Befunde auf die hier etablierten Raftkulturen, erscheint es angemessen, sie auf Grund der hohen HPV16-Präsenz sowie der vorhandenen aktiven viralen E6*I-Transkription (Tabelle 3.1) mit etablierten CIN-Läsionen *in vivo* vergleichen zu können. Nachgehenden Arbeiten bleibt eine detailliertere Beschreibung des gesamten HPV16-Transkriptom, ein Vergleich zu CIN-Läsionen und damit auch ein Überblick über den manifestierten HPV-Lebenszyklus in diesem System vorbehalten. Dazu könnte der neu entwickelte NASBA-Luminex Hybridisierungssassay herangezogen werden (Schmitt et al., 2011).

Anhand der aufgeführten Daten konnte somit der Nachweis einer Verwendbarkeit der HaCaT-Zelllinie in einem *in vitro* Modell als dermales Äquivalent auf Basis loxp_HPV16_peGFP-N1 transfizierter Zellen erbracht werden, das eine aktive HPV-Transkription unterstützt.

4.2 HPV16 vermittelt ein stärkeres Auswachsen der HaCaT-Raftkultur durch eine induzierte Proliferation in suprabasalen Bereichen

HP-Viren müssen in den von ihnen infizierten Zellen einen Konflikt auflösen. Die Vervollständigung ihres Lebenszyklus über eine effiziente Induktion viraler Transkription am späten Promotor p670 hin zu neu gebildeten infektiösen HP-Viren erfordert die fortschreitende Differenzierung der Wirtszellen (Howley and Lowy, 2001). Dabei führt die terminale Differenzierung zum Übergang der Zellen in suprabasalen Schichten in die G₀-Phase. Die Amplifikation des viralen Genoms wiederum benötigt den Durchlauf der S-Phase in den HPV-tragenden Zellen (Kadaja et al., 2009). Das E7 Protein der *high-risk* HPV-Typen beeinflusst mit dem Tumorsuppressor pRb ein Schlüsselprotein in der Zellzykluskontrolle und Differenzierung sowie dessen nahe verwandte Pocketproteine p107 und p130 (Munger et al., 2004). Die Interaktion schafft bzw. erhält im Gewebe ein Umfeld, das den differenzierungsabhängigen Zellzyklusaustritt umgeht und die virale Genomamplifikation ermöglicht

(McLaughlin-Drubin et al., 2005). Diese Eigenschaft von *high-risk* E7 konnte bereits in organotypischer Raftkultur gezeigt werden (Cheng et al., 1995; Chien et al., 2002; Chien et al., 2000).

Der Nachweis eines S-Phasen-Wiedereintritts bei postmitotischen, differenzierten Zellen sollte im vorliegenden Modell vordergründig als Marker für die Expression von E7 und der Funktionalität der beiden E7-Mutanten dienen. Der BrdU-Inkorporationsassay zeigte eine deutliche Zunahme von Zellen mit DNA-Synthese in suprabasalen Bereichen der Gewebe von HPV16^{wt}, HPV16^{E5-} und HPV16^{E6-}. Die beiden E7-Mutanten wiesen hingegen einen stark erniedrigten Quotienten BrdU-positiver Zellen im suprabasalen zu Zellen im basalen Bereich des Gewebes auf (Abbildung 3.15). Damit konnte indirekt die Expression von E7 und die Funktionalität der Mutanten bestätigt werden. Weiterhin wiesen die reduzierten S/B-Quotienten im Vergleich zu den Wildtyp-Kulturen auf die unterstützende Beteiligung von E6 und E5 in den Prozess der Proliferationsinduktion in den suprabasalen Bereichen hin (Abbildung 3.15). Offensichtlich ist dabei die Bedeutung von E5 und E6 deutlich weniger relevant als die von E7. Der Einfluss von E5 auf die produktive Phase des HPV-Lebenszyklus konnte in einem ähnlichen System bereits verifiziert werden und zeigte eine Reduktion an proliferativen Zellen um den Faktor 2 (Fehrmann et al., 2003; Genther et al., 2003). In den hier untersuchten Geweben war dieser Befund mit einem Faktor von 1,5 weniger stark ausgeprägt. Diese Diskrepanz ist dabei wohl der technischen Anpassung der Auswertung (Abschnitt 3.2.8), auf Grund der weniger klar strukturierten Morphologie der HaCaT-Raftkulturen (Abbildung 3.10) geschuldet. Die Mechanismen, die hinter einer E5-vermittelten Induktion von Proliferation stehen, sind bisher nicht ausreichend aufgeklärt. Der vermutliche Angriffspunkt ist die Modulation der EGFR-Signalwege direkt (Bouvard et al., 1994; Crusius et al., 1998; Fehrmann et al., 2003; Gu and Matlashewski, 1995) oder indirekt über die 16kDa-Untereinheit der v-ATPase (Conrad et al., 1993; Straight et al., 1995). E6 vermittelt eine G1/S-Transition über die Hyperphosphorylierung von pRb, während die Interaktion mit p53 keine Rolle für diesen Prozess spielt (Malanchi et al., 2004; Malanchi et al., 2002). Dies konnte im vorliegenden Modell erstmals auch unter den Bedingungen einer differenzierungsabhängigen Expression von E6 nachgewiesen werden. Alle HPV-positiven Gewebekulturen enthielten einen höheren Anteil p53-positiver Zellen im Vergleich zu den Kontrollen (Abbildung 3.19 A).

Obwohl viele Daten dafür sprechen, dass durch die Wirkmechanismen der drei Onkoproteine die Zellen in suprabasalen Bereichen einen S-Phasen-Wiedereinstieg erfahren (Munger et al., 2004), besteht ebenfalls die Möglichkeit, dass E7 Tochterzellen der basalen und

suprabasalen Schicht daran hindert, in die G₀-Phase überzugehen (Banerjee et al., 2006). Auch die hier durchgeführte BrdU-Immunfluoreszenzanalyse lässt beide Möglichkeiten plausibel erscheinen. In einigen Bereichen zog sich eine Reihe von BrdU-positiven Zellen von der Basalschicht bis in die obersten granularen Schichten durch (Abbildung 3.14, beispielhaft HPV16^{E5-} durch gepunktete Linie markiert). Dies könnte als Indiz für den Erhalt der S-Phasenkompetenz der Zellen während ihrer Wanderung und Differenzierung vom *Stratum basale* zum *Stratum spinosum* angesehen werden. Ferner bestanden auch Strukturen in den obersten Bereichen der Raftkulturen, die positiv für BrdU waren, während die umgebenden Bereiche negativ blieben (Abbildung 3.14, beispielhaft HPV16^{wt}). Hierfür wäre ein S-Phasenwiedereinstieg die plausible Erklärung. E7 ist nur in einem Subset von Zellen, die sich durch eine geringe Expression von p21^{CIP1} und p27^{KIP1} auszeichnen, fähig, eine Zellzyklusprogression zu induzieren (Noya et al., 2001). Weitere Untersuchungen hierzu könnten dabei den Einfluss von E5 und E6 aufdecken.

Die Folge der HPV-vermittelten Hyperproliferation in suprabasalen Bereichen der Epidermis spiegelt sich eindrücklich in der Morphologie der einzelnen Raftkulturen wider (Abbildung 3.12). Die Gewebe HPV16^{wt}-tragender Zellen waren im Querschnitt 50% stärker ausgeprägt als die der Kontrolle (Abbildung 3.13). Der starke Rückgang der Gewebestärke der Mutanten HPV16^{E7-} und HPV16^{E6/E7-/-} auf das Niveau der Kontrollen korrelierte dabei mit einer deutlich geringeren Anzahl proliferativer Zellen in apikalen Zellschichten durch den Verlust an E7-Expression. Hingegen bewirkte die verminderte Anzahl S-Phasen-kompetenter Zellen der beiden Mutanten HPV16^{E6-} und HPV16^{E5-} eine nur geringgradige Reduktion des Gewebequerschnitts (Tabelle 3.2). Einzig auffallend war hier jeweils eine große Heterogenität innerhalb der Gewebe, die anhand der Daten nicht erklärt werden kann. Einen ähnlichen Einfluss von E5 auf das stark heterogene Auswachsen von organotypischen Raftkulturen konnte Barbaresi et al. (2010) ebenfalls nachweisen, wobei die zugrundeliegenden Mechanismen ebenso ungeklärt blieben.

Somit konnte anhand der eigenen Resultate bestätigt werden, dass neben E7 auch E6 und E5 jeweils eine wesentliche Rolle bei der Induktion von Hyperproliferation zukommt.

4.3 HPV16-positive organotypische HaCaT-Raftkulturen zeigen eine veränderte Histologie und Differenzierung im *Stratum granulosum*

Die Expression von E6 und E7 führt zu einem veränderten Differenzierungsprozess des HPV-infizierten Epithels und zu hyperproliferativen Läsionen, wie benignen Warzen und CIN-Läsionen (Übersicht in Doorbar, 2006). Daher war es interessant zu erfahren, inwieweit sich im vorliegenden *in vitro* Modell ähnliche Charakteristika zeigen. Im vorherigen Abschnitt wurde eine hyperproliferative Induktion durch die viralen Onkoproteine diskutiert. Deren morphologische Konsequenz zeigte sich in einer deutlichen Zunahme der Epithelstärke der Gewebe von HPV16^{wt} von 50% gegenüber der Kontrolle (Abbildung 3.13). Die Gewebe der Mutanten HPV16^{E6-} und HPV16^{E5-} zeichneten sich ebenfalls durch einen stärkeren Querschnitt aus. Ein solches Ergebnis konnte bisher unter der Verwendung von viralen Gesamtgenomen in organotypischer Raftkultur und in einer solchen Ausprägung nicht nachgewiesen werden (Banerjee et al., 2005; Banerjee et al., 2006; McLaughlin-Drubin et al., 2005; McLaughlin-Drubin et al., 2003; Meyers et al., 1997; Ozbun, 2002b; Ozbun and Meyers, 1998). Hingegen konnte in Geweben mit überexprimierten E7 bzw. kombinierter E6 und E7 Überexpression ein stärkeres Auswachsen erfasst werden (Nobre et al., 2009; Westphal et al., 2009), wobei das Ausmaß deutlich moderater ausfiel als in den eigenen Ergebnissen.

Als weiteres sehr auffälliges Charakteristikum der dermalen Äquivalente von HPV16^{wt}, HPV16^{E5-} und HPV16^{E6-} sind die sich eindrehenden Zellpopulationen in den obersten Bereichen von Raftkulturen hervorzuheben. Deren Phänotyp mit großen, hyperchromatischen Zellkernen und partiell transparentem Zytoplasma entsprach dem von Koilozyten (Abbildung 3.12, Pfeilmarkierungen), einem zytologischen Hauptkriterium der HPV-Infektion (Hajdu, 2006; Meisels and Morin, 1997; Yamamoto et al., 2004). Krawczyk et al. (2008) konnte eine nachhaltige Einbeziehung von E5 und E6 bei der Entwicklung der Koilozytose aufzeigen, mit einem stärkeren Einfluss von E5. In den eigenen Untersuchungen mit den gewählten Bedingungen für das differenzierte Epithel bei naturnaher Expression der viralen Proteine konnte dies in Übereinstimmung mit den Untersuchungen an E5-Mutanten von Barbaresi et al. (2010) ebenfalls bestätigt werden. Im Gewebe von HPV16^{E6/E7-/-} ist die Ausprägung und Anzahl von Koilozyten vergleichbar mit derer in Raftkulturen von HPV16^{wt}, was ebenfalls verdeutlicht, dass dieses Phänomen unabhängig ist von einer E7 induzierten Hyperproliferation. Unterstützt wird der geringere Einfluss von E6 bei der Induktion von Koilozytose durch die Präsenz solcher Strukturen auch in E6-defizitärem Gewebe.

Eine weiteres Charakteristikum der Veränderung epithelialen Gewebes in Folge einer HPV-Infektion ist die Induktion von Hyperkeratosis sowie die Präsenz von kerntragenden Zellen im *Stratum corneum* (Boxman et al., 2001; Middleton et al., 2003; Westphal et al., 2009). Organotypische HaCaT-Raftkulturen wiesen deutlich geringer eine Keratinisierung des *Stratum corneums* auf als die aus NIKS und primären Keratinozyten. Somit ist dieses Merkmal epithelialer HPV-Infektion in dem hier etablierten *in vitro* System nur unzureichend abgebildet und der Aussagewert hierzu damit deutlich eingeschränkt. Zumindest wurde aber im Falle der Morphologie von HPV16^{E7-} und HPV16^{E6/E7-/-} deutlich, dass sich bei diesen Mutanten ein den Kontrollen vergleichbares Bild zeigte und insbesondere eine strukturelle Schichtenunterscheidung möglich war. Speziell die histologische Verifizierung von HPV16^{wt} und HPV^{E5-} ergab, dass diese Gewebe deutlich dysmorphere Strukturen aufwiesen als Geweben mit einer Überexpression von E6 und E7 (Westphal et al., 2009). Ein Einfluss des insgesamt geringeren Differenzierungspotentials der HaCaT-Zelllinie ist dabei nicht auszuschließen.

Die Gewebe wurden zudem bezüglich ihrer Differenzierung mit dem Basalzellmarker K14 und dem Marker terminaler Differenzierung Involucrin anhand Immunfluoreszenz untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Anwesenheit von HPV16 keine einheitlich drastische Veränderung im Differenzierungsprozess des Epithels bewirkt. K14 erschien gleichmäßig in allen Gewebeschichten, mit einer höheren Expression im Basalbereich. Involucrin war hingegen in den apikalen Schichten der Raftkultur präsent und zeigte keine verzögerte Expression im Vergleich zu den Kontrollen (Abbildung 3.16). Dies wurde im Western Blot bestätigt, da sich in den verschiedenen Geweben keine signifikanten Unterschiede in der Expression beider Marker ergaben (Abbildung 3.17). Dennoch waren in der Immunfluoreszenz-Analyse relevante Unterschiede bei den untersuchten Geweben ersichtlich. In den organotypischen Raftkulturen von HPV16^{wt}, HPV16^{E5-} und HPV16^{E6-} wurden Formationen in den oberen Schichten nachweisbar, die durch eine geringe Färbung für Involucrin bei ungewöhnlich starker K14-Expression auffielen (Abbildung 3.16, Ausschnitte HPV16^{wt}). Diese Strukturen stimmten in Form und Ausprägung mit Strukturen des *Stratum granulosum* überein, die in der Histologie als sich eindrehende Strukturen mit Koilozyten verifiziert werden konnten (Abbildung 3.12, Pfeilmarkierungen). Dies steht in Übereinstimmung mit Daten von McLaughlin-Drubin et al. (2005). Mit dem Verschwinden solcher Strukturen in den obersten Bereichen der Raftkulturen in Folge des Verlustes der Expression von E7 waren diese strukturellen Färbungen nicht mehr nachweisbar. Die Verteilung von K14 und Involucrin bei HPV16^{E7-} und der Doppelmutante glich der in der Kontrolle.

4.4 Die produktive Phase des HPV16-Lebenszyklus wird in organotypischer HaCaT-Raftkultur nicht unterstützt

Unabhängig vom spezifischen Gewebetropismus unterschiedlicher HPV-Typen ist eine erfolgreiche Replikation und Produktion infektiöser Virionen unabdingbar für ihren Erhalt in der Population. Drei virale Marker können sowohl *in vivo* als auch *in vitro* für die produktive Phase des HPV-Lebenszyklus nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich um die Amplifikation der viralen Genome, die Expression des viralen Proteins E4 gefolgt von einer hohen Expression des Strukturproteins L1 (Doorbar, 2005). Da in der vorliegenden Arbeit die Anwesenheit des viralen Genoms nur global via MPG-Assay bestimmt wurde (Tabelle 3.1) und ein Nachweis mittels *in situ* Hybridisierung spezifisch in suprabasalen Bereichen des Gewebes nicht zur Anwendung kam, erfolgte der Nachweis der späten und produktiven Phase des viralen Lebenszyklus auf Proteinebene. Hierzu wurde E4 in der Immunfluoreszenz nachgewiesen. Das E1^{E4}-Protein ist bisher nicht ausgiebig untersucht. Seine Expression scheint ein wichtiger Bestandteil der produktiven Phase (Peh et al., 2004; Peh et al., 2002) und der Freisetzung neu assemblierter Virionen über die Auflösung des Keratinnetzwerkes zu sein (Dall et al., 2008; Doorbar, 2005; Doorbar et al., 1991; McIntosh et al., 2010; Roberts et al., 1994). Das E4-Protein zeigt die höchste Expression aller viralen Proteine in *in vivo* Läsionen und kann bis zu 30% der Gesamtproteinmenge suprabasaler Zellen einnehmen (Doorbar et al., 1986). Es ist auch dann detektierbar, wenn dies für E7 und E6 nicht möglich ist (Middleton et al., 2003). Dabei geht die E4-Expression der von L1 voraus (Doorbar et al., 1997; Peh et al., 2002). In den hier etablierten und untersuchten Geweben war E4 allein in den epidermalen Äquivalenten von HPV16^{wt} deutlich, wenn auch vereinzelt in den obersten Bereichen des *Stratum granulosum* detektierbar (Abbildung 3.11). Eine leichte Expression konnte auch in einem Gewebe von HPV16^{E5-} nachgewiesen werden. Middleton et al. (2003) ordnete in einer großen Analyse von CIN-Läsionen und Karzinomen die quantitative und strukturelle Expression von Markerproteinen, darunter auch E4, bestimmten Stadien der Läsionen zu. Dabei wurde ein Expressionsmuster hochgradigen zervikalen intraepithelialen Neoplasien (CINIII) zugeordnet (schwache, sehr begrenzte Expression nahe der epidermalen Oberfläche), das dem hier vorliegenden Expressionsmuster bei HPV16^{wt} ähnelt. Das Fehlen eines Nachweises von L1 in Immunhistochemie, Immunfluoreszenz und Western Blot in allen hier vorliegenden Raftkulturen bestätigt diese Einschätzung. Auch in CINIII-Läsionen ist der Nachweis von L1 ein sehr seltenes Phänomen (Middleton et al., 2003). Nicht auszuschließen bleibt aber ein negativer Einfluss der geringeren Differenzierung des HaCaT-Gewebes auf die Expression beider Proteine. So bedarf es auch im Falle von Raftkulturen HPV18-tragender primärer

Keratinocyten einer Verlängerung der Wachstumsphase auf 14 bis 18 Tage (normalerweise 10 Tage für eine vollständige Ausbildung des Epithels) für eine Detektion von L1 (Chow et al., 2009, Chow, L. & Broker, T. persönliche Kommunikation 2010). Übertragen auf die Wachstumsspanne der HaCaT-Raftkultur entspräche dies einer Kultivierung von bis zu 35 Tagen. Derartige Untersuchungen wurden jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Außerdem ist zu berücksichtigen, dass dabei die maximale Kultivierungsdauer dieser Art Gewebekultur erreicht würde. Ein längerer Zeitraum führt zu Apoptose und Nekrose innerhalb des Gewebes (Groeber et al., 2010).

Eine genauere Charakterisierung aller Marker und ein Vergleich zu *in vivo* Läsionen soll später genauer besprochen werden (Abschnitt 4.6).

4.5 Hyperproliferation in organotypischer HaCaT-Raftkultur basiert nicht auf der E6- und E7-vermittelten Degradation von p53 bzw. pRb

Zwei Hauptereignisse bestimmen die onkogene Wirkung von *high-risk* HPV-Typen, die Vermittlung der Degradation von pRb durch E7 und von p53 durch E6. Das hat eine unkontrollierte Proliferation infizierter Zellen zur Folge, die auch der Schutzmechanismen von Apoptose und DNA-Reparatur beraubt sind (Übersicht in Moody and Laimins, 2010). In den hier etablierten dermalen Äquivalenten von HPV16^{wt} und den Mutanten konnte hingegen ein solcher Effekt reduzierter Mengen an pRb und p53 nicht nachgewiesen werden.

Einheitlich zeigte sich in allen HPV-positiven Geweben ein circa doppelt so hoher Anteil an Zellen, die p53 auf detektierbarem Niveau exprimieren (Abbildung 3.19 A). Auch die Stärke der Expression von p53 war mit Ausnahme von HPV16^{E6-} (Gesamtgewebe) und HPV16^{E5-} (kernspezifisch) deutlich erhöht gegenüber den Kontrollen. Dies steht in Übereinstimmung mit einer bekannten E7-vermittelten Stabilisierung von p53 (Demers et al., 1994b), die auch bei einer Präsenz von E6 aufrechterhalten bleibt (Jones et al., 1997a; Jones et al., 1997b). Im Widerspruch zu einer E7-vermittelten Stabilisierung von p53 stehen hingegen die Befunde hoher Expressionsmengen an p53 in E7-defizitärem, HPV-positivem Gewebe (Abbildung 3.18). Hierfür lässt sich sowohl für den Gesamteffekt aller HPV-positiven Gewebe als auch speziell für die Befunde beider E7-Mutanten HPV16^{E7-} und HPV16^{E6/E7-/-} ein Einfluss der p53-Mutationen in der HaCaT-Zelllinie nicht ausschließen. Diese Mutationen liegen in der *core*-Domäne von p53 (Lehman et al., 1993). Ihre Wildtyp-Konformation ist essentiell für eine Bindung des HPV16 E6/E6-AP-Komplexes und der dadurch vermittelten proteasomalen Degradation des Proteins (Li and Coffino, 1996). Die hohen Expressionsmengen stehen dabei

nicht im Widerspruch zu einer verringerten Apoptoseinduktion, da E6 mit einer Bindung am C-Terminus die p53-vermittelte Transkriptionsrepression degradationsunabhängig aufhebt (Lechner et al., 1992; Li and Coffino, 1996). Neben dieser E6-vermittelten Abweichung unterdrückt E7 ebenfalls die p53-Transkriptionsaktivität (Jones et al., 1999) und wirkt den p53-vermittelten G1-Arrestsignalen entgegen (Demers et al., 1994a; Hickman et al., 1994). Für eine spezifische Analyse der Wechselwirkung von HPV16 auf p53 im Gewebe ist daher eine genaue Zuordnung der HPV-positiven Zelle zum p53 Befund erforderlich.

Wie bereits im oberen Abschnitt erwähnt konnte ebenfalls für pRb keine Reduktion des Expressionsniveaus als Folge viraler Onkoproteinpräsenz nachgewiesen werden. Mit der Ausnahme von HPV16^{E6-} zeigten alle HPV-positiven dermalen Äquivalente erhöhte pRb-Proteinmengen gegenüber den Kontrollen. Unerwartet deutlich trat, ähnlich wie im Falle von p53, dieser Anstieg in den beiden E7-Mutanten hervor (Abbildung 3.21). Ebenfalls in Übereinstimmung mit der Expression von p53 war der tendenzielle Rückgang der globalen pRb-Proteinmengen in den Geweben der E5-Mutante und der E6-Mutante gegenüber den Kulturen des HPV16-Wildtyps. Diese Datenlage erschwert eine differenziertere Einschätzung des Einflusses der einzelnen viralen Proteine. Auch die Betrachtung der Literatur liefert keine eindeutigen Hinweise für eine konklusive Interpretation. So sind die Ergebnisse von Collins et al. (2005) und Bodily et al. (2011), erhalten aus ähnlichen Experimentalansätzen wie in der vorliegenden Arbeit, konträr zueinander und beschreiben die Degradation von pRb in basalen bzw. suprabasalen Zellen bei unbeeinflusster Expression in den jeweils anderen Gewebekompartimenten. Erste Untersuchungen der hier etablierten Gewebe lassen vermuten, dass eine differentielle basale und suprabasale Expression auch hier besteht. Insgesamt verdeutlicht dies, dass eine unkritische Übertragung von Resultaten aus Überexpressionsstudien in Monolayerkultur, in denen ein eindeutiger Nachweis einer pRb-Degradation durch E7 erfolgte (Übersicht in Munger et al., 2004), auf die komplexen Vorgänge im Gewebe nicht möglich ist. Dazu kommt, dass die Rolle von pRb bei der epidermalen Differenzierung bisher nicht im Detail aufgeklärt ist. Während pRb im Verlauf des Zellzyklus nur posttranslational modifiziert wird (Weinberg, 1995), ist es im Laufe des Differenzierungsprozesses von Keratinozyten auf Expressionsebene - ausbalanciert mit den Pocket-Proteinen p107 und p130 - reguliert (Paramio et al., 1998). Dies könnte einen interessanten Ansatzpunkt für eine Untersuchung darstellen, die den Einfluss dieser beiden Proteine in einer HPV16 vermittelten Hyperproliferation (Abschnitt 3.2.8) ohne erkennbare Degradation von E7 untersucht.

Die Expressionsniveaus von p16 in den einzelnen Geweben folgten denen von pRb (Abbildung 3.21). Ein zu erwartender Befund wäre hingegen eine gegensätzliche Ausprägung ihrer Expression gewesen, da der pRB-E2F-Komplex eine negative Transkriptionskontrolle auf p16 ausübt (Khleif et al., 1996). Zudem war die Expression von p16 in den Geweben von HPV16^{wt}, HPV16^{E5-} und HPV16^{E6-} unverändert zu den Kontrollen. In den dermalen Äquivalenten von HPV16^{E7-} und HPV16^{E6/E7-/-} mit hoher pRb Expression hingegen war p16 erhöht. Insgesamt konnte eine bekannt hohe Expression von p16, wie in CIN-Läsionen bzw. zervikalen Tumoren vorhanden (von Knebel Doeberitz, 2002), die aus der E7-vermittelten pRb Degradation resultiert, im vorliegenden Modell nicht gezeigt werden. Ein möglicher Faktor der dieses unerwartete Ergebnis verursacht haben könnte, ist eine bereits modifizierte p16 Expression der HaCaT-Zelllinie als Folge ihrer Immortalisierung (Boukamp et al., 1988; Burnworth et al., 2007). Insbesondere die hohe Expression von pRb und p16 der E7-Mutanten im Vergleich zu HPV16^{wt}, HPV16^{E5-} und HPV16^{E6-} resultiert möglicherweise aus den deutlich unterschiedlichen Morphologien (Abbildung 3.12). Diese Morphologiedifferenzen könnten ein verändertes Verhältnis von HPV16-beeinflussten Zellen (auch durch die frühen Proteine E1, E2, E5 und E4) zu unbeeinflussten Zellen sowie undifferenzierten zu differenzierten Zellen hervorrufen. Dabei wären die dargestellten Unterschiede aus Gesamtgewebeextrakten eher unterschiedlichen Zellphänotypen zuzuordnen, als detailliert einer viralen Proteinaktion.

Insgesamt lässt sich zu den Ergebnissen der p53-, pRb- und p16-Expression festhalten, dass in dem Netzwerk gegenseitiger Funktionsverflechtungen beider viralen Onkoproteine E6 und E7, speziell im heterogenen Zellverband des differenzierten Gewebes, eine Kausalzuordnung von Ursache und Befund deutlich erschwert ist. Dies wird auch dadurch unterstrichen, dass die Ergebnisse aller HPV-positiven Gewebe deutlich höhere Varianzen aufweisen, als die beiden Kontrollgewebe (Abbildung 3.19 B & Abbildung 3.20), mithin die Heterogenität mit der Anwesenheit von HPV16 zunimmt. Das Fehlen hochreaktiver Antikörper gegen die viralen Proteine lässt jedoch eine dezidierte Begutachtung der infizierten Zelle im Gewebeverband bisher nicht zu. Trotzdem konnte hier gezeigt werden, dass neben der Degradation von pRb und p53 weitere sehr wirksame Mechanismen bestehen müssen, die in der Lage sind dysplastische Veränderungen hervorzurufen.

4.6 Gesamtbewertung des neu etablierten Modellsystems

Eine Untersuchung des viralen Lebenszyklus und der involvierten Funktionsweisen der viralen Proteine sollte immer gekoppelt sein an ein *in vivo* ähnliches Modellsystem. Durch die Schwierigkeiten, ein solches Modell *in vitro* abzubilden (insbesondere die Umgebung eines differenzierten Epithels), ist die bisher erhaltene Erkenntnismenge hieraus verschwindend klein gegenüber der aus sehr abstrakten Überexpressionsstudien in Monolayer-Zellkultur. Auch zum jetzigen Zeitpunkt ist die Abbildung eines differenzierten Gewebes und die Expression der viralen Proteine unter Kontrolle ihrer eigenen Promotoren aus dem Kontext des komplett vorliegenden viralen Genoms eine erhebliche experimentelle Herausforderung. Ziel des vorliegenden Projektes war es daher, die bereits bestehenden Ansätze zu übernehmen und für einen effektiveren und reproduzierbareren Einsatz weiterzuentwickeln.

Auch wenn zu Beginn der Arbeit die Verwendung der HaCaT-Zelllinie nicht vorgesehen war, brachte ihr Einsatz entscheidende Vorteile. Sie ist eine gebräuchliche Keratinozytenzelllinie und steht vielen Laboren zur Verfügung. Dem gegenüber sind primäre Keratinozyten eher schwer zu erhalten bzw. erfordern einen hohen finanziellen Aufwand. Im Vergleich zu der ebenfalls immortalisierten NIKS-Zelllinie ist die Handhabung von HaCaT-Zellen durch den nicht nötigen Einsatz von Mausfibroblasten als Feederzellen vereinfacht. Außerdem zeichnete sie sich durch einen deutlich reduzierten Effekt transfektionsinduzierter Differenzierung aus, bei einem gleichwertigen Auswachsen als dermales Äquivalent in organotypischer Raftkultur (Abbildung 3.10). Außerdem konnte eine hohe Effizienz etablierter HPV16-Episome über das Cre/LoxP-System erhalten werden. Zusammenfassend ist es damit gelungen, ein vergleichsweise zeit- und ressourcensparendes Modell zu etablieren, das sich für größer angelegte Studien gut eignet und sich auf andere HPV-Typen schnell übertragen lässt. Dabei stellt ein Einsatz für die Untersuchung von kutanen HPV-Typen eine sehr interessante Perspektive dar.

Ein entscheidender Unterschied bei der Verwendung der HaCaT-Zelllinie im Kontrast zum üblichen Gebrauch von primären Keratinozyten bzw. der Zelllinie NIKS zeigte sich jedoch. Die Präsenz von HPV16 und der viralen Onkoproteinfunktionen verursachte deutlicher dysplastische Morphologien und ein stärkeres Auswachsen der Raftkulturen (Abbildung 3.12), eine Charakteristik, die in dieser Ausprägung bislang nicht *in vitro* gezeigt werden konnte (Banerjee et al., 2005; Banerjee et al., 2006; McLaughlin-Drubin et al., 2005; McLaughlin-Drubin et al., 2003; Meyers et al., 1997; Ozbun, 2002b; Ozbun and Meyers, 1998). Lediglich in Gewebekulturen mit einer Überexpression der beiden Onkoproteine, speziell von E7, konnte

ein erhöhter Querschnitt der Raftkulturen bisher nachgewiesen werden (Nobre et al., 2009; Ueno et al., 2006; Westphal et al., 2009). Für diese vergleichsweise starke morphologische Manifestation können mehrere Gründe ausschlaggebend sein. Die effiziente Etablierung hoher Kopienzahlen von HPV16 führte hier zu einer höheren Expression der viralen Proteine (Tabelle 3.1). Die deutlich längere Wachstumsphase der HaCaT-Gewebekultur (21 Tage) gegenüber der von primären Keratinozyten (10 Tage) und NIKS (14 Tage) kann ebenfalls dazu beitragen, dass sich die virusinduzierten Veränderungen in der Gewebemorphologie widerspiegeln. Am wahrscheinlichsten erscheint jedoch, dass HaCaT-Zellen auf Grund ihrer bereits erworbenen Mutationen und Aneuploidie als Folge des Immortalisierungsprozesses (Boukamp et al., 1988; Lehman et al., 1993) ein neoplasieähnliches Umfeld darstellen. Diese Annahme wird unterstützt durch eine sehr ähnliche Morphologie der Raftkulturen untransfizierter HaCaT im Vergleich zu CIN I-Läsionen (Rubin and Strayer, 2008). Nimmt man die Charakterisierung von *in vivo* Läsionen nach Middleton et al. (2003) als Grundlage, deutet die sporadische Expression von E1⁺E4 und das Fehlen der Expression von L1 in der Raftkultur von HPV16^{wt} auf eine CIN II-ähnliche Charakteristik hin. In Kombination mit der stark dysplastischen Histologie ist eine Einstufung „CIN III-ähnlich“ wohl eher zutreffend. Eine genauere Einschätzung müsste jedoch mit weiteren Markern validiert werden und war nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Insgesamt erweitert dieses entwickelte *in vitro* System auf Basis der HaCaT-Zelllinie die Untersuchungsmöglichkeiten von HPV-Infektion auf die späten Phasen einer persistierenden Infektion bzw. von CIN-Läsionen unter *in vivo* ähnlichen Bedingungen. Dadurch können zukünftig gegebenenfalls die zellulären Faktoren aufgedeckt werden, die für den Übergang von einer produktiven HPV-Infektion hin zu der Entstehung von höhergradigen CIN-Läsionen entscheidend sind. Ebenfalls könnte dieses System von Nutzen sein, um neue Therapeutika für HPV-assoziierte Tumore zu entwickeln bzw. *in vitro* zu testen.

4.7 Produktion infektiöser HPV16-Virionen *in vitro* und Infektion von Keratinozyten

Die Produktion von infektiösen HP-Virionen *in vitro* war auf Grund der Kopplung des viralen Lebenszyklus an das Differenzierungsprogramm (Stubenrauch and Laimins, 1999) des infizierten Gewebes lange Zeit sehr aufwendig und wenig effizient, da eine organotypische Raftkultur aus HPV-tragender Keratinozyten erforderlich war (McLaughlin-Drubin et al., 2003; Meyers et al., 2002; Meyers et al., 1992; Meyers et al., 1997; Ozbun, 2002a, b). Erste, wenig effiziente Ansätze erreichten eine Produktion auch in einfacher Zellkultur auf Basis eines transfektionsbasierten Systems (Unckell et al., 1997). Der Gruppe von John T. Schiller gelang es nachfolgend, ein einfaches und hocheffizientes System zu etablieren. Auf Basis einer Kotransfektion eines kodonoptimierten Expressionsvektors für die beiden Strukturproteine L1 und L2 in Kombination mit dem HPV16-Genom bzw. eines Reporterplasmids gelang es, Virionen bzw. Pseudovirionen aufzureinigen deren Titer über 10^9 /mL lagen (Buck et al., 2004, 2005a). Auf diesem Wege produzierte Virionen der HPV-Typen 31b und 16 erwiesen sich *in vitro* als infektiös (Pyeon et al., 2005).

Diese vielversprechenden Ergebnisse sollten die eigentliche Grundlage des hier vorgestellten Projektes bilden. Auf ihrer Basis war es theoretisch möglich, ein naturnahes Modell, beginnend mit einer Infektion der Targetzellen zu etablieren. Außerdem eröffnete es die Möglichkeit, eine Schwierigkeit im Umgang mit Keratinozyten zu vermeiden – die Transfektion als wenig effiziente und differenzierungsinduzierende Methode zum Einschleusen von Fremd-DNA. Die Etablierung der *in vitro* Virionen-Produktion im eigenen Labor erreichte in Bezug auf die Struktur der Virionen (Abbildung 3.1 B), ihrem Verhalten in der Dichtegradientenzentrifugation (Abbildung 3.1 A) und auch im Ausmaß der aufgereinigten Titer von ca. 10^8 die von Buck et al. (2004) und Pyeon et al. (2005) angegebenen Resultate. Als hinderlich erwies sich jedoch der hohe Aufwand und eine sehr geringe Effizienz bei der Herstellung rezirkularisierter HPV16-Genome bzw. -Genommutanten (Abschnitt 3.1.1). Auch ergab die Analyse der von den Virionen verpackten DNA, dass der weitaus größte Teil der Virionen zelluläre, humane DNA der 293TT-Zelllinie aufwies. Besonders interessant hierbei war die einheitliche Größe der verpackten DNA-Fragmente von ca. 8 kb, entsprechend der Größe des HPV16-Genoms. Wir erklärten diesen Befund mit der Art des Aufschlusses der Zellen und dem folgenden Maturierungsprozess. Um eine Kopräzipitation produzierter Virionen mit der genomischen DNA zu verhindern, beinhaltet der Lysepuffer zwei Nukleasen (Endo- und Exonuklease), die die DNA während einer 24-stündigen Inkubation bei 37°C aufspalten und abbauen. Sich unspezifisch an DNA-Sequenzen assemblierende Virushüllen

schützen während dieses Vorganges DNA-Fragmente der Größe des maximal verfügbaren Volumens innerhalb des Kapsides. Dies steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Buck et al. (2004) und Pyeon et al. (2005), die ebenfalls eine maximale Größe der enkapsidierbaren DNA von 7 kb bis 8 kb zeigten. Die auf diesem Wege gewonnenen Virionen konnten jedoch nicht weiter verwendet werden, weil ein starkes Mißverhältnis zwischen produzierten Human-DNA-tragender Virionen und HPV16-Virionen bestand, es sich somit um eine äußerst heterologe „Pseudovirionen“-Population handelte. Eine Zuordnung von Effekten in infizierten Zellen wäre somit nicht möglich gewesen. In der Folge gelang es durch die Anpassung des Lysepuffers (ohne die Verwendung der beiden Nukleasen) Virionenpräparationen zu erhalten, die keine humane DNA mehr enthielten. Ein Sachverhalt, den auch die Gruppe von JT Schiller bestätigte (Buck C. & Thompson C. <http://home.ccr.cancer.gov/lco/ripcord.htm>, rev. Jan. 2008).

Obwohl die produzierten eGPF-Pseudovirionen eine starke Infektivität in 293T-Zellen *in vitro* zeigten (Abbildung 3.2), konnte eine Infektion von HPV16-Virionen in HaCaT-Zellen auf nur sehr geringem Niveau gezeigt werden und es bedurfte einer *nested*-PCR für ihren Nachweis (Abbildung 3.3). Dies bestätigt Ergebnisse von Pyeon et al. (2005). Im Gegensatz zur immortalisierten HaCaT-Zelllinie konnten jedoch primäre Keratinozyten mit *in vitro* produzierten HPV16-Virionen nicht infiziert werden (Abbildung 3.3). Auch andere Labore zeigten schon diesen erstaunlichen Sachverhalt (Lambert PF & Ozbun M. persönliche Kommunikation, 2008, Day et al., 2008). Dies führte zum damaligen Zeitpunkt zur Schlussfolgerung, dass diese Methode zur Herstellung HPV16-Virionen und ihre Anwendung für ein naturnahes Infektionsmodell nicht möglich sei. Bis zum heutigen Zeitpunkt existiert keine Veröffentlichung, die die *in vitro* Virionen Produktion in der hier angestrebten Weise verwendet.

Jedoch wurden bei Verwendung von hauptsächlich *in vitro* erzeugten Pseudovirionen viele Aspekte des einzigartigen Infektionsweges der Papillomaviren entschlüsselt (Übersicht in Schiller et al., 2010). Sie helfen in der Nachbetrachtung, die am Anfang dieses Projektes erhaltenen Ergebnisse aufzuklären. Das zurzeit akzeptierte Modell der Virusbindung an der Zelloberfläche bis hin zu einer aktiven Internalisierung beinhaltet zwei unerlässliche Schritte: Die primären Bindungsstrukturen sind Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG), wobei Papillomaviren an nur ein bestimmtes basalmembranspezifisches Muster von N- und O-Sulfaten binden (Selinka et al., 2003). *In vitro* passagierte Zelllinien könnten aufgrund ihrer Kulturbedingungen für ein HSPG-Sulfatierungsmuster auf ihrer Zelloberfläche selektioniert

werden, das dem der Basallamina *in vivo* entspricht (Schiller et al., 2010). Dies könnte erklären, warum HPV16-Virionen und Pseudovirionen zwar HaCaT-Zellen bzw. 293T-Zellen aktiv infizieren, unterdessen primäre Keratinozyten sich als nicht infizierbar zeigen. Die Bindung an HSPG induziert als nachfolgenden wichtigen Schritt der Infektion einen Konformationswechsel innerhalb des Kapsides, der eine Konsensussequenz von L2 für eine spezifische Spaltung durch Furin freigibt (Richards et al., 2006). Der Konformationswechsel und die Furinspaltung von L2 exponieren die virale Bindestelle für den essentiellen Zelloberflächenrezeptor (bisher nicht bekannt) der Virusinternalisierung. Den Beweis für diesen Binde- und Internalisierungsweg erbrachten Day et al. (2008) durch eine aktive Infektion auch von primären Keratinozyten mit Furin-behandelten Pseudovirionen.

QUELLEN- und LITERATURVERZEICHNIS

- Akgul, B., Cooke, J.C., and Storey, A. (2006). HPV-associated skin disease. *J Pathol* 208, 165-175.
- Allen-Hoffmann, B.L., Schlosser, S.J., Ivarie, C.A., Sattler, C.A., Meisner, L.F., and O'Connor, S.L. (2000). Normal growth and differentiation in a spontaneously immortalized near-diploid human keratinocyte cell line, NIKS. *J Invest Dermatol* 114, 444-455.
- Alonso, A., and Reed, J. (2002). Modelling of the human papillomavirus type 16 E5 protein. *Biochim Biophys Acta* 1601, 9-18.
- American.Cancer.Society (2007). Global Cancer Facts & Figures 2007.
- Angeline, M., Merle, E., and Moroianu, J. (2003). The E7 oncoprotein of high-risk human papillomavirus type 16 enters the nucleus via a nonclassical Ran-dependent pathway. *Virology* 317, 13-23.
- Arany, I., and Tyring, S.K. (1996). Status of local cellular immunity in interferon-responsive and -nonresponsive human papillomavirus-associated lesions. *Sex Transm Dis* 23, 475-480.
- Ashrafi, G.H., Haghshenas, M., Marchetti, B., and Campo, M.S. (2006). E5 protein of human papillomavirus 16 downregulates HLA class I and interacts with the heavy chain via its first hydrophobic domain. *Int J Cancer* 119, 2105-2112.
- Asselineau, D., and Prunieras, M. (1984). Reconstruction of 'simplified' skin: control of fabrication. *Br J Dermatol* 111 Suppl 27, 219-222.
- Baldwin, A., Huh, K.W., and Munger, K. (2006). Human papillomavirus E7 oncoprotein dysregulates steroid receptor coactivator 1 localization and function. *J Virol* 80, 6669-6677.
- Banerjee, N.S., Chow, L.T., and Broker, T.R. (2005). Retrovirus-mediated gene transfer to analyze HPV gene regulation and protein functions in organotypic "raft" cultures. *Methods Mol Med* 119, 187-202.
- Banerjee, N.S., Genovese, N.J., Noya, F., Chien, W.-M., Broker, T.R., and Chow, L.T. (2006). Conditionally activated E7 proteins of high-risk and low-risk human papillomaviruses induce S phase in postmitotic, differentiated human keratinocytes. *J Virol* 80, 6517-6524.
- Barbaresi, S., Cortese, M.S., Quinn, J., Ashrafi, G.H., Graham, S.V., and Campo, M.S. (2010). Effects of human papillomavirus type 16 E5 deletion mutants on epithelial morphology: functional characterization of each transmembrane domain. *J Gen Virol* 91, 521-530.

- Barbosa, M.S., Edmonds, C., Fisher, C., Schiller, J.T., Lowy, D.R., and Vousden, K.H. (1990). The region of the HPV E7 oncoprotein homologous to adenovirus E1a and Sv40 large T antigen contains separate domains for Rb binding and casein kinase II phosphorylation. *EMBO J* 9, 153-160.
- Bedell, M.A., Hudson, J.B., Golub, T.R., Turyk, M.E., Hosken, M., Wilbanks, G.D., and Laimins, L.A. (1991). Amplification of human papillomavirus genomes in vitro is dependent on epithelial differentiation. *J Virol* 65, 2254-2260.
- Bell, E., Sher, S., Hull, B., Merrill, C., Rosen, S., Chamson, A., Asselineau, D., Dubertret, L., Coulomb, B., Lapiere, C., *et al.* (1983). The reconstitution of living skin. *J Invest Dermatol* 81, 2s-10s.
- Bernard, H.-U., Burk, R.D., Chen, Z., van Doorslaer, K., Hausen, H.Z., and de Villiers, E.-M. (2010). Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*.
- Bernard, H.U. (2005). The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol* 32 *Suppl* 1, S1-6.
- Blanton, R.A., Coltrera, M.D., Gown, A.M., Halbert, C.L., and McDougall, J.K. (1992). Expression of the HPV16 E7 gene generates proliferation in stratified squamous cell cultures which is independent of endogenous p53 levels. *Cell Growth Differ* 3, 791-802.
- Blanton, R.A., Perez-Reyes, N., Merrick, D.T., and McDougall, J.K. (1991). Epithelial cells immortalized by human papillomaviruses have premalignant characteristics in organotypic culture. *Am J Pathol* 138, 673-685.
- Bodily, J., and Laimins, L.A. (2010). Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression. *Trends Microbiol* 19, 33-39.
- Bodily, J.M., Mehta, K.P., Cruz, L., Meyers, C., and Laimins, L.A. (2011). The E7 Open Reading Frame Acts in Cis and Trans to Mediate Differentiation-Dependent Activities in the Human Papillomavirus Type 16 Life Cycle. *J Virol*.
- Bonnez, W., DaRin, C., Borkhuis, C., de Mesy Jensen, K., Reichman, R.C., and Rose, R.C. (1998). Isolation and propagation of human papillomavirus type 16 in human xenografts implanted in the severe combined immunodeficiency mouse. *J Virol* 72, 5256-5261.
- Borbely, A.A., Murvai, M., Konya, J., Beck, Z., Gergely, L., Li, F., and Veress, G. (2006). Effects of human papillomavirus type 16 oncoproteins on survivin gene expression. *J Gen Virol* 87, 287-294.
- Bosch, F.X., Burchell, A.N., Schiffman, M., Giuliano, A.R., de Sanjose, S., Bruni, L., Tortolero-Luna, G., Kjaer, S.K., and Munoz, N. (2008). Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine* 26 *Suppl* 10, K1-16.
- Boshart, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., Kleinheinz, A., Scheurlen, W., and zur Hausen, H. (1984). A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J* 3, 1151-1157.

- Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., and Fusenig, N.E. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 106, 761-771.
- Bouvard, V., Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Secretan, B., Ghissassi, F.E., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Freeman, C., Galichet, L., *et al.* (2009). A review of human carcinogens--Part B: biological agents. *Lancet Oncol* 10, 321-322.
- Bouvard, V., Matlashewski, G., Gu, Z.M., Storey, A., and Banks, L. (1994). The Human Papillomavirus Type-16 E5 Gene Cooperates with the E7 Gene to Stimulate Proliferation of Primary-Cells and Increases Viral Gene-Expression. *Virology* 203, 73-80.
- Bouwes Bavinck, J.N., Feltkamp, M., Struijk, L., and ter Schegget, J. (2001). Human papillomavirus infection and skin cancer risk in organ transplant recipients. *J Investig Dermatol Symp Proc* 6, 207-211.
- Boxman, I.L., Mulder, L.H., Noya, F., de Waard, V., Gibbs, S., Broker, T.R., ten Kate, F., Chow, L.T., and ter Schegget, J. (2001). Transduction of the E6 and E7 genes of epidermodysplasia- verruciformis-associated human papillomaviruses alters human keratinocyte growth and differentiation in organotypic cultures. *J Invest Dermatol* 117, 1397-1404.
- Braun-Falco, M., Doenecke, A., Smola, H., and Hallek, M. (1999). Efficient gene transfer into human keratinocytes with recombinant adeno-associated virus vectors. *Gene Ther* 6, 432-441.
- Bravo, I.G., and Alonso, A. (2004). Mucosal human papillomaviruses encode four different E5 proteins whose chemistry and phylogeny correlate with malignant or benign growth. *J Virol* 78, 13613-13626.
- Bravo, I.G., de Sanjose, S., and Gottschling, M. (2010). The clinical importance of understanding the evolution of papillomaviruses. *Trends Microbiol* 18, 432-438.
- Breitkreutz, D., Schoop, V.M., Mirancea, N., Baur, M., Stark, H.J., and Fusenig, N.E. (1998). Epidermal differentiation and basement membrane formation by HaCaT cells in surface transplants. *Eur J Cell Biol* 75, 273-286.
- Bryan, J.T., and Brown, D.R. (2001). Transmission of human papillomavirus type 11 infection by desquamated cornified cells. *Virology* 281, 35-42.
- Bubb, V., McCance, D.J., and Schlegel, R. (1988). DNA sequence of the HPV-16 E5 ORF and the structural conservation of its encoded protein. *Virology* 163, 243-246.
- Buck, C.B., Cheng, N., Thompson, C.D., Lowy, D.R., Steven, A.C., Schiller, J.T., and Trus, B.L. (2008). Arrangement of L2 within the papillomavirus capsid. *J Virol* 82, 5190-5197.
- Buck, C.B., Pastrana, D.V., Lowy, D.R., and Schiller, J.T. (2004). Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors. *J Virol* 78, 751-757.
- Buck, C.B., Pastrana, D.V., Lowy, D.R., and Schiller, J.T. (2005a). Generation of HPV pseudovirions using transfection and their use in neutralization assays. *Methods Mol Med* 119, 445-462.

- Buck, C.B., Thompson, C.D., Pang, Y.Y., Lowy, D.R., and Schiller, J.T. (2005b). Maturation of papillomavirus capsids. *J Virol* *79*, 2839-2846.
- Burk, R.D., Chen, Z., and Doorslaer, K.V. (2009). Human papillomaviruses: genetic basis of carcinogenicity. *Public Health Genomics* *12*, 281-290.
- Burnworth, B., Arendt, S., Muffler, S., Steinkraus, V., Brocker, E.B., Birek, C., Hartschuh, W., Jauch, A., and Boukamp, P. (2007). The multi-step process of human skin carcinogenesis: a role for p53, cyclin D1, hTERT, p16, and TSP-1. *Eur J Cell Biol* *86*, 763-780.
- Butz, K., Denk, C., Ullmann, A., Scheffner, M., and Hoppe-Seyler, F. (2000). Induction of apoptosis in human papillomaviruspositive cancer cells by peptide aptamers targeting the viral E6 oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 6693-6697.
- Campo, M.S. (1997). Bovine papillomavirus and cancer. *Vet J* *154*, 175-188.
- Campo, M.S. (2002). Animal models of papillomavirus pathogenesis. *Virus Res* *89*, 249-261.
- Chang, Y.E., and Laimins, L.A. (2000). Microarray analysis identifies interferon-inducible genes and Stat-1 as major transcriptional targets of human papillomavirus type 31. *J Virol* *74*, 4174-4182.
- Chen, S.L., Huang, C.H., Tsai, T.C., Lu, K.Y., and Tsao, Y.P. (1996). The regulation mechanism of c-jun and junB by human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein. *Arch Virol* *141*, 791-800.
- Chen, Z., Storthz, K.A., and Shillitoe, E.J. (1997). Mutations in the long control region of human papillomavirus DNA in oral cancer cells, and their functional consequences. *Cancer Res* *57*, 1614-1619.
- Cheng, S., Schmidt-Grimminger, D.C., Murant, T., Broker, T.R., and Chow, L.T. (1995). Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes. *Genes Dev* *9*, 2335-2349.
- Chien, W.M., Noya, F., Benedict-Hamilton, H.M., Broker, T.R., and Chow, L.T. (2002). Alternative fates of keratinocytes transduced by human papillomavirus type 18 E7 during squamous differentiation. *J Virol* *76*, 2964-2972.
- Chien, W.M., Parker, J.N., Schmidt-Grimminger, D.C., Broker, T.R., and Chow, L.T. (2000). Casein kinase II phosphorylation of the human papillomavirus-18 E7 protein is critical for promoting S-phase entry. *Cell Growth Differ* *11*, 425-435.
- Chow, L.T., Duffy, A.A., Wang, H.K., and Broker, T.R. (2009). A highly efficient system to produce infectious human papillomavirus: Elucidation of natural virus-host interactions. *Cell Cycle* *8*, 1319-1323.
- Christensen, N.D. (2005). Cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) model system to test antiviral and immunotherapeutic strategies. *Antivir Chem Chemother* *16*, 355-362.
- Clemens, K.E., Brent, R., Gyuris, J., and Munger, K. (1995). Dimerization of the human papillomavirus E7 oncoprotein in vivo. *Virology* *214*, 289-293.

- Collins, A.S., Nakahara, T., Do, A., and Lambert, P.F. (2005). Interactions with pocket proteins contribute to the role of human papillomavirus type 16 E7 in the papillomavirus life cycle. *J Virol* *79*, 14769-14780.
- Combata, A.L., Touze, A., Bousarghin, L., Sizaret, P.Y., Munoz, N., and Coursaget, P. (2001). Gene transfer using human papillomavirus pseudovirions varies according to virus genotype and requires cell surface heparan sulfate. *FEMS Microbiol Lett* *204*, 183-188.
- Conrad, M., Bubbs, V.J., and Schlegel, R. (1993). The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein. *J Virol* *67*, 6170-6178.
- Crusius, K., Auvinen, E., and Alonso, A. (1997). Enhancement of EGF- and PMA-mediated MAP kinase activation in cells expressing the human papillomavirus type 16 E5 protein. *Oncogene* *15*, 1437-1444.
- Crusius, K., Auvinen, E., Steuer, B., Gaissert, H., and Alonso, A. (1998). The human papillomavirus type 16 E5-protein modulates ligand-dependent activation of the EGF receptor family in the human epithelial cell line HaCaT. *Exp Cell Res* *241*, 76-83.
- Crusius, K., Rodriguez, I., and Alonso, A. (2000). The human papillomavirus type 16 E5 protein modulates ERK1/2 and p38 MAP kinase activation by an EGFR-independent process in stressed human keratinocytes. *Virus Genes* *20*, 65-69.
- Culp, T.D., Budgeon, L.R., and Christensen, N.D. (2006a). Human papillomaviruses bind a basal extracellular matrix component secreted by keratinocytes which is distinct from a membrane-associated receptor. *Virology* *347*, 147-159.
- Culp, T.D., Budgeon, L.R., Marinkovich, M.P., Meneguzzi, G., and Christensen, N.D. (2006b). Keratinocyte-secreted laminin 5 can function as a transient receptor for human papillomaviruses by binding virions and transferring them to adjacent cells. *J Virol* *80*, 8940-8950.
- Culp, T.D., and Christensen, N.D. (2004). Kinetics of in vitro adsorption and entry of papillomavirus virions. *Virology* *319*, 152-161.
- Dall, K.L., Scarpini, C.G., Roberts, I., Winder, D.M., Stanley, M.A., Muralidhar, B., Herdman, M.T., Pett, M.R., and Coleman, N. (2008). Characterization of naturally occurring HPV16 integration sites isolated from cervical keratinocytes under noncompetitive conditions. *Cancer Res* *68*, 8249-8259.
- Darshan, M.S., Lucchi, J., Harding, E., and Moroianu, J. (2004). The 12 minor capsid protein of human papillomavirus type 16 interacts with a network of nuclear import receptors. *J Virol* *78*, 12179-12188.
- Day, P.M., Baker, C.C., Lowy, D.R., and Schiller, J.T. (2004). Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 14252-14257.
- Day, P.M., Lowy, D.R., and Schiller, J.T. (2003). Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology* *307*, 1-11.

- Day, P.M., Lowy, D.R., and Schiller, J.T. (2008). Heparan sulfate-independent cell binding and infection with furin-precleaved papillomavirus capsids. *J Virol* *82*, 12565-12568.
- Day, P.M., Roden, R.B., Lowy, D.R., and Schiller, J.T. (1998). The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral transcription/replication protein, E2, to PML oncogenic domains. *J Virol* *72*, 142-150.
- De Geest, K., Bergman, C.A., Turyk, M.E., Frank, B.S., and Wilbanks, G.D. (1994). Differential response of cervical intraepithelial and cervical carcinoma cell lines to transforming growth factor-beta 1. *Gynecol Oncol* *55*, 376-385.
- de Roda Husman, A.M., Walboomers, J.M., van den Brule, A.J., Meijer, C.J., and Snijders, P.J. (1995). The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* *76 (Pt 4)*, 1057-1062.
- de Sanjose, S., Diaz, M., Castellsague, X., Clifford, G., Bruni, L., Munoz, N., and Bosch, F.X. (2007). Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis* *7*, 453-459.
- de Villiers, E.-M., Fauquet, C., Broker, T.R., Bernard, H.-U., and zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology* *324*, 17-27.
- de Villiers, E.M., Lavergne, D., Chang, F., Syrjanen, K., Tosi, P., Cintonino, M., Santopietro, R., and Syrjanen, S. (1999). An interlaboratory study to determine the presence of human papillomavirus DNA in esophageal carcinoma from China. *Int J Cancer* *81*, 225-228.
- DeMasi, J., Chao, M.C., Kumar, A.S., and Howley, P.M. (2007). Bovine papillomavirus E7 oncoprotein inhibits anoikis. *J Virol* *81*, 9419-9425.
- DeMasi, J., Huh, K.W., Nakatani, Y., Munger, K., and Howley, P.M. (2005). Bovine papillomavirus E7 transformation function correlates with cellular p600 protein binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 11486-11491.
- Demers, G.W., Foster, S.A., Halbert, C.L., and Galloway, D.A. (1994a). Growth arrest by induction of p53 in DNA damaged keratinocytes is bypassed by human papillomavirus 16 E7. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 4382-4386.
- Demers, G.W., Halbert, C.L., and Galloway, D.A. (1994b). Elevated wild-type p53 protein levels in human epithelial cell lines immortalized by the human papillomavirus type 16 E7 gene. *Virology* *198*, 169-174.
- Deyrieux, A.F., and Wilson, V.G. (2007). In vitro culture conditions to study keratinocyte differentiation using the HaCaT cell line. *Cytotechnology* *54*, 77-83.
- DiMaio, D., and Mattoon, D. (2001). Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins. *Oncogene* *20*, 7866-7873.
- Distler, J.H., Jungel, A., Kurowska-Stolarska, M., Michel, B.A., Gay, R.E., Gay, S., and Distler, O. (2005). Nucleofection: a new, highly efficient transfection method for primary human keratinocytes*. *Exp Dermatol* *14*, 315-320.

- Dollard, S.C., Wilson, J.L., Demeter, L.M., Bonnez, W., Reichman, R.C., Broker, T.R., and Chow, L.T. (1992). Production of human papillomavirus and modulation of the infectious program in epithelial raft cultures. *Off. Genes Dev* 6, 1131-1142.
- Doorbar, J. (2005). The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol* 32 *Suppl 1*, S7-15.
- Doorbar, J. (2006). Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)* 110, 525-541.
- Doorbar, J., Campbell, D., Grand, R.J., and Gallimore, P.H. (1986). Identification of the human papilloma virus-1a E4 gene products. *EMBO J* 5, 355-362.
- Doorbar, J., Ely, S., Coleman, N., Hibma, M., Davies, D.H., and Crawford, L. (1992). Epitope-mapped monoclonal antibodies against the HPV16E1-E4 protein. *Virology* 187, 353-359.
- Doorbar, J., Ely, S., Sterling, J., McLean, C., and Crawford, L. (1991). Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* 352, 824-827.
- Doorbar, J., Foo, C., Coleman, N., Medcalf, L., Hartley, O., Prospero, T., Napthine, S., Sterling, J., Winter, G., and Griffin, H. (1997). Characterization of events during the late stages of HPV16 infection in vivo using high-affinity synthetic Fabs to E4. *Virology* 238, 40-52.
- Duensing, A., and Duensing, S. (2008). Centrosome-mediated chromosomal instability and steroid hormones as co factors in human papillomavirus-associated cervical carcinogenesis: small viruses help to answer big questions. *Adv Exp Med Biol* 617, 109-117.
- Duensing, S., and Munger, K. (2003a). Centrosome abnormalities and genomic instability induced by human papillomavirus oncoproteins. *Prog Cell Cycle Res* 5, 383-391.
- Duensing, S., and Munger, K. (2003b). Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein can induce abnormal centrosome duplication through a mechanism independent of inactivation of retinoblastoma protein family members. *J Virol* 77, 12331-12335.
- Durst, M., Dzarlieva-Petrusevska, R.T., Boukamp, P., Fusenig, N.E., and Gissmann, L. (1987). Molecular and cytogenetic analysis of immortalized human primary keratinocytes obtained after transfection with human papillomavirus type 16 DNA. *Oncogene* 1, 251-256.
- Durst, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., and zur Hausen, H. (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, 3812-3815.
- Dyson, N., Guida, P., Munger, K., and Harlow, E. (1992). Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins. *J Virol* 66, 6893-6902.
- Egawa, K. (2003). Do human papillomaviruses target epidermal stem cells? *Dermatology* 207, 251-254.
- Epstein, M.A., Achong, B.G., and Barr, Y.M. (1964). Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet* 1, 702-703.

- Evander, M., Frazer, I.H., Payne, E., Qi, Y.M., Hengst, K., and McMillan, N.A. (1997). Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol* 71, 2449-2456.
- Fehrmann, F., Klumpp, D.J., and Laimins, L.A. (2003). Human papillomavirus type 31 E5 protein supports cell cycle progression and activates late viral functions upon epithelial differentiation. *J Virol* 77, 2819-2831.
- Ferlay, J., Parkin, D.M., and Steliarova-Foucher, E. (2010). Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer* 46, 765-781.
- Ferrandina, G., Lauriola, L., Zannoni, G.F., Fagotti, A., Fanfani, F., Legge, F., Maggiano, N., Gessi, M., Mancuso, S., Ranelletti, F.O., *et al.* (2002). Increased cyclooxygenase-2 (COX-2) expression is associated with chemotherapy resistance and outcome in ovarian cancer patients. *Ann Oncol* 13, 1205-1211.
- Flores, E.R., Allen-Hoffmann, B.L., Lee, D., and Lambert, P.F. (2000). The human papillomavirus type 16 E7 oncogene is required for the productive stage of the viral life cycle. *J Virol* 74, 6622-6631.
- Flores, E.R., Allen-Hoffmann, B.L., Lee, D., Sattler, C.A., and Lambert, P.F. (1999). Establishment of the human papillomavirus type 16 (HPV-16) life cycle in an immortalized human foreskin keratinocyte cell line. *Virology* 262, 344-354.
- Florin, L., Becker, K.A., Lambert, C., Nowak, T., Sapp, C., Strand, D., Streeck, R.E., and Sapp, M. (2006). Identification of a dynein interacting domain in the papillomavirus minor capsid protein l2. *J Virol* 80, 6691-6696.
- Flotte, T.R., and Carter, B.J. (1995). Adeno-associated virus vectors for gene therapy. *Gene Ther* 2, 357-362.
- Fontaine, V., van der Meijden, E., de Graaf, J., ter Schegget, J., and Struyk, L. (2000). A functional NF-kappaB binding site in the human papillomavirus type 16 long control region. *Virology* 272, 40-49.
- Frattini, M.G., Lim, H.B., Doorbar, J., and Laimins, L.A. (1997). Induction of human papillomavirus type 18 late gene expression and genomic amplification in organotypic cultures from transfected DNA templates. *J Virol* 71, 7068-7072.
- Frattini, M.G., Lim, H.B., and Laimins, L.A. (1996). In vitro synthesis of oncogenic human papillomaviruses requires episomal genomes for differentiation-dependent late expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 3062-3067.
- Frazer, I.H. (2009). Interaction of human papillomaviruses with the host immune system: a well evolved relationship. *Virology* 384, 410-414.
- Frisch, M., Fenger, C., van den Brule, A.J., Sorensen, P., Meijer, C.J., Walboomers, J.M., Adami, H.O., Melbye, M., and Glimelius, B. (1999). Variants of squamous cell carcinoma of the anal canal and perianal skin and their relation to human papillomaviruses. *Cancer Res* 59, 753-757.

- Funk, J.O., Waga, S., Harry, J.B., Espling, E., Stillman, B., and Galloway, D.A. (1997). Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev* 11, 2090-2100.
- Genther, S.M., Sterling, S., Duensing, S., Munger, K., Sattler, C., and Lambert, P.F. (2003). Quantitative role of the human papillomavirus type 16 E5 gene during the productive stage of the viral life cycle. *J Virol* 77, 2832-2842.
- Ghittoni, R., Accardi, R., Hasan, U., Gheit, T., Sylla, B., and Tommasino, M. (2010). The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. *Virus Genes* 40, 1-13.
- Gillison, M.L. (2008). Human papillomavirus-related diseases: oropharynx cancers and potential implications for adolescent HPV vaccination. *J Adolesc Health* 43, S52-60.
- Giroglou, T., Florin, L., Schafer, F., Streeck, R.E., and Sapp, M. (2001). Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol* 75, 1565-1570.
- Gissmann, L., Pfister, H., and Hausen, H.Z. (1977). Human papilloma viruses (HPV): characterization of four different isolates. *Virology* 76, 569-580.
- Gissmann, L., and zur Hausen, H. (1976). Human papilloma virus DNA: physical mapping and genetic heterogeneity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 1310-1313.
- Giuliano, A.R. (2007). Human papillomavirus vaccination in males. *Gynecol Oncol* 107, S24-26.
- Gray, E., Pett, M.R., Ward, D., Winder, D.M., Stanley, M.A., Roberts, I., Scarpini, C.G., and Coleman, N. (2010). In vitro progression of human papillomavirus 16 episome-associated cervical neoplasia displays fundamental similarities to integrant-associated carcinogenesis. *Cancer Res* 70, 4081-4091.
- Greenhough, A., Smartt, H.J., Moore, A.E., Roberts, H.R., Williams, A.C., Paraskeva, C., and Kaidi, A. (2009). The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis* 30, 377-386.
- Greer, C.E., Wheeler, C.M., Ladner, M.B., Beutner, K., Coyne, M.Y., Liang, H., Langenberg, A., Yen, T.S., and Ralston, R. (1995). Human papillomavirus (HPV) type distribution and serological response to HPV type 6 virus-like particles in patients with genital warts. *J Clin Microbiol* 33, 2058-2063.
- Groeber, F., Holeiter, M., Hampel, M., Hinderer, S., and Schenke-Layland, K. (2010). Skin tissue engineering - In vivo and in vitro applications. *Adv Drug Deliv Rev* 63, 352-366.
- Gruener, M., Bravo, I.G., Momburg, F., Alonso, A., and Tomakidi, P. (2007). The E5 protein of the human papillomavirus type 16 down-regulates HLA-I surface expression in calnexin-expressing but not in calnexin-deficient cells. *Virology* 4, 116.
- Gu, Z., and Matlashewski, G. (1995). Effect of human papillomavirus type 16 oncogenes on MAP kinase activity. *J Virol* 69, 8051-8056.

- Hajdu, S.I. (2006). The link between koilocytes and human papillomaviruses. *Ann Clin Lab Sci* 36, 485-487.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hawley-Nelson, P., Vousden, K.H., Hubbert, N.L., Lowy, D.R., and Schiller, J.T. (1989). HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J* 8, 3905-3910.
- Heck, D.V., Yee, C.L., Howley, P.M., and Munger, K. (1992). Efficiency of binding the retinoblastoma protein correlates with the transforming capacity of the E7 oncoproteins of the human papillomaviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4442-4446.
- Hermens, W.T., ter Brake, O., Dijkhuizen, P.A., Sonnemans, M.A., Grimm, D., Kleinschmidt, J.A., and Verhaagen, J. (1999). Purification of recombinant adeno-associated virus by iodixanol gradient ultracentrifugation allows rapid and reproducible preparation of vector stocks for gene transfer in the nervous system. *Hum Gene Ther* 10, 1885-1891.
- Hickman, E.S., Picksley, S.M., and Vousden, K.H. (1994). Cells expressing HPV16 E7 continue cell cycle progression following DNA damage induced p53 activation. *Oncogene* 9, 2177-2181.
- Hiller, T., Poppelreuther, S., Stubenrauch, F., and Iftner, T. (2006). Comparative analysis of 19 genital human papillomavirus types with regard to p53 degradation, immortalization, phylogeny, and epidemiologic risk classification. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15, 1262-1267.
- Ho, G.Y., Bierman, R., Beardsley, L., Chang, C.J., and Burk, R.D. (1998). Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 338, 423-428.
- Hoffmann, R., Hirt, B., Bechtold, V., Beard, P., and Raj, K. (2006). Different modes of human papillomavirus DNA replication during maintenance. *J Virol* 80, 4431-4439.
- Howett, M.K., Christensen, N.D., and Kreider, J.W. (1997). Tissue xenografts as a model system for study of the pathogenesis of papillomaviruses. *Clin Dermatol* 15, 229-236.
- Howley, P.M., and Lowy, D.R. (2001). Papillomaviruses and their replication (Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins).
- Huh, K., Zhou, X., Hayakawa, H., Cho, J.Y., Libermann, T.A., Jin, J., Harper, J.W., and Munger, K. (2007). Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with the cullin 2 ubiquitin ligase complex, which contributes to degradation of the retinoblastoma tumor suppressor. *J Virol* 81, 9737-9747.
- Hurlin, P.J., Kaur, P., Smith, P.P., Perez-Reyes, N., Blanton, R.A., and McDougall, J.K. (1991). Progression of human papillomavirus type 18-immortalized human keratinocytes to a malignant phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 570-574.
- Husmann, G., and Robert-Koch-Institut (2010). Krebs in Deutschland 2005/2006 : Häufigkeiten und Trends ; eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V, 7. Ausg. edn (Berlin

Saarbrücken, Robert Koch-Inst.
GEKID).

Hwang, S.G., Lee, D., Kim, J., Seo, T., and Choe, J. (2002). Human papillomavirus type 16 E7 binds to E2F1 and activates E2F1-driven transcription in a retinoblastoma protein-independent manner. *J Biol Chem* 277, 2923-2930.

James, M.A., Lee, J.H., and Klingelutz, A.J. (2006). Human papillomavirus type 16 E6 activates NF-kappaB, induces cIAP-2 expression, and protects against apoptosis in a PDZ binding motif-dependent manner. *J Virol* 80, 5301-5307.

Jemal, A., Center, M.M., DeSantis, C., and Ward, E.M. (2010a). Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 19, 1893-1907.

Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., and Ward, E. (2010b). Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 60, 277-300.

Johnson, K.M., Kines, R.C., Roberts, J.N., Lowy, D.R., Schiller, J.T., and Day, P.M. (2009). Role of heparan sulfate in attachment to and infection of the murine female genital tract by human papillomavirus. *J Virol* 83, 2067-2074.

Jones, D.L., Alani, R.M., and Munger, K. (1997a). The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. *Genes Dev* 11, 2101-2111.

Jones, D.L., and Munger, K. (1997). Analysis of the p53-mediated G1 growth arrest pathway in cells expressing the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *J Virol* 71, 2905-2912.

Jones, D.L., Thompson, D.A., and Munger, K. (1997b). Destabilization of the RB tumor suppressor protein and stabilization of p53 contribute to HPV type 16 E7-induced apoptosis. *Virology* 239, 97-107.

Jones, D.L., Thompson, D.A., Suh-Burgmann, E., Grace, M., and Munger, K. (1999). Expression of the HPV E7 oncoprotein mimics but does not evoke a p53-dependent cellular DNA damage response pathway. *Virology* 258, 406-414.

Joyce, J.G., Tung, J.S., Przysiecki, C.T., Cook, J.C., Lehman, E.D., Sands, J.A., Jansen, K.U., and Keller, P.M. (1999). The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J Biol Chem* 274, 5810-5822.

Kabsch, K., and Alonso, A. (2002). The human papillomavirus type 16 E5 protein impairs TRAIL- and FasL-mediated apoptosis in HaCaT cells by different mechanisms. *J Virol* 76, 12162-12172.

Kadaja, M., Silla, T., Ustav, E., and Ustav, M. (2009). Papillomavirus DNA replication - from initiation to genomic instability. *Virology* 384, 360-368.

Kamper, N., Day, P.M., Nowak, T., Selinka, H.C., Florin, L., Bolscher, J., Hilbig, L., Schiller, J.T., and Sapp, M. (2006). A membrane-destabilizing peptide in capsid protein L2 is required for egress of papillomavirus genomes from endosomes. *J Virol* 80, 759-768.

- Khleif, S.N., DeGregori, J., Yee, C.L., Otterson, G.A., Kaye, F.J., Nevins, J.R., and Howley, P.M. (1996). Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 4350-4354.
- Kim, S.H., Juhnn, Y.S., Kang, S., Park, S.W., Sung, M.W., Bang, Y.J., and Song, Y.S. (2006). Human papillomavirus 16 E5 up-regulates the expression of vascular endothelial growth factor through the activation of epidermal growth factor receptor, MEK/ ERK1,2 and PI3K/Akt. *Cell Mol Life Sci* *63*, 930-938.
- Kim, S.H., Oh, J.M., No, J.H., Bang, Y.J., Juhnn, Y.S., and Song, Y.S. (2009). Involvement of NF-kappaB and AP-1 in COX-2 upregulation by human papillomavirus 16 E5 oncoprotein. *Carcinogenesis* *30*, 753-757.
- Kines, R.C., Thompson, C.D., Lowy, D.R., Schiller, J.T., and Day, P.M. (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*, 20458-20463.
- Kleter, B., van Doorn, L.J., ter Schegget, J., Schrauwen, L., van Krimpen, K., Burger, M., ter Harmsel, B., and Quint, W. (1998). Novel short-fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of anogenital human papillomaviruses. *Am J Pathol* *153*, 1731-1739.
- Klingelhutz, A.J., Foster, S.A., and McDougall, J.K. (1996). Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* *380*, 79-82.
- Knapp, A.A., McManus, P.M., Bockstall, K., and Moroianu, J. (2009). Identification of the nuclear localization and export signals of high risk HPV16 E7 oncoprotein. *Virology* *383*, 60-68.
- Koutsky, L. (1997). Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med* *102*, 3-8.
- Krawczyk, E., Suprynowicz, F.A., Liu, X., Dai, Y., Hartmann, D.P., Hanover, J., and Schlegel, R. (2008). Koilocytosis: a cooperative interaction between the human papillomavirus E5 and E6 oncoproteins. *Am J Pathol* *173*, 682-688.
- Lacey, C.J. (2005). Therapy for genital human papillomavirus-related disease. *J Clin Virol* *32 Suppl 1*, S82-90.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680-685.
- Lechner, M.S., Mack, D.H., Finicle, A.B., Crook, T., Vousden, K.H., and Laimins, L.A. (1992). Human papillomavirus E6 proteins bind p53 in vivo and abrogate p53-mediated repression of transcription. *EMBO J* *11*, 3045-3052.
- Lee, C.L., L.A. (2007). The differentiation-dependent life cycle of human papillomaviruses in keratinocytes. In: Garcea, R.L., DiMaio, D. (Eds.), *The Papillomaviruses*. Springer, New York, pp. 45-68.

- Lee, J.H., Yi, S.M., Anderson, M.E., Berger, K.L., Welsh, M.J., Klingelutz, A.J., and Ozbun, M.A. (2004). Propagation of infectious human papillomavirus type 16 by using an adenovirus and Cre/LoxP mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 2094-2099.
- Leechanachai, P., Banks, L., Moreau, F., and Matlashewski, G. (1992). The E5 gene from human papillomavirus type 16 is an oncogene which enhances growth factor-mediated signal transduction to the nucleus. *Oncogene* *7*, 19-25.
- Lehman, T.A., Modali, R., Boukamp, P., Stanek, J., Bennett, W.P., Welsh, J.A., Metcalf, R.A., Stampfer, M.R., Fusenig, N., Rogan, E.M., *et al.* (1993). p53 mutations in human immortalized epithelial cell lines. *Carcinogenesis* *14*, 833-839.
- Lehr, E.E., Qadadri, B., Brown, C.R., and Brown, D.R. (2003). Human papillomavirus type 59 immortalized keratinocytes express late viral proteins and infectious virus after calcium stimulation. *Virology* *314*, 562-571.
- Li, M., Beard, P., Estes, P.A., Lyon, M.K., and Garcea, R.L. (1998). Intercapsomeric disulfide bonds in papillomavirus assembly and disassembly. *J Virol* *72*, 2160-2167.
- Li, X., and Coffino, P. (1996). High-risk human papillomavirus E6 protein has two distinct binding sites within p53, of which only one determines degradation. *J Virol* *70*, 4509-4516.
- Liu, X., Clements, A., Zhao, K., and Marmorstein, R. (2006). Structure of the human Papillomavirus E7 oncoprotein and its mechanism for inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor. *J Biol Chem* *281*, 578-586.
- Longworth, M.S., and Laimins, L.A. (2004). The binding of histone deacetylases and the integrity of zinc finger-like motifs of the E7 protein are essential for the life cycle of human papillomavirus type 31. *J Virol* *78*, 3533-3541.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* *193*, 265-275.
- Madison, K.C. (2003). Barrier function of the skin: "la raison d'etre" of the epidermis. *J Invest Dermatol* *121*, 231-241.
- Madsen, B.S., Jensen, H.L., van den Brule, A.J., Wohlfahrt, J., and Frisch, M. (2008a). Risk factors for invasive squamous cell carcinoma of the vulva and vagina--population-based case-control study in Denmark. *Int J Cancer* *122*, 2827-2834.
- Madsen, B.S., van den Brule, A.J., Jensen, H.L., Wohlfahrt, J., and Frisch, M. (2008b). Risk factors for squamous cell carcinoma of the penis--population-based case-control study in Denmark. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* *17*, 2683-2691.
- Malanchi, I., Accardi, R., Diehl, F., Smet, A., Androphy, E., Hoheisel, J., and Tommasino, M. (2004). Human papillomavirus type 16 E6 promotes retinoblastoma protein phosphorylation and cell cycle progression. *J Virol* *78*, 13769-13778.
- Malanchi, I., Caldeira, S., Krutzfeldt, M., Giarre, M., Alunni-Fabbroni, M., and Tommasino, M. (2002). Identification of a novel activity of human papillomavirus type 16 E6 protein in deregulating the G1/S transition. *Oncogene* *21*, 5665-5672.

- Markowitz, L.E., Dunne, E.F., Saraiya, M., Lawson, H.W., Chesson, H., and Unger, E.R. (2007). Quadrivalent Human Papillomavirus Vaccine: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* 56, 1-24.
- Marques, J.T., and Carthew, R.W. (2007). A call to arms: coevolution of animal viruses and host innate immune responses. *Trends Genet* 23, 359-364.
- Marshall, O.J. (2004). PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics* 20, 2471-2472.
- Mathor, M.B., Ferrari, G., Dellambra, E., Cilli, M., Mavilio, F., Cancedda, R., and De Luca, M. (1996). Clonal analysis of stably transduced human epidermal stem cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10371-10376.
- Maufort, J.P., Shai, A., Pitot, H.C., and Lambert, P.F. (2010). A role for HPV16 E5 in cervical carcinogenesis. *Cancer Res* 70, 2924-2931.
- McCance, D.J., Kopan, R., Fuchs, E., and Laimins, L.A. (1988). Human papillomavirus type 16 alters human epithelial cell differentiation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 7169-7173.
- McIntosh, P.B., Laskey, P., Sullivan, K., Davy, C., Wang, Q., Jackson, D.J., Griffin, H.M., and Doorbar, J. (2010). E1--E4-mediated keratin phosphorylation and ubiquitylation: a mechanism for keratin depletion in HPV16-infected epithelium. *J Cell Sci* 123, 2810-2822.
- McIntyre, M.C., Frattini, M.G., Grossman, S.R., and Laimins, L.A. (1993). Human papillomavirus type 18 E7 protein requires intact Cys-X-X-Cys motifs for zinc binding, dimerization, and transformation but not for Rb binding. *J Virol* 67, 3142-3150.
- McLaughlin-Drubin, M.E., Bromberg-White, J.L., and Meyers, C. (2005). The role of the human papillomavirus type 18 E7 oncoprotein during the complete viral life cycle. *Virology* 338, 61-68.
- McLaughlin-Drubin, M.E., Huh, K.-W., and Münger, K. (2008). Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with E2F6. *J Virol* 82, 8695-8705.
- McLaughlin-Drubin, M.E., and Münger, K. (2009). The human papillomavirus E7 oncoprotein. *Virology* 384, 335-344.
- McLaughlin-Drubin, M.E., Wilson, S., Mullikin, B., Suzich, J., and Meyers, C. (2003). Human papillomavirus type 45 propagation, infection, and neutralization. *Virology* 312, 1-7.
- McNicol, P., Guijon, F., Wayne, S., Hidajat, R., and Paraskevas, M. (1995). Expression of human papillomavirus type 16 E6-E7 open reading frame varies quantitatively in biopsy tissue from different grades of cervical intraepithelial neoplasia. *J Clin Microbiol* 33, 1169-1173.
- Meisels, A., and Morin, C. (1997). [Morphology of lesions of the uterine cervix and human papillomaviruses]. *Arch Anat Cytol Pathol* 45, 261-267.
- Meyers, C., Bromberg-White, J.L., Zhang, J., Kaupas, M.E., Bryan, J.T., Lowe, R.S., and Jansen, K.U. (2002). Infectious virions produced from a human papillomavirus type 18/16 genomic DNA chimera. *J Virol* 76, 4723-4733.

- Meyers, C., Frattini, M.G., Hudson, J.B., and Laimins, L.A. (1992). Biosynthesis of human papillomavirus from a continuous cell line upon epithelial differentiation. *Science* 257, 971-973.
- Meyers, C., Mayer, T.J., and Ozbun, M.A. (1997). Synthesis of infectious human papillomavirus type 18 in differentiating epithelium transfected with viral DNA. *J Virol* 71, 7381-7386.
- Middleton, K., Peh, W., Southern, S., Griffin, H., Sotlar, K., Nakahara, T., El-Sherif, A., Morris, L., Seth, R., Hibma, M., *et al.* (2003). Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *J Virol* 77, 10186-10201.
- Moody, C.A., and Laimins, L.A. (2010). Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer* 10, 550-560.
- Mota, F., Rayment, N., Chong, S., Singer, A., and Chain, B. (1999). The antigen-presenting environment in normal and human papillomavirus (HPV)-related premalignant cervical epithelium. *Clin Exp Immunol* 116, 33-40.
- Munger, K., Baldwin, A., Edwards, K.M., Hayakawa, H., Nguyen, C.L., Owens, M., Grace, M., and Huh, K. (2004). Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol* 78, 11451-11460.
- Munger, K., Basile, J.R., Duensing, S., Eichten, A., Gonzalez, S.L., Grace, M., and Zacny, V.L. (2001). Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene* 20, 7888-7898.
- Munger, K., Phelps, W.C., Bubb, V., Howley, P.M., and Schlegel, R. (1989a). The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol* 63, 4417-4421.
- Munger, K., Werness, B.A., Dyson, N., Phelps, W.C., Harlow, E., and Howley, P.M. (1989b). Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J* 8, 4099-4105.
- Munoz, N., Bosch, F.X., Castellsague, X., Diaz, M., de Sanjose, S., Hammouda, D., Shah, K.V., and Meijer, C.J. (2004). Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int J Cancer* 111, 278-285.
- Nakahara, T., Peh, W.L., Doorbar, J., Lee, D., and Lambert, P.F. (2005). Human papillomavirus type 16 E1circumflexE4 contributes to multiple facets of the papillomavirus life cycle. *J Virol* 79, 13150-13165.
- Nees, M., Geoghegan, J.M., Hyman, T., Frank, S., Miller, L., and Woodworth, C.D. (2001). Papillomavirus type 16 oncogenes downregulate expression of interferon-responsive genes and upregulate proliferation-associated and NF-kappaB-responsive genes in cervical keratinocytes. *J Virol* 75, 4283-4296.
- Nguyen, C.L., Eichwald, C., Nibert, M.L., and Munger, K. (2007). Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with the centrosomal component gamma-tubulin. *J Virol* 81, 13533-13543.

- Nguyen, C.L., McLaughlin-Drubin, M.E., and Münger, K. (2008). Delocalization of the microtubule motor Dynein from mitotic spindles by the human papillomavirus E7 oncoprotein is not sufficient for induction of multipolar mitoses. *Cancer Res* 68, 8715-8722.
- Nguyen, C.L., and Munger, K. (2008). Direct association of the HPV16 E7 oncoprotein with cyclin A/CDK2 and cyclin E/CDK2 complexes. *Virology* 380, 21-25.
- Nguyen, M.L., Nguyen, M.M., Lee, D., Griep, A.E., and Lambert, P.F. (2003). The PDZ ligand domain of the human papillomavirus type 16 E6 protein is required for E6's induction of epithelial hyperplasia in vivo. *J Virol* 77, 6957-6964.
- Nieto, K., Gissmann, L., and Schadlich, L. (2010). Human papillomavirus-specific immune therapy: failure and hope. *Antivir Ther* 15, 951-957.
- Nobre, R.J., Herraiz-Hernandez, E., Fei, J.W., Langbein, L., Kaden, S., Grone, H.J., and de Villiers, E.M. (2009). E7 oncoprotein of novel human papillomavirus type 108 lacking the E6 gene induces dysplasia in organotypic keratinocyte cultures. *J Virol* 83, 2907-2916.
- Noya, F., Chien, W.M., Broker, T.R., and Chow, L.T. (2001). p21^{cip1} Degradation in differentiated keratinocytes is abrogated by costabilization with cyclin E induced by human papillomavirus E7. *J Virol* 75, 6121-6134.
- Oetke, C., Auvinen, E., Pawlita, M., and Alonso, A. (2000). Human papillomavirus type 16 E5 protein localizes to the Golgi apparatus but does not grossly affect cellular glycosylation. *Arch Virol* 145, 2183-2191.
- Oh, K.J., Kalinina, A., Wang, J., Nakayama, K., Nakayama, K.I., and Bagchi, S. (2004a). The papillomavirus E7 oncoprotein is ubiquitinated by UbcH7 and Cullin 1- and Skp2-containing E3 ligase. *J Virol* 78, 5338-5346.
- Oh, S.T., Longworth, M.S., and Laimins, L.A. (2004b). Roles of the E6 and E7 proteins in the life cycle of low-risk human papillomavirus type 11. *J Virol* 78, 2620-2626.
- Ohlenschlager, O., Seiboth, T., Zengerling, H., Briese, L., Marchanka, A., Ramachandran, R., Baum, M., Korbas, M., Meyer-Klaucke, W., Durst, M., *et al.* (2006). Solution structure of the partially folded high-risk human papilloma virus 45 oncoprotein E7. *Oncogene* 25, 5953-5959.
- Orth, G. (1986). Epidermodysplasia verruciformis: a model for understanding the oncogenicity of human papillomaviruses. *Ciba Found Symp* 120, 157-174.
- Orth, G., Favre, M., and Croissant, O. (1977). Characterization of a new type of human papillomavirus that causes skin warts. *J Virol* 24, 108-120.
- Otsu, N. (1979). A Threshold Selection Method from Gray-level Histograms *IEEE Trans Syst Man Cybern* 9, 62-66.
- Ozbun, M.A. (2002a). Human papillomavirus type 31b infection of human keratinocytes and the onset of early transcription. *J Virol* 76, 11291-11300.

- Ozbun, M.A. (2002b). Infectious human papillomavirus type 31b: purification and infection of an immortalized human keratinocyte cell line. *J Gen Virol* 83, 2753-2763.
- Ozbun, M.A., and Meyers, C. (1998). Human papillomavirus type 31b E1 and E2 transcript expression correlates with vegetative viral genome amplification. *Virology* 248, 218-230.
- Paramio, J.M., Lain, S., Segrelles, C., Lane, E.B., and Jorcano, J.L. (1998). Differential expression and functionally co-operative roles for the retinoblastoma family of proteins in epidermal differentiation. *Oncogene* 17, 949-957.
- Parkin, D.M. (2006). The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer* 118, 3030-3044.
- Patel, D., Huang, S.M., Baglia, L.A., and McCance, D.J. (1999). The E6 protein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300. *EMBO J* 18, 5061-5072.
- Pedroza-Saavedra, A., Lam, E.W., Esquivel-Guadarrama, F., and Gutierrez-Xicotencatl, L. (2010). The human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein synergizes with EGF-receptor signaling to enhance cell cycle progression and the down-regulation of p27(Kip1). *Virology* 400, 44-52.
- Peh, W.L., Brandsma, J.L., Christensen, N.D., Cladel, N.M., Wu, X., and Doorbar, J. (2004). The viral E4 protein is required for the completion of the cottontail rabbit papillomavirus productive cycle in vivo. *J Virol* 78, 2142-2151.
- Peh, W.L., Middleton, K., Christensen, N., Nicholls, P., Egawa, K., Sotlar, K., Brandsma, J., Percival, A., Lewis, J., Liu, W.J., *et al.* (2002). Life cycle heterogeneity in animal models of human papillomavirus-associated disease. *J Virol* 76, 10401-10416.
- Pett, M., and Coleman, N. (2007). Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? *J Pathol* 212, 356-367.
- Phelps, W.C., Yee, C.L., Munger, K., and Howley, P.M. (1989). Functional and sequence similarities between HPV16 E7 and adenovirus E1A. *Curr Top Microbiol Immunol* 144, 153-166.
- Pim, D., Collins, M., and Banks, L. (1992). Human papillomavirus type 16 E5 gene stimulates the transforming activity of the epidermal growth factor receptor. *Oncogene* 7, 27-32.
- Pirisi, L., Creek, K.E., Doniger, J., and DiPaolo, J.A. (1988). Continuous cell lines with altered growth and differentiation properties originate after transfection of human keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA. *Carcinogenesis* 9, 1573-1579.
- Psyrrri, A., and DiMaio, D. (2008). Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 5, 24-31.
- Pyeon, D., Lambert, P.F., and Ahlquist, P. (2005). Production of infectious human papillomavirus independently of viral replication and epithelial cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 9311-9316.

- Rader, J.S., Golub, T.R., Hudson, J.B., Patel, D., Bedell, M.A., and Laimins, L.A. (1990). In vitro differentiation of epithelial cells from cervical neoplasias resembles in vivo lesions. *Oncogene* 5, 571-576.
- Rasband, W.S. (1997-2004). ImageJ. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA.
- Reinstein, E., Scheffner, M., Oren, M., Ciechanover, A., and Schwartz, A. (2000). Degradation of the E7 human papillomavirus oncoprotein by the ubiquitin-proteasome system: targeting via ubiquitination of the N-terminal residue. *Oncogene* 19, 5944-5950.
- Reno, C., Marchuk, L., Sciore, P., Frank, C.B., and Hart, D.A. (1997). Rapid isolation of total RNA from small samples of hypocoellular, dense connective tissues. *Biotechniques* 22, 1082-1086.
- Ressler, S., Scheiden, R., Dreier, K., Laich, A., Muller-Holzner, E., Pircher, H., Morandell, D., Stein, I., Viertler, H.P., Santer, F.R., *et al.* (2007). High-risk human papillomavirus E7 oncoprotein detection in cervical squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 13, 7067-7072.
- Richards, R.M., Lowy, D.R., Schiller, J.T., and Day, P.M. (2006). Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 1522-1527.
- Richardson, H., Kelsall, G., Tellier, P., Voyer, H., Abrahamowicz, M., Ferenczy, A., Coutlee, F., and Franco, E.L. (2003). The natural history of type-specific human papillomavirus infections in female university students. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12, 485-490.
- Roberts, S., Ashmole, I., Gibson, L.J., Rookes, S.M., Barton, G.J., and Gallimore, P.H. (1994). Mutational analysis of human papillomavirus E4 proteins: identification of structural features important in the formation of cytoplasmic E4/cytokeratin networks in epithelial cells. *J Virol* 68, 6432-6445.
- Roden, R.B., Day, P.M., Bronzo, B.K., Yutzy, W.H.t., Yang, Y., Lowy, D.R., and Schiller, J.T. (2001). Positively charged termini of the L2 minor capsid protein are necessary for papillomavirus infection. *J Virol* 75, 10493-10497.
- Rous, P. (1911). A Sarcoma of the Fowl Transmissible by an Agent Separable from the Tumor Cells. *J Exp Med* 13, 397-411.
- Rubin, R., and Strayer, D.S. (2008). *Rubin's Pathology : clinicopathologic foundations of medicine ; [includes access to online text, cases, images, and audio review questions!]*, 5. edn (Philadelphia, Pa. [u.a.], Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins).
- Sarid, R., and Gao, S.J. (2010). Viruses and human cancer: From detection to causality. *Cancer Lett.*
- Scheffner, M., Huibregtse, J.M., Vierstra, R.D., and Howley, P.M. (1993). The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75, 495-505.
- Scheffner, M., Werness, B.A., Huibregtse, J.M., Levine, A.J., and Howley, P.M. (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63, 1129-1136.

- Schelhaas, M., Ewers, H., Rajamaki, M.L., Day, P.M., Schiller, J.T., and Helenius, A. (2008). Human papillomavirus type 16 entry: retrograde cell surface transport along actin-rich protrusions. *PLoS Pathog* *4*, e1000148.
- Schiller, J.T., Day, P.M., and Kines, R.C. (2010). Current understanding of the mechanism of HPV infection. *Gynecol Oncol* *118*, S12-17.
- Schmitt, A., Rochat, A., Zeltner, R., Borenstein, L., Barrandon, Y., Wettstein, F.O., and Iftner, T. (1996). The primary target cells of the high-risk cottontail rabbit papillomavirus colocalize with hair follicle stem cells. *J Virol* *70*, 1912-1922.
- Schmitt, M., Bravo, I.G., Snijders, P.J., Gissmann, L., Pawlita, M., and Waterboer, T. (2006). Bead-based multiplex genotyping of human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* *44*, 504-512.
- Schmitt, M., Dalstein, V., Waterboer, T., Clavel, C., Gissmann, L., and Pawlita, M. (2011). The HPV16 transcriptome in cervical lesions of different grades. *Mol Cell Probes*.
- Schmitt, M., Dondog, B., Waterboer, T., and Pawlita, M. (2008). Homogeneous amplification of genital human alpha papillomaviruses by PCR using novel broad-spectrum GP5+ and GP6+ primers. *J Clin Microbiol* *46*, 1050-1059.
- Schoop, V.M., Mirancea, N., and Fusenig, N.E. (1999). Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* *112*, 343-353.
- Selinka, H.C., Giroglou, T., Nowak, T., Christensen, N.D., and Sapp, M. (2003). Further evidence that papillomavirus capsids exist in two distinct conformations. *J Virol* *77*, 12961-12967.
- Shafti-Keramat, S., Handisurya, A., Kriehuber, E., Meneguzzi, G., Slupetzky, K., and Kirnbauer, R. (2003). Different heparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses. *J Virol* *77*, 13125-13135.
- Sherman, L., Alloul, N., Golan, I., Durst, M., and Baram, A. (1992). Expression and splicing patterns of human papillomavirus type-16 mRNAs in pre-cancerous lesions and carcinomas of the cervix, in human keratinocytes immortalized by HPV 16, and in cell lines established from cervical cancers. *Int J Cancer* *50*, 356-364.
- Shirasawa, H., Tanzawa, H., Matsunaga, T., and Simizu, B. (1991). Quantitative detection of spliced E6-E7 transcripts of human papillomavirus type 16 in cervical premalignant lesions. *Virology* *184*, 795-798.
- Shope, R.E., and Hurst, E.W. (1933). Infectious Papillomatosis of Rabbits : With a Note on the Histopathology. *J Exp Med* *58*, 607-624.
- Sibbet, G., Romero-Graillet, C., Meneguzzi, G., and Saveria Campo, M. (2000). alpha6 integrin is not the obligatory cell receptor for bovine papillomavirus type 4. *J Gen Virol* *81 Pt 6*, 1629.
- Sibbet, G.J., Cuthill, S., and Campo, M.S. (1995). The enhancer in the long control region of human papillomavirus type 16 is up-regulated by PEF-1 and down-regulated by Oct-1. *J Virol* *69*, 4006-4011.

- Smith-McCune, K., Kalman, D., Robbins, C., Shivakumar, S., Yuschenkoff, L., and Bishop, J.M. (1999). Intranuclear localization of human papillomavirus 16 E7 during transformation and preferential binding of E7 to the Rb family member p130. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 6999-7004.
- Smith, J.L., Campos, S.K., and Ozbun, M.A. (2007a). Human papillomavirus type 31 uses a caveolin 1- and dynamin 2-mediated entry pathway for infection of human keratinocytes. *J Virol* *81*, 9922-9931.
- Smith, J.L., Lidke, D.S., and Ozbun, M.A. (2008). Virus activated filopodia promote human papillomavirus type 31 uptake from the extracellular matrix. *Virology* *381*, 16-21.
- Smith, J.S., Lindsay, L., Hoots, B., Keys, J., Franceschi, S., Winer, R., and Clifford, G.M. (2007b). Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer* *121*, 621-632.
- Smits, H.L., Traanberg, K.F., Krul, M.R., Prussia, P.R., Kuiken, C.L., Jebbink, M.F., Kleyne, J.A., van den Berg, R.H., Capone, B., de Bruyn, A., *et al.* (1994). Identification of a unique group of human papillomavirus type 16 sequence variants among clinical isolates from Barbados. *J Gen Virol* *75 (Pt 9)*, 2457-2462.
- Smola-Hess, S., de Silva, U.S., Hadaschik, D., and Pfister, H.J. (2001). Soluble interleukin-6 receptor activates the human papillomavirus type 18 long control region in SW756 cervical carcinoma cells in a STAT3-dependent manner. *J Gen Virol* *82*, 2335-2339.
- Smotkin, D., and Wettstein, F.O. (1987). The major human papillomavirus protein in cervical cancers is a cytoplasmic phosphoprotein. *J Virol* *61*, 1686-1689.
- Snijders, P.J., Steenbergen, R.D., Heideman, D.A., and Meijer, C.J. (2006). HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications. *J Pathol* *208*, 152-164.
- Sotlar, K., Stubner, A., Diemer, D., Menton, S., Menton, M., Dietz, K., Wallwiener, D., Kandolf, R., and Bultmann, B. (2004). Detection of high-risk human papillomavirus E6 and E7 oncogene transcripts in cervical scrapes by nested RT-polymerase chain reaction. *J Med Virol* *74*, 107-116.
- Spoden, G., Freitag, K., Husmann, M., Boller, K., Sapp, M., Lambert, C., and Florin, L. (2008). Clathrin- and caveolin-independent entry of human papillomavirus type 16--involvement of tetraspanin-enriched microdomains (TEMs). *PLoS One* *3*, e3313.
- Stacey, S.N., Jordan, D., Williamson, A.J., Brown, M., Coote, J.H., and Arrand, J.R. (2000). Leaky scanning is the predominant mechanism for translation of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein from E6/E7 bicistronic mRNA. *J Virol* *74*, 7284-7297.
- Stanley, M. (2007). Prevention strategies against the human papillomavirus: the effectiveness of vaccination. *Gynecol Oncol* *107*, S19-23.
- Stanley, M. (2008). Immunobiology of HPV and HPV vaccines. *Gynecol Oncol* *109*, S15-21.
- Stanley, M.A. (2009). Immune responses to human papilloma viruses. *Indian J Med Res* *130*, 266-276.

- Stanley, M.A., Browne, H.M., Appleby, M., and Minson, A.C. (1989). Properties of a non-tumorigenic human cervical keratinocyte cell line. *Int J Cancer* *43*, 672-676.
- Stauffer, Y., Raj, K., Masternak, K., and Beard, P. (1998). Infectious human papillomavirus type 18 pseudovirions. *J Mol Biol* *283*, 529-536.
- Steben, M., and Duarte-Franco, E. (2007). Human papillomavirus infection: epidemiology and pathophysiology. *Gynecol Oncol* *107*, S2-5.
- Sterling, J., Stanley, M., Gatward, G., and Minson, T. (1990). Production of human papillomavirus type 16 virions in a keratinocyte cell line. *J Virol* *64*, 6305-6307.
- Stoppler, M.C., Straight, S.W., Tsao, G., Schlegel, R., and McCance, D.J. (1996). The E5 gene of HPV-16 enhances keratinocyte immortalization by full-length DNA. *Virology* *223*, 251-254.
- Storey, A., Almond, N., Osborn, K., and Crawford, L. (1990). Mutations of the human papillomavirus type 16 E7 gene that affect transformation, transactivation and phosphorylation by the E7 protein. *J Gen Virol* *71 (Pt 4)*, 965-970.
- Straight, S.W., Herman, B., and McCance, D.J. (1995). The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 inhibits the acidification of endosomes in human keratinocytes. *J Virol* *69*, 3185-3192.
- Straight, S.W., Hinkle, P.M., Jewers, R.J., and McCance, D.J. (1993). The E5 Oncoprotein of Human Papillomavirus Type-16 Transforms Fibroblasts and Effects the down-Regulation of the Epidermal Growth-Factor Receptor in Keratinocytes. *Journal of Virology* *67*, 4521-4532.
- Stubenrauch, F., and Laimins, L.A. (1999). Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Semin Cancer Biol* *9*, 379-386.
- Subbaramaiah, K., and Dannenberg, A.J. (2007). Cyclooxygenase-2 transcription is regulated by human papillomavirus 16 E6 and E7 oncoproteins: evidence of a corepressor/coactivator exchange. *Cancer Res* *67*, 3976-3985.
- Supryniewicz, F.A., Disbrow, G.L., Krawczyk, E., Simic, V., Lantzky, K., and Schlegel, R. (2008). HPV-16 E5 oncoprotein upregulates lipid raft components caveolin-1 and ganglioside GM1 at the plasma membrane of cervical cells. *Oncogene* *27*, 1071-1078.
- Talbert-Slagle, K., and DiMaio, D. (2009). The bovine papillomavirus E5 protein and the PDGF beta receptor: it takes two to tango. *Virology* *384*, 345-351.
- Thomas, J.T., Hubert, W.G., Ruesch, M.N., and Laimins, L.A. (1999). Human papillomavirus type 31 oncoproteins E6 and E7 are required for the maintenance of episomes during the viral life cycle in normal human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 8449-8454.
- Thomas, J.T., and Laimins, L.A. (1998). Human papillomavirus oncoproteins E6 and E7 independently abrogate the mitotic spindle checkpoint. *J Virol* *72*, 1131-1137.
- Thomas, M., and Banks, L. (1998). Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6. *Oncogene* *17*, 2943-2954.

- Thorland, E.C., Myers, S.L., Persing, D.H., Sarkar, G., McGovern, R.M., Gostout, B.S., and Smith, D.I. (2000). Human papillomavirus type 16 integrations in cervical tumors frequently occur in common fragile sites. *Cancer Res* 60, 5916-5921.
- Tomakidi, P., Cheng, H., Kohl, A., Komposch, G., and Alonso, A. (2000a). Connexin 43 expression is downregulated in raft cultures of human keratinocytes expressing the human papillomavirus type 16 E5 protein. *Cell Tissue Res* 301, 323-327.
- Tomakidi, P., Cheng, H., Kohl, A., Komposch, G., and Alonso, A. (2000b). Modulation of the epidermal growth factor receptor by the human papillomavirus type 16 E5 protein in raft cultures of human keratinocytes. *Eur J Cell Biol* 79, 407-412.
- Tommasino, M., Adamczewski, J.P., Carlotti, F., Barth, C.F., Manetti, R., Contorni, M., Cavalieri, F., Hunt, T., and Crawford, L. (1993). HPV16 E7 protein associates with the protein kinase p33CDK2 and cyclin A. *Oncogene* 8, 195-202.
- Tornesello, M.L., Buonaguro, F.M., Meglio, A., Buonaguro, L., Beth-Giraldo, E., and Giraldo, G. (1997). Sequence variations and viral genomic state of human papillomavirus type 16 in penile carcinomas from Ugandan patients. *J Gen Virol* 78 (Pt 9), 2199-2208.
- Tsao, Y.P., Li, L.Y., Tsai, T.C., and Chen, S.L. (1996). Human papillomavirus type 11 and 16 E5 represses p21(Waf1/Sdi1/Cip1) gene expression in fibroblasts and keratinocytes. *J Virol* 70, 7535-7539.
- Ueno, T., Sasaki, K., Yoshida, S., Kajitani, N., Satsuka, A., Nakamura, H., and Sakai, H. (2006). Molecular mechanisms of hyperplasia induction by human papillomavirus E7. *Oncogene* 25, 4155-4164.
- Unckell, F., Streeck, R.E., and Sapp, M. (1997). Generation and neutralization of pseudovirions of human papillomavirus type 33. *J Virol* 71, 2934-2939.
- Venuti, A., Salani, D., Poggiali, F., Manni, V., and Bagnato, A. (1998). The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 enhances endothelin-1-induced keratinocyte growth. *Virology* 248, 1-5.
- Verma, I.M., and Somia, N. (1997). Gene therapy -- promises, problems and prospects. *Nature* 389, 239-242.
- Villa, L.L., Vieira, K.B., Pei, X.F., and Schlegel, R. (1992). Differential effect of tumor necrosis factor on proliferation of primary human keratinocytes and cell lines containing human papillomavirus types 16 and 18. *Mol Carcinog* 6, 5-9.
- von Knebel Doeberitz, M. (2002). New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *Eur J Cancer* 38, 2229-2242.
- Vousden, K.H., and Jat, P.S. (1989). Functional similarity between HPV16E7, SV40 large T and adenovirus E1a proteins. *Oncogene* 4, 153-158.
- Wang, Q., Kennedy, A., Das, P., McIntosh, P.B., Howell, S.A., Isaacson, E.R., Hinz, S.A., Davy, C., and Doorbar, J. (2009). Phosphorylation of the human papillomavirus type 16 E1-E4 protein at T57 by ERK triggers a structural change that enhances keratin binding and protein stability. *J Virol* 83, 3668-3683.

- Watson, R.A., Thomas, M., Banks, L., and Roberts, S. (2003). Activity of the human papillomavirus E6 PDZ-binding motif correlates with an enhanced morphological transformation of immortalized human keratinocytes. *J Cell Sci* *116*, 4925-4934.
- Weinberg, R.A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* *81*, 323-330.
- Weinberger, P.M., Yu, Z., Haffty, B.G., Kowalski, D., Harigopal, M., Brandsma, J., Sasaki, C., Joe, J., Camp, R.L., Rimm, D.L., *et al.* (2006). Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus--associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis. *J Clin Oncol* *24*, 736-747.
- Weinstock, H., Respass, R., Heneine, W., Petropoulos, C.J., Hellmann, N.S., Luo, C.C., Pau, C.P., Woods, T., Gwinn, M., and Kaplan, J. (2000). Prevalence of mutations associated with reduced antiretroviral drug susceptibility among human immunodeficiency virus type 1 seroconverters in the United States, 1993-1998. *J Infect Dis* *182*, 330-333.
- Wentzensen, N., and von Knebel Doeberitz, M. (2007). Biomarkers in cervical cancer screening. *Dis Markers* *23*, 315-330.
- Westphal, K., Akgul, B., Storey, A., and Nindl, I. (2009). Cutaneous human papillomavirus E7 type-specific effects on differentiation and proliferation of organotypic skin cultures. *Cell Oncol* *31*, 213-226.
- Williams, S.M.G., Disbrow, G.L., Schlegel, R., Lee, D., Threadgill, D.W., and Lambert, P.F. (2005). Requirement of epidermal growth factor receptor for hyperplasia induced by E5, a high-risk human papillomavirus oncogene. *Cancer Research* *65*, 6534-6542.
- Wilson, V.G., West, M., Woytek, K., and Rangasamy, D. (2002). Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. *Virus Genes* *24*, 275-290.
- Winder, D.M., Pett, M.R., Foster, N., Shivji, M.K., Herdman, M.T., Stanley, M.A., Venkitaraman, A.R., and Coleman, N. (2007). An increase in DNA double-strand breaks, induced by Ku70 depletion, is associated with human papillomavirus 16 episome loss and de novo viral integration events. *J Pathol* *213*, 27-34.
- Woodworth, C.D., Cheng, S., Simpson, S., Hamacher, L., Chow, L.T., Broker, T.R., and DiPaolo, J.A. (1992). Recombinant retroviruses encoding human papillomavirus type 18 E6 and E7 genes stimulate proliferation and delay differentiation of human keratinocytes early after infection. *Oncogene* *7*, 619-626.
- Yamamoto, L.S., Alves, V.A., Maeda, M.Y., Longatto-Filho, A., Utogawa, M.L., and Eluf Neto, J. (2004). A morphological protocol and guide-list on uterine cervix cytology associated to Papillomavirus infection. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* *46*, 189-193.
- You, J., Croyle, J.L., Nishimura, A., Ozato, K., and Howley, P.M. (2004). Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes. *Cell* *117*, 349-360.
- Zehbe, I., Richard, C., DeCarlo, C.A., Shai, A., Lambert, P.F., Lichtig, H., Tommasino, M., and Sherman, L. (2009). Human papillomavirus 16 E6 variants differ in their dysregulation of human keratinocyte differentiation and apoptosis. *Virology* *383*, 69-77.

- Zerfass-Thome, K., Zwerschke, W., Mannhardt, B., Tindle, R., Botz, J.W., and Jansen-Durr, P. (1996). Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene* 13, 2323-2330.
- Zhang, P., Nouri, M., Brandsma, J.L., Iftner, T., and Steinberg, B.M. (1999). Induction of E6/E7 expression in cottontail rabbit papillomavirus latency following UV activation. *Virology* 263, 388-394.
- Zhou, J., Stenzel, D.J., Sun, X.Y., and Frazer, I.H. (1993). Synthesis and assembly of infectious bovine papillomavirus particles in vitro. *J Gen Virol* 74 (Pt 4), 763-768.
- Ziegler, K., Bui, T., Frisque, R.J., Grandinetti, A., and Nerurkar, V.R. (2004). A rapid in vitro polyomavirus DNA replication assay. *J Virol Methods* 122, 123-127.
- zur Hausen, H. (1977). Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr Top Microbiol Immunol* 78, 1-30.
- zur Hausen, H. (1991). Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology* 184, 9-13.
- zur Hausen, H. (2009a). Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology* 384, 260-265.
- zur Hausen, H. (2009b). The search for infectious causes of human cancers: where and why (Nobel lecture). *Angew Chem Int Ed Engl* 48, 5798-5808.
- Zur Hausen, H., and Fox, J.G. (2006). *Infections causing human cancer* (Weinheim, Wiley-VCH).

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.1: Phylogenetischer Baum der <i>Papillomaviridae</i>	3
Abbildung 1.2: Häufigkeit von HPV Infektionen	4
Abbildung 1.3: Genom- und Kapsidstruktur von HPV.....	7
Abbildung 1.4: Der HPV Lebenszyklus.....	8
Abbildung 1.5: Intrazelluläre Interaktionspartner von E6 und E7 in der Vermittlung ihrer onkogenen Eigenschaften	14
Abbildung 2.1: Schematischer Aufbau Southern Blot.....	41
Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der organotypischen Raftkultur	51
Abbildung 2.3: Aufarbeitung von Fluoreszenzbildern für eine quantitative Analyse	62
Abbildung 3.1: Virionenfraktionen und EM Struktur	66
Abbildung 3.2: GFP Fluoreszenz peGFP-N1-Pseudovirionen infizierter 293TT Zellen.....	67
Abbildung 3.3: Nachweis aktiver Infektion von Keratinozyten durch HPV16-Virionen mittels E1 ^{E4} RT-PCR.	68
Abbildung 3.4: Histologie HPV-positiver NIKS Raft-Kulturen.....	69
Abbildung 3.5: Einfluß der Kulturbedingungen auf den Differenzierungsgrad von HaCaT.....	71
Abbildung 3.6: Plasmidkarte von loxp _{HPV16} _peGFP-N1	73
Abbildung 3.7: GFP Expression nach Rekombination des loxp _{HPV16} _peGFP-N1 Vektors in HaCaT	74
Abbildung 3.8: Nachweis von episomaler HPV16-DNA und früher HPV16-Transkripte....	76
Abbildung 3.9: Nachweis von Markern von Differenzierung und HPV-Funktion in HPV16-positiver HaCaT-Monolayer-Kultur	77
Abbildung 3.10: Vergleichende Histologie der Raft-Kulturen von HaCaT, NIKS sowie primären Keratinozyten (NHEK)	79
Abbildung 3.11: E1 ^{E4} -Nachweis als Marker der Vervollständigung des Lebenszyklus in der HaCaT-Raftkultur.....	82
Abbildung 3.12: Histologie HPV-positiver HaCaT Raft-Kulturen	84
Abbildung 3.13: Gewebedicke in Abhängigkeit der viralen Onkoproteinexpression.....	85
Abbildung 3.14: Nachweis proliferierender Zellen in suprabasalen Bereichen HPV-positiver Gewebe.....	87

Abbildung 3.15: Verhältnis proliferierender Zellen in suprabasalen zu denen in basalen Zellschichten (S/B-Quotient)	89
Abbildung 3.16: Nachweis undifferenzierter Zellpopulationen in suprabasalen Bereichen von HPV-positiven Raftkulturen.....	92
Abbildung 3.17: Involucrin und K14 zeigen global keine Veränderung in ihrer Expression...	93
Abbildung 3.18: Nachweis erhöhter p53 Expression in HPV-positivem Gewebe mittels Immunfluoreszenz	95
Abbildung 3.19: Quantifizierung erhöhter p53 Expression in HPV-positivem Gewebe mittels Immunfluoreszenz	96
Abbildung 3.20: Erhöhte p53 Expression in HPV-positivem Gewebe.....	97
Abbildung 3.21: Erhöhte Expression von pRb und p16 in Gewebe der HPV16 E7-Mutanten	98

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 3.1:	Semiquantitativer MPG-Assay und qualitative RT-PCR zum Nachweis viraler Episome und viraler Transkription.....	80
Tabelle 3.2:	Quantifizierung des Gewebequerschnitts in Abhängigkeit der viralen Onkoproteinexpression.....	85
Tabelle 3.3:	Quantifizierung proliferierender Zellen anhand anti-BrdU Immunhistochemie	88

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α -	anti-
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
ATP	Adenosin-Triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNS	komplementäre Desoxiribonukleinsäure
cm	Zentimeter
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Da, kDa	Dalton, Kilodalton
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxiribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor</i>)
EGTA	N, N, N', N'-Tetraessigsäure
FCS	Fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
g	Gramm
GFP, eGFP	Grün fluoreszierendes Protein (green fluorescent protein, enhanced green fluorescent protein)
Glc	Glukose
h	Stunde(n)
ddH ₂ O	entionisiertes Wasser
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-2-ethanesulfonic acid
HPV	Humane Papillomaviren
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
KGM	Keratinocyte growth medium
kV	Kilovolt
L	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
M	molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
mL	Milliliter
mm ²	Quadratmillimeter

mM	millimolar
msec	Millisekunde(n)
min	Minute(n)
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NHEK	Primäre humane Keratinozyten (normal human epidermal keratinocytes)
NP-40	Nonidet-P40
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBS-T	Phosphatgepufferte Salzlösung mit 0,1% Tween®20
PCR	Polymerasekettenreaktion
pg	Pikogramm
PV	Papillomaviren
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde(n)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
s.o.	siehe oben
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit 0,1% Tween®20
TEMED	(N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TZ	Tischzentrifuge
U	Einheit (<i>unit</i>)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Stromspannung gemessen in Volt
WB	Western Blot
(w/v)	Gewicht zu Volumen
(w/w)	Gewicht zu Gewicht
z.B.	zum Beispiel
µF	Mikrofarad
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	mikromolar
Ω	Stromstärke gemessen in Ohm

DANKSAGUNG

Bei Herrn Prof. Dr. Angel Alonso möchte ich mich herzlich für die Überlassung dieses sehr spannenden Themas und für die Möglichkeit, meine Arbeit unter ausgezeichneter Betreuung durchführen zu können, bedanken. Ebenso gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. Lutz Gissmann für die Übernahme meiner Doktorarbeit als Erstgutachter.

All meinen Kollegen und Kolleginnen im Labor 2.112: Evelyn Oswald, Dr. Ignacio G. Bravo, Jürgen Fischer, Eileen Reinz und Michaela Hipp möchte ich für die außergewöhnliche Arbeitsatmosphäre, die Hilfsbereitschaft und die spaßigen Momente, die wir innerhalb und auch außerhalb des Labors zusammen hatten, danken - eine Quelle, die mich immer wieder motiviert hat.

Danken möchte ich Frau Annette Kohl für die erste Einweisung in die Methodik der organotypischen Raftkultur und Frau Sarah Schmidt für die unkomplizierte und schnelle Paraffineinbettung und Anfertigung der Dünnschnitte der Gewebe.

Danken möchte ich Herrn Dr. Massimo Tommassino für die Möglichkeit 4 Monate in seiner Arbeitsgruppe in der *LARC*, Lyon zu verbringen – eine Zeit in der ich viel gelernt habe. Damit danke ich auch allen Mitarbeitern im 9.OG für die nette Aufnahme und Arbeitsatmosphäre während dieser Zeit.

Ein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Reinhard Bauer für die anregenden und interessanten Diskussionen in den letzten Wochen, die sofortige Hilfe & das Korrekturlesen meiner Arbeit.

All meinen Freunden möchte ich danken, für die vielen Erlebnisse und Aktivitäten, die immer wieder eine notwendige Ablenkung vom harten und teilweise auch frustrierenden Laboralltag brachten.

Meiner Liebe Stephanie danke ich besonders für ihre immer wieder aufbauenden Worte, wenn es mal wieder durch ein Tief ging, für das Geben der letzten Motivation zur Vollendung dieser Arbeit und für Ihr Dasein auch während der Jahre der Fernbeziehung.

Meinen Eltern, denen ich nicht genug mit Worten danken kann, danke ich zutiefst für die bedingungslose Unterstützung und ihre unermüdliche Geduld. Sie ermöglichten mir dadurch ein sorgenfreies Studieren und Arbeiten.