

Aus dem Bereich  
Klinische Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**HPV8 E6-vermittelte Monozyten-Migration und Induktion des CCL2  
Chemokins über den C/EBP $\alpha$ -p63-Signalweg in humanen Keratinozyten**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes

**2023**

vorgelegt von

**Luca Giuseppe Vella**

geb. am 30.04.1995 in Saarlouis

Die experimentellen Arbeiten im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Sigrun Smola am Institut für Virologie am Universitätsklinikum des Saarlandes in Homburg/Saar durchgeführt.

Tag der Promotion: 04.12.2023

Dekan: Prof. Dr. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. Klaus Römer

Prof. Dr. Thomas Vogt

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	1
Summary .....	2
1 Einleitung .....	4
1.1 Humane Papillomviren (HPV) .....	4
1.1.1 Aufbau, Struktur und Phylogenie .....	4
1.1.2 HPV-Lebenszyklus .....	5
1.1.3 Mukosale $\alpha$ -HPV und das Zervixkarzinom .....	7
1.1.4 Kutane $\beta$ -HPV und Plattenepithelkarzinome .....	8
1.1.5 Molekulare Mechanismen von $\beta$ -HPV-Onkoproteinen .....	10
1.2 Epidermodysplasia Verruciformis .....	12
1.2.1 Klinische Manifestation .....	12
1.2.2 Molekulare Alterationen und Suszeptibilität für kutane $\beta$ -HPV .....	13
1.3 Die Familie der C/EBP Transkriptionsfaktoren .....	14
1.3.1 C/EBP $\alpha$ .....	14
1.4 Die p53 Tumorsuppressor Genfamilie .....	15
1.4.1 $\Delta$ Np63 $\alpha$ , ein epidermaler Stammzellfaktor .....	16
1.5 Makrophagen: Funktionen und Polarisierungen .....	16
1.5.1 M1- und M2-Makrophagen .....	17
1.5.2 Tumor-assoziierte Makrophagen .....	17
1.6 Der CC-Chemokin Ligand 2 (CCL2) .....	18
1.6.1 Eigenschaften und Funktionen von CCL2 .....	18
1.6.2 Regulation der CCL2 Genexpression .....	19
1.6.3 Deregulationen der CCL2 Expression im Tumorwachstum .....	21
1.7 Proteinkinasen .....	22
1.7.1 MAP-Kinasen und Proteinkinase A .....	22
1.8 Ziele der Arbeit .....	24
2 Material und Methoden .....	25
2.1 Material .....	25
2.1.1 Organismen .....	25
2.1.1.1 Eukaryotische Zelllinien .....	25
2.1.1.2 Eukaryotische primäre Zellen .....	25
2.1.1.3 Prokaryotische Zellen .....	26
2.1.2 EV-Läsionen .....	26
2.1.3 Zellkulturmedien und Zusätze .....	26
2.1.4 Vektoren .....	28

2.1.5	Oligonukleotide .....	30
2.1.5.1	siRNA .....	30
2.1.5.2	cDNA-Synthese .....	31
2.1.5.3	qRT-PCR .....	31
2.1.5.4	Mykoplasmen PCR.....	32
2.1.6	Antikörper .....	32
2.1.7	Enzyme und Puffer.....	33
2.1.8	Inhibitoren .....	34
2.1.9	Kits .....	34
2.1.10	Chemikalien und Reagenzien .....	35
2.1.11	Puffer und Lösungen .....	37
2.1.12	Plastikwaren und Gebrauchsgüter .....	40
2.1.13	Geräte .....	41
2.2	Methoden .....	42
2.2.1	Auftauen von Zellen .....	42
2.2.2	Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	42
2.2.3	Bestimmung der Zellzahl .....	42
2.2.4	Aussäen von Zellen .....	43
2.2.5	Zell-Behandlung mit Inhibitoren.....	43
2.2.6	Ernte von Zellen und Zellüberständen .....	44
2.2.7	Organotypische Kulturen .....	44
2.2.8	Kultivierung prokaryotischer Zellen .....	45
2.2.9	Anlegen von Kryokulturen .....	45
2.3	Molekularbiologische Methoden.....	45
2.3.1	Aufreinigung mononukleärer Zellen aus peripherem Vollblut .....	45
2.3.2	Magnetische Zellsortierung (MACS).....	46
2.3.3	Bestimmung der Zellviabilität mit 7-AAD .....	46
2.3.4	Durchflusszytometrie (FACS).....	47
2.3.5	Migrations-Assay .....	48
2.3.6	Transiente Transfektion humaner Zellen.....	49
2.3.6.1	Transfektion von Plasmid DNA mit Lipofectamin 2000 .....	49
2.3.6.2	Transfektion von Plasmid DNA mit Lipofectamin LTX.....	50
2.3.6.3	Transfektion von siRNA mit Lipofectamin RNAiMAX.....	50
2.3.7	Transformation von Bakterien.....	51
2.3.8	Aufreinigung von Plasmid DNA .....	51
2.3.9	Aufreinigung von RNA .....	51
2.3.10	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	52

2.3.11	DNA-Sequenzierung .....	52
2.3.12	DNA-Gelelektrophorese.....	52
2.3.13	cDNA-Synthese aus mRNA und miRNA .....	52
2.3.14	qRT-PCR .....	54
2.3.14.1	qRT-PCR für cDNA aus mRNA.....	54
2.3.14.2	qRT-PCR für cDNA aus miRNA .....	56
2.3.15	Mykoplasmen PCR.....	56
2.3.16	mRNA und miRNA-Microarray .....	57
2.3.17	Proteinextraktion .....	58
2.3.17.1	RIPA-Extraktion .....	58
2.3.17.2	M-PER-Extraktion .....	58
2.3.18	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	59
2.3.18.1	BCA Assay.....	59
2.3.18.2	Bradford Assay .....	59
2.3.19	SDS-PAGE.....	59
2.3.20	Western Blot.....	60
2.3.21	Kinase-Aktivitäts-Assay.....	61
2.3.22	ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) .....	61
2.3.23	Multiplex-Immuno Assay.....	62
2.3.24	Luciferase Assay .....	62
2.3.25	Immunhistochemische Färbung .....	63
2.3.26	Immunfluoreszenz Färbung.....	64
2.3.27	Statistische Auswertung .....	65
3	Ergebnisse .....	66
3.1	Erhöhte Makrophagen-Infiltration und CCL2 Expression in EV-Läsionen.....	66
3.2	CCL2 wird von HPV8 E6 induziert und steigert die in vitro Migration von Monozyten 68	
3.3	Der C/EBP $\alpha$ -p63-Signalweg ist in die HPV8 E6-abhängige CCL2 Induktion involviert 73	
3.3.1	C/EBP $\alpha$ ist ein negativer Regulator von CCL2.....	75
3.3.2	Die 8E6-vermittelte CCL2 Induktion ist p63-abhängig .....	77
3.4	Die CCL2 Induktion durch HPV8 E6 verläuft auf Transkriptionsebene in Abhängigkeit von p63 .....	85
3.5	CCL2 wird auch im Co- und 3D-Kultur Modell von HPV8 E6 induziert .....	88
3.6	HPV8 E6 reguliert die Aktivität von Kinasen die potenziell in die CCL2 Regulation involviert sind.....	91
3.6.1	Das Kinase-Profil HPV8 E6-exprimierender Keratinozyten .....	91
3.6.2	HPV8 E6 induziert die PKA-C $\alpha$ Aktivität und reguliert dadurch potenziell CCL2	94

3.6.3	Relevanz des MAPK- und NF- $\kappa$ B-Signalings in der Signalweg-Konvergenz in HPV8 E6-exprimierenden HaCaT Zellen .....	97
3.7	Charakterisierung des HPV8 E6-C/EBP $\alpha$ -p63-abhängigen Sekretoms und Transkriptoms.....	99
3.7.1	Analyse sezernierter Zytokine.....	99
3.7.2	Analyse der Genexpression .....	102
4	Diskussion .....	107
4.1	Mechanismen der HPV8 E6-abhängigen CCL2 Induktion .....	107
4.1.1	CCL2 Induktion in Keratinozyten durch HPV8 E6 .....	107
4.1.2	Regulation von CCL2 über den HPV8 E6-C/EBP $\alpha$ -p63-Signalweg .....	109
4.1.3	Einfluss der HPV8 E6-regulierten PKA-C $\alpha$ Aktivität auf die CCL2 Expression.....	113
4.1.4	HPV8 E6-abhängige CCL2 Induktion in primären NFK vs. HaCaT Zellen.....	116
4.2	Physiologische Relevanz der CCL2-abhängigen Rekrutierung von Makrophagen für den HPV8 Lebenszyklus und die Tumorprogression.....	117
4.3	HPV8 E6-regulierte Kinasen .....	121
4.4	HPV8 E6-regulierte Gene und Zytokine über den C/EBP $\alpha$ -p63-Signalweg.....	122
4.5	Therapieansätze der HPV8-assoziierten kutanen Karzinogenese.....	124
5	Anhang .....	126
6	Verzeichnisse .....	134
6.1	Abkürzungsverzeichnis .....	134
6.2	Abbildungsverzeichnis .....	138
6.3	Tabellenverzeichnis .....	141
6.4	Literaturverzeichnis .....	142
7	Danksagung .....	156
8	Lebenslauf und Publikationen .....	157

## Zusammenfassung

Humane Papillomviren sind mit der Entstehung verschiedener Krebsformen assoziiert. Die beiden  $\beta$ -HPV Typen HPV5 und HPV8 infizieren die Haut und es mehren sich Hinweise für eine bedeutende Co-Faktorrolle in der UV-induzierten kutanen Karzinogenese. Insbesondere Patienten, die an der seltenen Genodermatose *Epidermodysplasia verruciformis* (EV) leiden, weisen eine hohe Suszeptibilität für eine persistente Infektion mit kutanen  $\beta$ -HPV auf. Dies führt in 30-60 % der Fälle zur Entwicklung kutaner Plattenepithelkarzinome, vornehmlich an sonnenexponierten Körperstellen. Kürzlich wurde von unserer Arbeitsgruppe der Transkriptionsfaktor C/EBP $\alpha$  als neues Target des HPV8 E6 Proteins identifiziert, dessen Repression zur erhöhten Expression des Stammzellfaktors  $\Delta$ Np63 $\alpha$  führt und dadurch suprabasale Keratinozyten in einem proliferativen Zustand hält. Des Weiteren wurde in vorangegangenen Experimenten gezeigt, dass HPV8-positive EV-Läsionen zwar weniger Langerhanszellen im Epithel aufweisen, im Stroma jedoch von einem deutlichen inflammatorischen Immunzellinfiltrat begleitet werden. In diesem Infiltrat konnten u.a. Makrophagen nachgewiesen werden. Es war bisher jedoch unklar, auf welchem Mechanismus die Rekrutierung von Monozyten bzw. Makrophagen beruht. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass das HPV8 E6 Protein, aber nicht E7, die Expression des CCL2 Chemokins in humanen Keratinozyten induziert und dadurch die CCL2/CCR2-abhängige *in vitro* Migration von Monozyten stimuliert. Mittels *Knockdown*- und Reportergenversuchen in der HaCaT Zelllinie und in primären Vorhautkeratinozyten konnte der C/EBP $\alpha$ -p63-Signalweg als Regulator der HPV8 E6-abhängigen CCL2 Induktion identifiziert werden. Außerdem erwies sich in Überexpressionsanalysen die  $\Delta$ Np63 $\alpha$  Isoform, die vorherrschende Isoform in Keratinozyten, als positiver Regulator der CCL2 Expression. In einem Screening zur Aktivitätsbestimmung von Kinasen konnte des Weiteren gezeigt werden, dass HPV8 E6 zu einer Induktion von Proteinkinase A-C $\alpha$  in ihrer aktiven Form führt, die unabhängig von dem C/EBP $\alpha$ -p63-Signalweg an der 8E6-abhängigen CCL2 Induktion beteiligt sein könnte.

Durch Genexpressionsanalysen wurden weitere Gene identifiziert, die potenziell von HPV8 E6 über den C/EBP $\alpha$ -p63-Signalweg reguliert werden. Hierbei zeigte sich der C/EBP $\alpha$ -p63-Signalweg als bedeutender Aktivator eines proliferativen und inflammatorischen Genprogramms.

Für den HPV8-Lebenszyklus könnte ein solches inflammatorisches Programm von Vorteil sein, da bekannt ist, dass inflammatorische Faktoren den HPV8 Promotor aktivieren und somit die virale Replikation verstärken könnten. Als Nebeneffekt könnte die chronische Inflammation

über sekundäre Mechanismen eine maligne Progression von benignen Läsionen bei EV-Patienten begünstigen. Demnach stellt die 8E6-induzierte CCL2 Expression und insbesondere der C/EBP $\alpha$ -p63-Signalweg einen potenziellen Ansatzpunkt zur Therapie HPV8-induzierter Erkrankungen dar.

## Summary

Human Papillomaviruses are associated with the development of various forms of cancer. The two  $\beta$ -HPV types HPV5 and HPV8 infect the skin and there is increasing evidence for a significant co-factor role in UV-induced cutaneous carcinogenesis. In particular, patients suffering from the rare genodermatosis Epidermodysplasia verruciformis (EV) have a high susceptibility to persistent infection with cutaneous  $\beta$ -HPV. This leads to the development of cutaneous squamous cell carcinoma in 30-60% of cases, primarily on sun-exposed body sites. Recently, our group identified the transcription factor C/EBP $\alpha$  as a novel target of the HPV8 E6 protein, whose repression leads to increased expression of the stem cell factor  $\Delta$ Np63 $\alpha$ , thereby maintaining suprabasal keratinocytes in a proliferative state. Furthermore, previous experiments have shown that HPV8-positive EV lesions have fewer Langerhans cells in the epithelium but are accompanied by a distinct inflammatory immune cell infiltrate in the stroma. Macrophages, among others, could be detected in this infiltrate. However, it was previously unclear on which mechanism the recruitment of monocytes or macrophages is based. In the present work, HPV8 E6 protein, but not E7, was shown to induce CCL2 chemokine expression in human keratinocytes, thereby stimulating CCL2/CCR2-dependent *in vitro* migration of monocytes. Using knockdown and reporter gene experiments in the HaCaT cell line and in primary foreskin keratinocytes, the C/EBP $\alpha$ -p63 pathway was identified as a regulator of HPV8 E6-dependent CCL2 induction. In addition, overexpression analyses revealed the  $\Delta$ Np63 $\alpha$  isoform, the predominant isoform in keratinocytes, as a positive regulator of CCL2 expression. A kinase activity assay screen further demonstrated that HPV8 E6 leads to induction of protein kinase A-C $\alpha$  in its active form, which may be involved in 8E6-dependent CCL2 induction independently of C/EBP $\alpha$ -p63 signaling.

Gene expression analyses identified additional genes potentially regulated by HPV8 E6 through the C/EBP $\alpha$ -p63 pathway. Here, the C/EBP $\alpha$ -p63 pathway was shown to be a significant activator of a proliferative and inflammatory gene program. For the HPV8 life cycle, such an inflammatory program could be beneficial, as it is known that inflammatory factors could activate the HPV8 promoter and thus enhance viral replication. As a side effect, chronic



inflammation could promote malignant progression of benign lesions in EV patients via secondary mechanisms. Accordingly, 8E6-induced CCL2 expression and, in particular, the C/EBP $\alpha$ -p63 pathway represent a potential target for therapy of HPV8-induced diseases.

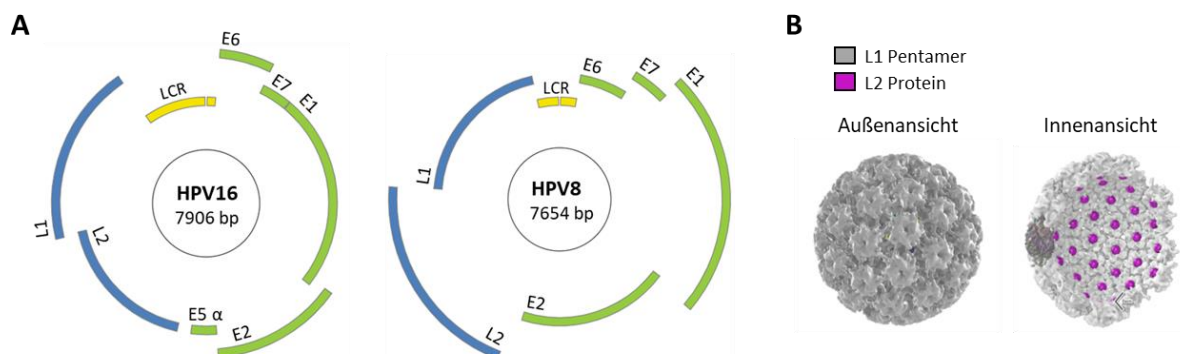
# 1 Einleitung

## 1.1 Humane Papillomviren (HPV)

### 1.1.1 Aufbau, Struktur und Phylogenie

Humane Papillomviren (HPV) gehören zur Familie der *Papillomaviridae* und infizieren Epithelzellen der Haut (Kutis) und Schleimhaut (Mukosa), wo sie hyperproliferative Läsionen bis hin zu hochgradigen Neoplasien und invasiven Karzinomen induzieren können. Bisher sind über 220 HPV-Typen beschrieben worden, die basierend auf der DNA-Sequenz des L1 Kapsidproteins in 5 Genera ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\mu$  und  $\eta$ ) gegliedert werden (Van Doorslaer et al., 2017). Basierend auf ihrem onkogenen Potenzial wird zwischen zwei Gruppen unterschieden, Niedrig-Risiko (*low risk*, LR-HPV) und Hoch-Risiko (*high risk*, HR-HPV) (Muñoz et al., 2003). Mukosale HPV werden oftmals über sexuellen Kontakt übertragen, bei kutanen HPV reicht jedoch bereits enger Körperkontakt für eine Infektion aus (Weissenborn et al., 2009). In diesem Zusammenhang haben sich HPV-Subtypen an verschiedene epitheliale Nischen wie die Zervix, Tonsillen-Krypten oder Haarfollikel adaptiert (Egawa et al., 2015). Eine Infektion verläuft in der Regel asymptomatisch und wird gewöhnlich innerhalb der ersten zwei Jahre durch das Immunsystem eliminiert. Problematisch zeigen sich vor allem persistente Infektionen mit HR-HPV, die über Jahre hinweg zervikale, anogenitale, oropharyngeale sowie Plattenepithelkarzinome induzieren können (zur Hausen, 2009).

Bei HPV handelt es sich um unbehüllte Viren mit einem zirkulären, doppelsträngige DNA-Genom mit einer Größe von ca. 8000 bp (Abbildung 1A). Ihr Genom kodiert sowohl die frühen (*early*) Gene E1, E2, E4, E5, E6, und E7 als auch die beiden späten (*late*) Gene L1 und L2. Darüber hinaus entstehen durch alternatives Splicen die Transkriptvarianten E1<sup>E4</sup> und E8<sup>E2</sup> (PaVE, 2022). Während die frühen Gene für die virale Replikation von Bedeutung sind, werden die späten Gene zur Assemblierung von Viruspartikel benötigt. Die E6 und E7 Proteine weisen bei HR-HPV das höchste onkogene Potenzial auf. Im Gegensatz zu  $\beta$ -HPV kodieren  $\alpha$ -HPV ein E5 Protein, von dem wiederum vier Varianten existieren, die  $\alpha$ -HPV zusätzliche transformierende Eigenschaften verleihen, aber für deren Lebenszyklus nicht essenziell sind (Bravo und Alonso, 2004, Venuti et al., 2011). Die virale Genexpression wird über eine lange Kontrollregion (*long control region*, LCR) reguliert, die sich in der Größe und Anzahl multipler Promotoren zwischen verschiedenen HPV-Typen und Genera unterscheidet. Diverse Bindestellen für virale und zelluläre Transkriptionsfaktoren machen die LCR unverzichtbar für die virale Replikation und damit für den viralen Lebenszyklus (Yu et al., 2022).



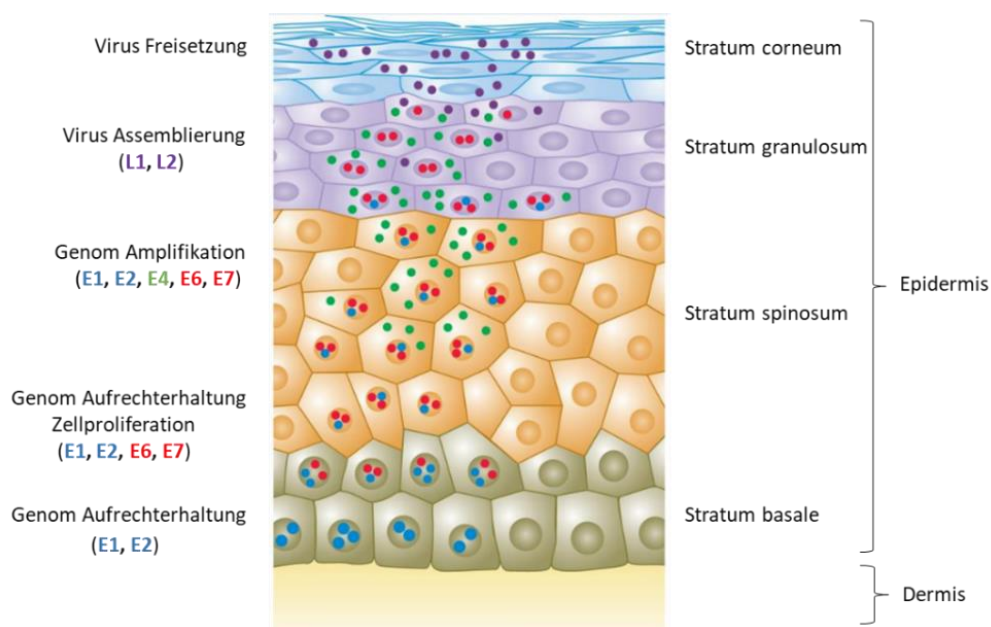
**Abbildung 1. Schematische Darstellung des HPV-Genoms und der Kapsidstruktur.** **A:** Zirkuläre Darstellung des DNA-Genoms mit frühen und späten Genen, deren Expression über eine lange Kontrollregion (*long control region*, LCR) reguliert wird. Links: mukosales  $\alpha$ -HPV16. Rechts: kutanes  $\beta$ -HPV8. **B:** 3D-Darstellung eines HPV Virions. Die Oberfläche besteht überwiegend aus L1 Pentameren, während das L2 Protein an der Innenseite des Kapsids lokalisiert ist. Beide verändert nach PaVE (The Papillomavirus Episysteme, NIH, 2022).

Das Viruskapsid besteht aus 72 Kapsomeren, die jeweils aus 5 L1 Proteinen zusammengesetzt sind und den Virionen eine ikosaedrische Struktur mit einem Durchmesser von 50-60 nm verleihen (Abbildung 1B). Dabei stabilisieren Disulfidbrücken (S-S) die L1 Pentamere an sich und untereinander (Sapp et al., 1998, Conway und Meyers, 2009). Dahingegen befinden sich die L2 Proteine an der Innenseite des Kapsids, wo sie neben der Enkapsidierung des viralen Genoms, die Assemblierung des Virions finalisieren (Wang und Roden, 2013). Das Zusammenspiel von viraler Genexpression und die Bildung viraler Partikel gewährleisten den HPV-Lebenszyklus.

### 1.1.2 HPV-Lebenszyklus

Der HPV-Lebenszyklus beginnt mit der Infektion basaler Stammzellen, deren Zugänglichkeit durch Mikroverletzungen begünstigt wird. Beim Eintritt in die Zelle erfolgt der initiale Kontakt durch die Bindung des L1 Proteins an Heparansulfat-Proteoglykane an der Zelloberfläche. Anschließend ermöglicht eine Konformationsänderung des L2 Proteins durch Abspaltung seines konservierten N-Terminus die Internalisierung über Endozytose-abhängige Prozesse (Day und Schelhaas, 2014). Einmal im Zellkern angekommen, wird das virale Genom in geringer Kopienzahl repliziert (Abbildung 2). Dies wird durch die E1 und E2 Proteine gesteuert, die beide an den viralen Replikationsursprung (*origin of replication*, Ori) in der LCR binden können. Hier vermitteln sie die episomale Replikation des viralen Genoms, indem sie die zelluläre Replikationsmaschinerie rekrutieren (Lazarczyk et al., 2009). Während der Zellteilungsprozesse der Wirtszellen wird das virale Genom schließlich an die Tochterzellen weitergegeben. In suprabasalen Zellschichten findet die Expression viraler Onkogene

statt (Abbildung 2), die an das zelluläre Differenzierungsprogramm gekoppelt ist. Hier sind die E1 und E2 Proteine sowie zelluläre Co-Faktoren, die sich zwischen HPV-Typen und epithelialen Nischen unterscheiden können, von besonderer Bedeutung für die produktive virale Genomamplifikation. Die viralen Onkoproteine, insbesondere E6 und E7, interagieren bzw. manipulieren diverse zelluläre Mechanismen und schaffen somit optimierte Bedingungen für die virale Replikation, die ebenfalls die Expression der anderen frühen Gene erfordert (Doorbar, 2005).



**Abbildung 2. HPV-Lebenszyklus in der Epidermis.** Gezeigt ist ein Querschnitt der Epidermis mit den verschiedenen Zellschichten. Nach Infektion basaler Stammzellen, wird das HPV-Genom über E1 und E2 in geringer Kopienzahl repliziert. In suprabasalen Zellen werden zusätzlich die HPV Onkoproteine exprimiert, die in diverse zelluläre Prozesse eingreifen und somit die Amplifikation des viralen Genoms fördern. In den oberen differenzierten Zellschichten werden die L1 und L2 Proteine produziert, wodurch sich intakte Viruspartikel ausbilden und den Wirt verlassen können. Verändert nach Lazarzczyk et al., 2009.

Im terminal-differenzierten Epithel werden schließlich die späten L1 und L2 Proteine synthetisiert und infektiöse Virionen gebildet, die den Wirt zusammen mit verhornten Hautschuppen verlassen (Abbildung 2) (Lazarzczyk et al., 2009).

Die im HPV-Lebenszyklus ablaufenden molekularen Mechanismen, sowie klinische Manifestationen, können sich jedoch zwischen verschiedenen HPV-Gattungen und -Typen unterscheiden.

### 1.1.3 Mukosale $\alpha$ -HPV und das Zervixkarzinom

Mukosale HPV des  $\alpha$ -Genus infizieren die Schleimhaut und sind für etwa 5 % der Krebsvorkommen beim Menschen verantwortlich. Aufgrund ihres onkogenen Potenzials wurden 15 HPV-Typen (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 und 82) von der IARC (*International Agency for Research on Cancer*) als Hoch-Risiko und 12 HPV (HPV6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 und CP6108) als Niedrig-Risiko HPV eingestuft (Muñoz et al., 2003). Während LR-HPV, vor allem HPV6 und 11 die Hauptursache für Genitalwarzen darstellen, werden HR-HPV mit der Entwicklung anogenitaler (Vagina, Vulva, Penis und Anus), oropharyngealer (Kopf-Hals Tumore) und zervikaler Karzinome assoziiert (zur Hausen, 2009).

Die HPV-Prävalenz im Zervixkarzinom liegt bei über 99 % (Walboomers et al., 1999), wobei die Menge an detektierbarer HPV-DNA mit dem Schweregrad der Krebsvorstufen bis hin zum invasiven Krebs zunimmt (Guan et al., 2012). Im Allgemeinen wird beim Zervixkarzinom zwischen drei Vorstufen, den zervikalen intraepithelialen Neoplasien (*cervical intraepithelial neoplasia*, CIN) CIN I-III unterschieden. Das Fortschreiten von präkanzerösen Läsionen bis hin zu invasivem Krebs kann Jahre bis Jahrzehnte in Anspruch nehmen. Mit ein Grund für das Fortschreiten von CINs ist die DeRegulation der Expression von Onkogenen (E6 und E7), die unter anderem durch eine Integration des viralen Genoms in das Wirtsgenom hervorgerufen werden kann (Arias-Pulido et al., 2006). Dabei werden nicht nur zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Apoptose und DNA-Reparaturmechanismen von HPV-Onkogenen beeinflusst, sondern auch die Interaktion mit dem Tumormikromilieu treibt die zervikale Karzinogenese voran. Während die Unterdrückung inflammatorischer Signalwege in Keratinozyten die virale Persistenz in frühen Phasen erlaubt, ändert sich die Rolle des Immunsystems in späten Phasen, indem chronische stromale Entzündungsprozesse die Progression zu invasivem Krebs fördern (Smola, 2019). Neben einer möglichst effektiven Prävention der HPV-Infektion durch eine prophylaktische Impfung, die derzeit in Deutschland für Mädchen und Jungen zwischen 9-14 Jahren empfohlen wird (STIKO am RKI, 2018), bieten Faktoren des Immunsystems einen vielversprechenden Ansatzpunkt für die Therapie HPV-assoziiierter Krebsformen (Smola et al., 2017). Im Gegensatz zur  $\alpha$ -HPV-assoziierten Karzinogenese, ist die Rolle von kutanen  $\beta$ -HPV bei der Entstehung von Hautkrebs weniger gut verstanden.

### 1.1.4 Kutane $\beta$ -HPV und Plattenepithelkarzinome

Kutane HPV wurden erstmals aus flachen Warzen von Patienten isoliert, die an der seltenen, genetisch vererbten Hauterkrankung *Epidermodysplasia verruciformis* (EV) leiden (Orth et al., 1978). Nachdem diverse  $\beta$ -HPV-Typen auch in der Haut oder gezupften Augenbrauen von Organtransplantationspatienten und dem Großteil der immunkompetenten Bevölkerung detektiert wurden, gelten  $\beta$ -HPV als Kommensale der humanen Hautflora. (Boxman et al., 1997, Antonsson et al., 2000). Da  $\beta$ -HPV in Haarfollikeln verschiedener Körperstellen nachgewiesen wurden (Köhler et al., 2007), werden Haarfollikel als natürliches Reservoir für kutane  $\beta$ -HPV angesehen (Howley und Pfister, 2015). Zudem wird vermutet, dass frühe  $\beta$ -HPV Proteine die Proliferation von Lrig1<sup>+</sup> Stammzellen in Haarfollikeln antreibt und deren Expansion in die überliegende Epidermis bewirkt (Lanfredini et al., 2017).

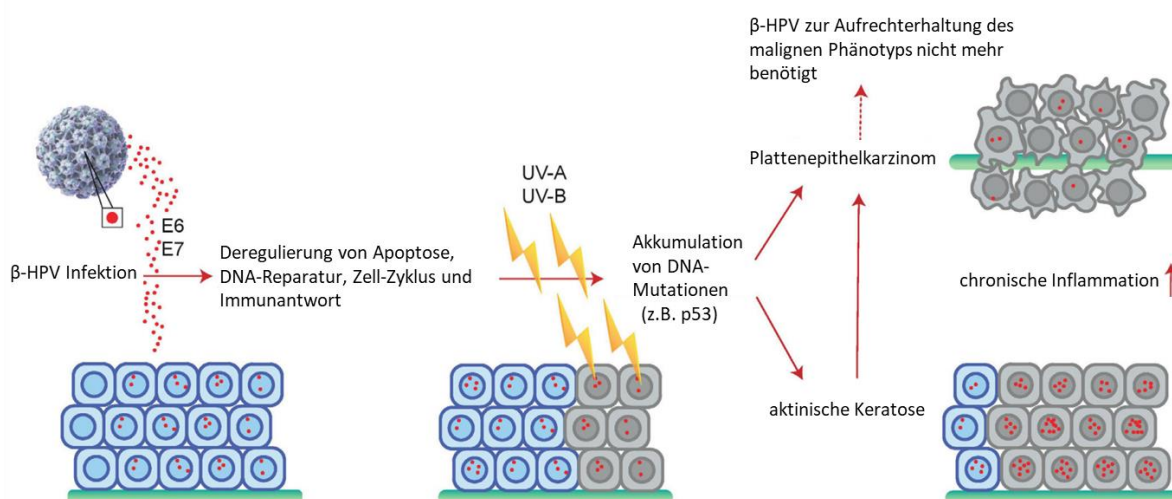
Die Infektion mit kutanen HPV erfolgt oftmals in der frühen Kindheit oder kurz nach der Geburt, wobei bereits enger Körperkontakt zwischen Mutter und Kind vermutlich für die Übertragung ausreicht (Antonsson et al., 2003, Weissenborn et al., 2009). Letzteres wird durch eine Studie bestärkt, in der das Auftreten der gleichen HPV-Typen innerhalb von Familien beschrieben wird (Hsu et al., 2009). Nach einer Infektion können kutane HPV über lange Zeitperioden in der Haut persistieren (de Koning et al., 2007).

Insbesondere zeigen EV-Patienten eine hohe Suszeptibilität für eine produktive und persistente Infektion mit kutanen HPV (s. 1.2.2) (Smola, 2020). Die Assoziation von  $\beta$ -HPV bei der malignen Transformation von EV-Läsionen in Plattenepithelkarzinome (*Squamous Cell Carcinoma*, SCC), eine Form von nicht-melanozytärem Hautkrebs (*Non Melanoma Skin Cancer*, NMSC), wurde bereits vor geraumer Zeit beschrieben (Orth, 1986). Bei etwa 30-60 % der EV-Patienten, vor allem im höheren Alter und an sonnenexponierten Stellen, entwickeln sich aus benignen Läsionen aggressive und invasive SCCs, bei denen HPV5 und HPV8 in mehr als 90 % der Fälle nachgewiesen werden können (Pfister, 2003). Auf dieser Grundlage wurden im Jahr 2009 die beiden kutanen  $\beta$ -HPV Typen HPV5 und HPV8 von der IARC als potenziell karzinogen in EV-Patienten eingestuft (Bouvard et al., 2009). Nicht nur EV-Patienten tragen ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von kutanen SCCs, sondern auch Patienten mit anderen Immundefekten oder -suppressionen (Organtransplantation und HIV-Infektion) und ältere Menschen mit schwachem Immunsystem sind betroffen. Im Gegensatz zu Immunkompetenten Personen, können kutane HPV bei diesen Patienten mit beeinträchtigter adaptiver T-Zell Immunität vermutlich lebenslang persistieren (Venuti et al., 2019).

Bezüglich ihrer Rolle, während der Karzinogenese, geht ein großer Unterschied zwischen kutanen und mukosalen HPV hervor, deren Prävalenz mit dem Schweregrad der

Tumorprogression zunimmt (s. 1.1.3). Während in präkanzerösen Läsionen, den aktinischen Keratosen, hohe  $\beta$ -HPV-Viruslasten detektierbar sind (Weissenborn et al., 2005), ist in späten Phasen von SCCs kaum noch virale DNA nachweisbar (Arron et al., 2011). Auf der Basis dieser Erkenntnisse wird spekuliert, dass  $\beta$ -HPV weniger für Aufrechterhaltung des malignen Phänotyps, sondern vielmehr für die initiale Phase der Krebsentstehung von Bedeutung ist, was auch als *hit-and-run* Mechanismus bezeichnet wird.

Dementsprechend führen Infektionen mit  $\beta$ -HPV zu einer E6- und E7-assoziierten Deregulation diverser zellulärer Mechanismen (s. 1.1.5). Letzteres begünstigt vor allem UV-induzierte Akkumulationen von DNA-Mutationen an sonnenexponierten Stellen, die für die Entwicklung von aktinischen Keratosen bzw. Plattenepithelkarzinomen ausschlaggebend sind und den malignen Phänotyp aufrechterhalten (Abbildung 3) (Bandolin et al., 2020).



**Abbildung 3. Modell der  $\beta$ -HPV/UV-induzierten kutanen Karzinogenese.** Nach Infektion der Haut mit  $\beta$ -HPV interagieren die viralen Onkoproteine mit den dargestellten zellulären Mechanismen, die im Zusammenspiel die UV-induzierte Akkumulation von DNA-Mutationen fördern. Aufgrund dieser Mutationen, die oftmals prominente Zell-Zyklus Regulatoren wie p53 betreffen, entstehen aus benignen Läsionen aktinische Keratosen oder invasive kutane Plattenepithelkarzinome, für deren Aufrechterhaltung HPV nicht mehr benötigt wird. Bei diesem Prozess sind ebenfalls HPV-assoziierte Deregulationen von Immunkomponenten und chronische Entzündungsprozesse von zentraler Bedeutung (Venuti et al., 2019). Verändert nach Bandolin et al., 2020.

Da die UV-Exposition in diesem Modell eine entscheidende Rolle einnimmt, gelten  $\beta$ -HPV als Co-Faktoren der UV-induzierten Karzinogenese bei EV-Patienten. Des Weiteren scheint sich der  $\beta$ -HPV-Lebenszyklus an das UV-induzierte inflammatorische Mikromilieu der Haut angepasst zu haben. Die durch UV-Strahlung induzierbaren HPV5 und HPV8 Promotoren unterstreichen diese Form der Adaptation (Akgül et al., 2005b).  $\beta$ -HPV können über ihre Onkoproteine und verschiedene Signalwege selbst inflammatorische Prozesse antreiben. Die

daraus resultierenden chronischen Inflammationen besitzen das Potenzial, einen malignen Phänotyp zu fördern (Venuti et al., 2019, Smola, 2020).

Somit bieten auch bei  $\beta$ -HPV, analog zu  $\alpha$ -HPV, Faktoren des Immunsystems einen potenziellen Ansatzpunkt für eine Krebstherapie (Smola et al., 2017). Gerade weil  $\beta$ -HPV noch nicht durch prophylaktische Impfungen abgedeckt sind, rücken solche therapeutische Ansatzpunkte in den Vordergrund.

### 1.1.5 Molekulare Mechanismen von $\beta$ -HPV-Onkoproteinen

Das karzinogene Potenzial der frühen  $\beta$ -HPV-Onkoproteine wurde erstmals *in vivo* in einem Mausmodell nachgewiesen. Unter Kontrolle des Keratin14-Promotors wurden die frühen HPV8 Gene (E2, E6 und E7) in der epidermalen Basalschicht transgener Mäuse exprimiert. Dabei traten bei über 90 % der transgenen Mäuse benigne Tumore auf und 6 % entwickelten Plattenepithelkarzinome (Schaper et al., 2005). Später wurde dies noch einmal separat für E2 und E6 im gleichen Versuchsaufbau bestätigt, wobei zusätzlich gezeigt wurde, dass UV-Strahlung die Entwicklung von SCCs stark beschleunigt (Pfefferle et al. 2008, Marcuzzi et al., 2009).

Neben der Replikation des viralen Genoms (s. 1.1.2) besitzt das  $\beta$ -HPV E2 Protein auch transformierende Eigenschaften (McLaughlin-Drubin und Münger, 2018). Die Bindung von E2 an C/EBP $\beta$  steigert dessen Transkriptionsaktivität und treibt so Zellen verstärkt in ein Differenzierungsprogramm (Hadaschick et al., 2003). Darüber hinaus bewirkt dieser Mechanismus eine S100A8/A9-abhängige Rekrutierung myeloischer Zellen (Podgórska et al., 2018), die eine maligne Transformation begünstigen (Venuti et al., 2019), zumal pro-tumorale Inflammationen zu den *Hallmarks of cancer* zählen (Hanahan, 2022). Interaktionsstudien identifizierten zahlreiche weitere Bindepartner von E2, jedoch ist die Funktion dieser Interaktionen weniger gut verstanden (Müller et al., 2012).

Bei mukosalen HPV stellt die Interaktion von E6 mit dem p53 Tumorsuppressor Protein, das den Zell-Zyklus-Arrest und apoptotische Signalwege einleitet, einen entscheidenden Mechanismus der Transformation dar. Durch die Bindung von E6 an p53 werden durch LR-HPV und HR-HPV Funktionen des p53 Proteins inaktiviert. E6 Proteine von HR-HPV stimulieren zusätzlich die Ubiquitinierung von p53 über einen E6-AP-abhängigen Prozess und somit dessen proteasomale Degradation, was ein unkontrolliertes Zellwachstum ermöglicht (Huibregtse et al., 1991. Doorbar et al., 2012). Im Gegensatz zu  $\alpha$ -HPV und den kutanen  $\beta$ -HPV38 und HPV42 (Rollison et al., 2019) ist p53 kein Target von  $\beta$ -HPV Proteinen, weshalb  $\beta$ -HPV andere Mechanismen entwickelt haben, um dem E6 Protein sein onkogenes Potenzial



zu verleihen. So unterdrücken  $\beta$ -HPV E6 Proteine UV-induzierte Apoptose-Prozesse über die Degradation des Bak Proteins (Underbrink et al., 2008). Da E6 außerdem die Reparatureffizienz von UV-induzierten DNA-Doppelstrangbrüchen durch die Repression von ATR, ATM und DNA-PK verringert, destabilisiert die Akkumulation von Mutationen das Wirtgenom (Dacus und Wallace, 2021). Des Weiteren greift E6 über verschiedene Faktoren in das zelluläre Differenzierungsprogramm ein. HPV8 E6 verzögert die Differenzierung von Keratinozyten, indem es den Notch-Signalweg durch die Bindung an MAML1 und den TGF- $\beta$  Signalweg durch die Komplexbildung von Smad Proteinen unterdrückt (Meyers et al., 2018). Außerdem ist C/EBP $\alpha$ , ein Masterregulator der Differenzierung, ein Target des HPV8 E6 Proteins. Der Transkriptionsfaktor C/EBP $\alpha$  reguliert unter anderem die Expression der miRNA-203, die den Stammzellfaktor  $\Delta$ Np63 $\alpha$  post-transkriptionell supprimiert und dadurch die Proliferation unterdrückt. Durch die Destabilisierung von p300 wird C/EBP $\alpha$  von HPV8 E6 reprimiert, wodurch  $\Delta$ Np63 $\alpha$  im Zellkern vermehrt vorliegt und in suprabasalen Keratinozyten die Proliferation stimuliert (Marthaler et al., 2017).

Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -HPV E7 Proteine haben Retinoblastoma (Rb) als gemeinsames Target, dessen Degradation durch E7 vermittelt und somit die Transition von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus erleichtert wird. Die Bindung von HPV8 E7 an Rb erfolgt allerdings mit geringerer Affinität (Schmitt et al., 1994). Zusätzlich kann E7 über die Hochregulation von Matrix-Metalloproteasen (MMP) einen proliferativen und invasiven Phänotyp von Keratinozyten hervorrufen (Smola-Hess et al., 2005, Akgül et al., 2005a).

Mechanismen der Immunevasion stellen eine entscheidende Komponente der viralen Persistenz im Epithel dar. Das HPV8 E7 Protein interagiert in dieser Hinsicht mit einem essenziellen Signalweg der kutanen Immunität. Durch die Bindung an C/EBP $\beta$  reprimiert E7 die Expression des CCL20 Zytokins und unterdrückt dadurch die Migration epidermaler Antigen-präsentierender Zellen, der Langerhans Zellen (Sperling et al., 2020). HPV38 E6 und E7 Proteine reprimieren die Expression des Toll-like Rezeptors 9 (TLR9) und unterdrücken dadurch eine antivirale Immunantwort (Pacini et al., 2015).

Die molekularen Mechanismen von  $\beta$ -HPV Onkoproteinen sind demnach insbesondere für die initiale Phase der Karzinogenese fundamental und steigern die Akkumulation UV-induzierter Mutationen. Letztlich fördert der Synergismus zwischen HPV-Proteinen und UV-Exposition die Entwicklung eines malignen Phänotyps, für dessen Aufrechterhaltung HPV nicht mehr benötigt wird (Bandolin et al., 2020).

## 1.2 Epidermodysplasia Verruciformis

### 1.2.1 Klinische Manifestation

Erstmals wurde *Epidermodysplasia verruciformis* (EV) im Jahr 1922 beschrieben (Lewandosky und Lutz, 1922). Es handelt sich um eine seltene Genodermatose mit einem autosomal-rezessiven Vererbungsmuster. Bisher sind weltweit etwas mehr als 500 Fälle beschrieben worden (de Jong et al., 2018b). EV manifestiert sich bereits in der frühen Kindheit als flache Warzen, seborrhoische Keratosen und Pityriasis-versicolor ähnlichen Läsionen, die überwiegend an Extremitäten, am Rumpf, am Hals und im Gesicht auftreten (Abbildung 4A-C). Aufgrund genetischer Mutationen weisen EV-Patienten eine hohe Suszeptibilität für eine Infektion mit kutanen HPV auf, die anders als bei immunkompetenten Personen, durch eine lebenslange Persistenz gekennzeichnet ist. Allerdings sind davon nur wenige HPV, insbesondere HPV5 und HPV8, mit einer malignen Transformation assoziiert (Orth, 2008).



**Abbildung 4. EV-spezifische benigne Läsionen und maligne Plattenepithelkarzinome.** EV-Patienten weisen bereits im frühen Kindesalter verschiedene benigne Hautläsionen auf, die sich über Jahre hinweg zu HPV- bzw. UV-induzierten invasiven SCCs entwickeln können. **A:** Rot-braune Pityriasis-versicolor ähnliche Läsionen am Rumpf. **B:** Seborrhoische Keratosen auf der Stirn. **C:** flache Warzen auf dem Handrücken. **D-F:** invasive SCCs an der Schläfe (D), Stirn (E) und am Oberarm (F). Aus de Jong et al., 2018a (A-C), da Cruz Silva et al., 2019 (D) und de Oliveira et al., 2015 (E+F).

Infolge der synergistischen Wirkung von HPV-assoziierten Mechanismen und UV-Strahlung können EV-Patienten aus benignen Läsionen an sonnenexponierten Stellen aktinische Keratosen entwickeln, die innerhalb von 20 Jahren zu invasiven SCCs entarten können (Abbildung 4D-F) (Majewski und Jablonska, 1997).

### 1.2.2 Molekulare Alterationen und Suszeptibilität für kutane $\beta$ -HPV

Ein EV-spezifischer Phänotyp wird durch *loss-of-function* Mutationen in *TMC6* oder *TMC8* Genen hervorgerufen, die für die EVER1 und EVER2 Proteine kodieren. In etwa 75 % der Fälle ist eines der beiden EVER-Proteine mutiert (Orth, 2006). Als Transmembranproteine in der ER-Membran können sie einen Komplex mit dem ZnT1 Zinktransporter bilden, der die intrazelluläre Zinkhomöostase reguliert (Lazarczyk et al., 2008). Kürzlich wurde bei EV-Patienten ein weiteres Gen identifiziert, dessen Mutation, unabhängig von EVER-Proteinen, einen EV-spezifischen Phänotyp bedingt. Dabei handelt es sich um das CIB1 Protein, das ebenfalls in der ER-Membran lokalisiert ist und mit EVER1 und EVER2 einen trimeren Komplex eingehen kann (de Jong et al., 2018a). Wenn bei EV-Patienten der CIB1-EVER1/2-Proteinkomplex von Mutationen betroffen ist, spricht man von klassischer EV.

Nicht-klassisches EV hingegen beruht auf Mutations-assoziierten Immundefekten, die überwiegend die Funktion von T- und NK-Zellen limitieren. Im Gegensatz zur klassischen EV, deren beeinträchtigte Immunität spezifisch für  $\beta$ -HPV ist, zeigen Patienten mit nicht-klassischem EV auch eine Empfänglichkeit für Infektionen mit anderen Pathogenen (de Jong et al., 2008b).

Als Grund für den  $\beta$ -HPV-spezifischen kutanen Immundefekt wurde eine gestörte Zink-Homöostase angenommen, die durch Bindung von EVER1/2 an ZnT1 bedingt ist und Zink als Co-Faktor von Transkriptionsfaktoren die virale Replikation fördert. Da ein solcher Zusammenhang zwischen CIB1 und ZnT1 nicht existiert, gilt das Modell mit Zink als Hauptmechanismus jedoch als veraltet. Vielmehr wird angenommen, dass der CIB1-EVER1/2 Komplex einen Restriktionsfaktor darstellt, der über einen bislang unbekannten Mechanismus eine spezifische, Keratinozyten-intrinsische Immunität gegen  $\beta$ -HPV verleiht (de Jong et al., 2018a).

Obwohl die Rolle von  $\beta$ -HPV als Initiator der kutanen Karzinogenese in EV-Patienten gut beschrieben ist, liegt jedoch noch Potenzial beim Verständnis molekularer Mechanismen von HPV-Onkoproteinen während der EV-Pathogenese. Aufgrund ihrer hohen Suszeptibilität für eine persistente und produktive Infektion mit  $\beta$ -HPV, gelten EV-Patienten heute als Modell der HPV-assoziierten Karzinogenese (Jablonska et al., 1972).

### 1.3 Die Familie der C/EBP Transkriptionsfaktoren

CCAAT/Enhancer-Bindeproteine (CEBPs) sind gewebespezifische Transkriptionsfaktoren mit regulatorischer Funktion verschiedener zellulärer Prozesse wie Zell-Zyklus, Differenzierung und Apoptose. Sie zeichnen sich durch ihre hohe Affinität zu CCAAT-Box-Sequenzen in diversen Promotoren aus. Die C/EBP-Familie umfasst insgesamt sechs Mitglieder (C/EBP $\alpha$ - $\epsilon$  und CHOP), wobei C/EBP $\alpha$  und C/EBP $\beta$  am ausführlichsten beschrieben sind. Sie unterscheiden sich vorwiegend bezüglich ihrer Gewebespezifität und Transaktivierungsaktivität voneinander. Strukturell teilen sich C/EBPs eine C-terminale Leucin-Zipper (bZIP) Domäne, gefolgt von einer basischen DNA-Bindedomäne und einer N-terminalen Transaktivierungsdomäne, die verschiedene regulatorische Elemente enthält. Über die bZIP-Domäne können nicht nur Homo- und Hetero Dimere ausgebildet werden, die daraufhin die Expression von Target Genen aktivieren, sondern sie können auch mit anderen bZIP-enthaltenden Proteinen interagieren (Ramji und Foka, 2002). Post-translationale Modifikationen in Form von Phosphorylierung bieten eine zusätzliche Regulationsebene und unterstreichen ihre komplexe Funktion in verschiedenen Zelltypen. Aufgrund ihrer antiproliferativen Eigenschaften gehören C/EBPs zu den Tumorsuppressor Proteinen, können aber je nach Kontext auch Tumor-fördernd wirken (Tolomeo und Grimaudo, 2020). C/EBP $\beta$  wurde auch als Target des kutanen HPV8 beschrieben. Während das E2 Protein in frühen Phasen die Transkriptionsaktivität von C/EBP $\beta$  steigert und damit Zellen in ein Differenzierungsprogramm treibt und inflammatorische Immunzellen rekrutiert (Hadaschick et al., 2003, Podgórska et al., 2018), unterdrückt das E7 Protein in späten Phasen die C/EBP $\beta$ -abhängige Expression von CCL20 und supprimiert die Migration von Antigen-präsentierenden Zellen (Sperling et al., 2012).

#### 1.3.1 C/EBP $\alpha$

Das C/EBP $\alpha$  Protein liegt in zwei Isoformen vor, dem p42 Vollängentranskript und einer N-terminal verkürzten, alternativ translatierten p30 Variante. C/EBP $\alpha$  ist insbesondere für terminale Differenzierungsprozesse von Pneumo-, Adipo-, Hepato- und Keratinozyten sowie myeloischen Zellen von essenzieller Bedeutung (Ramji et al., 2002). Diese Funktion wird hauptsächlich durch die Induktion des Zell-Zyklus-Arrests vermittelt, welche die Folge einer C/EBP $\alpha$ -abhängigen Inhibition von CDK2/4 und E2F ist. Außerdem wird C/EBP $\alpha$  durch p53 nach DNA-Schäden induziert und bildet somit ein wichtiges Bindeglied zwischen der Antwort auf DNA-Schäden und dem Zellzyklus-Arrest (Tolomeo und Grimaudo, 2020). Mutationen von

C/EBP $\alpha$  bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML), Brust- und Hautkrebs, unterstreichen seine Rolle als Tumorsuppressor Protein (Pabst et al., 2001, Gery et al., 2005, Shim et al., 2005).

Des Weiteren wurde beschrieben, dass in suprabasalen Keratinozyten der epidermale Stammzellfaktor  $\Delta$ Np63 von C/EBP $\alpha$  unterdrückt wird (Lopez et al., 2009). In diesem Zusammenhang wurde C/EBP $\alpha$  auch als Target des HPV8 E6 Proteins identifiziert, wodurch suprabasale Keratinozyten in einer proliferativen Phase gehalten werden und dadurch die virale Replikation fördern. Letzteres beruht auf einem C/EBP $\alpha$ -miR-203- $\Delta$ Np63 $\alpha$ -abhängigen Mechanismus (s. 1.1.5) (Marthaler et al., 2017).

#### 1.4 Die p53 Tumorsuppressor Genfamilie

Humane Krebserkrankungen werden in mehr als 50 % der Fälle durch Mutationen des p53 Proteins verursacht. Entsprechend groß ist das Interesse an dem klassischen Tumorsuppressor und seinem regulatorischen Netzwerk sehr groß. Unter zellulärem Stress, verursacht durch DNA-Schäden, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) oder Replikationsstress, wird p53 durch Phosphorylierung stabilisiert und aktiviert nach Oligomerisierung (Tetramere) seine Target Gene. Diese induzieren im Anschluss vor allem DNA-Reparaturmechanismen, Zell-Zyklus-Arrest, Seneszenz und Apoptose (Hernández Borrero und El-Deiry, 2021). In Kooperation mit Notch1 reguliert p53 auch kontextabhängig Differenzierungsprozesse und erweitert somit sein komplexes regulatorisches Spektrum (Römer, 2012).

Aufgrund hoher Sequenzhomologien der zentral gelegenen DNA-Bindedomäne und Oligomerisierungsdomäne gehören p63 und p73 zur p53-Genfamilie. Sie grenzen sich hauptsächlich durch die Struktur der N-terminalen Transaktivierungsdomäne (TAD) und des C-terminalen SAM-Motivs (steriles alpha Motiv) voneinander ab, die eine Interaktion mit verschiedenen Co-faktoren erlauben (Osterburg und Dötsch, 2022). Trotz ähnlicher Funktion und Target Genen zählen p63 und p73 nicht zu den klassischen Tumorsuppressoren wie p53, da in verschiedenen Tumoren auch p63/p73 Überexpressionen zu beobachten sind (Deyoung und Ellisen, 2007).

Durch Transkriptionsstart über alternative Promotoren entstehen jeweils TA- und verkürzte  $\Delta$ N-Formen von p63 und p73, denen im letzteren Fall die N-terminale TAD fehlt. Das alternative Splicen am C-terminalen Ende erlaubt die Synthese weiterer Isoformen der TA- und  $\Delta$ N-Proteine. Während die TA-Varianten eine p53-ähnliche Funktion aufweisen, fungieren  $\Delta$ N-Proteine eher als dominant-negative Regulatoren der TA-Proteine und p53 (Moses et al., 2019). Im Gegensatz dazu sind die spezifischen Funktionen einiger Isoformen noch nicht gut

verstanden, sie kennzeichnen sich jedoch durch eine gewebespezifische Expression und unterschiedliche Transaktivierungsaktivitäten.

#### **1.4.1 $\Delta$ Np63 $\alpha$ , ein epidermaler Stammzellfaktor**

In Basalzellen mehrschichtiger Epithelien ist  $\Delta$ Np63 $\alpha$  die vorherrschende Isoform. Zum einen reguliert  $\Delta$ Np63 $\alpha$  die epidermale Morphogenese während Entwicklungsprozessen, zum anderen blockiert es die Differenzierung und Apoptose, um den Stammzellcharakter von Basalzellen aufrechtzuerhalten. Daneben wirkt  $\Delta$ Np63 $\alpha$  als Regulator von Zytokinen und balanciert damit die Rekrutierung proinflammatorischer Immunzellen (Yang et al., 2011).

In erster Linie unterdrückt  $\Delta$ Np63 $\alpha$  p53-Target Gene durch kompetitive Bindung an Promotorregionen oder inaktiviert p53 oder andere TA-Formen durch Oligomerisierung. Auch die Interaktion mit Chromatin-modulierenden Komplexen sowie die Expressionskontrolle von miRNAs zählen zu seinen Regulationsebenen. Obwohl im  $\Delta$ Np63 $\alpha$  Protein die N-terminale TAD fehlt, können Target Gene auch über eine zweite Transaktivierungsdomäne am C-Terminus induziert werden, insbesondere in Kooperation mit Co-Faktoren (Ghioni et al., 2002). Des Weiteren ist  $\Delta$ Np63 $\alpha$  mit der Entstehung von Plattenepithelkarzinomen in verschiedenen Organen assoziiert, einschließlich der Haut, (Moses et al., 2019). Deregulationen von  $\Delta$ Np63 $\alpha$  werden auch bei HPV8 infizierten EV-Patienten beobachtet, bei denen  $\Delta$ Np63 $\alpha$  über E6 und einen C/EBP $\alpha$ -miR-203-abhängigen Mechanismus verstärkt in differenzierenden Zellen exprimiert wird. Dies resultiert in einer Expansion proliferierender Zellen, die sowohl die virale Replikation als auch die kutane Karzinogenese vorantreiben (Marthaler et al., 2017).

### **1.5 Makrophagen: Funktionen und Polarisierungen**

Makrophagen entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark und zirkulieren als Monozyten im Blutstrom. Nachdem sie das Endothel verlassen haben, migrieren sie, angetrieben durch Chemokine wie CCL2, in nahezu alle Gewebe, wo sie zu Makrophagen differenzieren (Gordon et al., 2005). Daneben werden Gewebe-residente Makrophagen bereits in frühen pränatalen Phasen gebildet und verbringen ihre gesamte Lebensspanne in spezifischen Geweben. Als Teil des angeborenen Immunsystems haben Makrophagen hauptsächlich eine Überwachungsfunktion für Pathogene, Fremdstoffe und Gewebeschäden. Aufgrund phagozytotischen und Antigen-präsentierenden Eigenschaften bilden sie eine Brücke zur adaptiven Immunantwort. Ihre lokalen Funktionen hängen jedoch vom Makrophagen-Typ ab,

in den sie sich aus Monozyten differenziert haben. Generell wird zwischen zwei Hauptpopulationen unterschieden, M1- und M2-Makrophagen (Murray und Wynn, 2011).

### **1.5.1 M1- und M2-Makrophagen**

Monozyten, die aus dem Blut ins Gewebe migrieren, differenzieren abhängig vom lokalen Stimulus zu M1- oder M2-Makrophagen. Während IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und Lipopolysaccharide (LPS) zu einer M1-Polarisierung führen, bewirken IL-4 und IL-13 die Entwicklung eines M2-Phänotyps. Hinsichtlich ihrer Funktionen unterscheiden sich die beiden Hauptpopulationen enorm (Murray und Wynn, 2011). Klassisch aktivierte M1-Makrophagen schützen den Wirt vor Pathogenen und weisen eine anti-tumorale Aktivität auf. Ihre antimikrobiellen Eigenschaften werden durch ihre phagozytotische Aktivität vermittelt, wodurch Antigene präsentiert werden und Pathogene Enzym- und Radikal-abhängig abgetötet werden. Außerdem erleichtern Degradationen der extrazellulären Matrix die aktive Rekrutierung von Immunzellen. M2-Makrophagen hingegen besitzen anti-inflammatorische Fähigkeiten und regulieren Wundheilungsprozesse. Bei Gewebeschäden entfernen sie Fremdsubstanzen, tote Zellen sowie deren Zelltrümmer und leiten in Kooperation mit den umliegenden Fibroblasten den Wiederaufbau des Gewebes ein (Barron und Wynn, 2011). M1- und M2- Makrophagen haben jedoch auch das Potenzial, ihren funktionellen Phänotyp in Abhängigkeit von lokalen Stimuli zu verändern und können sich so schnell an Veränderungen des lokalen Mikromilieus adaptieren (Stout et al., 2005).

### **1.5.2 Tumor-assoziierte Makrophagen**

Bei verschiedenen Krebsformen kommt es vor, dass durch kontextabhängige Mechanismen im Tumormikromilieu Zytokine oder anderen Faktoren freigesetzt werden, die die Chemotaxis von Monozyten auslösen können. Eines der wichtigsten Chemokine für die Rekrutierung von Monozyten in das Gewebe unterschiedlicher Krebsformen ist CCL2 (s. 1.6.3). Im Gewebe differenzieren Monozyten und teilweise auch residente Makrophagen zu sogenannten Tumor-assoziierten Makrophagen (TAMs) und stellen mit etwa 50 % den höchsten Anteil an Immunzellen im Tumormikromilieu dar (Christofides et al., 2022). Lokale Faktoren des Tumormikromilieus können die TAM-Polarisierung fördern. Zelltypen wie Immun-, Stroma- oder Tumorzellen sezernieren verschiedene Zytokine, die neben Komplementproteinen und Hypoxie auch einen TAM-spezifischen Phänotyp hervorrufen können (Mantovani et al., 2017). Im Tumorgewebe weisen TAMs heterogene Funktionen auf und können sowohl anti- als auch pro-tumorale Eigenschaften aufzeigen. Dies hängt von der Art und dem Hintergrund des

jeweiligen Tumors ab. In den meisten Fällen fördern sie jedoch das Tumorwachstum und ähneln dabei einem M2-Phänotyp. Einerseits supprimieren TAMs adaptive Immunantworten, andererseits rekrutieren sie weitere inflammatorische Immunzellen und fördern die Angiogenese, was zu krebsbedingten Inflammationen führt, die schließlich maligne transformierte Zellen das Überleben ermöglichen (Christofides et al., 2022, Mantovani et al., 2008). Dabei produzieren sie selbst CCL2 und induzieren dadurch die Migration weiterer Monozyten. Des Weiteren steigern TAMs die Proliferation, Migration und genetische Instabilität von Tumorzellen und leisten somit einen erheblichen Beitrag zur Tumorprogression (Mantovani et al., 2017). Die Rolle von zirkulierenden Monozyten in der Tumorprogression wurde insbesondere im transgenen Mausmodell hervorgehoben. Hier wurde gezeigt, dass HPV8 E6-exprimierende Mäuse, denen zirkulierende Monozyten fehlen, resistent gegen UV-induzierte kutane SCCs sind. Der gleiche Effekt wurde in *CCR2-Knockout* Mäusen beobachtet (Lelios et al., 2021). CCR2 ist der Oberflächen-Rezeptor von Monozyten für die Bindung des CCL2 Proteins und ist für deren Chemotaxis von Bedeutung. Demnach sind in HPV8 E6 transgenen Mäusen nicht nur zirkulierende Monozyten, sondern auch ihre CCL2/CCR2-getriebene Chemotaxis essenziell für die Entwicklung kutaner SCCs.

## **1.6 Der CC-Chemokin Ligand 2 (CCL2)**

### **1.6.1 Eigenschaften und Funktionen von CCL2**

CCL2, auch bekannt als MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein 1*), wurde erstmals 1989 aufgereinigt und zählt zu den ersten charakterisierten Chemokinen überhaupt (Matsushima et al., 1989). Aufgrund der zwei direkt nebeneinander liegenden, N-terminalen Cysteine wird CCL2 in die Klasse der CC-Chemokine gegliedert. Nach seiner Synthese liegt CCL2 in einer Vorläuferform vor. Die Abspaltung eines Signalpeptids resultiert in der Aktivierung von CCL2, woraufhin das reife, 13 kDa Chemokin von den exprimierenden Zellen sezerniert wird (Baggiolini, 1998). Mit hoher Affinität bindet es an CCR2, einen G-Protein gekoppelten Rezeptor, der auf der Zelloberfläche von Monozyten und anderen Leukozyten exprimiert wird. Das extrazelluläre CCL2-Signal wird von CCR2 transduziert und intrazellulär durch Signalkaskaden (MAPK und PI3K) weitergeleitet, wo es die Migration von Monozyten aktiviert.

An Verletzungs- und Infektionsstellen wird CCL2 von Epithel-, Endothel-, Muskel- und Stromazellen als Reaktion auf oxidativen Stress, proinflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren produziert. Folglich werden Immunzellen in einer Gradienten-abhängigen



Weise rekrutiert und gewährleisten eine protektive Immunantwort. Monozyten reagieren dabei am stärksten auf CCL2 und werden zugleich dazu angeregt, mehr CCL2 sowie weitere proinflammatorische Zytokine zu produzieren. Aufgrund seiner charakteristischen und starken inflammatorischen Wirkung wird CCL2 auch als diagnostischer Marker für Inflammationen eingesetzt (Singh et al., 2021).

Außerdem können funktionelle Eigenschaften von Monozyten und anderen Immunzellen durch CCL2 reguliert werden. So rekrutiert CCL2 nicht nur Monozyten in das Gewebe, sondern verstärkt auch ihre Expression von Adhäsionsmolekülen und garantiert so ihre Residenz im Gewebe. Dies ist vor allem eine Voraussetzung für die Differenzierung von Monozyten. Hierbei hat CCL2 das Potenzial, die Polarisierung von M1- und M2-Makrophagen kontextabhängig und in Kooperation mit anderen Faktoren (s. 1.5.1), zu beeinflussen (Gschwandtner et al., 2019). Letzteres umfasst ebenfalls die Polarisierung von T<sub>H</sub>2-Zellen (Gu et al., 2000). Darüber hinaus haben *in vitro* Experimente eine Priming-Funktion von CCL2 gezeigt. Dabei können Monozyten und Makrophagen nach dem ersten Stimulus durch CCL2 verstärkt auf einen zweiten Stimulus (z.B. LPS) reagieren, was zu einem Boost-Effekt hinsichtlich der Abwehr von Pathogenen führt (Singh et al., 1993). Ein weiterer bemerkenswerter Aspekt ist die Rolle von CCL2 in diversen Erkrankungen, einschließlich Krebs (Singh et al., 2021). Obwohl CCL2 bei Makrophagen das Abtöten von Tumorzellen induzieren kann, wird eine hohe CCL2 Expression bei zahlreichen Krebsformen mit einer malignen Transformation assoziiert (Gschwandtner et al., 2019).

### 1.6.2 Regulation der CCL2 Genexpression

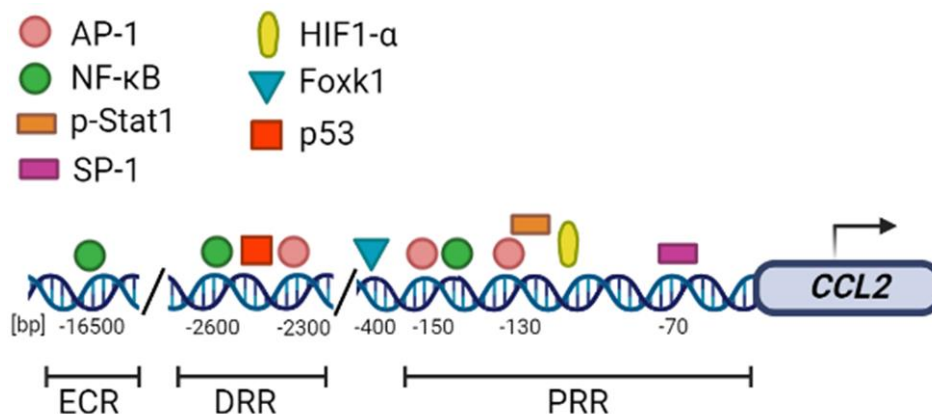
Die CCL2 Genexpression kann konstitutiv oder nach Induktion erfolgen und umfasst mehrere komplexe Regulationsebenen. Dazu gehören im Wesentlichen epigenetische, transkriptionelle und post-transkriptionelle Prozesse.

Zu den epigenetischen Regulationen zählen Histon-spezifische Acetylierungen und Methylierungen, die die Struktur des Chromatins und damit seine Zugänglichkeit für Transkriptionsfaktoren beeinflussen. H3K9Ac- und H4Ac- Histon-Acetylierungen und H3K4me<sup>3</sup>-Methylierungen ermöglichen die Ausbildung von Euchromatin und induzieren die CCL2 Genexpression. Dahingegen führen H3K9me<sup>3</sup> und H3K27me<sup>3</sup> Methylierungen zur Ausbildung von Heterochromatin wodurch CCL2 reprimiert wird (Kiguchi et al., 2014).

Bei der post-transkriptionellen CCL2 Regulation steht die mRNA-Stabilität im Vordergrund. Während mRNA-Bindeproteine (HuR und TTP) die mRNA-Stabilität beeinflussen und mit

ihrer Translationseffizienz assoziiert sind, kann CCL2 mRNA auch von miRNAs (z.B. miR-374a) degradiert werden (Ezegbunam und Foronjy, 2017, Yang et al., 2018).

Die Transkriptionsebene stellt das breiteste Regulationsspektrum der CCL2 Genregulation dar. Diverse Transkriptionsfaktor-Bindestellen im CCL2 Promotor erlauben es diesem, über diverse Signalkaskaden auf externe Stimuli zu reagieren. Generell lässt sich der CCL2 Promotor in drei Regionen gliedern, eine proximale regulatorische Region (PRR), eine distale regulatorische Region (DRR) und eine evolutionär konservierte Region (ECR) (Abbildung 5).



**Abbildung 5. Transkriptionelle Regulation des CCL2 Promotors.** Dargestellt sind die für die CCL2 Transkription notwendigen Promotorregionen (PRR, DRR und ECR). In Abhängigkeit des Stimulus und der angeschalteten Signalwege kann über verschiedene Transkriptionsfaktoren und Bindestellen die CCL2 Genexpression induziert werden. Die Position der Bindestellen ist grob angegeben und bezieht sich auf das CCL2 Transkriptions-Startcodon (ATG). Referenzen für die jeweiligen Bindestellen sind dem Fließtext zu entnehmen. PRR=proximal regulatorische Region, DRR=distale regulatorische Region, ECR=evolutionär konservierte Region, bp=Basenpaare. Erstellt mit BioRender.com.

Die basale CCL2 Genexpression erfolgt über die Bindung von Sp1 an die GC-Box in der PRR (Ueda et al., 1994). Daneben bietet eine Bindestelle für HIF-1 $\alpha$  die Möglichkeit auf Hypoxie-Stress zu reagieren. Eine Antwort auf externe IFN- $\gamma$  Stimuli wird durch die Aktivierung und Bindung von p-Stat1 an das IRIS/GAS-Motiv vermittelt (Valente et al., 1998). Insulin-induzierte Signale verlaufen über den mTOR1-Signalweg, wobei FOXK1 die CCL2 Transkription anschalten kann (Nakatsumi et al., 2017). Sowohl die PRR als auch die DRR enthalten Bindestellen für AP-1 und NF- $\kappa$ B, die eine starke Wirkung auf den CCL2 Promotor aufweisen. Dabei wird insbesondere die DRR als Enhancer-Region beschrieben, die eine CCL2 Induktion nach TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , LPS und PMA-Stimulation verstärken kann (Lim und Garzino-Demo, 2000, Ueda et al., 1994). Eine weitere Bindestelle in der DRR ist ein p53-Motiv, das zwischen den NF- $\kappa$ B und AP-1 Bindestellen liegt und ebenfalls bei der TNF- $\alpha$ -assoziierten CCL2 Induktion eine Rolle spielt (Hacke et al., 2010). Für die maximale Stimulation der CCL2 Expression durch TNF- $\alpha$  wurde eine weitere NF- $\kappa$ B Bindestelle identifiziert. Diese befindet sich in der ECR und ist bei Säugetieren hoch konserviert (Bonello et al., 2011). Anormale

Aktivitäten von induzierenden Transkriptionsfaktoren, die eine konstitutiv verstärkte CCL2 Expression bedingen, können einen zentralen Faktor diverser Erkrankungen darstellen oder eine entscheidende Rolle in der Tumorprogression spielen.

### **1.6.3 Deregulationen der CCL2 Expression im Tumorwachstum**

Tumorzellen können je nach genetischem Hintergrund eine Deregulation der CCL2 Expression aufweisen. Dabei können entweder Tumorzellen selbst oder indirekt über Interaktion mit umliegenden Stromazellen die CCL2 Expression erhöhen (Yoshimura, 2018). Bei Krebsformen wie Brustkrebs, Prostata-, Oropharynx-, Ovarial- oder Zervixkarzinomen wird eine hohe CCL2 Expression, insbesondere die dadurch rekrutierten Monozyten, mit einer malignen Transformation assoziiert (Singh et al., 2021, Rogic et al., 2021). Die hierbei ablaufenden Prozesse werden vor allem über die CCL2/CCR2-Achse vermittelt. CCL2 begünstigt die Polarisierung von TAMs und steigert erheblich deren Aktivität, wodurch diese wiederum die Tumorprogression über verschiedene Mechanismen fördern können (s. 1.5.2). Die Tumorfördernden Eigenschaften von CCL2 gehen ebenfalls aus dem HR-HPV-induzierten Zervixkarzinom hervor. In frühen Phasen wird die CCL2 Expression von HPV16 E6 und E7 Onkoproteinen in Epithelzellen unterdrückt, wodurch HPV der Immunüberwachung entgeht (Kleine-Lowinski et al., 2003). Dahingegen wird in späten Phasen CCL2 von HPV über das Tumormikromilieu hochreguliert, wobei die dadurch induzierten Inflammationen die zervikale Karzinogenese fördern (Schröer et al., 2011).

Deregulationen von CCL2 sind häufig auf anormale Aktivitäten von Transkriptionsfaktoren zurückzuführen. Veränderte Aktivitäten von Transkriptionsfaktoren können unterschiedliche Ursachen haben. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass Transkriptionsfaktoren auf mRNA-Ebene reguliert werden, zum anderen können Interaktionen mit anderen Proteinen ihre Aktivität beeinflussen. Auch Genmutationen können hier eine Rolle spielen. Eine weitere wichtige Form der Regulation stellen Proteinkinasen dar, die Transkriptionsfaktoren durch Phosphorylierung aktivieren können. Demnach können Signalkaskaden, in denen Kinasen involviert sind, die Aktivität von CCL2-spezifischen Transkriptionsfaktoren regulieren.

## 1.7 Proteinkinasen

Proteinkinasen sind ein Hauptbestandteil intrazellulärer Signalübertragungen und nehmen einen außerordentlichen Anteil an physiologischen Prozessen ein. Die Aktivität vieler Enzyme und anderer Faktoren hängt von ihrem Phosphorylierungsstatus ab. Indem sie ihre Substrate post-translational an Hydroxygruppen (OH) phosphorylieren, regulieren Proteinkinasen deren Aktivität und greifen dadurch in diverse zelluläre Prozesse ein. Dabei können Phosphorylierungen sowohl aktivierende als auch inhibierende Effekte auf die Substrataktivität haben (Ardito et al., 2017). Basierend auf Sequenzhomologien der katalytischen Domänen werden Kinasen in insgesamt sieben Gruppen eingeteilt (Manning et al., 2002). Anhand ihrer katalytischen Spezifität kann jedoch grob zwischen zwei Klassen unterschieden werden, Protein-Tyrosin-Kinasen (PTK) und Serin/Threonin-Kinasen (STK). Kinasen werden durch regulatorische Stimuli aktiviert. PTKs sind oftmals membrangebunden und Rezeptor-assoziiert, wodurch sie extrazelluläre Signale wahrnehmen können. Nach Bindung spezifischer Liganden werden PTKs aktiviert und leiten Signale intrazellulär über Auto- und Substratphosphorylierungen weiter (Blume-Jensen und Hunter, 2001). Demgegenüber können STKs und deren nachgeschalteten Signalwege durch sogenannte *second Messenger* (cAMP/gAMP, DAG, IP<sub>3</sub> und Ca<sup>2+</sup>) induziert werden (Newton et al., 2016). An den intrazellulären Signalkaskaden können mehrere Kinasen beteiligt sein, die ihrerseits durch Phosphorylierung aktiviert werden und jeweils mehrere Substrate regulieren können. Am Ende dieser Signalkaskaden stehen oft regulatorische Proteine wie Transkriptionsfaktoren, die die spezifische Genexpression regulieren. Aufgrund des breiten regulatorischen Spektrums von Kinasen führen Deregulationen unter anderem zu Krebswachstum, wobei vor allem Proliferations- und Inflamationsprozesse betroffen sind (Roskoski, 2015, Blume-Jensen und Hunter, 2001).

### 1.7.1 MAP-Kinasen und Proteinkinase A

MAP-Kinasen (*Mitogen activated Protein Kinases*, MAPK) gehören zu den Serin/Threonin-Kinasen und werden in drei Gruppen eingeteilt, ERK- (*Extracellular signal-Regulated Kinases*), JNK- (*c-Jun N-terminal Kinases*) und p38-Kinasen. Bei externen Stimuli werden sie von MAPK-Kinasen (MAPKK) aktiviert, welche wiederum von MAPKK-Kinasen (MAPKKK) reguliert werden. Zu den Substraten von MAPK gehören zahlreiche Transkriptionsfaktoren, die abhängig vom Stimulus diverse zelluläre Prozesse induzieren können. ERK-Kinasen werden überwiegend durch Wachstumsfaktoren aktiviert und sind mit

Zellwachstum und Differenzierungsprozessen assoziiert. Im Gegensatz dazu werden JNK- und p38-Kinasen eher durch zellulären Stress und proinflammatorische Zytokine stimuliert und lösen apoptotische und inflammatorische Mechanismen aus, wobei p38 auch an der Regulation des Zell-Zyklus beteiligt ist (Raman et al., 2007). Bei einer Stimulation mit TNF- $\alpha$ , dem Master-Zytokin für inflammatorische Prozesse, werden jedoch neben Caspasen und NF- $\kappa$ B alle drei MAPK-Gruppen aktiviert. Dies resultiert unter anderem in einer starken Produktion inflammatorischer Zytokine wie CCL2. Für die transkriptionelle Induktion inflammatorischer Gene als Reaktion auf TNF- $\alpha$  sind vornehmlich die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1 von Bedeutung (s. 1.6.2) (Sabio und Davis, 2014).

Die Proteinkinase A (PKA) gehört ebenfalls zu den STK und ist eine cAMP-abhängige Kinase. Zwei regulatorische (R) Untereinheiten und zwei katalytische (C) Untereinheiten bilden jeweils das Holoenzym aus. Bei ansteigender intrazellulärer cAMP-Konzentration bindet und löst cAMP die R-Untereinheiten und aktiviert dadurch die C-Untereinheiten. Multiple Isoenzyme, die auf der Heterogenität der R- und C-Untereinheiten beruhen, erlauben Gewebe- und Zell-spezifische Funktionen (Skalhegg und Tasken, 2000). Diese werden unter anderem durch Transkriptionsfaktoren der CREB/ATF-Familie vermittelt und umfassen Prozesse wie Metabolismus, Zell-Zyklus, Proliferation und Differenzierung. Außerdem ist PKA in die Regulation von proinflammatorischen Zytokinen und Immunantworten involviert. Dabei können Zytokin-spezifische Transkriptionsfaktoren wie AP-1, NF- $\kappa$ B und CREB von PKA moduliert werden (Torgersen et al., 2002).

## 1.8 Ziele der Arbeit

Kutane  $\beta$ -HPV sind mit der Entstehung kutaner Plattenepithelkarzinome (cSCC) assoziiert. Insbesondere EV-Patienten, weisen eine hohe Suszeptibilität für eine Infektion mit kutanen HPV auf und tragen daher ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung aggressiver cSCCs, vornehmlich an sonnenexponierten Körperstellen. Obwohl die Rolle von  $\beta$ -HPV in frühen Phasen der Karzinogenese gut beschrieben ist, sind die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen von HPV Onkoproteinen weniger gut verstanden. Interaktionen mit dem Wirts-Immunsystem zählen zu den Faktoren, die die virale Persistenz bzw. Replikation und die Tumorprogression fördern können. In diesem Zusammenhang kann HPV8 die Migration von Langerhanszellen unterdrücken und die von anderen myeloischen Zellen über C/EBP $\beta$ -abhängige Mechanismen induzieren (Podgórska et al., 2018, Sperling et al., 2012).

Die Rekrutierung zirkulierender Monozyten ist für die Entstehung von HPV-assoziierten UV-induzierten cSCCs von essenzieller Bedeutung (Lelios et al., 2021). Vorangegangene Versuche deuteten auf eine CCL2-gesteuerte Makrophagen-Infiltration von EV-Läsionen hin (Sperling, 2009, nicht publiziert).

Der Zusammenhang zwischen der CCL2 Expression, Makrophagen-Infiltration und HPV8 soll in der vorliegenden Arbeit näher analysiert werden. Insbesondere sollen dabei die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen eingehender untersucht werden. Bezüglich einer HPV8-abhängigen CCL2 Regulation deuteten erste Experimente in Zelllinien auf eine Beteiligung des C/EBP $\alpha$ -p63-Signalwegs hin (Vella, 2019, nicht publiziert). Dieser wurde zuvor als Target von HPV8 E6 beschrieben, um die Differenzierung in suprabasalen Keratinozyten zu unterdrücken und Zellen in einem proliferativen Zustand zu halten (Marthaler et al., 2017). In dieser Arbeit sollen daher, basierend auf dieser Grundlage und unter Verwendung verschiedener Zellkulturmodelle und Patientenmaterial, HPV8-abhängige CCL2 Regulationen breiter aufgestellt und näher charakterisiert werden. Des Weiteren soll diesbezüglich, neben dem C/EBP $\alpha$ -p63-Signalweg insbesondere die Rolle und Involvierung von Proteinkinasen fokussiert werden.

Zusätzlich sollen in einem Screening-Verfahren weitere Gene bzw. miRNAs und Zytokine identifiziert werden, die von HPV8 über den C/EBP $\alpha$ -p63-Signalweg reguliert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Organismen

##### 2.1.1.1 Eukaryotische Zelllinien

##### **HaCaT** (*Human adult low Calcium high Temperature*)

HaCaT Zellen sind spontan transformierte Keratinozyten, bei denen das p53 Tumorsuppressor Gen in beiden Allelen eine Punktmutation trägt. Als immortalisierte Zelllinie sind sie besonders zur Analyse epithelialer bzw. Keratinozyten-intrinsischer Mechanismen geeignet. Ursprünglich wurden sie aus der Rückenhaut eines 62-jährigen männlichen Patienten isoliert (Boukamp et al., 1988). HaCaT Zellen lagen als Kryokultur in der AG Smola vor.

##### **HaCaT pLXSN/HPV8 E6**

Das pLXSN Vektor-System wird zum retroviralen Gentransfer verwendet. Die Verpackungszelllinie PT67 wird mit pLXSN Konstrukten transfiziert und verpackt den Vektor anschließend in infektiöse, nicht-replikationsfähige Viruspartikel, die in den Überstand abgegeben werden. Mit den infektiösen Viruspartikeln können dann Zielzellen retroviral infiziert werden. Zur stabilen Expression von HPV8 E6 wurde das HPV8 E6 Gen in die MSC des pLXSN Vektors kloniert. HaCaT Zellen wurden mit dem pLXSN-HPV8 E6 (8E6) Konstrukt bzw. mit dem pLXSN Leervektor retroviral infiziert. Zur Selektion Plasmid-tragender Zellen wurde G-418 verwendet. Die beiden Zelllinien lagen bereits als Kryokultur in der AG Smola vor.

##### 2.1.1.2 Eukaryotische primäre Zellen

##### **NFK** (*Normal Foreskin Keratinocytes*)

Primäre humane Keratinozyten wurden aus der Vorhaut anonymisierter Patienten isoliert. Das Patientenmaterial stammt aus einer Kooperation mit Prof. Dr. Michael Stöckle aus der Urologie und Kinderurologie am Universitätsklinikum des Saarlandes. Im Vergleich zu Zelllinien, kennzeichnen sich NFKs durch ihr spezifischeres *in vivo* Verhalten.

## **NFK pLXSN/HPV8 E6**

NFKs wurden mit dem pLXSN Vektor-System retroviral infiziert (s. 2.1.1.1). Sie enthalten den pLXSN Leervektor bzw. exprimieren stabil das HPV8 E6 Gen. Zur Selektion Plasmid-tragender Zellen wurde G-418 verwendet. Die Zellen lagen in der AG Smola als Kryokulturen vor.

## **VHF (Vorhautfibroblasten)**

Primäre humane Vorhautfibroblasten wurden aus Vorhautgewebe anonymisierter Patienten isoliert. Das Patientenmaterial stammt aus einer Kooperation mit Prof. Dr. Kerstin Junker aus der Urologie am Universitätsklinikum des Saarlandes.

### **2.1.1.3 Prokaryotische Zellen**

#### ***E. Coli* (*Escherichia Coli*)**

Chemisch kompetente *E. Coli* Bakterien wurden zur Amplifikation mit den entsprechenden Plasmiden transformiert. Es wurden Luciferase-, GFP- und Expressions-Plasmide amplifiziert. (One Shot™ Mach1™ *E. Coli*, ThermoFisher Scientific, Waltham, USA).

## **2.1.2 EV-Läsionen**

Die verwendeten EV-Läsionen wurden von Magdalena Malejczyk und Sławomir Majewski vom Institut für Dermatologie und Venerologie der Medizinischen Universität Warschau bereitgestellt und von der Diagnostik am Institut für Virologie am Universitätsklinikum des Saarlandes für HPV typisiert.

## **2.1.3 Zellkulturmedien und Zusätze**

In dieser Arbeit wurden folgende Zellkulturmedien und Zusätze verwendet:

Adenin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ampicillin	Ratiopharm, Ulm
Choleratoxin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kalziumchlorid-Lösung (CaCl <sub>2</sub> )	PromoCell, Heidelberg
DMEM	PAN-Biotech, Aidenbach
DMEM (10x)	PAN-Biotech, Aidenbach



DMEM/F12	PAN-Biotech, Aidenbach
DPBS	PAN-Biotech, Aidenbach
Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fetales Kälberserum (FKS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
G-418	PAN-Biotech, Aidenbach
Hydrocortison	Sigma-Aldrich, Steinheim
Insulin	Sigma-Aldrich, Steinheim
KGM2	PromoCell, Heidelberg
LB-Agar	ThermoFisher, Waltham, USA
LB-Medium	ThermoFisher, Waltham, USA
Natriumpyruvat-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim
Opti-MEM	Gibco, Karlsruhe
Pancoll human	PAN-Biotech, Aidenbach
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim
SOC-Medium	ThermoFisher, Waltham, USA
Transferrin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Triiodothyronin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin	Gibco, Karlsruhe

#### DMEM-Vollmedium

*Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) für HaCaT Zellen und VHF wurde wie folgt modifiziert:

FKS	10 %
Natriumpyruvat	1 mM
Penicillin/Streptomycin	10 U/ml / 100 µg/ml

DMEM für retroviral infizierte HaCaT Zellen wurde zusätzlich mit 200 µg/ml G-418 versetzt.

#### FAD-Vollmedium

FAD-Medium wurde zur Kultivierung organotypischer Kulturen verwendet. Es besteht aus einer Mischung von DMEM und DMEM-F12 im Verhältnis 1:1. FAD-Medium wurde wie folgt supplementiert:

FKS	10 %
Natriumpyruvat	1 mM
Penicillin/Streptomycin	10 U/ml / 100 µg/ml

Choleratoxin	10 ng/ml
Hydrocortison	400 ng/ml
Epidermaler Wachstumsfaktor	10 ng/ml
Transferrin	20 µg/ml
Adenin	123,5 µg/ml
Insulin	20 µg/ml
Triiodothyronin	3,6 ng/ml

#### KGM2-Vollmedium

Das *Keratinocyte Growth Medium 2* (KGM2) für die Kultivierung primärer Keratinozyten wurde nach Herstellerangaben mit dem dazugehörigen Supplementier-Mix versetzt. Die CaCl<sub>2</sub> Konzentration wurde entgegen den Herstellerangaben von 60 µM auf 100 µM erhöht. Für die Kultivierung von retroviral infizierten NFKs wurde das Medium mit 100 µg/ml G-418 supplementiert.

#### LB-Medium

LB-Medium wurde zur Kultivierung von *E. Coli* verwendet. Das Medium wurde nach Herstellerangaben angesetzt und anschließend autoklaviert. Zur Selektion Plasmid-tragender *E. Coli* wurde das LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt.

#### **2.1.4 Vektoren**

Abhängig vom Versuchsaufbau wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Vektoren verwendet (Abbildung 6). Für die stabile Expression von HPV8 E6 in HaCaT und NFK wurde das retrovirale pLXSN Vektor-System verwendet. Reportergen Versuche wurden mit pGL4.16 durchgeführt. Für Überexpressionen wurde der pcDNA3.1+Hygro Vektor verwendet. Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurde der pEGFP-C1 Vektor eingesetzt.



Promotoraktivität verschiedener CCL2 Promotor Konstrukte verwendet, die von Bonello et al. (2011) zur Verfügung gestellt wurden.

### **pcDNA3.1+Hygro**

Mit dem pCDNA3.1+Hygro Vektor (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) können beliebige Gene in Säugetier Zellen überexprimiert werden. Plasmid-tragende Bakterienkulturen bzw. Säugetier Zellen können aufgrund eines Ampicillin bzw. Hygromycin Resistenzgens selektiert werden. Die MCS steht unter Kontrolle des CMV-Promotors. Der Vektor wurde zur transienten Überexpression von  $\Delta$ Np63 $\alpha$  in HaCaT Zellen verwendet. Das  $\Delta$ Np63 $\alpha$  Protein enthält einen C-terminalen FLAG-Tag und trägt eine S59G Mutation, die jedoch nach Angaben des Herstellers keinen Einfluss auf die Funktion des Proteins hat (Chatterjee et al., 2008). Das  $\Delta$ Np63 $\alpha$  Konstrukt wurde bei Addgene (Watertown, USA) erworben.

### **pEGFP-C1**

Der pEGFP-C1 Vektor (Clontech, Mountain View, USA) ist ein Überexpressionsvektor für Säugetier Zellen. Die MCS steht unter Kontrolle des CMV-Promotors. Vor der MCS wird das EGFP-Gen kodiert. Überexprimierte Gene enthalten dadurch einen N-terminalen EGFP-Tag, wobei ohne Insert nur EGFP exprimiert wird. Der pEGFP-C1 Vektor wurde zur Bestimmung der Transfektionseffizienz von HaCaT Zellen mittels FACS verwendet.

## **2.1.5 Oligonukleotide**

### **2.1.5.1 siRNA**

Die eingesetzten siRNAs wurden bei Dharmacon (Lafayette, USA) erworben.

#### **Non-targeting siRNA Kontrolle:**

5'-UGGUUUACAUGUUGUGUGA-3'

#### **p63 siRNA:**

ON-TARGETplus SMARTpool siRNA TP73L (p63):

5'-GAUGAACUGUUAUACUUAC-3'

5'-CGACAGUCUUGUACAAUUU-3'

5'-GCACACAGACAAAUGAAUU-3'

5'-UCUAUCAGAUUGAGCAUUA-3'

Die unterstrichenen siRNA sind die eingesetzten p63 siRNA single #3 und #4.

#### **C/EBP $\alpha$ siRNA:**

ON-TARGET plus human CEBP $\alpha$  siRNA SMART pool:

5'-ACAAUGACCGCCUGCGCAA-3'

5'-CACGAGACGUCCAUCGACA-3'

5'-GAACAGCUGAGCCGCGAAC-3'

5'-GAACAGCAACGAGUACCGG-3'

#### 2.1.5.2 cDNA-Synthese

Zur cDNA-Synthese wurden Random Hexamer Primer von Sigma-Aldrich (Steinheim) eingesetzt.

#### 2.1.5.3 qRT-PCR

Das Primerdesign für die in dieser Arbeit durchgeführten qRT-PCRs erfolgte mit dem *Universal ProbeLibrary* (UPL) Programm der Firma Roche (Mannheim, Deutschland). Die Primer liegen an Exon-Exon Übergängen, so dass eine Amplifikation genomischer DNA ausgeschlossen werden kann. Die spezifischen Sonden wurden von Roche und die Primer von Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen (Tabelle 1).

**Tabelle 1. Verwendete Primer für die qRT-PCR.** Aufgelistet sind die Sequenzen der verwendeten Primer mit dazugehörigen UPL-Sonden und eingesetzter MgCl<sub>2</sub> Konzentrationen.

Gen	Primer (sense und antisense)	UPL Sondennummer	MgCl <sub>2</sub> Konzentration
CCL2	5'-AGTCTCTGCCGCCCTTCT-3' 5'-GTGACTGGGGCATTGATTG-3'	40	4 mM
C/EBP $\alpha$	5'-GTGGACAAGAACAGCAACGA-3' 5'-CACTGGTCAGCTCCAGCAC-3'	84	4 mM
HPV8 E6	5'-CCGCAACGTTTGAATTTAATG-3' 5'-ATTGAACGTCCTGTAGCTAATTCA-3'	13	5 mM
HPV8 E7	5'-AGGAATTACCAAACGAACAGGA-3' 5'-CACGGTGCAACAATTTTGAATA-3'	63	3 mM
RPL13a	5'-AGCGGATGAACACCAACC-3' 5'-TTTGTGGGGCAGCATACTC-3'	28	4 mM
$\Delta$ Np63 $\alpha$	5'-GGAAAACAATGCCCAGACTC-3' 5'-CTGCTGGTCCATGCTGTTC-3'	45	4 mM

#### 2.1.5.4 Mykoplasmen PCR

Zur Kontrolle potenzieller Mykoplasmen Kontaminationen wurde folgenden Mykoplasmen spezifische Primer in der PCR eingesetzt:

**Sense:**

5'-CGCCTGAGTAGTACGTTCGC-3'  
 5'-CGCCTGAGTAGTACGTACGC-3'  
 5'-TGCCTGGGTAGTACATTCGC-3'  
 5'-TGCCTGAGTAGTACATTCGC-3'  
 5'-CGCCTGAGTAGTATGCTCGC-3'  
 5'-CACCTGAGTAGTATGCTCGC-3'  
 5'-CGCCTGGGTAGTACATTCGC-3'

**Antisense:**

5'-GCGGTGTGTACAAGACCCGA-3'  
 5'-GCGGTGTGTACAAAACCCGA-3'  
 5'-GCGGTGTGTACAAACCCC GA-3'

#### 2.1.6 Antikörper

Verwendete Antikörper sind in Tabelle 2 aufgelistet.

**Tabelle 2. Verwendete Antikörper.** Die jeweiligen Antikörper sind zusammen mit ihrer spezifischen Anwendung, Konzentration und Herkunft angegeben. Wenn nicht anders angegeben bezieht sich die Angabe auf humane Antigene. IHC=Immunhistochemie, WB=Western Blot, IF=Immunfluoreszenz, MACS=Magnetische Zell-Sortierung POX=Peroxidase, AP=Alkalische- Phosphatase.

Antigen (Klon)	Spezies	Verwendung	Verdünnung	Firma
anti-Kaninchen-Alexa Fluor 555	Ziege	IF	s. Hersteller	Sigma-Aldrich, Steinheim
anti-Kaninchen-AP	Pferd	IHC	s. Hersteller	Vector Labs, Eching
anti-Kaninchen-POX (polyklonal)	Ziege	WB	1:2000	Sigma-Aldrich, Steinheim
anti-Maus-POX (polyklonal)	Kaninchen	WB	1:2000	Sigma-Aldrich, Steinheim
β-Aktin (AC-15)	Maus	WB	1:10000	Sigma-Aldrich, Steinheim
CD68 (EPR20545)	Kaninchen	IHC	1:200	Abcam, Cambridge, England
CCL2 (polyklonal)	Kaninchen	IHC, IF	1:200	Abcam, Cambridge, England

CD14 Mikro Beads	Maus	MACS	s. Hersteller	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD14-FITC (M5E2)	Maus	FACS	1:10	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
C/EBP $\alpha$ (56F10)	Kaninchen	WB	1:1000	Cell Signaling, Cambridge, England
CREB (polyklonal)	Kaninchen	WB	1:1000	Merck, Darmstadt
ERK (137F5)	Kaninchen	WB	1:1000	Cell Signaling, Cambridge, England
GAPDH (6C5)	Maus	WB	1:10000	Abcam, Cambridge, England
IKK $\alpha$ (D3W6N)	Kaninchen	WB	1:1000	Cell Signaling, Cambridge, England
IKK $\beta$ (D30C6)	Kaninchen	WB	1:1000	Cell Signaling, Cambridge, England
Isotyp IgG-FITC (MPOC-21)	Maus	FACS	1:10	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
p63 (D9L7L)	Kaninchen	WB, IF	1:1000, 1:200	Cell Signaling, Cambridge, England
PKA-C $\alpha$ (D38C6)	Kaninchen	WB	1:1000	Cell Signaling, Cambridge, England
p-CREB (87G3)	Kaninchen	WB	1:1000	Cell Signaling, Cambridge, England
p-ERK (polyklonal)	Kaninchen	WB	1:1000	Cell Signaling, Cambridge, England
p-PKA-C $\alpha$ (D45D3)	Kaninchen	WB	1:1000	Cell Signaling, Cambridge, England
ROS1 (D4D6)	Kaninchen	WB	1:1000	Cell Signaling, Cambridge, England
SGK2 (D7G1)	Kaninchen	WB	1:1000	Cell Signaling, Cambridge, England

### 2.1.7 Enzyme und Puffer

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme und ihre Reaktionspuffer sind in Tabelle 3 dargestellt.

**Tabelle 3. Verwendete Enzyme und Puffer.** Es sind Enzyme, ihre Reaktionspuffer und ihre Herkunft angegeben.

Enzym/Puffer	Verwendung	Herkunft
Maxima Reverse Transkriptase (RT)	cDNA-Synthese	ThermoFisher, Waltham, USA
RT-Puffer (5x)	cDNA-Synthese	ThermoFisher, Waltham, USA
Taq-DNA-Polymerase	Mykoplasmen PCR	Sigma-Aldrich, Steinheim
Taq-DNA-Polymerase Puffer (10x)	Mykoplasmen PCR	Sigma-Aldrich, Steinheim

### 2.1.8 Inhibitoren

Die verwendeten Inhibitoren sind in Tabelle 4 aufgelistet.

**Tabelle 4. Verwendete Inhibitoren.** Es sind verwendete Inhibitoren, deren zelluläre Targets, ihr Verwendungszweck und ihre Herkunft dargestellt.

Inhibitor	Target	Verwendung	Herkunft
cOmplete™	Proteasehemmer-Mix	RIPA-Extrakte	Sigma-Aldrich, Steinheim
GDC-0994	ERK1/2	Zellkultur	Selleckchem, Houston, USA
Halt™ Phosphatase-Inhibitor-Cocktail	Phosphatasehemmer-Mix	Pamgene-Extrakte	ThermoFisher, Waltham, USA
Halt™ Protease-Inhibitor-Cocktail	Proteasehemmer-Mix	Pamgene-Extrakte	ThermoFisher, Waltham, USA
H-89-2HCl	PKA	Zellkultur	Selleckchem, Houston, USA
PhosSTOP™	Phosphatasehemmer-Mix	RIPA-Extrakte	Sigma-Aldrich, Steinheim
PS-1145	IKK	Zellkultur	Selleckchem, Houston, USA
RiboLock	RNase	cDNA-Synthese	ThermoFisher, Waltham, USA
RS-102895	CCR2 (Antagonist)	Migrations-Assay	Bio-Techne, Minneapolis, USA
SB-203580	p38	Zellkultur	Selleckchem, Houston, USA
SC-75741	NF-κB	Zellkultur	Selleckchem, Houston, USA
SP-600125	JNK	Zellkultur	Selleckchem, Houston, USA
Ulixertinib	ERK1/2	Zellkultur	Selleckchem, Houston, USA
8-Bromo-cAMP	PKA (Aktivator)	Zellkultur	Selleckchem, Houston, USA

### 2.1.9 Kits

Die in dieser Arbeit verwendeten Kits sind in Tabelle 5 aufgelistet.

**Tabelle 5. Verwendete Kits.** Es sind die verwendeten Kits, ihr Verwendungszweck und ihre Herkunft angegeben. IHC=Immunhistochemie, AP=alkalische Phosphatase, WB=Western Blot. IF=Immun Fluoreszenz.

Bezeichnung	Verwendung	Herkunft
Alexa Fluor™ 555 Tyramid SuperBoost Kit	IF	ThermoFisher, Waltham, USA
Bio-Plex Pro Human Cytokine Screening Panel (48-Plex)	Zytokin-Screening	Bio-Rad, Hercules, USA



ELISA MAX™ Deluxe Set Human MCP-1/CCL2	CCL2 ELISA	BioLegend, San Diego, USA
FastStart™ Taq-DNA- Polymerase, dNTPack	qRT-PCR	Sigma-Aldrich, Steinheim
ImmPACT® Vektor® Red AP Substrat	IHC	Vector Labs, Eching
NucleoBond Xtra Midi Kit	Plasmid DNA-Isolation	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin miRNA	miRNA + RNA-Isolation	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin RNA	RNA-Isolation	Macherey-Nagel, Düren
Pierce™ BCA-Protein Assay Kit	Proteinkonzentration	ThermoFisher, Waltham, USA
QIAamp® DNA Mini Kit	Plasmid DNA-Isolation (Bakteriengenom)	Qiagen, Hilden
TaqMan™ MicroRNA-Assay	cDNA-Synthese aus miRNA	ThermoFisher, Waltham, USA
TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit	cDNA-Synthese aus miRNA	ThermoFisher, Waltham, USA
WesternBright ECL HRP substrate	WB	Advansta, San José, USA

### 2.1.10 Chemikalien und Reagenzien

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Chemikalien und Reagenzien verwendet:

Acrylamid/Bisacrylamid (30 %)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
ATP	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem, Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bradford Reagenz	Bio-Rad, Hercules, USA
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dikaliumhydrogenphosphat ( $K_2HPO_4$ )	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dinatriumhydrogenophosphat ( $Na_2HPO_4$ )	Merck, Darmstadt
E-Gel 1 kb Plus DNA-Leiter	ThermoFisher, Waltham, USA
E-Gel Agarose Gels mit SYBR™	ThermoFisher, Waltham, USA
E-Gel Probenaufnahmepuffer	ThermoFisher, Waltham, USA
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Fischer Chemicals, Zürich, Schweiz
Ethanol vergällt	SAV Liquid production, Flintsbach am Inn
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Hämatoxilin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Igepal	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol	SAV Liquid production, Flintsbach am Inn
kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Kalziumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt
Kristallviolett	Sigma-Aldrich, Steinheim
Lipofectamin 2000	ThermoFisher, Waltham, USA
Lipofectamin LTX	ThermoFisher, Waltham, USA
Lipofectamin RNAi Max	ThermoFisher, Waltham, USA
Luziferin	AppliChem, Darmstadt
Magermilchpulver	Serva, Heidelberg
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Methanol	Fischer Chemicals, Zürich, Schweiz
M-PER Extraktions-Reagenz	M-PER™ Extraktions-Reagenz
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	ThermoFisher, Waltham, USA
Natriumchlorid (NaCl)	VWR Chemicals, Pennsylvania, USA
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Natriumlaurylsulfat (SDS)	AppliChem, Darmstadt
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ponceau S-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim
rekombinates humanes CCL2	PeproTech (ThermoFisher, Waltham, USA)
RIPA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Salzsäure (HCl)	Bernd Kraft GmbH, Duisburg
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) % ??	VWR Chemicals, Pennsylvania, USA
Spectra™ mehrfarbige Proteinleiter, High Range	ThermoFisher, Waltham, USA
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tetramethylethylendiamin (Temed)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
tri-Natriumcitrat Dihydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tris	Sigma-Aldrich, Steinheim
TRIS-Glycin-SDS-Laufpuffer (10x), pH 8.3	ThermoFisher, Waltham, USA
Tween20	Serva, Heidelberg
UltraPure™ Lachssperma-DNA-Lösung	ThermoFisher, Waltham, USA
Vectamount	Vector Labs, Eching
Vectashield	Vector Labs, Eching
Wasser deionisiert (H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> )	Fresenius, Bad Homburg

Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	VWR Chemicals, Pennsylvania, USA
Xylol	Otto Fischar GmbH, Saarbrücken
7-Aminoactinomycin D (7-AAD)	BioLegend, San Diego, USA

### 2.1.11 Puffer und Lösungen

Wenn nicht anders angegeben wurden die Puffer und Lösungen mit H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> angesetzt.

#### Organotypische Kulturen

##### Kollagen-Lösung

Rattenschwanzkollagen	4 g/ml
Essigsäure	0,1 M

#### SDS-PAGE

##### Acrylamidgel (10 %)

Trenngel:

Acrylamid/Bisacrylamid 30 %	2,7 ml
Trenngelstock	2 ml
APS 10 %	70 µl
Temed	7 µl
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	3,3 ml

Sammelgel:

Acrylamid/Bisacrylamid 30 %	750 µl
Sammelstock	625 µl
APS 10 %	45 µl
Temed	4,5 µl
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	3,1 ml

##### Trenngelstock:

Tris-HCl	1,5 M
SDS	0,4 %

Der pH-Wert wurde auf 8,8 mit HCl eingestellt.

Sammelgelstock:

Tris-HCl 0,5 M

SDS 0,4 %

Der pH-Wert wurde auf 6,8 mit HCl eingestellt.

Lämmli-puffer (5x):

Tris-HCl pH 6,8 165 mM

SDS 3,5 %

Glycerin 2,5 %

Bromphenolblau 0,62 mg/ml

**Western Blot**

Transferpuffer:

Tris-HCl pH 6,8 25 mM

Glycin 200 mM

Methanol 20 %

Blockpuffer:

Magermilchpulver 5 %

Die Lösung wurde in TBS angesetzt.

PBS:

NaCl 140 mM

KCl 25 mM

MgCl<sub>2</sub> 500 µM

CaCl<sub>2</sub> 1 mM

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM

TBS:

Tris-HCl	10 mM
NaCl	150 mM

Der pH-Wert wurde auf 7,6 mit HCl eingestellt.

Waschpuffer:

PBS-T:

0,1 % Tween in PBS

TBS-T:

0,1 % Tween in TBS

**MACS**

MAC-Puffer:

BSA	0,5 %
EDTA	2 mM

Die Lösung wurde in PBS angesetzt und sterilfiltriert.

**FACS**

FACS-Puffer:

BSA	1 %
Natriumazid	0,1 %

Die Lösung wurde in PBS angesetzt.

FACS-Fixierung Puffer:

1 % PFA in PBS

**Immunhistochemie und Immunfluoreszenz**

Citratpuffer:

tri-Natriumcitrat Dihydrat	10 mM
----------------------------	-------

Der pH-Wert wurde auf 6,0 mit Essigsäure angesetzt.

## Luciferase-Assay

### Extraktionspuffer:

KPO <sub>4</sub>	100 mM
Igepal	0,5 %

### Reaktionspuffer:

KPO <sub>4</sub>	100 mM
MgSO <sub>4</sub>	15 mM
ATP	5 mM
Luziferin	140 µg/ml

### KPO<sub>4</sub>:

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	90,8 % (v/v)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	9,2 % (v/v)

## 2.1.12 Plastikwaren und Gebrauchsgüter

Es wurden folgende Plastikwaren und Gebrauchsgüter verwendet:

C-Chip, Einweg-Zählkammer	NanoEntek, Seoul, Südkorea
FACS-Röhrchen (Probenröhre)	Sarstedt, Nümbrecht
Kryoröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
LS-Säule	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACS-Multistand	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mikroplatten (96-Well)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Mikrotestplatten (96-Well), V-Boden	Sarstedt, Nümbrecht
MidiMACS™ Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mini-Blot-Modul	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Mini-Gel-Tank	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Nitrozellulosemembran	GE Healthcare, München
Nunc MaxiSorp Immuno 96-Well Platten	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
OptiPlate 96-Well Mikroplatte, schwarz	PerkinElmer, Waltham, USA
PCR-Platten (96-Well)	LTF-Labortechnik, Wasserburg
Pre-Separation Filter (30 µm)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

SureCast™ Gel Handcast Station	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
TPP-Zellkulturflaschen	TPP, Trasadingen, Schweiz
TPP-Zellkulturtestplatten (6 und 12-Well)	TPP, Trasadingen, Schweiz
Transparente Folien (Entwicklertaschen)	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Transwell (24-well, 5 µm Porengröße)	Corning, Corning, USA
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkultur Multiwellplatten (6, 12, 24-Well)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Zellkulturschalen (6 cm und 10 cm)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich

### 2.1.13 Geräte

Es wurden folgende Geräte verwendet:

Azure-500	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Bio-Plex 200 System	Bio-Rad, Hercules, USA
Durchflusszytometer (FACS)	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
E-Gel Electrophorese Gerät	ThermoFisher, Waltham, USA
Inversmikroskop DMI 6000B	Leica, Wetzlar
LightCycler 480 System	Roche, Mannheim
Megafuge 16R TX-400	ThermoFisher, Waltham, USA
Mikrozentrifuge 1-16k, gekühlt	Sigma-Aldrich, Steinheim
Mini ELISA Plate Reader	BioLegend, San Diego, USA
Nanodrop 2000c	ThermoFisher, Waltham, USA
Netzgerät Power Source	VWR International, Darmstadt
PTC-200 Thermal Cycler	MJ Research/ Bio-Rad, Hercules, USA
Rotationsmikrotom RM2125 RTS	Leica, Wetzlar
Thermoschüttler	Cellmedia, Zeitz
Ultraschallbad	Bandelin electronic GmbH, Berlin
Victor X4 Plattenreader	PerkinElmer, Waltham, USA

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Auftauen von Zellen**

Eingefrorene Zellen wurden im Kryoröhrchen langsam in der Hand aufgetaut. HaCaT Zellen und VHF wurden in 9 ml DMEM-Vollmedium aufgenommen und 5 min bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde dann verworfen und das Pellet wurde in frischem DMEM-Vollmedium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche gegeben. NFKs wurden direkt nach dem Auftauen mit 25 ml KGM2 in 150 cm<sup>2</sup> TPP-Zellkulturflaschen kultiviert. Das Medium wurde am nächsten Tag gewechselt.

### **2.2.2 Kultivierung eukaryotischer Zellen**

Alle verwendeten eukaryotischen Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. HaCaT Zellen wurden mit 12,5 ml DMEM-Vollmedium in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen kultiviert und bei 90-100 % Konfluenz im Verhältnis 1:10 zwei Mal wöchentlich passagiert. VHF wurden bei 80-100 % Konfluenz einmal wöchentlich im Verhältnis 1:10 passagiert und wurden mit 25 ml in 175 cm<sup>2</sup> Flaschen kultiviert. VHF wurden bis einschließlich Passage 7 verwendet. NFK hingegen wurden mit 25 ml KGM-2 Medium in 150 cm<sup>2</sup> TPP-Zellkulturflaschen kultiviert. Bei einer Konfluenz von 80 % wurden NFKs bis einschließlich Passage 3 kultiviert, wobei zum Passagieren von NFKs jeweils 10<sup>6</sup> Zellen verwendet wurden.

Für das Passagieren adhärenter Zellen wurde das verbrauchte Medium verworfen und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Das Ablösen der Zellen vom Flaschenboden erfolgte durch Zugabe von 2 ml bei 75 cm<sup>2</sup> bzw. 3 ml Trypsin für 150 und 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen. Die Zellen wurden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von ca. 10-15 min bei HaCaTs, 10 min bei NFK und 5 min bei VHF wurde die Reaktion durch Zugabe von 8 bzw. 7 ml des entsprechenden Mediums abgestoppt. Die Zellen wurden im Medium resuspendiert und 5 min bei 300 g abzentrifugiert. Im Anschluss wurden die Zellen in 10 ml Medium aufgenommen und zur weiteren Kultivierung wieder in Zellkulturflaschen gegeben oder für weitere Versuche gezählt und ausgesät.

### **2.2.3 Bestimmung der Zellzahl**

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte, nachdem Zellen trypsiniert und wieder in frischem Medium aufgenommen wurden (s. 2.2.2). Zellen wurden im Verhältnis 1:1 in 0,025 % Trypanblau verdünnt und in eine C-Chip Einweg-Zählkammer pipettiert. Hier wurden am



Mikroskop bei 10x Vergrößerung insgesamt vier große Quader gezählt, wobei blau gefärbte, tote Zellen ausgelassen wurden. Die Zellzahl pro ml errechnete sich durch den Mittelwert der Zellzahl aus vier Quader multipliziert mit dem Faktor  $10^4$  und dem entsprechenden Verdünnungsfaktor.

#### 2.2.4 Aussäen von Zellen

Zur Durchführung verschiedener Versuche wurden Zellen zunächst in Wellplatten ausgesät. In Abhängigkeit des Zelltyp-spezifischen Wachstumsverhaltens und dem Versuchsaufbau, wurde die Zellzahl und das Well-Format angepasst. Generell wurden Zellen für RNA-Extraktionen und für Reporter-gen Versuche im 12-Well Format und für Proteinextraktionen im 6-Well Format ausgesät. Für größere Ansätze und höhere benötigte Proteinmengen wurden Zellen auch in 6 cm Schalen ausgesät. Die jeweiligen Zellzahlen sind Tabelle 6 zu entnehmen.

**Tabelle 6. Übersicht der Anzahl ausgesäter Zellen.** Es sind die Zellzahlen verwendeter Zelltypen angegeben, die im entsprechenden Well-Format und Medium Volumen ausgesät wurden.

Well-Format	Medium Volumen	HaCaT		NFK (WT, pLXSN & 8E6)
		WT	pLXSN & 8E6	
12-Well	1 ml	$1,5 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	$8 \times 10^4$
6-Well	2,5 ml	$3,75 \times 10^5$	$3 \times 10^5$	$2 \times 10^5$
6 cm Schale	5 ml	$7,5 \times 10^5$	$6 \times 10^5$	$5 \times 10^5$

Für Co-Kulturen aus HaCaT Zellen und VHF wurden  $7,5 \times 10^4$  HaCaT Zellen zusammen mit  $7,5 \times 10^4$  VHF in 1 ml DMEM-Vollmedium kultiviert. Das Medium wurde an Tag 2 erneuert und die Ansätze an Tag 3 geerntet.

#### 2.2.5 Zell-Behandlung mit Inhibitoren

Für Versuche mit Inhibitoren wurden Zellen im entsprechenden Medium in 12- bzw. 6-Wellplatten ausgesät. Am Folgetag wurde das Medium durch Medium mit  $10 \mu\text{M}$  Inhibitor ersetzt. Da alle verwendeten Inhibitoren in DMSO gelöst wurden, wurde ein Ansatz mit entsprechenden Volumen an DMSO als Kontrolle mitgeführt. Nach 16 h Behandlung wurden die Zellen und ihre Überstände geerntet.

### 2.2.6 Ernte von Zellen und Zellüberständen

Nach verschiedenen Versuchen im Well-Format (Überexpression, siRNA, Inhibitoren oder unbehandelt) wurden Zellüberstände und Zellen für Folgeversuche geerntet. Überstände wurden abgenommen und bei 4 °C und 300 g 5 min zentrifugiert, wodurch tote Zellen pelletiert wurden. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung (ELISA) bei -20 °C gelagert. Zur Ernte wurden die Zellen, nachdem der Überstand abgenommen wurde, in 1 ml PBS im 12-Well und 2 ml PBS im 6-Well gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe des entsprechenden Puffers lysiert und für weitere spezifische Versuche verwendet.

### 2.2.7 Organotypische Kulturen

Organotypische 3D-Kulturen bieten eine Alternative zur Kultivierung von Keratinozyten als Monolayer. Aufgrund des mehrschichtigen, dreidimensionalen Wachstums von Keratinozyten auf einer Fibroblasten-Kollagen Matrix, welches durch die Zugabe komplexer Zusätze und dem Wachstum an der Luft-Medium-Grenze induziert wird, stellen sie ein modellhaftes *in vivo* Epithel dar.

Für die Erstellung einer 3D-Kultur wurde am ersten Tag die Fibroblasten-Kollagen Matrix hergestellt. Dazu wurde pro Ansatz 800 µl Rattenschwanzkollagen mit 100 µl 10x DMEM als pH-Indikator gemischt. Zur Neutralisierung des pH-Werts wurde zu dem Ansatz tropfenweise 1 M NaOH Lösung gegeben, bis ein violetter Farbumschlag zu erkennen war. Parallel wurden  $5 \times 10^5$  VHF in 100 µl FKS aufgenommen. Anschließend wurden die VHF mit dem Kollagen vermischt und luftblasenfrei resuspendiert. Der Ansatz wurde in ein Well einer 24-Wellplatte gegeben und 30 min im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nachdem die Fibroblasten-Kollagen Matrix ausgehärtet war, wurde sie mit 1 ml DMEM-Vollmedium überschichtet und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am zweiten Tag wurde das Medium verworfen und  $7 \times 10^5$  Keratinozyten in FAD Medium wurden dazugegeben. Am Tag 3 wurde der Ansatz mit einer Pinzette auf ein Metallgitter in einer 6-Well Platte transferiert. Die Kulturen wurden mit FAD Medium unterschichtet, sodass die unten liegenden Fibroblasten in Kontakt zum Medium standen. Das Medium wurde jeden zweiten Tag erneuert. Nach einer Woche Kultivierung auf dem Metallgitter wurden die Ansätze geerntet. Dazu wurde das Medium abgenommen und die Kulturen mit 4 % PFA unterschichtet. Nach 1 h Inkubation bei 4 °C wurden die Kulturen mit 4 % PFA überschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Letztlich wurden die Kulturen vorsichtig von den Gittern abgelöst, einmal in der Mitte

geschnitten und dann in Paraffin eingebettet. Das Einbetten erfolgte in Kooperation mit Prof. Dr. Michael Menger von Mitarbeitern der experimentellen Chirurgie am Universitätsklinikum des Saarlandes.

### **2.2.8 Kultivierung prokaryotischer Zellen**

In dieser Arbeit wurden One Shot Mach 1 *E. Coli* zur Amplifikation von Plasmiden verwendet. Sie wurden in Erlenmeyerkolben mit LB-Medium bei 37 °C über Nacht bei 220 *rpm* kultiviert. Das LB-Medium wurde nach Angaben des Herstellers angesetzt. Plasmid-tragende *E. Coli* wurden durch Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin selektiert. Das Animpfen einer Bakterienkultur erfolgte durch den Transfer kleiner Mengen Kryokulturen oder Klonen, die mit einer Pipettenspitze abgekratzt wurden.

### **2.2.9 Anlegen von Kryokulturen**

Damit Zellen über einen längeren Zeitraum aufbewahrt werden können, wurden von allen verwendeten Zellen Kryokulturen erstellt. Dafür wurden zunächst konfluente Zellen (90-100 % bei HaCaTs und VHF und 80 % bei NFK) trypsinisiert. Für eine Kryokultur wurden jeweils 10<sup>6</sup> Zellen in 1 ml des entsprechenden Einfriermediums gelöst und anschließend bei -150 °C oder in flüssigem Stickstoff eingefroren. HaCaT Zellen und VHF wurden in FKS mit 10 % DMSO eingefroren und NFK in KGM2 mit 30 % FKS und 10 % DMSO.

Für Kryokulturen von *E. Coli* Bakterien wurden 800 µl einer Zellsuspension mit 200 µl DMSO gemischt und bei -80 °C eingefroren.

## **2.3 Molekularbiologische Methoden**

### **2.3.1 Aufreinigung mononukleärer Zellen aus peripherem Vollblut**

Zur Aufreinigung von CD14<sup>+</sup> Monozyten aus peripherem Vollblut wurde ein Dichtegradient (Pancoll, 1,077 g/ml) eingesetzt. Dazu wurde Vollblut von freiwilligen Spendern 1:1 in PBS verdünnt und anschließend langsam und tropfenweise auf den Dichtegradient pipettiert. Pro Ansatz wurden 35 ml verdünntes Blut auf 12,5 ml Pancoll gegeben. Danach wurde der Ansatz für 20 min bei 800 *g* ohne Bremse zentrifugiert. Hierbei wurden PBMCs (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) von Granulozyten und Erythrozyten aufgrund ihrer Größe und Dichte voneinander getrennt. Nach dem Zentrifugieren befinden sich Granulozyten und Erythrozyten ganz unten im Falcon. Darauf folgt das Pancoll und die PBMCs, wobei die leichteren mononukleären Zellen als gelblicher Ring auf dem Dichtegradienten schwimmen. Nachdem

das sich oben befindende Blutplasma verworfen wurde, wurde der PBMC-Ring abgenommen und in ein frisches Falcon überführt. Um das restliche Pancoll zu entfernen wurden die Zellen zwei Mal in 50 ml PBS gewaschen (5 min bei 300 g). Zur weiteren Aufreinigung spezifischer Zelltypen wurden die PBMCs in 1 ml PBS in ein Reaktionsgefäß überführt und durch 5 min Zentrifugation bei 300 g pelletiert.

### **2.3.2 Magnetische Zellsortierung (MACS)**

Mit dem MACS-Verfahren (*Magnetic-Activated Cell Separation*) können Zellen mit spezifischer Oberflächenmarker Expression, mittels Antikörper-gekoppelter Beads aus einer Zellpopulation selektiert werden. Hier wurden CD14-exprimierende Monozyten aus einer PBMC-Zellpopulation positiv selektiert. Dazu wurden PBMCs mit anti-CD14-gekoppelten Beads inkubiert. Je  $10^7$  PBMCs wurden in 80  $\mu$ l MAC-Puffer resuspendiert und anschließend mit 20  $\mu$ l CD14-Beads versetzt. Der Ansatz wurde resuspendiert und dann 15 min bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurde der Ansatz mit 1 ml MAC-Puffer gewaschen und 5 min bei 300 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 3 ml MAC-Puffer aufgenommen und auf eine LS-Säule mit einem Pre-Separation Filter (30  $\mu$ m) gegeben. Der Filter und die LS-Säule wurden zuvor in den MidiMACS Separator gespannt, am MACS-Multistand befestigt und durch Zugabe von 3 ml MAC-Puffer äquilibriert. Beim Durchlaufen der Säule wurden die Beads, an denen CD14<sup>+</sup> Monozyten gebunden waren, durch das magnetische Feld zurückgehalten, wohingegen alle anderen ungebundenen PBMCs durch die Säule hindurch gelaufen sind. Die Säule wurde drei Mal mit 3 ml MAC-Puffer gewaschen. Zur Elution der CD14<sup>+</sup> Monozyten wurde die Säule von der Platte gelöst und mit 5 ml MAC-Puffer gefüllt. Die Flüssigkeit wurde mit einem zur LS-Säule passenden Kolben durch die Säule in ein Falcon gepresst. Die Reinheit der CD14<sup>+</sup> Monozyten wurde mittels Antikörperfärbung und die Viabilität mittels 7-AAD Färbung im Durchflusszytometer (FACS) bestimmt.

### **2.3.3 Bestimmung der Zellviabilität mit 7-AAD**

Bei 7-AAD (7-Aminoactinomycin D) handelt es sich um einen DNA-interkalierenden, fluoreszierenden Farbstoff, mit dem DNA angefärbt werden kann. Da 7-AAD nicht membrangängig ist und demnach nur von toten bzw. beschädigten Zellen aufgenommen wird, steht dessen Aufnahme im Zusammenhang mit der Zellviabilität und wird über die DNA-Färbung quantifiziert. Die 7-AAD-Färbung wurde zur Bestimmung der Viabilität von Monozyten nach Behandlung mit RS-102895 durchgeführt. Hierzu wurden  $2 \times 10^5$  Monozyten

analog zum Migrations-Assay (s. 2.3.5) mit verschiedenen Konzentrationen RS-102895 bzw. DMSO behandelt. Anschließend wurden die Zellen durch 5 min Zentrifugation bei 300 g pelletiert und dann mit 7-AAD gefärbt. Dazu wurden die Zellen in 250 µl PBS mit 50 ng/ml 7-AAD aufgenommen und 10 min im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Zellen pelletiert und in 500 µl PBS gewaschen (jeweils 5 min bei 300 g). Letztlich wurden die Zellen in 500 µl PBS aufgenommen und umgehend im FACS analysiert. Dabei wurde 7-AAD in toten bzw. beschädigten Zellen mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und dann die Emission bei 647 nm detektiert.

### 2.3.4 Durchflusszytometrie (FACS)

In der Durchflusszytometrie, auch FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) genannt, können prinzipiell Zellen in einem Flüssigkeitsstrom gezählt und basierend auf ihrer Größe und Granularität voneinander abgegrenzt werden. Die physikalischen Eigenschaften von Zellen können anhand ihrer Lichtstreuung ermittelt werden. Werden Zellen mit Laser-Licht bestrahlt, gibt das Vorwärtstreulicht (*Forward Scatter*, FSC) Aufschluss über ihre Form und Größe. Dahingegen erlaubt das Seitwärtstreulicht (*Side Scatter*, SSC) es Rückschlüsse auf die Granularität und innere Komplexität der Zelle zu ziehen. Des Weiteren können unter Verwendung Fluoreszenz-markierter Antikörper Oberflächen- und intrazelluläre Proteine detektiert bzw. quantifiziert werden. Nachdem Fluorochrome durch spezifische Laser angeregt wurden, emittieren sie detektierbares Fluoreszenzlicht. Dabei verhält sich die Fluoreszenzintensität proportional zur gebundenen Antikörpermenge. Letzteres gilt ebenfalls für die Analyse fluoreszierender Proteine wie das Grün fluoreszierende Protein (GFP). Das FACS wurde verwendet, um die CD14 Expression auf Monozyten nachzuweisen, deren Viabilität mittels 7-AAD-Färbung zu bestimmen (s. 2.3.3) und die Transfektionseffizienz von HaCaT Zellen unter Verwendung eines GFP-Konstrukts zu ermitteln.

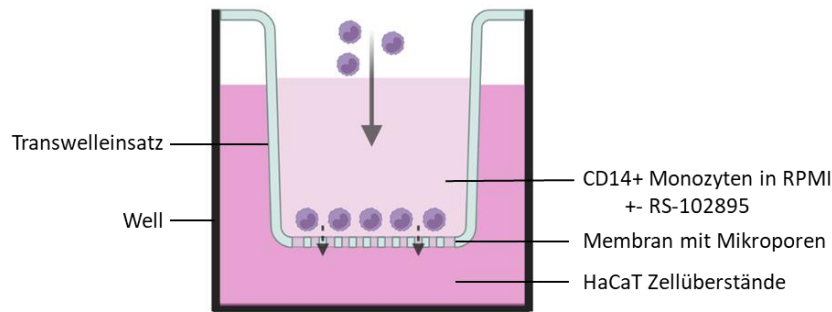
Zum Nachweis der CD14 Expression auf der Zelloberfläche von Monozyten wurden pro Ansatz  $1,5 \times 10^5$  Zellen in ein Well einer 96-Wellplatte mit V-Boden gegeben. Bei allen folgenden Schritten wurde auf Eis gearbeitet. Die Zellen wurden durch 3 min Zentrifugation bei 300 g und 4 °C pelletiert und anschließend in 10 µl CD14-FITC Antikörper aufgenommen (1:10 in PBS verdünnt). Als Negativkontrolle wurde ein Isotyp igG-FITC Antikörper mitgeführt. Die Ansätze wurden 30 min im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurden die Ansätze zwei Mal mit 100 µl FACS-Puffer gewaschen (3 min bei 300 g und 4 °C). Letztlich wurden die Zellen in 500 µl FACS-Fixierungspuffer aufgenommen, in FACS-Röhrchen überführt und im Durchflusszytometer analysiert.

Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz von HaCaT Zellen wurden diese mit dem pEGFP-C1 Konstrukt transfiziert (s. 2.3.6.1). Die transfizierten Zellen wurden im 12-Well mit 1 ml PBS gewaschen und dann mit 150 µl Trypsin vom Wellboden abgelöst. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 600 µl DMEM-Vollmedium abgestoppt und die Zellen wurden in ein Reaktionsgefäß überführt, pelletiert und mit 800 µl PBS gewaschen (5 min bei 300 g). Anschließend wurden die Zellen in 500 µl FACS-Fixierungspuffer aufgenommen und in ein FACS-Röhrchen überführt. GFP-exprimierende Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie im 488 nm Kanal quantifiziert.

### **2.3.5 Migrations-Assay**

In einem Migrations-Assay kann die migratorische Aktivität von Zellen analysiert werden. Dafür werden sogenannte Transwells eingesetzt, welche neben dem Well auch über einen zugänglichen Transwelleinsatz verfügen, der in das Well hinein reicht und durch eine Membran mit Mikroporen abgeschlossen ist. Während in den Transwelleinsatz die zu analysierenden Zellen gegeben werden, wird das Well mit Medium gefüllt, welches Chemotaxis-auslösende Faktoren enthält (Abbildung 7). Wird die Chemotaxis durch bestimmte Stimuli induziert, migrieren die Zellen durch die Membran und können anschließend mittels Kristallviolett-Färbung quantifiziert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde der Migrations-Assay verwendet um den Einfluss von Zellüberständen 8E6-exprimierender HaCaT Zellen auf die Migration von CD14<sup>+</sup> Monozyten zu untersuchen.

Dazu wurden pro Ansatz  $5 \times 10^5$  CD14<sup>+</sup> Monozyten in 200 µl RPMI-Vollmedium aufgenommen und in den Welleinsatz einer 24-Transwell Platte gegeben (5 µm Porengröße). Bei Verwendung des CCR2 Inhibitors wurden die Monozyten zunächst 1 h in 200 µl RPMI-Vollmedium mit RS-101895 bei RT inkubiert und dann in den Welleinsatz gegeben. In das unten gelegene Well wurden 600 µl der HaCaT Zellüberstände pipettiert (Abbildung 7).



**Abbildung 7. Aufbau des Migrations-Assays.** Die migratorische Aktivität von CD14<sup>+</sup> Monozyten in Antwort auf Stimuli 8E6-exprimierender HaCaT Zellen wurde im dargestellten Transwell untersucht. Die sich im Transwelleinsatz befindenden Monozyten lagern sich an der Membran mit 5 µm Mikroporen an. Befinden sich im Medium bzw. in den Zellkulturüberständen im äußeren Kompartiment Faktoren, welche die Migration von Monozyten stimulieren, migrieren diese durch die Mikroporen auf die andere Seite der Membran. Migrierte Zellen können mittels Kristallviolett-Färbung quantifiziert werden. Erstellt mit BioRender.com

Es wurde DMEM-Vollmedium als Negativkontrolle und DMEM-Vollmedium mit rekombinantem humanen CCL2 (1 µg/ml) als Positivkontrolle der Monozyten-Migration mitgeführt. Die Ansätze wurden 4 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Medium und die Überstände entfernt und zur Fixierung mit 70 % Ethanol ersetzt (750 µl im Well und 200 µl im Welleinsatz). Nach 10 min Inkubation wurde die Membran kurz trocken gelassen und dann für 5 min in 0,2 % Kristallviolett Lösung inkubiert, wobei die Zellkerne der Monozyten angefärbt wurden. Danach wurden die Ansätze durch mehrfaches Eintauchen in H<sub>2</sub>O gewaschen und nicht-migrierte Zellen wurden mit Q-Tips entfernt. Die Ansätze wurden über Nacht trocken gelassen. Zur Auswertung wurden am Mikroskop bei 20x Vergrößerung 6 unabhängige Bereiche der Membran dokumentiert und die jeweils migrierten Zellen gezählt. Es wurde der Mittelwert aus 6 Aufnahmen gebildet und in Relation zur entsprechenden Kontrolle gesetzt.

## 2.3.6 Transiente Transfektion humaner Zellen

### 2.3.6.1 Transfektion von Plasmid DNA mit Lipofectamin 2000

Eine Form der Transfektion, dem Einbringen fremder Nukleinsäuren in eukaryotische Zellen, ist die Lipofektion. Hierbei wird das zu transfizierende genetische Material unter Verwendung von Transfektionsreagenzien in Liposomen verpackt, die mit der Zellmembran fusionieren und somit ins Zellinnere gelangen, wo ihr Inhalt freigesetzt wird. Hier wurde das Transfektionsreagenz Lipofectamin 2000 verwendet, das sich besonders zur Transfektion von Plasmid DNA in zahlreiche adhärente Zelltypen eignet. Es wurde verwendet, um HaCaT Zellen mit Reporter-gen-Konstrukten zu transfizieren. Zur Transfektion wurden Zellen im 12- oder 6-

Well Format in Antibiotika freiem DMEM-Vollmedium ausgesät (s. 2.2.4). Am nächsten Tag wurden pro Ansatz im 12-Well 800 ng Plasmid DNA mit 100 µl Opti-MEM gemischt. In einem davon getrennten Ansatz wurde das Transfektionsreagenz mit 100 µl Opti-MEM und 2 µl Lipofectamin 2000 vorbereitet. Die beiden Ansätze wurden 10 min bei RT inkubiert und dann zusammengegeben. Das Antibiotika freie DMEM-Vollmedium wurde erneuert (1 ml) und anschließend wurden 200 µl des Transfektionsmix tropfenweise auf die Zellen gegeben. An Tag 3 erfolgte ein Mediumwechsel mit DMEM-Vollmedium. Die Transfektion wurde an Tag 4 nach insgesamt 48 h geerntet.

#### 2.3.6.2 Transfektion von Plasmid DNA mit Lipofectamin LTX

Eine Alternative zur Transfektion von Plasmid DNA bietet Lipofectamin LTX Plus-Reagenz. Transfektionen mit Lipofectamin LTX erfolgen mit optimierten, Zell-schonenden Protokoll für schwer transfizierbare Zellen. Es kombiniert eine hohe Transfektionseffizienz mit maximaler Zellviabilität und wurde zur Überexpression von  $\Delta Np63\alpha$  in HaCaT Zellen eingesetzt. Dazu wurden an Tag 1 Zellen in Antibiotika-freiem DMEM-Vollmedium ausgesät (s. 2.2.4). Am zweiten Tag wurde das Medium erneuert und der Transfektionsansatz vorbereitet. Pro Ansatz im 12-Well wurden 800 ng Plasmid DNA mit 200 µl Opti-MEM zusammengegeben und gevortext. Anschließend wurde 0,8 µl Plus-Reagenz (DNA-Plus-Reagenz Verhältnis von 1:1) dazugegeben und der Ansatz wurde invertiert und 5 min bei RT inkubiert. Danach wurde 1 µl Lipofectamin LTX dazugegeben, invertiert und 30 min bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde tropfenweisen auf die Zellen gegeben. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel mit DMEM-Vollmedium und nach 48 h an Tag 4 wurden die Ansätze geerntet. Für die Erstellung einer Konzentrationsreihe der  $\Delta Np63\alpha$  Überexpression (800 ng, 400 ng und 200 ng im 12-Well) wurde jeweils die Menge der Gesamt-DNA auf 800 ng mit pCDNA3.1+Hygro Leervektor aufgefüllt. Transfektionen im 6-Well wurden mit der 2,5-fachen Menge aller Reagenzien durchgeführt.

#### 2.3.6.3 Transfektion von siRNA mit Lipofectamin RNAiMAX

Für Gen-Knockdown Versuche in HaCaT Zellen und NFK wurde Lipofectamin RNAiMAX verwendet, welches für Transfektionen von siRNA optimiert ist. Die Transfektion von siRNA erfolgte äquivalent zur Transfektion mit Lipofectamin 2000 (s. 2.3.6.1). Jedoch wurde hier Lipofectamin RNAiMax als Transfektionsreagenz eingesetzt und 10 nM der entsprechenden



siRNA. Bei NFKs wurde stets KGM2-Vollmedium verwendet. Transfektionen im 6-Well wurden mit der 2,5-fachen Menge aller Reagenzien durchgeführt.

### 2.3.7 Transformation von Bakterien

In der Zellkultur eingesetzte Vektoren wurden in *E. Coli* Bakterien amplifiziert. Dazu wurden One Shot Mach1 *E. Coli* mit der jeweiligen Plasmid DNA mittels Hitzeschock transformiert. Die chemisch kompetenten Bakterien wurden 20 min auf Eis aufgetaut. Zur Transformation wurde 1 µl Plasmid DNA (10 pg bis 100 ng) zu 15-50 µl One Shot Mach1 *E. Coli* gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Danach folgte der Hitzeschock für 2 min bei 42 °C. Im Anschluss wurden die Bakterien in 250 µl SOC-Medium aufgenommen und 1 h bei 37 °C und 220 rpm geschüttelt. Von den transformierten *E. Coli* wurden 100 µl auf vorgewärmte LB<sub>Amp</sub>-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Der LB-Agar wurde nach Herstellerangaben angesetzt und mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt. Am nächsten Tag wurden einzelne Klone mit einer Pipettenspitze abgekratzt und in LB<sub>Amp</sub>-Medium angeimpft. Nach Aufreinigung der Plasmid DNA wurden die Sequenzen mittels Sequenzierung überprüft.

### 2.3.8 Aufreinigung von Plasmid DNA

Die Isolation von in *E. Coli* amplifizierter *high copy* Plasmid DNA erfolgte über eine Säulenbasierte Ionenaustauschchromatographie. Dazu wurde das NucleoBond Xtra Midi Kit eingesetzt und nach Angaben des Herstellers verwendet. Es wurden insgesamt 200 ml einer frischen *E. Coli* über Nacht Kultur eingesetzt. Das DNA-Pellet wurde steril in 100 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

Zur Überprüfung einer Mykoplasmen Kontamination wurde Plasmid DNA aus Zellkulturüberständen isoliert. Dafür wurde das QIAamp® DNA Mini Kit nach Herstellerangaben verwendet.

### 2.3.9 Aufreinigung von RNA

Die Isolation von RNA aus humanen Zellen wurde über die Silica-Membran Technologie mit dem NucleoSpin RNA Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zellen wurden teilweise direkt aus dem 12-Well mit dem Lyse-Puffer geerntet. RNA von HaCaT Zellen wurde in 60 µl und von NFK in 40 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O eluiert.

Für einige Ansätze mit NFKs wurde zusätzlich miRNA isoliert. Dies erfolgte mit dem RNA clean-up Protokoll des NucleoSpin miRNA Kits nach Angaben des Herstellers. Die RNA wurde in 40 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O eluiert.

Alle aufgereinigten RNAs wurden bei -80 °C gelagert.

### **2.3.10 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Messung von DNA- und RNA-Konzentrationen wurde am NanoDrop 2000/2000c Spektralphotometer durchgeführt. Es wurde 1 µl der Probe aufgetragen und die Extinktion bei 260 nm gemessen.

### **2.3.11 DNA-Sequenzierung**

Von allen verwendeten Vektor-Konstrukten wurde das Vorhandensein der korrekten Sequenz überprüft. Dafür wurden die Konstrukte von der Firma SEQ-IT, Kaiserslautern mittels Sanger-Sequenzierung sequenziert.

### **2.3.12 DNA-Gelelektrophorese**

In einer DNA-Gelelektrophorese können DNA-Fragmente, aufgrund ihrer negativen Ladung, durch das Anlegen eines elektrischen Feldes in einem Agarosegel ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Hier wurden 1 %- E-Gel<sup>TM</sup> Agarosegele verwendet, die den DNA-Farbstoff SYBR-Safe enthalten. Die Gele wurden in das E-Gel<sup>TM</sup> Elektrophorese Gerät gespannt und mit jeweils 20 µl der Proben befüllt. Die Proben wurden zuvor mit 1x E-Gel<sup>TM</sup> Probenaufnahmepuffer aufgenommen. Als Größenstandard wurde die E-Gel<sup>TM</sup> 1 kb Plus DNA-Leiter mitgeführt. Die DNA wurde 15 min bei 100 V aufgetrennt und anschließend mit einem Blaulicht-Illuminator visualisiert.

### **2.3.13 cDNA-Synthese aus mRNA und miRNA**

Damit Genexpressionsanalysen in einer qRT-PCR durchgeführt werden können, muss die isolierte RNA zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Diese Reaktion wird von dem Enzym Reverse Transkriptase (RT) katalysiert.

Zur cDNA-Synthese aus mRNA wurde ein Hexamer Primer Mix verwendet. Die Primer binden dabei sequenzspezifisch an mRNA-Moleküle und ermöglichen dadurch den Start der RT-Reaktion. Da der Primer Mix alle möglichen Nukleotid-Kombinationen enthält, wird

gewährleistet, dass die gesamte vorliegende mRNA in cDNA umgeschrieben wird. Die Gesamtreaktion der cDNA-Synthese wurde in einem Volumen von 20 µl durchgeführt.

Im ersten Schritt wurden die Primer mit der mRNA hybridisiert:

RNA	500 ng
dNTPs	500 µM
Random Hexamer Primer	100 pM
ad H <sub>2</sub> O DEPC	15,2 µl

Der Ansatz wurde 5 min bei 65 °C inkubiert und danach kurz auf Eis abgekühlt. Bei zu geringen RNA-Konzentrationen wurde vom gesamten Set 300 ng RNA eingesetzt.

Im nächsten Schritt wurde die Reverse Transkriptase dazugegeben:

Maxima Reverse Transkriptase	60 U
RiboLock RNase Inhibitor	20 U
Reverse Transkriptase-Puffer	1x

Die Reaktion der reversen Transkription erfolgte durch drei Inkubationsschritte:

10 min	Raumtemperatur
30 min	50 °C
5 min	85 °C

Die cDNA von HaCaT Zellen wurde 1:20 und die von NFK 1:10 in H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> verdünnt. Sie wurden bei -20 °C gelagert.

Für die Analyse der Genexpression von miRNAs wurde ebenfalls zunächst cDNA generiert. Allerdings wurden hier zielspezifische Haarnadel-Primer des TaqMan microRNA-Assays eingesetzt. Dadurch werden nur die zu untersuchenden miRNAs in cDNA umgeschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde cDNA aus der miR-203 synthetisiert. Als Referenz-miRNA wurde im gleichen Ansatz ebenfalls cDNA aus RNU6B synthetisiert. Die miRNA-spezifische reverse Transkription wurde mit dem TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit nach folgendem Protokoll durchgeführt:

RNA	500 ng
10x RT-Puffer	1,5 µl
dNTP-Mix ohne dTTP	0,2 µl
RNase Inhibitor	0,2 µl

MultiScribe™ RT	1 µl
RNU6B Primer	1 µl
miR-203 Primer	1 µl
ad RNase-freies H <sub>2</sub> O	15 µl

Die Reaktion der reversen Transkription erfolgte durch drei Inkubationsschritte:

30 min	16 °C
30 min	42 °C
5 min	85 °C

Die cDNA wurde 1:10 in H<sub>2</sub>O verdünnt und bei -20 °C gelagert.

## 2.3.14 qRT-PCR

### 2.3.14.1 qRT-PCR für cDNA aus mRNA

In einer quantitativen Real Time-PCR (qRT-PCR) kann die Expression von Genen quantifiziert werden. Als Grundlage der Analyse dient cDNA, die zuvor durch reverse Transkription aus RNA synthetisiert wurde. Damit ausschließlich mRNA amplifiziert wird, werden in der qRT-PCR für jedes Gen spezifische Primer an Exon-Exon Übergängen eingesetzt. Während der Amplifikation werden sequenzspezifische, Fluorophor-gekoppelte DNA-Sonden der UPL eingebaut (s. 2.1.5.3), die eine Fluoreszenz-abhängige Quantifizierung des Amplifikats erlauben. Die UPL-Sonden bestehen aus 8-9 Nukleotiden und sind am 5'-Ende mit Fluorescein (FAM) und am 3'-Ende mit einem Dark-Quencher gekoppelt. Unter diesem Umstand wird beim Anregen des FAMs die Energie nicht in Form von Licht abgegeben, sondern wird auf den Quencher übertragen, welcher wiederum die Energie als Wärme abgibt. Wird die UPL-Sonde während der Amplifikation in die DNA eingebaut, bewirkt die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase die Abspaltung des Quenchers. Aufgrund der räumlichen Trennung wird beim Anregen des FAMs ein detektierbares Lichtsignal freigesetzt. Die Fluoreszenz verhält sich dabei proportional zur Kopienzahl des zu untersuchenden Gens.

qRT-PCRs wurden unter Verwendung des FastStart™ Taq-DNA-Polymerase, dNTPack-Kits in einem Reaktionsvolumen von 20 µl wie folgt durchgeführt:

MgCl <sub>2</sub>	3-5 mM
Taq-Puffer	1x
TE-Lachssperma	2 ng/µl
DMSO	5 %

Tween20	0,5 %
BSA	1 ng/ $\mu$ l
dNTP-Mix	200 $\mu$ M
UPL-Sonde	20 nM
Primer Forward	250 nM
Primer Reverse	250 nM
Taq-Polymerase	0,5 U
ad H <sub>2</sub> O	15 $\mu$ l

Für jeden Ansatz wurden 15  $\mu$ l des PCR-Mix in eine 96-Well PCR-Platte gegeben. Von der verdünnten cDNA wurden jeweils 5  $\mu$ l dazugegeben und kurz gemischt. Die PCR-Platte wurde anschließend im LightCycler 480 analysiert. Dazu wurde folgendes PCR-Programm verwendet:

Aktivierungsschritt	95 °C	10 min	
Denaturierung	95 °C	5 sek	} 10 Zyklen
Annealing	65 °C	5 sek	
Annealing	62 °C	10 sek	
Denaturierung	94 °C	15 sek	
Annealing	55 °C	30 sek	} 45 Zyklen
Amplifikation	70 °C	30 sek	

Für die Quantifizierung ist vor allem der sogenannte CT-Wert (*Cycle Threshold*) bzw. CP-Wert (*Crossing Point*) relevant. Dieser gibt die Zykluszahl an, bei der das Fluoreszenzsignal der amplifizierten DNA einen bestimmten Schwellenwert überschreitet. Anhand des CT-Werts wurden qRT-PCRs mit der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode ausgewertet (Livak und Schmittgen, 2001). Dabei wurde die Expression des untersuchten Gens in Relation zu dessen Expression im entsprechenden Kontrollansatz gesetzt. Zur Bestimmung der absoluten Kopienzahl in der Probe wurde eine Standard-Verdünnungsreihe (je 1:10) von  $10^7$ - $10^2$  Kopien mitgeführt. Anhand des Standards erstellte der LightCycler eine Standardkurve und berechnete die absolute Kopienzahl im Ansatz. Als Referenz der mRNA-Transkription wurde in jedem cDNA-Ansatz die Expression von RPL13a bestimmt. Demnach wurden alle Gen-spezifischen qRT-PCRs auf die entsprechende RPL13a Expression normiert.

### 2.3.14.2 qRT-PCR für cDNA aus miRNA

Um die Expression von miRNAs zu detektieren, wurde mit cDNA aus miRNA eine qRT-PCR mit dem TaqMan System und dem TaqMan™ MicroRNA-Assay Kit spezifisch für miR-203 und RNU6B durchgeführt. Das Grundprinzip der TaqMan-Sonden gleicht dem UPL-Sonden System (s. 2.3.14.1).

Eine qRT-PCR mit cDNA aus miRNA erfolgte nach folgendem Ansatz:

TaqMan Universal Master Mix	9 µl
Primer/Sonden Mix	1 µl
ad H <sub>2</sub> O	15 µl

Von dem PCR-Mix wurden 15 µl in eine 96-Well PCR Platte gegeben. In den PCR-Mix wurden anschließend 5 µl der verdünnten cDNA gegeben und die Platte wurde im LightCycler 480 mit folgendem PCR-Programm gemessen:

Aktivierungsschritt	95 °C	15 min	} 45 Zyklen
Denaturierung	94 °C	15 sek	
Annealing	55 °C	30 sek	
Amplifikation	70 °C	30 sek	

Die Auswertung erfolgte ebenfalls mit der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode (s. 2.3.14.1). Als Referenz der miRNA-Transkription wurde in jedem cDNA-Ansatz die Expression von RNU6B bestimmt. Demnach wurden die miR-203 spezifischen qRT-PCRs auf die entsprechende RNU6B Expression normiert.

### 2.3.15 Mykoplasmen PCR

Zellkulturen wurden regelmäßig auf eine Mykoplasmen Kontamination überprüft. Dazu wurde aus Zellkulturüberständen Plasmid DNA isoliert. Diese wurde in einer PCR eingesetzt, bei der durch die Verwendung spezifischer Primer nur Mykoplasmen Gene amplifiziert werden. Folglich ist ein Amplifikat nur bei einer Mykoplasmen Kontamination vorhanden und detektierbar.

Die Mykoplasmen PCR wurde in folgendem Ansatz durchgeführt:

Taq-DNA-Polymerase Puffer	1x
Primer-Mix	2 µM
dNTPs	200 µM

Taq-DNA-Polymerase	2,5 U
DNA	2 µl
ad H <sub>2</sub> O	25 µl

Dem PCR-Mix wurden 2 µl der zu testenden DNA hinzugefügt. Die PCR wurde im PTC-200 *Thermal Cycler* nach folgendem Programm durchgeführt:

Aktivierungsschritt	94 °C	1 min	} 35 Zyklen
Denaturierung	94 °C	30 sek	
Annealing	62 °C	30 sek	
Amplifikation	72 °C	30 sek	
	72 °C	3 min	

Die PCR-Produkte wurden anschließend in einer DNA-Gelelektrophorese aufgetrennt und dokumentiert.

### 2.3.16 mRNA und miRNA-Microarray

Microarrays für mRNA und miRNA ermöglichen eine vergleichende und quantitative Analyse des gesamten Transkriptoms von Zellen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein mRNA und miRNA Microarray durchgeführt, um den Einfluss verschiedener Faktoren auf die gesamte Genexpression in NFK zu untersuchen. Dies erfolgte in Kooperation mit Dr. Nicole Ludwig am Institut für Humangenetik am Universitätsklinikum des Saarlandes mit dem SurePrint G3 Human Gene Expression 8×60Kv3 Microarray und dem Human miRNA Microarray, Release 21.0, 8 x 60K. Beim mRNA-Microarray wird aus mRNA zuerst cDNA und dann cRNA synthetisiert, welche mit dem Cy3 fluoreszierenden Farbstoff markiert ist. Dahingegen wird miRNA direkt mit Cy3 markiert. Die markierte cRNA bzw. miRNA wird dann auf den Microarray gegeben, auf dessen Oberfläche sich an definierten Positionen spezifische Sequenzen befinden, die jeweils komplementär zu sämtlichen humanen Genen sind. Werden mRNAs bzw. miRNAs in einem Ansatz exprimiert, so bindet die erzeugte, Cy3 markierte cRNA bzw. miRNA auf dem Chip an ihr komplementäres Gegenstück. Letzteres kann mittels Fluoreszenz quantifiziert werden, wobei die Fluoreszenzintensität proportional zur Expressionsstärke des entsprechenden Gens ist.

Zur bioinformatischen Auswertung wurden die Microarray Daten Quantile-normalisiert und anschließend log<sub>2</sub>-transformiert. Außerdem wurden alle Gene, die nicht in mindestens einer Probe detektiert wurden, herausgefiltert. Dies erfolgte durch Viktoria Wagner, Doktorandin von

Prof. Dr. Andreas Keller am Lehrstuhl für klinische Bioinformatik, medizinische Fakultät an der Universität des Saarlandes.

Die relative Genexpression in Bezug auf die jeweils mitgeführte Kontrolle wurde durch  $2^{(\text{Behandlung-Kontrolle})}$  berechnet. Beim mRNA-Microarray wurden die Gene zusätzlich anhand der NM-Zugangsnummer (NM-Accession number) nach Protein-kodierenden Genen gefiltert.

### **2.3.17 Proteinextraktion**

#### **2.3.17.1 RIPA-Extraktion**

Proteinextrakte aus humanen Zellen wurden mit Radioimmunpräzipitationspuffer (RIPA-Puffer) generiert, welcher die Zelllyse und Solubilisierung von Proteinen bewirkt. Zur Proteinextraktion wurden diverse Versuche im 6-Well Format durchgeführt. Die Zellernte erfolgte direkt aus dem Well und wurde auf Eis durchgeführt. Zunächst wurde das Medium entfernt und die Zellen zwei Mal mit 2 ml kaltem PBS gewaschen. Danach wurden 150  $\mu$ l RIPA-Puffer in das Well pipettiert und mit einem Zellschaber auf dem Wellboden verteilt. Der RIPA-Puffer wurde zuvor nach Herstellerangaben mit Proteasen- und Phosphatasen-Inhibitoren (cOmplete<sup>TM</sup> und PhosSTOP<sup>TM</sup>) versetzt. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden die Ansätze in ein Reaktionsgefäß überführt und in einem Ultraschallbad 3x für 5 s sonifiziert. Die Ansätze wurden anschließend 30 min auf Eis inkubiert und dann 15 min bei 14000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand, in dem sich die extrahierten Proteine befinden, wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinkonzentration wurde mittels BCA-Assay bestimmt. RIPA-Proteinextrakte wurden bei -20 °C gelagert.

#### **2.3.17.2 M-PER-Extraktion**

Bei M-PER-Extrakten werden alle löslichen Proteine auf schonende, Amin-freie und nicht-denaturierende Weise aus humanen Zellen isoliert. Sie wurden beansprucht um Onkogen-exprimierende NFK in einem Kinase-Aktivitäts-Assay zu analysieren. NFK wurden bei 80-90 % Konfluenz direkt aus 6 cm Schalen und auf Eis im Zelllyse-Puffer geerntet. Dazu wurde das Medium verworfen und die Zellen zwei Mal mit 2 ml kaltem PBS gewaschen. Danach wurden 300  $\mu$ l des M-PER<sup>TM</sup> Extraktions-Reagenz, welches zuvor mit Halt Phosphatase Inhibitor Cocktail und Halt Protease Inhibitor Cocktail EDTA free (beide 1:100) ergänzt wurde, auf die Zellen gegeben und mit einem Zellschaber auf dem Zellkulturschalenboden verteilt. Die Ansätze wurden 15 min auf Eis inkubiert und dabei alle 5 min durch Resuspendieren



homogenisiert. Im Anschluss wurden die Ansätze 15 min bei 14000 g und 4 °C zentrifugiert. Die Proteine im Überstand wurden in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der Bradford Assay herangezogen. M-PER-Extrakte wurden bei -80 °C gelagert.

### **2.3.18 Konzentrationsbestimmung von Proteinen**

#### **2.3.18.1 BCA Assay**

Zur Messung der Proteinkonzentration von RIPA-Extrakten wurde das Pierce™ BCA-Protein Assay Kit nach Herstellerangaben verwendet. Hierbei werden in Anwesenheit von Proteinen Kupferionen reduziert und bilden dann mit BCA (Bicinchoninsäure) einen blau-violetten Farbkomplex. Die Intensität der Färbung wurde photometrisch am Victor X4 Plattenreader gemessen und anhand eines Protein-Größenstandards quantifiziert. Die Proben wurden 1:5 in PBS verdünnt und als Dubletten aufgetragen.

#### **2.3.18.2 Bradford Assay**

Proteinkonzentrationen von M-PER-Extrakten und Extrakten des Luciferase Assays wurden im Bradford Assay bestimmt. Das Bradford Reagenz enthält den Coomassie Brilliant Blue G-250 Farbstoff, der überwiegend an basische und aromatische Aminosäurenreste von Proteinen bindet. Dies geht mit einer Verschiebung des Absorptionsmaximums in den kurzwelligen, blauen Farbbereich einher, welche am Victor X4 Plattenreader gemessen wurde. Das Mitführen eines BSA-Proteingrößenstandards (0, 1, 2, 4, 6 und 10 µg) erlaubte die Quantifizierung der Proteinkonzentration. Für die Messung wurde in 96-Well Platten 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> vorgelegt und 2 µl der zu untersuchenden Probe hinzugegeben. Anschließend wurde das Bradford Reagenz 1:5 in H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> verdünnt und 150 µl wurden zu der Probe gegeben. Die Ansätze wurden 10 min bei RT inkubiert und dann gemessen. Die Konzentration wurde jeweils in Doppelansätzen bestimmt.

### **2.3.19 SDS-PAGE**

In einer SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) können Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Dies ermöglicht in einem darauffolgenden Western Blot eine Analyse spezifischer Proteinexpressionen. Bei der SDS-PAGE werden die Proteine vor dem Auftragen reduziert, denaturiert und mit einer negativen Ladung versehen. Das Anlegen eines elektrischen Feldes bewirkt die Bewegung der negativ geladenen Proteine

durch das Polyacrylamid-Gel in Richtung positiv geladener Anode, wobei sie in Abhängigkeit ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden.

Zur Durchführung einer SDS-PAGE wurden 15 µg (HaCaT) bzw. 10 µg (NFK) der Proteinextrakte in 1x Lämmli-Puffer aufgenommen und 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Nach kurzem Abkühlen wurden die Ansätze auf ein 10 %-iges Polyacrylamid-Gel aufgetragen und bis Erreichen des Trenngels bei 100 V und dann für ca. weitere 60 min bei 120 V aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte in einem Mini-Gel-Tank mit 1x TRIS-Glycin-SDS-Laufpuffer. Als Größenstandard wurde die Spectra™ mehrfarbige Proteinleiter (High Range) mitgeführt.

### 2.3.20 Western Blot

Beim Western Blot werden Proteine, die zuvor in einer SDS-PAGE aufgetrennt wurden, vom Polyacrylamid-Gel über Elektrottransfer auf eine Membran geblottet. Hier kann deren Expressionsstärke immunologisch mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurden Proteine nach einer SDS-PAGE auf eine Nitrozellulosemembran mit 0,45 µm Porengröße geblottet. Das Blotten erfolgte in einem Mini-Blot-Modul nach folgendem Aufbau (von der Katode zu Anode): Schwammpad, Whatman Filter, SDS-Gel, Nitrozellulosemembran, Whatman Filter, Schwammpad. Die Materialien wurden auf die Größe des SDS-Gels zugeschnitten und in Transferpuffer getränkt. Das Mini-Blot-Modul wurde in den Mini-Gel-Tank eingespannt und Innen mit Transferpuffer und Außen mit H<sub>2</sub>O gefüllt. Der Proteintransfer erfolgte für 45 min bei 300 mA. Im Anschluss wurde die Membran kurz in TBS gewaschen und der Erfolg des Proteintransfers wurde mittels Ponceau-Färbung überprüft. Dazu wurde die Membran 3-5 min in Ponceau S-Lösung geschwenkt, wodurch Proteine auf der Membran reversibel gefärbt wurden. Unspezifische Bindestellen wurden durch 30 min Inkubation auf einem Wippschüttler mit Blockpuffer blockiert. Danach wurde die Membran drei Mal 5 min in Waschpuffer gewaschen und dann über Nacht mit dem primären Antikörper bei 4 °C inkubiert. Je nach Angaben des Herstellers wurden die Antikörper in Blockpuffer oder in 5 % BSA in TBS verdünnt (s. 2.1.6). Am nächsten Tag wurde die Membran drei Mal 10 min mit Waschpuffer gewaschen und dann für 1 h bei 4 °C mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Nach erneutem Waschen mit Waschpuffer (drei Mal 10 min) wurden in Abhängigkeit der Membrangröße 300-600 µl des Peroxidase Substrats (WesternBright ECL HRP Substrat) auf die Membran gegeben. Die in der Peroxidase Reaktion erzeugte Chemilumineszenz ist dabei proportional zur Stärke der Proteinexpression bzw. zur Menge gebundener Antikörper und wurde am Azure-500 Gerät detektiert. Mit ImageJ wurde die Pixeldichte der jeweiligen

Proteinbanden bestimmt und auf die Expression der Referenzproteine  $\beta$ -Aktin oder GAPDH normiert.

### 2.3.21 Kinase-Aktivitäts-Assay

Der Kinase-Aktivitäts-Assay ist eine 3D Peptid Microarray Technologie, mit der ein globales Kinase-Aktivitätsprofil in Zellen erstellt werden kann. Für die Erstellung eines Kinase-Aktivitätsprofils werden sogenannte PamChips<sup>®</sup> verwendet, bei denen zahlreiche Peptidsequenzen mit einer Länge von 13 Aminosäuren auf einer Keramikmembran angeordnet sind. Diese Peptidsequenzen enthalten diverse Phosphorylierungsstellen, die aus der Literatur und *in silico*-Vorhersagen abgeleitet wurden. Im Kinase-Aktivitäts-Assay werden Serin/Threonin Kinasen (STK) und Protein-Tyrosin Kinasen (PTK) getrennt voneinander analysiert. Ein Array eines STK-PamChips enthält insgesamt 144 und der eines PTK-PamChips 196 der spezifischen Target-Peptidsequenzen, welche jeweils von einer oder mehreren upstream Kinasen phosphoryliert werden können. Nach Zugabe der Probe werden die Peptidsequenzen in Abhängigkeit der Kinasen-Aktivitäten im Zelllysate unterschiedlich stark phosphoryliert. Detektiert werden die phosphorylierten Peptide mit Phosphorylierungsspezifischen und Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper. Die Fluoreszenzintensität ist proportional zur Anzahl der Peptidphosphorylierungen und wird in Relation zum mitgeführten Kontrollansatz gesetzt. Bioinformatische Analysen erlauben es, anhand der Fluoreszenzintensitäten und des Phosphorylierungsmusters, Rückschlüsse auf die potenziell involvierten Kinasen zu ziehen, die für den Unterschied der Peptidphosphorylierungen (Behandlung vs. Kontrolle) verantwortlich sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Kinase-Aktivitätsprofil von 8E6-exprimierenden und pLXSN Leervektor enthaltenden NFK erstellt. Die Durchführung und Auswertung erfolgte von der Firma PamGene International BV, Herzogenbusch, Niederlande. Von den entsprechenden Zellen wurden M-PER-Extrakte hergestellt (s. 2.3.17.2) und an die Firma PamGene versandt. Dargestellte Graphen bezüglich des Kinase-Aktivitätsprofils 8E6-exprimierender NFK wurden von der Firma PamGene generiert.

### 2.3.22 ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*)

In einem ELISA können Proteine in Flüssigkeiten detektiert und quantifiziert werden. Hier wurde im ELISA die Expression des CCL2 Chemokins in Zellkulturüberständen ermittelt. Dies erfolgte mit dem ELISA MAX<sup>™</sup> Deluxe Set (Human MCP-1/CCL2) nach Angaben des

Herstellers in Nunc MaxiSorp Immuno 96-Well Platten. Hierbei handelt es sich um einen Sandwich-ELISA. Im ersten Schritt wird das Well mit einem Capture-Antikörper beschichtet. Bei Zugabe der Probe bindet der Capture-Antikörper das zu untersuchende Antigen. Im nächsten Schritt erkennt der biotinylierte Detektions-Antikörper das Antigen, sodass ein Antikörper-Antigen-Antikörper Komplex entsteht. Anschließend wird eine Avidin-gebundene Meerrettichperoxidase (HRP) als Reporterenzym dazugegeben. Über die Interaktion von Avidin und Biotin kann das HRP-Konjugat an den Detektions-Antikörper binden. Bei Zugabe ihres Substrats setzt die Meerrettichperoxidase Tetramethylbenzidin (TMB) in ein blaues Produkt um, dessen Farbintensität proportional zur Antigen Konzentration ist. Nach Abstoppen der Reaktion färbt die Lösung sich gelb und kann bei einer Wellenlänge von 450 nm photometrisch quantifiziert werden. Das Mitführen eines Proteingrößenstandards ermöglichte die Bestimmung der absoluten Proteinkonzentration. Die Messung erfolgte am Mini ELISA Plate Reader.

### **2.3.23 Multiplex-Immuno Assay**

In einem Multiplex-Immuno Assay kann in einer Probe eine Vielzahl von Proteinen gleichzeitig quantifiziert werden. Hierfür werden spezifische Bead-gekoppelte Capture-Antikörper verwendet. Die Beads werden jeweils mit zwei fluoreszierenden Farbstoffen markiert. Beads mit verschiedenen Antikörpern unterscheiden sich durch ein spezifisches Verhältnis der beiden Farbstoffe, wodurch sie bei der Messung mit entsprechenden Lasern voneinander abgegrenzt und dem jeweiligen Antikörper bzw. Antigen zugeordnet werden können. Über biotinylierte Detektions-Antikörper, welche das Streptavidin-Phycoerythrin (SA-PE) Reporter Konjugat binden, können Antigene mittels Fluoreszenz quantifiziert werden. Bei der Messung werden somit die Beads in eine Kapillare eingezogen, wo sie durch einen roten Laser klassifiziert bzw. dem Antigen zugeordnet werden, wohingegen ein grüner Laser das gebundene Antigen quantifiziert. Der Multiplex-Immuno Assay wurde verwendet, um in Zellüberständen verschiedener Versuche ein Zytokin-Screening durchzuführen. Letzteres erfolgte mit dem Bio-Plex Pro Human Cytokine Screening Panel (48-Plex) Kit nach Angaben des Herstellers. Zur Messung wurde das Bio-Plex 200 System herangezogen.

### **2.3.24 Luciferase Assay**

Bei einem Luciferase Assay handelt es sich um einen Reporter Assay, bei dem die Luciferase als Reporter gen eingesetzt wird, um in Zellen die Aktivität bestimmter Promotor DNA-

Bereiche zu bestimmen. In den Luciferase Konstrukten steht die Expression des Luciferase Gens unter Kontrolle des zu untersuchenden Promotorbereichs. In Abhängigkeit der Promotoraktivität wird somit die Luciferase unterschiedlich stark exprimiert. Die Luciferase Expression kann durch Zugabe ihres Substrats Luciferin quantifiziert werden. Unter ATP-Verbrauch wird Luciferin oxidiert, wobei es zur Biolumineszenz kommt, die photometrisch gemessen werden kann und proportional zur Luciferase Expression bzw. Promotoraktivität ist. Hier wurde der Luciferase Assay zur Bestimmung der Aktivität verschiedener CCL2 Promotor Konstrukte in HPV8 E6-exprimierenden HaCaT Zellen benutzt. Dazu wurden pLXSN-enthaltende und 8E6-exprimierende HaCaT Zellen im 12-Well ausgesät (s. 2.2.4) und mit den CCL2 Promotor Konstrukten (in pGL4.16) mittels Lipofectamin 2000 transfiziert. Bei Co-Transfektionen von Expressionsplasmiden wurden 500 ng Luciferase Konstrukt mit 300 ng Expressionsplasmid transfiziert. Zur Co-Transfektion von siRNA erfolgte an Tag 2 zunächst die siRNA Transfektion mittels Lipofectamin RNAiMAX und an Tag 3 die Reportergen Transfektion. Co-Transfektionen mit siRNA wurden schließlich an Tag 5 geerntet. Für die Zellernte wurde das Medium verworfen und die Zellen zwei Mal in 1 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen im Well durch Zugabe von 120 µl Extraktionspuffer und 10 min Inkubation lysiert. Von den Extrakten wurden 50 µl in eine schwarze 96-Well Platte (OptiPlate) pipettiert. Am Victor X4 Plattenreader wurde über das Dispenser Modul 150 µl Reaktionspuffer zu den Ansätzen gegeben, wobei unmittelbar die Biolumineszenz der Luciferase Reaktion gemessen wurde. Die erhaltenen Werte wurden auf die jeweilige Proteinkonzentration und Transfektionseffizienz normiert. Dazu wurde zum einen von den Extrakten die Proteinkonzentration mittels Bradford Assay bestimmt. Zum anderen wurden zur Bestimmung der Transfektionseffizienz Ansätze mitgeführt, die parallel mit einem GFP-Konstrukt transfiziert wurden und dann im FACS analysiert wurden (s. 2.3.4).

### **2.3.25 Immunhistochemische Färbung**

Mit einer immunhistochemischen Färbung (IHC) können Proteinexpressionsanalysen in Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten (FFPE) Gewebeschnitten durchgeführt werden, welche Aufschluss über die Stärke und Lokalisation der Proteinexpression geben. Mittels IHC wurde die CCL2 Expression in EV-Läsionen analysiert. Dazu wurden am Rotationsmikrotom 6 µM dicke Schnitte der Präparate angefertigt und über Nacht bei 37 °C getrocknet. Die Schnitte wurden zunächst drei Mal 10 min in Xylol deparaffiniert und dann in einer absteigenden Ethanolreihe (99 %, 90 %, 80 %, 70 %, 50 %, jeweils 2 min) rehydriert. Antigene wurden nach 5 min Waschen in H<sub>2</sub>O durch 10 min Aufkochen in Citratpuffer in der Mikrowelle

demaskiert. Nach 15 min Abkühlen wurden die Schnitte 5 min in TBS gewaschen und zum Blocken unspezifischer Bindestellen 20 min mit 2,5 % Pferdeserum in einer Feuchtkammer inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit dem primären Antikörper (verdünnt in 0,5 % BSA in TBS) über Nacht bei 4 °C in einer Feuchtkammer inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Ansätze 5 min in TBS gewaschen und 30 min mit dem AP-gekoppelten sekundären Antikörper inkubiert. Nach zwei Mal 5 min Waschen in TBS wurde das ImmPACT Vektor Red AP Substrat auf die Schnitte gegeben und 5 min im Dunkeln inkubiert. Das Substrat wurde nach Herstellerangaben in 100 mM Tris-HCl pH 8,3 angesetzt. Nach der Substratentwicklung wurden die Schnitte kurz in H<sub>2</sub>O gespült, 20 s mit Hämatoxylin gegengefärbt und 5 min mit laufendem warmem Wasser gebläut. Zum Dehydrieren wurden die gefärbten Schnitte kurz in einer aufsteigenden Ethanolreihe (50 %, 70 %, 80 %, 90 % und 2 min 99 %) geschwenkt und dann 5 min in Xylol inkubiert. Nach kurzem Trocknen wurden die Schnitte in Vectamount mit einem Deckglas auf einem Objektträger eingedeckt. Die Färbungen wurden am Inversmikroskop DMI 6000B dokumentiert.

### **2.3.26 Immunfluoreszenz Färbung**

Bei einer Immunfluoreszenz Färbung (IF) kann mit Hilfe von Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern das Proteinexpressionsmuster in Monolayer Zellkulturen oder in Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Gewebeschnitten analysiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden FFPE-organotypische 3D Kulturen mittels IF gefärbt. Die Färbungen wurden mit dem Alexa Fluor™ 555 Tyramid SuperBoost Kit nach Herstellerangaben durchgeführt. Die FFPE-Schnitte, das Deparaffinieren, das Rehydrieren und die Antigendemaskierung erfolgten analog zur IHC (s. 2.3.25). Endogene Peroxidasen wurden im Anschluss durch 60 min Inkubation mit 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> abgedunkelt in einer Feuchtkammer inaktiviert. Daraufhin wurden unspezifische Bindestellen durch 20 min Inkubation mit 2,5 % Pferdeserum blockiert. Die Schnitte wurden danach mit dem primären Antikörper (verdünnt in 0,5 % BSA in PBS) über Nacht bei 4 °C in einer Feuchtkammer inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte 5 min in PBS gewaschen und dann 30 min mit dem sekundären Alexa Fluor 555 Antikörper inkubiert. Ab hier wurden alle Schritte weitestgehend im Dunkeln durchgeführt. Die Schnitte wurden drei Mal 5 min in PBS gewaschen und dann 10 min mit der Tyramid-Working Lösung inkubiert. Unmittelbar danach folgte eine Inkubation von 10 min mit der Reaction-Stop Lösung. Es folgten erneut drei Waschschrte für 5 min in PBS. Danach wurden die Schnitte 2 min mit 0,1 % DAPI (in Methanol) gefärbt, zwei Mal mit 1 ml Methanol gespült und dann mit Vectashield und einem Deckglas auf einem Objektträger eingedeckt. Die Färbungen wurden

im Dunkeln bei 4 °C aufbewahrt und am Inversmikroskop DMI 6000B mit Fluoreszenz-Funktion in Graustufen dokumentiert. Farben wurden nachträglich mit ImageJ eingefügt.

### **2.3.27 Statistische Auswertung**

Für die Auswertung von Ergebnissen wurden die erforderlichen mathematischen Berechnungen mit Microsoft Excel (2016) durchgeführt. Dargestellte Graphen wurden mit GraphPad PRISM (Version 9) generiert. Signifikanzen wurden mit einem ungepaarten, zweiseitigen T-Test in GraphPad PRISM (Version 9) bestimmt. Sofern nicht anders angegeben, stammen alle dargestellten Ergebnisse aus  $\geq 3$  unabhängigen biologischen Experimenten. Abbildungen wurden, sofern nicht anders angegeben, mit Microsoft PowerPoint (2016) erstellt.

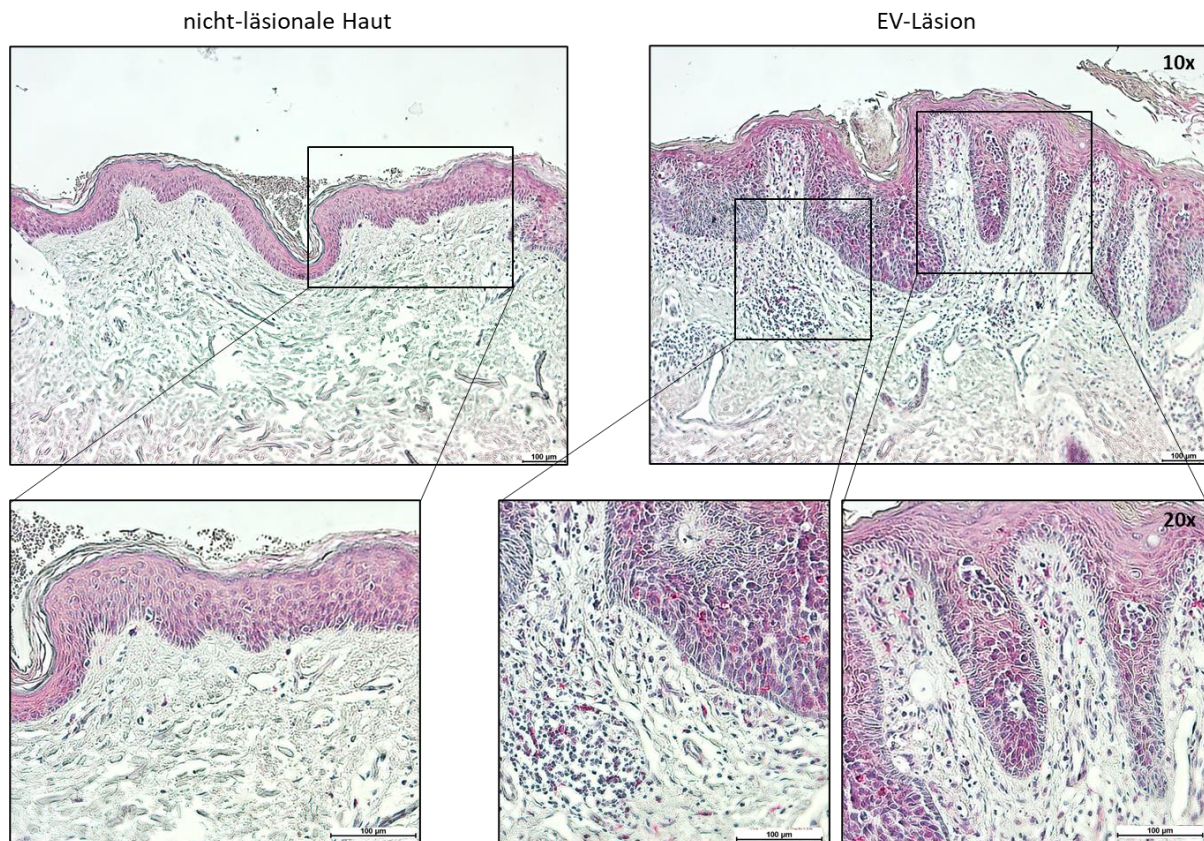
### 3 Ergebnisse

Das kutane humane Papillomvirus Typ 8 (HPV8) ist bei EV-Patienten mit der Entstehung von Plattenepithelkarzinomen (SCC) an sonnenexponierten Körperstellen assoziiert. Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen von HPV8 Onkoproteinen während der UV-induzierten Karzinogenese sind jedoch noch nicht vollständig verstanden. Deregulationen von Komponenten des Immunsystems, die Schlüsselkomponenten diverser Krebsformen darstellen, zählen zu den mit HPV8-assoziierten Alterationen in Patienten, aber auch in HPV8-*early region* bzw. HPV8-E6-transgenen Mäusen. In dieser Hinsicht deuten vorangegangene Arbeiten der Arbeitsgruppe (AG Smola) darauf hin, dass EV-Läsionen verstärkt von Makrophagen infiltriert werden, was möglicherweise auf eine Induktion des CCL2 Chemokins durch das HPV8 E6 Protein zurückgeht (Sperling, 2009, Vella, 2019). Im Folgenden sollen sowohl die Rekrutierung von Makrophagen als auch die molekularen Mechanismen der HPV8-vermittelten CCL2 Expression in EV-Läsionen weiter charakterisiert und aufgeklärt werden.

#### 3.1 Erhöhte Makrophagen-Infiltration und CCL2 Expression in EV-Läsionen

Um eine Makrophagen-Infiltration in läsionaler Haut von EV-Patienten zu analysieren, wurden FFPE-Schnitte von HPV8-positiven EV-Läsionen immunhistochemisch gegen CD68 angefärbt, einen allgemein anerkannten Marker für Makrophagen (Abbildung 8). In der läsionalen Haut von EV-Patienten war eine starke Infiltration von CD68-exprimierenden Makrophagen zu erkennen, die ungleichmäßig in der Dermis verteilt war. Während Makrophagen unmittelbar unterhalb der Epidermis stark akkumulierten, verringerte sich deren Detektionsdichte mit zunehmender Entfernung zur Epidermis. Makrophagen konnten ebenfalls im Epithel detektiert werden. Im Gegensatz dazu konnte im nicht-läsionalen Gewebe kein Makrophagen Infiltrat nachgewiesen werden. Des Weiteren ist zu erwähnen, dass in der Dermis von EV-Läsionen neben Makrophagen sich auch andere Immunzellen im Infiltrat befanden, die nicht mit CD68 Antikörpern reagierten.

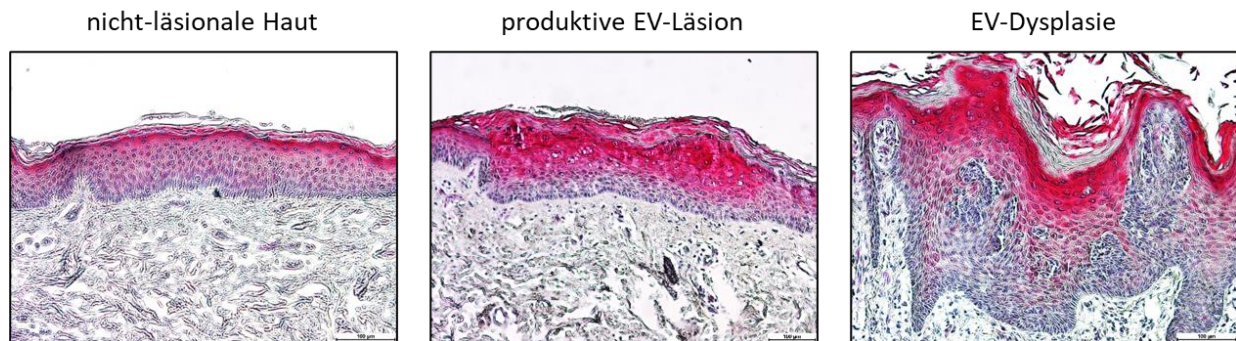




**Abbildung 8. CD68 Färbung von EV-Läsionen.** FFPE-Schnitte von EV-Gewebeproben wurden immunhistochemisch gegen CD68 gefärbt (rot). Es sind läsionale und nicht-läsionale Hautbereiche dargestellt. Vergrößerung: 10x (oben) und 20x (unten). Skalierung: 100 µm.

Bevor Makrophagen in das Gewebe migrieren, zirkulieren sie als Monozyten im Blut. Erst als Reaktion auf Chemotaxis auslösende Zytokine verlassen Monozyten die Blutgefäße und infiltrieren das Gewebe, wo sie zu Makrophagen differenzieren.

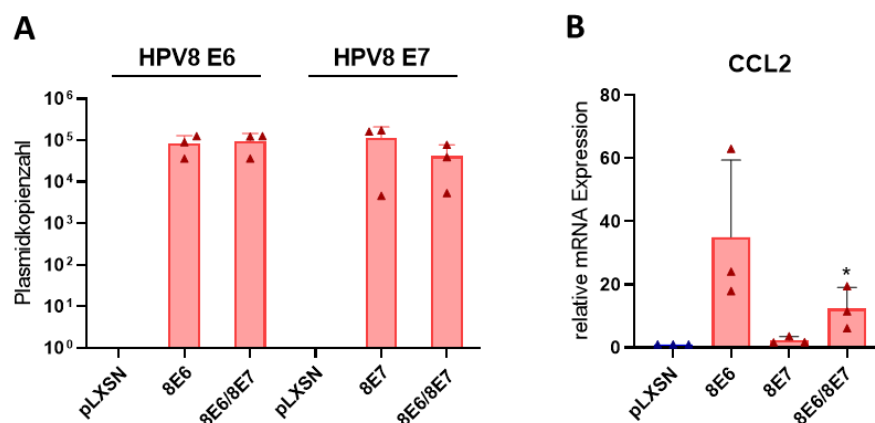
Insbesondere CCL2 zählt zu den Chemokinen, die die Migration von Monozyten zu inflammatorischen Körperstellen auslösen können. Aus diesem Grund wurde im Weiteren die CCL2 Expression in EV-Läsionen analysiert. Dazu wurden FFPE-Schnitte von EV-Läsionen immunhistochemisch gegen CCL2 gefärbt (Abbildung 9). Die CCL2 Färbung zeigte eine schwache Expression des Chemokins in nicht-läsionaler Haut, vornehmlich in differenzierten Zellschichten. In den suprabasalen Schichten produktiver Läsionen und EV-Dysplasien war die Expression des CCL2 Chemokins deutlich stärker. Im Gegensatz dazu war CCL2 in der epidermalen Basalzellschicht von EV-Läsionen, ähnlich zur nicht-läsionalen Haut, nur schwach exprimiert.



**Abbildung 9. CCL2 Färbung von EV-Läsionen.** FFPE-Schnitte von EV-Gewebeproben wurden immunhistochemisch gegen CCL2 gefärbt (rot). Die jeweiligen Bereiche der EV-Läsion sind angegeben. Vergrößerung: 20x. Skalierung 100  $\mu$ m.

### 3.2 CCL2 wird von HPV8 E6 induziert und steigert die *in vitro* Migration von Monozyten

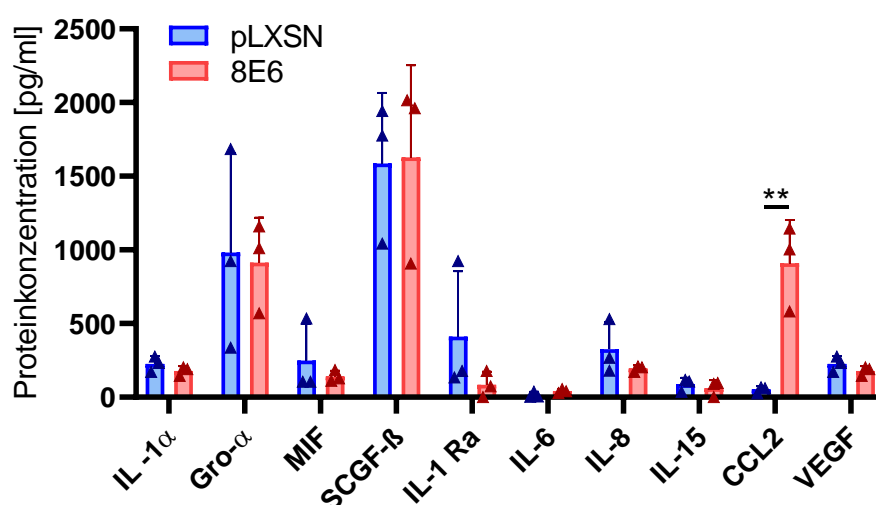
Da bei der Typisierung von EV-Läsionen HPV8 DNA detektiert wurde (Diagnostik am Institut für Virologie am Universitätsklinikum des Saarlandes) und HPV Onkoproteine inflammatorische Prozesse regulieren können, wurde im nächsten Schritt untersucht, inwieweit die erhöhte CCL2 Expression in EV-Läsionen mit HPV8 assoziiert ist. Dazu wurden mittels retroviralem Gentransfer HaCaT Zellen generiert, welche die HPV8 Onkogene E6 (8E6), E7 (8E7) und E6/E7 (8E6/8E7) stabil exprimieren bzw. den pLXSN Leervektor enthalten. Die Expression der Onkogene wurde in einer qRT-PCR überprüft und bestätigt (Abbildung 10A). In den untersuchten Ansätzen wurden zwischen  $10^4$  und  $10^5$  Kopien der jeweiligen Onkogene exprimiert. Anschließend wurde in einer qRT-PCR die Expression des CCL2 Chemokins auf mRNA-Ebene bestimmt (Abbildung 10B).



**Abbildung 10. CCL2 Induktion in HPV8 E6-exprimierenden HaCaT Zellen.** Von pLXSN Leervektor enthaltenden und 8E6-exprimierenden HaCaT Zellen wurde RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. In einer qRT-PCR wurde die Expression von (A) HPV8 E6 und E7 und (B) CCL2 quantifiziert. Die Werte wurden auf die Expression des Haushaltgens RPL13a normiert. Die Daten aus B wurden im Rahmen meiner Masterarbeit generiert und hier neu ausgewertet. \* $p < 0,05$ .

Im Vergleich zu pLXSN Leervektor enthaltenden Zellen, war die CCL2 mRNA Expression in 8E6-, aber nicht in 8E7-exprimierenden Zellen stark und signifikant erhöht. Dies entsprach einer 12,4-fachen (8E6/E7) bzw. 35-fachen (8E6) Induktion der CCL2 Genexpression im Vergleich zur pLXSN Kontrolle.

Da neben CCL2 auch andere Zytokine chemotaktisch auf Monozyten wirken können, die möglicherweise ebenfalls von 8E6 reguliert werden könnten, wurde ein Zytokin-Screening mit einem Multiplex Immuno Assay durchgeführt. Hier wurde von insgesamt 48 verschiedenen Zytokinen die Proteinkonzentration in Überständen 8E6-exprimierender HaCaT Zellen gemessen (Abbildung 11). Für die Auswertung wurden hier nur Zytokine berücksichtigt, die in einer Konzentration  $\geq 30$  pg/ml exprimiert wurden. Von 48 gemessenen Zytokinen betraf letzteres in HaCaT Zellen insgesamt 10 Zytokine. Alle übrigen Zytokine lagen unter diesem Schwellenwert oder waren nicht detektierbar (s. Anhang Tabelle 9). Zu den schwach exprimierten Zytokinen in HaCaT pLXSN-enthaltenden Zellen zählten neben IL-6, IL-8, IL-15 und VEGF auch CCL2 mit 52 pg/ml. Kein anderes Zytokin wurde in 8E6-exprimierenden HaCaT Zellen so stark und signifikant induziert wie CCL2. Mit einer Induktion auf 910 pg/ml durch 8E6 gehörte CCL2 zusammen mit GRO $\alpha$  (914 pg/ml) und SCGF $\beta$  (1630 pg/ml) zu den am stärksten exprimierten Zytokinen. Andere Zytokine, wie MCP-3, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , CCL5, M-CSF und GM-CSF, die chemotaktisch auf Monozyten wirken können, wurden in pLXSN-enthaltenden und 8E6-exprimierenden HaCaT Zellen kaum bzw. gar nicht exprimiert. Darüber hinaus ging aus dem Zytokin-Screening hervor, dass der IL-1 Rezeptorantagonist (IL-1 Ra) in 8E6-exprimierenden HaCaT Zellen (84 pg/ml) schwächer exprimiert war als in pLXSN-enthaltenden Zellen (410 pg/ml).



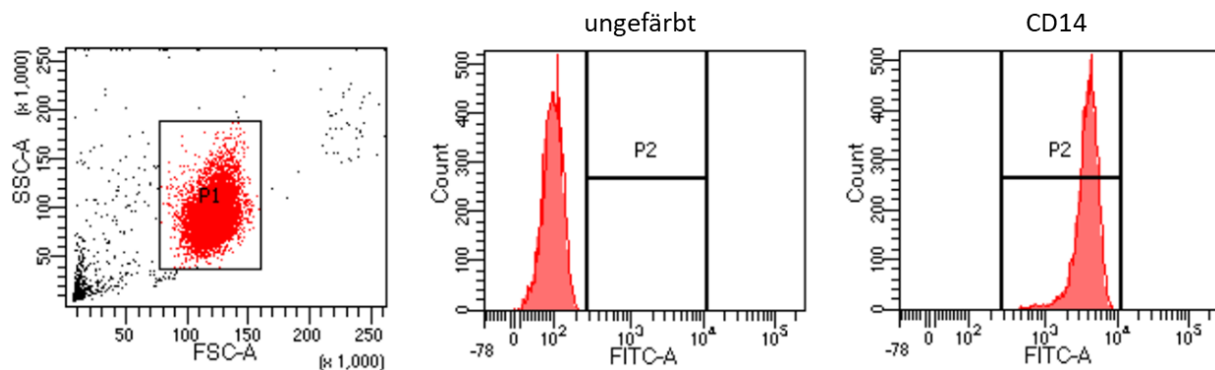
**Abbildung 11. Zytokin-Screening in HPV8 E6-exprimierenden HaCaT Zellen.** In Überständen von HaCaT pLXSN-enthaltenden und 8E6-exprimierenden Monokulturen wurde in einem Multiplex



Immuno Assay die Proteinkonzentration von 48 Zytokinen bestimmt. Es sind Zytokine mit einer Expression  $\geq 30$  pg/ml dargestellt. \*\* $p < 0,01$ .

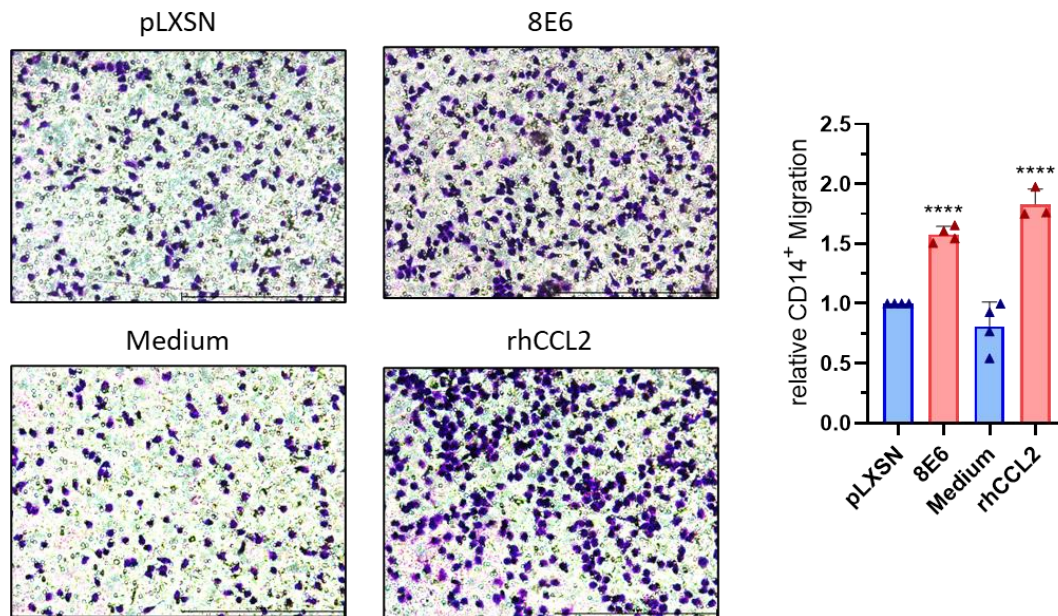
Da nach dem Ergebnis des Zytokin-Screenings CCL2 in 8E6-exprimierenden HaCaT Zellen deutlich induziert wurde, wurde im Weiteren analysiert, wie sich die 8E6-assoziierte CCL2 Induktion auf das migratorische Verhalten von Monozyten auswirkt.

Zu diesem Zweck wurden CD14<sup>+</sup> humane Monozyten aus dem peripheren Vollblut gesunder freiwilliger Spender durch Dichtegradient-Zentrifugation und anschließender MACS aufgereinigt. Um den Erfolg der Aufreinigung zu überprüfen und eine Kontamination mit anderen Zelltypen auszuschließen, wurde zunächst eine Immunfluoreszenzfärbung mit einem FITC-markierten Antikörper gegen humanes CD14 durchgeführt, die anschließend im Durchflusszytometer gemessen wurde (Abbildung 12). Die Reinheit der aufgereinigten CD14<sup>+</sup>-exprimierenden Monozyten betrug 97 %.



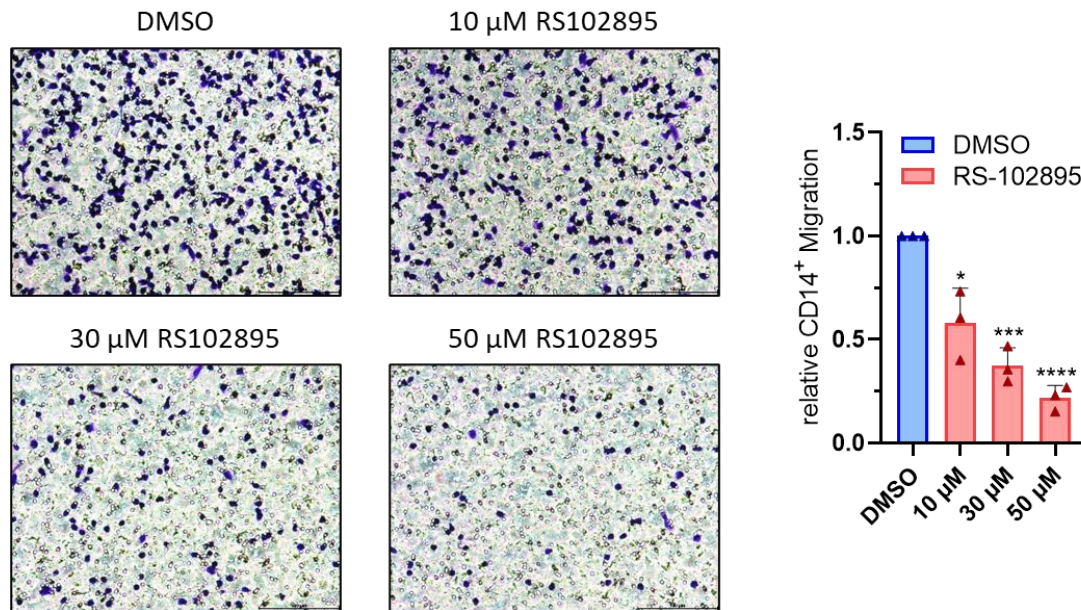
**Abbildung 12. Reinheitsbestimmung aufgereinigter CD14<sup>+</sup> Monozyten.** Aus peripherem Vollblut wurden CD14<sup>+</sup> Monozyten durch Dichtegradient-Zentrifugation und MACS aufgereinigt und mit einem FITC markierten, gegen CD14 gerichteten Antikörper auf ihre Reinheit überprüft. Im FACS wurde von Zellen der Hauptpopulation (P1) die Menge CD14-exprimierender Zellen im FITC-Kanal gemessen (P2). SSC=Seitwärtsstreulicht, FSC=Vorwärtsstreulicht.

Die aufgereinigten CD14<sup>+</sup> Monozyten wurden anschließend in einem Migrations-Assay eingesetzt und dem Überstand von pLXSN-enthaltenden und 8E6-exprimierenden HaCaT Zellen exponiert. Nach 4 h wurden migrierte Zellen mit Kristallviolett angefärbt und quantifiziert (Abbildung 13). Im Migrations-Assay war eine basale Migration von Monozyten zu beobachten, die durch DMEM-Vollmedium bedingt wurde. Diese basale Migration wurde in pLXSN Ansätzen nur schwach überschritten. Außerdem war im Migrations-Assay ersichtlich, dass Monozyten, die dem Überstand von 8E6-exprimierenden HaCaT Zellen exponiert wurden, signifikant mehr migrierten (1,6-fach) als in pLXSN Kontrollansätzen. Die 8E6-induzierte Monozyten-Migration war dabei vergleichbar zur Positivkontrolle (1,8-fach) mit rhCCL2 (1 µg/ml).



**Abbildung 13. 8E6 induziert die *in vitro* Migration von Monozyten.** Links: Migrations-Assay mit CD14<sup>+</sup> Monozyten, die dem Überstand von pLXSN-enhaltenden oder 8E6-exprimierenden HaCaT Zellen exponiert wurden. Nach 4 h wurde die Monozyten-Migration über eine Membran mit Mikroporen durch eine Kristallviolett-Färbung visualisiert. Es wurden Ansätze mit Medium als Negativkontrolle und mit rekombinanten humanen (rh) CCL2 (1 µg/ml) als Positivkontrolle mitgeführt. Rechts: relative Darstellung der Monozyten Migration. Migrierte Zellen wurden anhand mikroskopischer Aufnahmen von je sechs unabhängigen Bereichen gezählt, zusammengefasst und in Relation zu pLXSN Ansätzen gesetzt. Vergrößerung: 20x. Skalierung: 200 µm. \*\*\*\*p<0,0001.

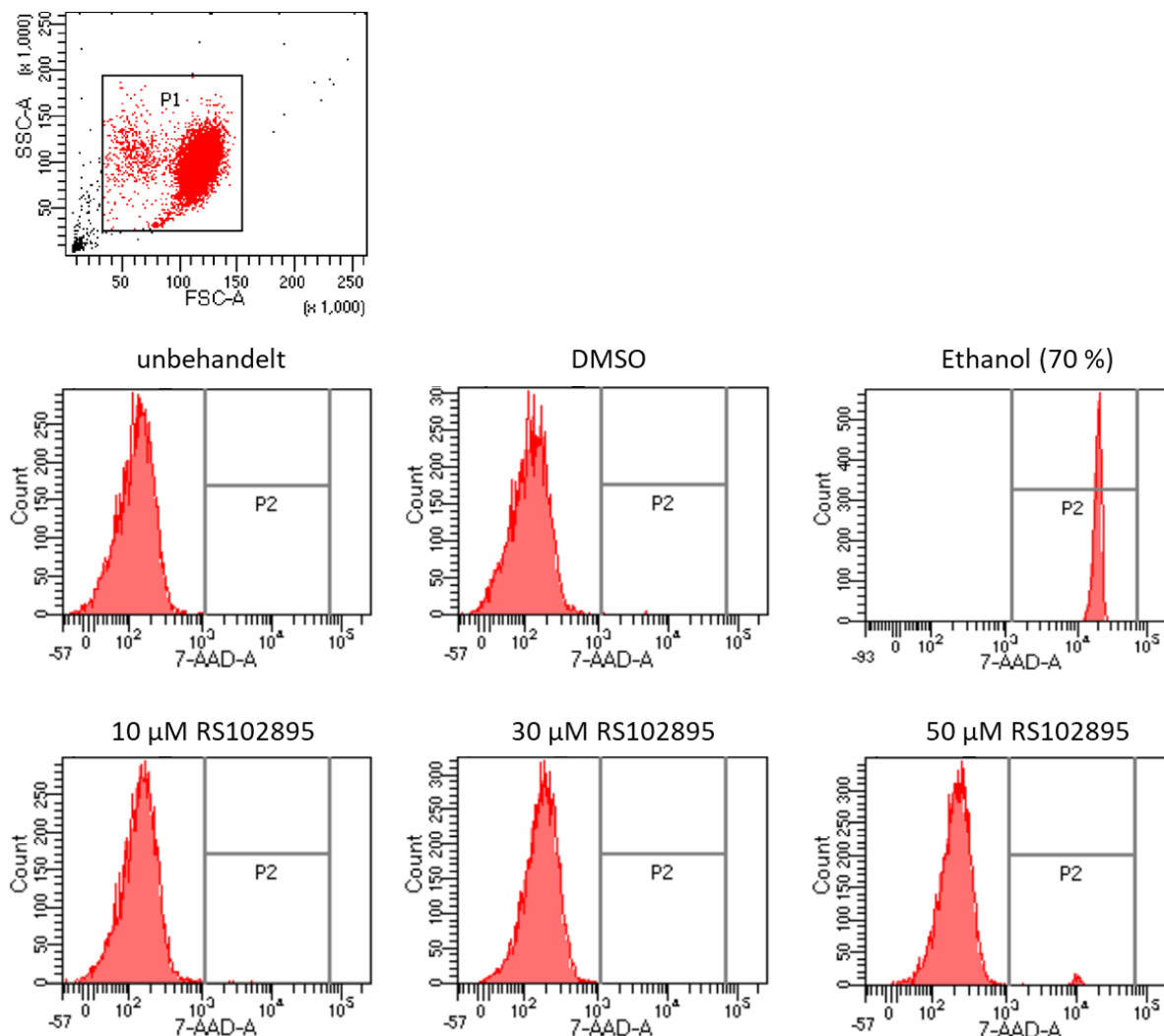
Da Überstände von 8E6-exprimierenden HaCaT Zellen die migratorische Kapazität von Monozyten *in vitro* signifikant erhöht haben und 8E6 CCL2 auf mRNA- und Proteinebene induziert, sollte nachgewiesen werden, ob die 8E6-induzierte Monozyten-Migration tatsächlich CCL2-abhängig ist. Dazu wurden CD14<sup>+</sup> Monozyten mit dem RS-102895 Inhibitor behandelt, woraufhin deren migratorische Kapazität im Migrations-Assay mit dem Überstand von 8E6-exprimierenden HaCaT Zellen untersucht wurde (Abbildung 14). Bei RS-102895 handelt es sich um einen CCR2 Antagonisten, der die CCL2 stimulierte Chemotaxis von Monozyten blockiert (Mitchell et al., 2013). Der Migrations-Assay mit RS-102895 vorbehandelten Monozyten zeigte, dass die durch 8E6-stimulierte *in vitro* Migration signifikant unterdrückt wurde. Insbesondere war dabei eine konzentrationsabhängige Repression der Monozyten-Migration zu beobachten. Im Vergleich zu DMSO-Kontrollansätzen wurde die Migration mit steigender Konzentration des CCR2 Inhibitors auf das 0,58-fache bei 10 µM, 0,37-fache bei 30 µM und 0,22-fache bei 50 µM RS-202895 Behandlung reduziert.



**Abbildung 14. 8E6 stimuliert CCL2/CCR2-abhängig die *in vitro* Migration von Monozyten.** Links: CD14<sup>+</sup> Monozyten wurden 1 h mit dem CCR2 Inhibitor RS-102895 (10 µM, 30 µM und 50 µM) bzw. mit DMSO als Negativkontrolle inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in einem Migrations-Assay dem Überstand von 8E6-exprimierenden HaCaT Zellen exponiert. Nach 4 h wurde die Monozyten Migration über eine Membran mit Mikroporen mittels Kristallviolett-Färbung visualisiert. Rechts: relative Darstellung der Monozyten Migration. Migrierte Zellen wurden anhand mikroskopischer Aufnahmen von je sechs unabhängigen Bereichen gezählt, zusammengefasst und in Relation zur DMSO-Kontrolle gesetzt. Vergrößerung: 20x. Skalierung: 100 µm. \*p<0,05, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001.

Damit ausgeschlossen werden kann, dass potenziell toxische Effekte des RS-102895 Inhibitors für die Unterdrückung der Monozyten-Migration verantwortlich waren, wurde die Zellviabilität nach der Behandlung mit dem Inhibitor bestimmt. Dafür wurden Monozyten analog zum Migrations-Assay mit RS-102895 behandelt und anschließend mit 7-AAD gefärbt, einem fluoreszierenden, Membran-impermeablen Farbstoff, der von toten Zellen aufgenommen wird und in die DNA interkaliert. Die 7-AAD-Färbung wurde im Durchflusszytometer analysiert (Abbildung 15). Das Resultat der Monozyten Viabilitätsmessung zeigte, dass DMSO allein mit 98,9 % Viabilität einen minimalen Effekt auf die Zellviabilität im Vergleich zu unbehandelten Monozyten hatte. In Bezug auf den DMSO-Kontrollansatz waren die mit 10 µM und 30 µM RS-102895 behandelten Monozyten zu 100 % vital, während eine Behandlung mit 50 µM RS-102895 die Zellviabilität auf 98,4 % reduzierte (Abbildung 15).

Basierend auf diesen Ergebnissen induziert das HPV8 E6 Onkogen die Expression des CCL2 Chemokins auf mRNA- und Proteinebene in HaCaT Zellen und steigert dadurch die CCL2/CCR2-abhängige *in vitro* Migration von CD14<sup>+</sup> Monozyten.



**Abbildung 15. Einfluss von RS-102895 auf die Zellviabilität von Monozyten.** CD14<sup>+</sup> Monozyten wurden 1 h mit dem CCR2 Inhibitor RS-102895 (10 µM, 30 µM und 50 µM) bzw. mit DMSO als Negativkontrolle inkubiert und analog zum Migrations-Assay behandelt. Im Anschluss wurden tote Zellen mit 7-AAD gefärbt und im FACS analysiert. Zellen der Hauptpopulation (P1) wurden im 7-AAD-Kanal auf die Aufnahme des Farbstoffs überprüft. Als Positivkontrolle der 7-AAD-Aufnahme toter Zellen wurden Monozyten mit 70 % Ethanol behandelt. SSC=Seitwärtsstreulicht, FSC=Vorwärtsstreulicht.

### 3.3 Der C/EBP $\alpha$ -p63-Signalweg ist in die HPV8 E6-abhängige CCL2 Induktion involviert

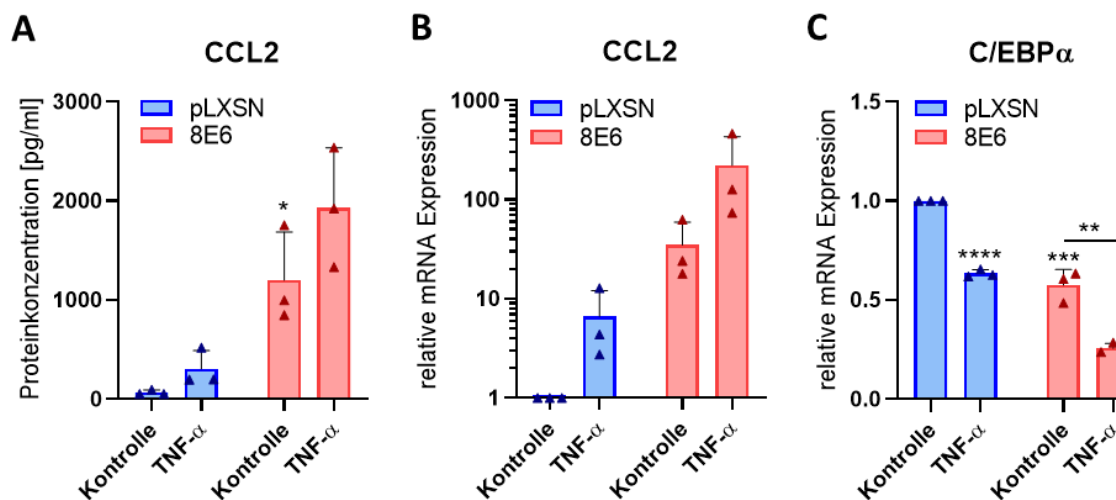
Nachdem gezeigt wurde, dass HPV8 E6 CCL2 in HaCaT Zellen induziert, wurden die molekularen Mechanismen der CCL2 Induktion tiefergehender analysiert.

Das Zytokin Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) ist an der Regulation zahlreicher inflammatorischer Prozesse beteiligt und seine Rolle als Induktor diverser Zytokine ist in der Literatur umfassend beschrieben. TNF- $\alpha$  hat ebenfalls eine stark aktivierende Wirkung auf die



CCL2 Genexpression (s. 1.6.2). Da beschrieben wurde, dass der TNF- $\alpha$  Signalweg eine Repression von C/EBP $\alpha$  beinhalten kann (Stephens und Pekala, 1991) und C/EBP $\alpha$  als Target des HPV8 E6 Onkoproteins beschrieben wurde (Marthaler et al., 2017), sollte im Folgenden untersucht werden, ob C/EBP $\alpha$  einen Regulator der CCL2 Expression darstellt.

Zunächst wurde der Zusammenhang zwischen TNF- $\alpha$  und HPV8 E6 in Bezug auf die Unterdrückung von C/EBP $\alpha$  in HaCaT Zellen charakterisiert. Dazu wurden pLXSN-enthaltende und 8E6-exprimierende HaCaT Zellen mit TNF- $\alpha$  stimuliert und auf die Expression von CCL2 und C/EBP $\alpha$  untersucht (Abbildung 16).



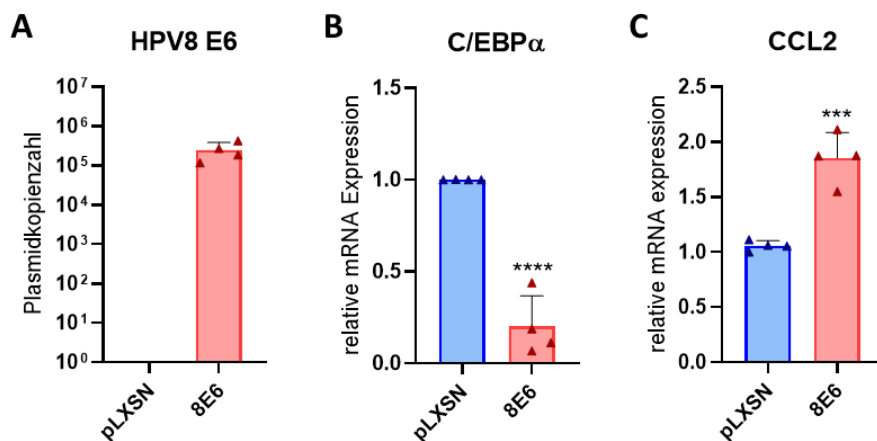
**Abbildung 16. Zusammenhang zwischen C/EBP $\alpha$  Repression und CCL2 Induktion durch TNF- $\alpha$  und HPV8 E6.** pLXSN-enthaltende und 8E6-exprimierende HaCaT Zellen wurden mit 1000 U/ml TNF- $\alpha$  stimuliert und nach 16 h geerntet. **A:** In dem jeweiligen Zellüberstand wurde mit einem ELISA die CCL2 Proteinkonzentration bestimmt. **B+C:** Aus den Zellen wurde RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. In einer qRT-PCR wurde die Expression von (B) CCL2 und (C) C/EBP $\alpha$  quantifiziert. Die Werte wurden auf die Expression des Haushaltgens RPL13a normiert. Die Daten wurden im Rahmen meiner Masterarbeit generiert und hier neu ausgewertet. Signifikanzen unmittelbar über den Balken beziehen sich auf die pLXSN Kontrolle. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

Im Einklang mit der Literatur, stimulierte TNF- $\alpha$  die CCL2 Protein- und Genexpression in HaCaT Zellen. Auf Proteinebene wurde CCL2 durch TNF- $\alpha$  von 68 pg/ml auf 307 pg/ml induziert. Der Effekt von 8E6 auf CCL2 (1201 pg/ml) überwog sogar den Effekt von TNF- $\alpha$  in pLXSN-enthaltenden HaCaT Zellen. Wurden 8E6-exprimierende Zellen mit TNF- $\alpha$  stimuliert, zeigte sich bei einer Proteinkonzentration von 1932 pg/ml ein synergistischer Effekt von 8E6 und TNF- $\alpha$  auf die CCL2 Induktion (Abbildung 16A). Ein Synergismus zwischen 8E6 und TNF- $\alpha$  auf die CCL2 Induktion war ebenfalls auf mRNA-Ebene zu beobachten (Abbildung 16B). In Bezug auf die C/EBP $\alpha$  Genexpression zeigte sich in der qRT-PCR, dass C/EBP $\alpha$  sowohl durch TNF- $\alpha$  (auf 0,63-fach) als auch 8E6 (auf 0,58-fach) signifikant unterdrückt wurde, was die in der Literatur beschriebenen Effekte von TNF- $\alpha$  und 8E6 bestätigt.



Auch hier zeigte sich ein Synergismus zwischen 8E6 und TNF- $\alpha$ , der zu einer starken und signifikanten C/EBP $\alpha$  Repression (auf 0,26-fach) führte (Abbildung 16C). Besonders auffällig war der Zusammenhang zwischen der C/EBP $\alpha$  Repression und CCL2 Induktion. Je stärker C/EBP $\alpha$  reprimiert wurde, desto ausgeprägter war die CCL2 Induktion.

Da es sich bei HaCaT Zellen um eine immortalisierte Zelllinie handelt, deren p53 Protein mutiert ist, sollte der Zusammenhang zwischen der 8E6-abhängigen C/EBP $\alpha$  Repression und CCL2 Induktion in einem primären Zellkulturmodell bestätigt werden. Zu diesem Zweck wurden aus primären Vorhautkeratinozyten (NFK) durch retroviralen Gentransfer Zellen erzeugt, die HPV8 E6 stabil exprimieren oder den pLXSN Leervektor enthalten. In einer qRT-PCR wurde zunächst die Expression des 8E6 Onkogens nachgewiesen (Abbildung 17A).



**Abbildung 17 Zusammenhang zwischen C/EBP $\alpha$  und CCL2 in HPV8 E6-exprimierenden NFK.** Von 8E6-exprimierenden bzw. pLXSN-enthaltenden NFK wurde RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. In einer qRT-PCR wurde die Expression von (A) HPV8 E6, (B) C/EBP $\alpha$  und (C) CCL2 quantifiziert. Die Werte wurden auf die Expression des Haushaltgens RPL13a normiert. \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001.

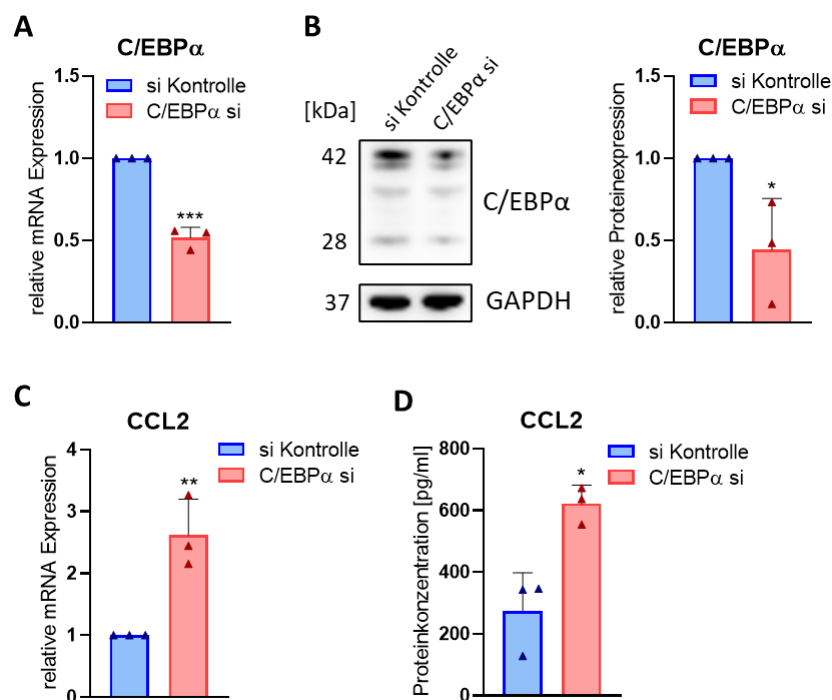
Das HPV8 E6 Onkogen wurde zwischen 10<sup>5</sup> und 10<sup>6</sup> Kopien in NFK exprimiert.

Ein Zusammenhang zwischen C/EBP $\alpha$  und CCL2 war auch in 8E6-exprimierenden primären Keratinozyten zu sehen. Während C/EBP $\alpha$  durch 8E6 signifikant auf das 0,2-fache reprimiert wurde (Abbildung 17B), war die CCL2 Expression bei denselben Ansätzen signifikant erhöht (1,9-fach) (Abbildung 17C). Zwar war damit die 8E6-induzierte Hochregulation von CCL2 in NFK geringer als in HaCaT Zellen (Abbildung 10B), dennoch bestand ein Zusammenhang zwischen der C/EBP $\alpha$  und CCL2 Expression.

### 3.3.1 C/EBP $\alpha$ ist ein negativer Regulator von CCL2

Um den Zusammenhang zwischen der C/EBP $\alpha$  und CCL2 Expression weiter zu charakterisieren, wurde in HaCaT Wildtyp (WT) Zellen ein *Knockdown* mit siRNA spezifisch

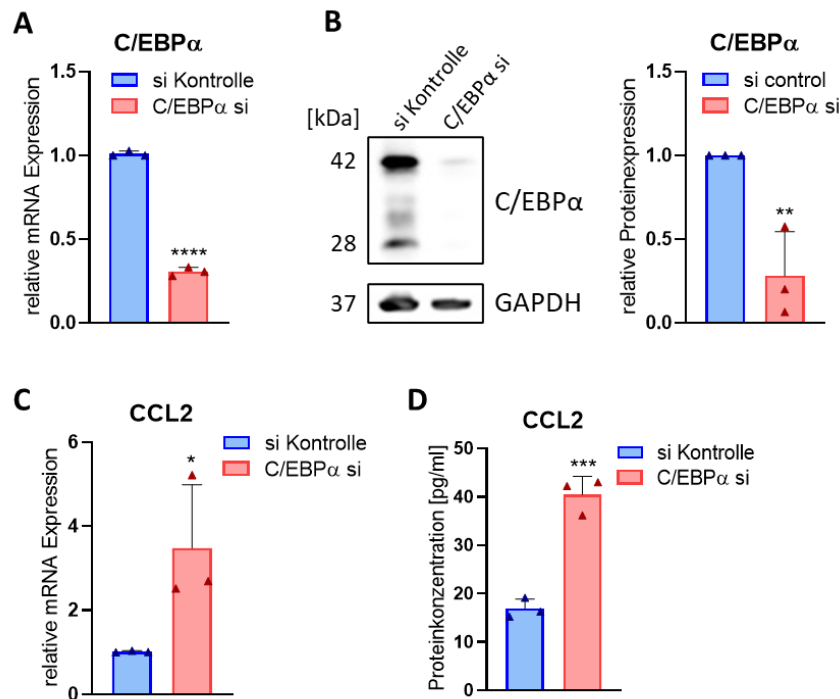
gegen C/EBP $\alpha$  mRNA durchgeführt. In den Ansätzen wurde anschließend die Effizienz des *Knockdowns* bestimmt und die CCL2 Expression analysiert (Abbildung 18). Im C/EBP $\alpha$  *Knockdown* war die C/EBP $\alpha$  Expression auf mRNA-Ebene (auf 0,52-fach) und auf Proteinebene (auf 0,44-fach) signifikant reduziert (Abbildung 18A+B). Im Western Blot war zu erkennen, dass der *Knockdown* spezifisch für beide C/EBP $\alpha$  Isoformen p42 (42 kDa) und p30 (28 kDa) war. In den C/EBP $\alpha$  *Knockdown* HaCaT WT Zellen war in der qRT-PCR eine 2,6-fache Induktion der CCL2 Genexpression nachweisbar (Abbildung 18C). Wie der ELISA zeigte, war auch die CCL2 Proteinkonzentration mit 270 pg/ml in der si Kontrolle und 620 pg/ml im C/EBP $\alpha$  *Knockdown* signifikant erhöht (Abbildung 18D). Damit erwies sich C/EBP $\alpha$  als negativer Regulator der CCL2 Gen- und Proteinexpression in HaCaT WT Zellen.



**Abbildung 18. C/EBP $\alpha$ -abhängige CCL2 Regulation in HaCaT WT.** HaCaT WT Zellen wurden mit *non-targeting* (si Kontrolle) oder siRNA gegen C/EBP $\alpha$  (si Pool) transfiziert und nach 48 h geerntet. **A+C:** Aus den Zellen wurde RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. In einer qRT-PCR wurde die Expression von (A) C/EBP $\alpha$  und (C) CCL2 quantifiziert. Die Werte wurden auf die Expression des Haushaltgens RPL13a normiert. **B:** Aus den Zellen wurden Proteine extrahiert und in einem Western Blot wurde die C/EBP $\alpha$  Proteinexpression detektiert. Die Werte wurden auf die Expression des Referenzgens GAPDH normiert. **D:** Aus dem jeweiligen Zellüberstand wurde in einem ELISA die CCL2 Proteinkonzentration bestimmt. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Um zu bestätigen, dass C/EBP $\alpha$  ein negativer Regulator der CCL2 Expression ist, wurde der C/EBP $\alpha$  *Knockdown* in wildtypischen Vorhautkeratinozyten (NFK WT) durchgeführt. Auch hier wurde zunächst der *Knockdown* verifiziert und dann der Effekt auf die CCL2 Expression analysiert (Abbildung 19).

In NFK WT konnte ebenfalls ein effizienter C/EBP $\alpha$  *Knockdown* erzielt werden. Hier war C/EBP $\alpha$  auf mRNA-Ebene auf das 0,3-fache und auf Proteinebene auf das 0,28-fache signifikant reduziert (Abbildung 19A+B).



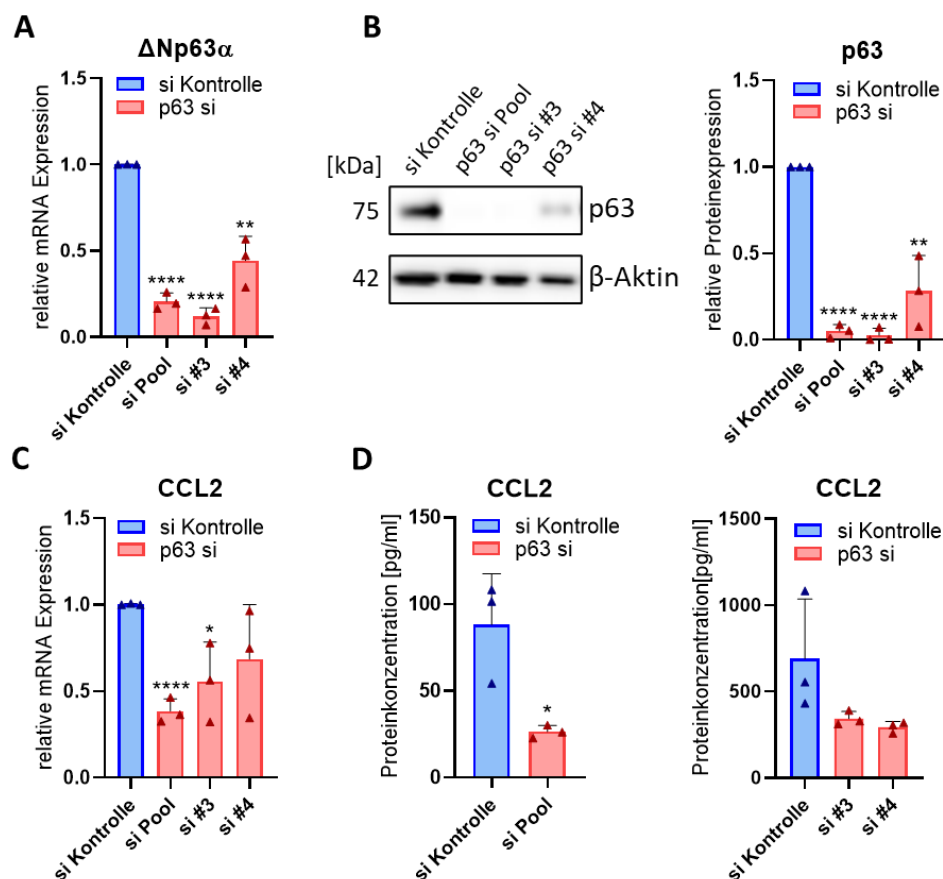
**Abbildung 19. C/EBP $\alpha$ -abhängige CCL2 Regulation in NFK WT.** Wildtypische NFK wurden mit non-targeting (si Kontrolle) oder siRNA gegen C/EBP $\alpha$  (si Pool) transfiziert und nach 48 h geerntet. **A+C:** Aus den Zellen wurde RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. In einer qRT-PCR wurde die Expression von (A) C/EBP $\alpha$  und (C) CCL2 quantifiziert. Die Werte wurden auf die Expression des Haushaltgens RPL13a normiert. **B:** Aus den Zellen wurden Proteine extrahiert und in einem Western Blot wurde die C/EBP $\alpha$  Proteinexpression detektiert. Die Werte wurden auf die Expression des Referenzgens GAPDH normiert. **D:** Aus dem jeweiligen Überstand wurde in einem ELISA die CCL2 Proteinkonzentration bestimmt. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001.

Ähnlich zu HaCaT Zellen war auch bei NFK WT in C/EBP $\alpha$  *Knockdown* Ansätzen eine signifikante Induktion der CCL2 Expression detektierbar. Hier war die Genexpression um das 3,5-fache und die Proteinexpression um das 2,3-fache induziert (Abbildung 19C+D). Im Allgemeinen war die CCL2 Proteinkonzentration schwächer als in HaCaT Zellen. Basierend auf diesen Ergebnissen ging C/EBP $\alpha$  sowohl in wildtypischen HaCaT Zellen als auch in wildtypischen NFK als negativer Regulator der CCL2 Expression hervor.

### 3.3.2 Die 8E6-vermittelte CCL2 Induktion ist p63-abhängig

Nachdem C/EBP $\alpha$  als negativer Regulator der CCL2 Expression identifiziert wurde und von unserer Arbeitsgruppe (Marthaler et al., 2017) beschrieben wurde, dass in Keratinozyten die HPV8 E6-induzierte C/EBP $\alpha$  Repression die miR-203 Expression verringert und dadurch der

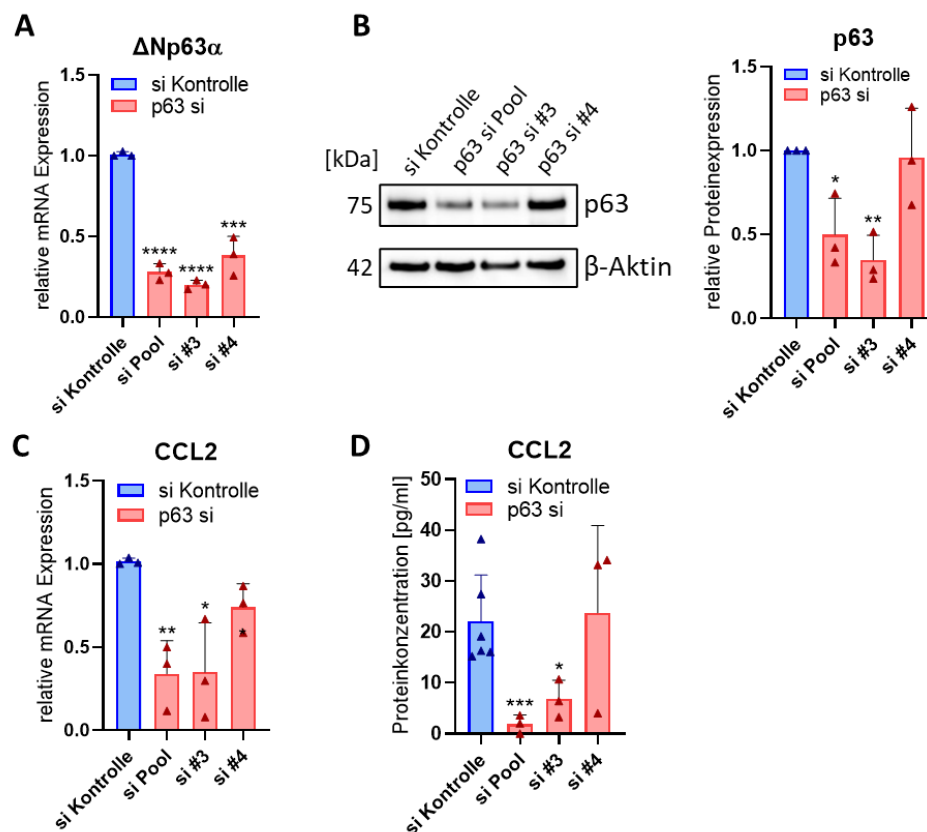
Stammzellfaktor  $\Delta$ Np63 $\alpha$  vermehrt im Zellkern vorliegt, wurde im Folgenden die Rolle von p63 bei der CCL2 Regulation untersucht. Hierzu wurde ein p63 *Knockdown* in HaCaT WT Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden neben dem siRNA Pool auch mit single siRNAs transfiziert. In den Ansätzen wurde der p63 *Knockdown* verifiziert und dann die CCL2 Expression analysiert (Abbildung 20). Der p63 *Knockdown* in HaCaT WT erwies sich als effizient und signifikant auf mRNA- und Proteinebene, wobei das *Silencing* mit der p63 single si #4 im Vergleich zum p63 si Pool und single si #3 mit einer Reduktion auf das 0,44-fache (mRNA) und 0,28-fache (Protein) am schwächsten ausgeprägt war (Abbildung 20A+B). In Bezug auf CCL2 bewirkte der *Knockdown* von p63 eine deutliche und signifikante Repression von CCL2, insbesondere im si Pool auf mRNA (auf 0,39-fach) und Proteinebene (auf 0,42-fach) (Abbildung 20C+D). Bei den Ansätzen mit der single si #4, in denen der p63 *Knockdown* weniger effizient war, wurde dagegen CCL2 schwächer supprimiert, was einem dosisabhängigen Effekt ähnelte.



**Abbildung 20. Die CCL2 Expression ist durch den *Knockdown* von p63 in HaCaT WT Zellen reduziert.** HaCaT WT Zellen wurden mit *non-targeting* (si Kontrolle) oder siRNA gegen p63 (si Pool, single si #3 und si #4) transfiziert und nach 48 h geerntet. **A+C:** Aus den Zellen wurde RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. In einer qRT-PCR wurde die Expression von (A)  $\Delta$ Np63 $\alpha$  und (C) CCL2 quantifiziert. Die Werte wurden auf die Expression des Haushaltgens RPL13a normiert. **B:** Aus den Zellen wurden Proteine extrahiert und in einem Western Blot wurde die p63 Proteinexpression

detektiert. Die Werte wurden auf die Expression des Referenzgens  $\beta$ -Aktin normiert. **D:** Aus dem jeweiligen Zellüberstand wurde in einem ELISA die CCL2 Proteinkonzentration bestimmt. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

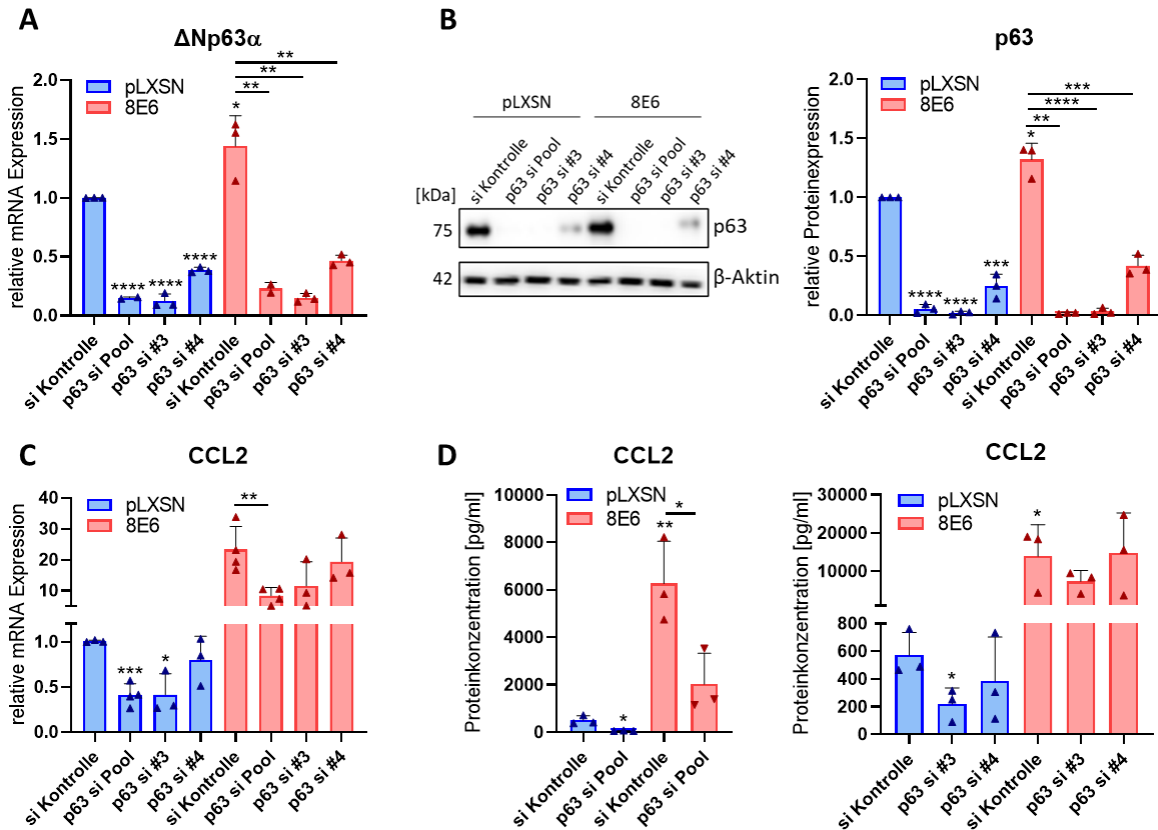
Um den Effekt von p63 auf die CCL2 Expression zu untermauern, wurde der p63 *Knockdown* zusätzlich in primären NFK durchgeführt. Auch hier erfolgte der *Knockdown* neben dem p63 si Pool auch mit single p63 siRNA si #3 und si #4. Obwohl die  $\Delta$ Np63 $\alpha$  mRNA Expression bei allen *Knockdown* Ansätzen signifikant reduziert war, hatte die single si #4 im Gegensatz zum si Pool und single si #3 keine Auswirkung auf die p63 Expression auf Proteinebene (Abbildung 21A+B). Ähnlich zu HaCaT Zellen war auch bei NFK die Reduktion der CCL2 Expression beim p63 *Knockdown* mit dem si Pool auf mRNA- (auf 0,34-fach) und Proteinebene (auf 0,12-fach) am stärksten, gefolgt vom si #3 Ansatz. Dahingegen hatte der p63 single si #4 Ansatz, bei dem p63 nicht auf Proteinebene reduziert war, nur geringe oder gar keine Auswirkungen auf die CCL2 Expression.



**Abbildung 21. In NFK WT ist die CCL2 Expression durch den *Knockdown* von p63 verringert.** NFK WT wurden mit *non-targeting* (si Kontrolle) oder siRNA gegen p63 (si Pool, si #3 und si #4) transfiziert und nach 48 h geerntet. **A+C:** Aus den Zellen wurde RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. In einer qRT-PCR wurde die Expression von (A)  $\Delta$ Np63 $\alpha$  und (C) CCL2 quantifiziert. Die Werte wurden auf die Expression des Haushaltgens RPL13a normiert. **B:** Aus den Zellen wurden Proteine extrahiert und in einem Western Blot wurde die p63 Proteinexpression detektiert. Die Werte wurden auf die Expression des Referenzgens  $\beta$ -Aktin normiert. **D:** Aus dem jeweiligen Zellüberstand

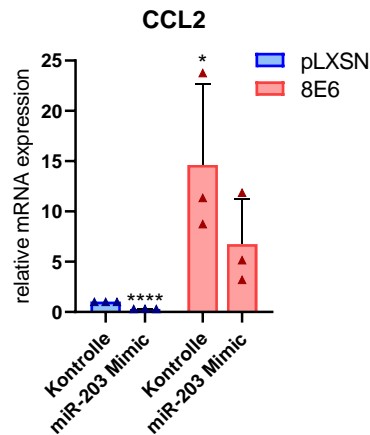
wurde in einem ELISA die CCL2 Proteinkonzentration bestimmt. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

Sowohl in HaCaT WT als auch in NFK WT erwies sich p63 als positiver Regulator der CCL2 Expression. Da HPV8 E6  $\Delta$ Np63 $\alpha$  über den C/EBP $\alpha$  abhängigen Mechanismus hochreguliert, wurde analysiert, ob p63 an der 8E6-abhängigen CCL2 Induktion beteiligt ist. Dazu wurde der p63 *Knockdown* in 8E6-exprimierenden bzw. pLXSN Leervektor enthaltenden HaCaT Zellen unter Verwendung des si Pools und den single si #3 und si #4 durchgeführt und anschließend die CCL2 Expression bestimmt (Abbildung 22). Die Effizienz des p63 *Knockdowns* war in pLXSN-enthaltenden bzw. 8E6-exprimierenden HaCaT Zellen vergleichbar zum *Knockdown* in HaCaT WT Zellen. Während der p63 si Pool und die single si #3 die p63 Expression stark unterdrückten, sodass p63 insbesondere auf Proteinebene kaum noch detektierbar war, erwies sich die single si #4 als weniger effizient (Abbildung 22A+B). Die CCL2 Genexpression wurde in allen Ansätzen durch den p63 Knockdown deutlich verringert. Besonders die CCL2 Induktion durch 8E6 war viel schwächer ausgeprägt, wobei der Effekt von 8E6 auf CCL2 mit steigender Effizienz des *Knockdowns* abnahm. Die 8E6-abhängige CCL2 Induktion wurde durch den p63 si pool um über 60 % und durch die single si #3 um 50 % signifikant reduziert, wohingegen die weniger effiziente single si #4 nur eine Reduktion von etwa 17 % bewirkte (Abbildung 22C). Diese Verhältnisse spiegelten sich ebenfalls in der Proteinexpressionsanalyse wider, bei der die p63 single si #4 allerdings keinen Effekt auf CCL2 ausübte (Abbildung 22D).



**Abbildung 22. In HaCaT Zellen reduziert der Knockdown von p63 die 8E6-abhängige CCL2 Induktion.** pLXSN-enhaltende und 8E6-exprimierende HaCaT Zellen wurden mit *non-targeting* (si Kontrolle) oder siRNA gegen p63 (si Pool, si #3 und si #4) transfiziert und nach 48 h geerntet. **A+C:** Aus den Zellen wurde RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. In einer qRT-PCR wurde die Expression von (A)  $\Delta Np63\alpha$  und (C) CCL2 quantifiziert. Die Werte wurden auf die Expression des Haushaltgens RPL13a normiert. **B:** Aus den Zellen wurden Proteine extrahiert und in einem Western Blot wurde die p63 Proteinexpression detektiert. Die Werte wurden auf die Expression des Referenzgens  $\beta$ -Aktin normiert. **D:** Aus dem jeweiligen Zellüberstand wurde in einem ELISA die CCL2 Proteinkonzentration bestimmt. Signifikanzen unmittelbar über den Balken beziehen sich auf die jeweilige pLXSN si Kontrolle. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

Die Beteiligung von p63 an der 8E6-abhängigen CCL2 Induktion sollte durch weitere Experimente bestärkt werden. Aus diesem Grund wurde die CCL2 Expression in pLXSN-enhaltenden und 8E6-exprimierenden HaCaT Zellen, die mit einem miR-203 Mimic transfiziert wurden, in einer qRT-PCR untersucht (Abbildung 23). In differenzierenden Keratinozyten reguliert C/EBP $\alpha$  die Expression von miR-203 (Marthaler et al., 2017), welche  $\Delta Np63\alpha$  mRNA post-transkriptionell degradiert und somit den gleichen Effekt wie p63 siRNA aufweisen sollte. Es wurden hierfür cDNAs von miR-203 Mimic transfizierten HaCaT Zellen verwendet, die bereits in der Arbeitsgruppe (AG Smola) vorlagen und von Anna Sternjakob (geb. Schneider) im Rahmen ihrer Promotion (Schneider, 2015) generiert und verifiziert wurden.

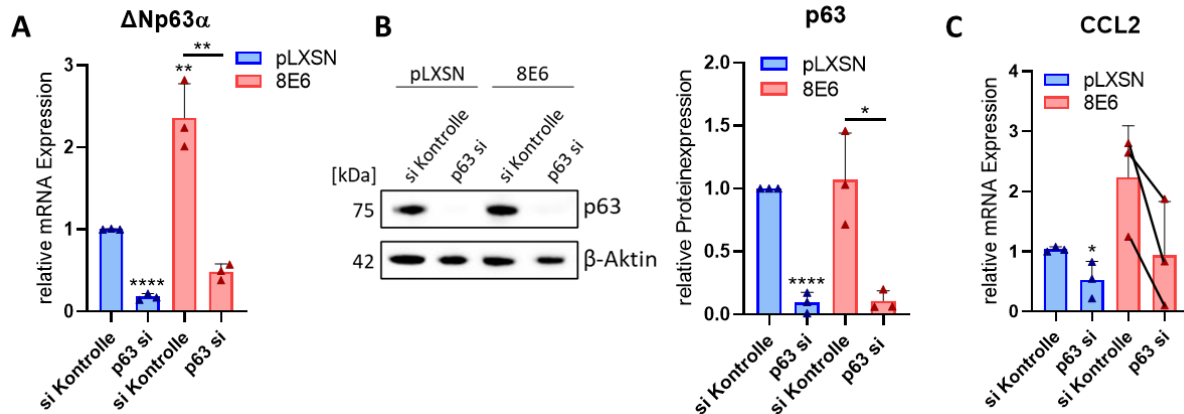


**Abbildung 23. Die Transfektion eines miR-203 Mimic verringert den Effekt von 8E6 auf die CCL2 Genexpression in HaCaT Zellen.** pLXSN-enthaltende und 8E6-exprimierende HaCaT Zellen wurden mit dem miR-203 Mimic oder einer Mimic-Negativkontrolle transfiziert und nach 48 h geerntet. Es wurde RNA isoliert und anschließend in cDNA umgeschrieben. Dies erfolgte durch Anna Sternjakob (geb. Schneider) im Rahmen ihrer Promotion (2015). In einer qRT-PCR wurde hier die CCL2 Expression quantifiziert. Die Werte wurden auf die Expression des Haushaltgens RPL13a normiert. \* $p < 0,05$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$

Wie aufgrund der p63 *Knockdown* Daten erwartet, resultierte die Transfektion des miR-203 Mimic in einer signifikanten Suppression der CCL2 Genexpression in HaCaT Zellen. In Leervektor enthaltenden Zellen wurde CCL2 nach Transfektion des miR-203 Mimic auf das 0,32-fache unterdrückt. Der Effekt von E6 auf CCL2 (14,6-fach) wurde durch den miR-203 Mimic um über 50 % reduziert.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Erkenntnisse aus den p63 *Knockdown* und miR-203 Mimic-Ansätzen in HaCaT Zellen, dass die CCL2 Induktion durch 8E6 von p63 abhängig ist, auch in primären Vorhautkeratinozyten reproduzierbar sind. Demzufolge wurde in 8E6-exprimierenden NFK ein *Knockdown* von p63 unter Verwendung des si Pools durchgeführt und anschließend die CCL2 Genexpression analysiert (Abbildung 24).

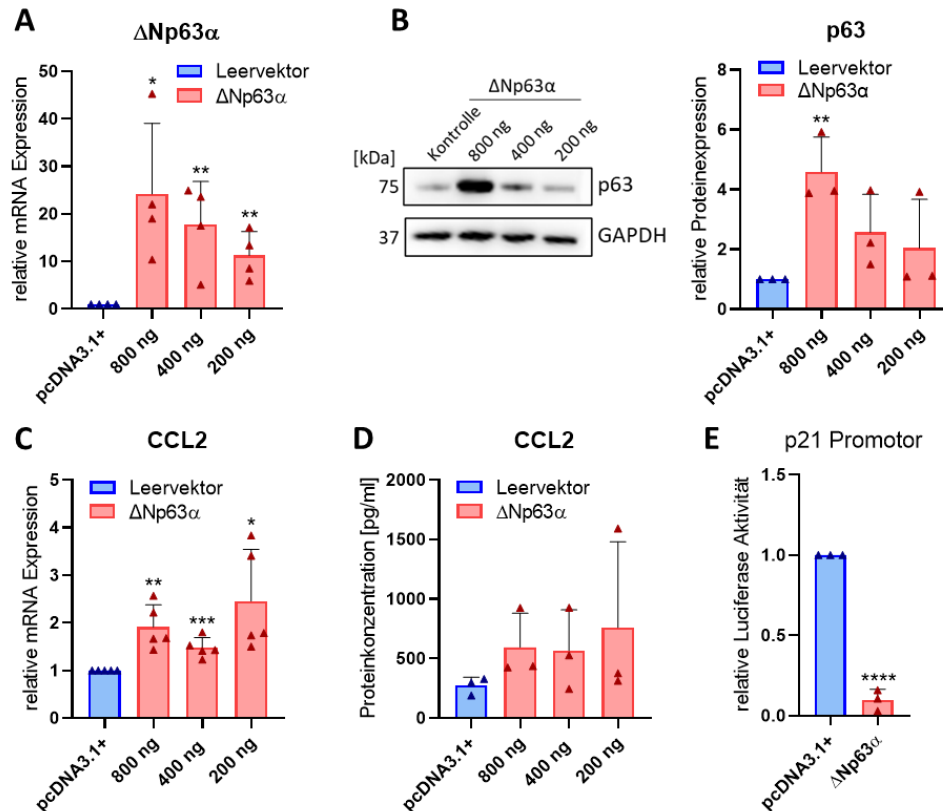




**Abbildung 24 Die CCL2 Induktion durch HPV8 E6 ist in NFK p63-abhängig.** pLXSN-enthaltende und 8E6-exprimierende NFK wurden mit *non-targeting* (si Kontrolle) oder siRNA gegen p63 (si Pool) transfiziert und nach 48 h geerntet. **A+C:** Aus den Zellen wurde RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. In einer qRT-PCR wurde die Expression von (A)  $\Delta Np63\alpha$  und (C) CCL2 quantifiziert. Die Werte wurden auf die Expression des Haushaltgens RPL13a normiert. **B:** Aus den Zellen wurden Proteine extrahiert und in einem Western Blot wurde die p63 Proteinexpression detektiert. Die Werte wurden auf die Expression des Referenzgens  $\beta$ -Aktin normiert. Signifikanzen unmittelbar über den Balken beziehen sich auf die jeweilige pLXSN si Kontrolle. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

In den retroviral infizierten NFK reduzierte der p63 Knockdown die p63 Genexpression signifikant, wobei in NFK pLXSN (auf 0,09-fach) und 8E6 (auf 0,11-fach) sogar kaum noch p63 Protein exprimiert wurde (Abbildung 24A+B). Dies führte zu einer signifikanten CCL2 Repression um 47 % in pLXSN-enthaltenden NFK und reduzierte die erhöhte CCL2 Expression durch 8E6 um 58 % auf das Basalniveau im Vergleich zur pLXSN si Kontrolle (Abbildung 24C).

Die bisherigen siRNA- oder miRNA-Experimente implizierten, dass p63 an der CCL2 Genregulation beteiligt und ein möglicher 8E6-abhängiger Mediator der CCL2 Expression ist. Inwiefern die  $\Delta Np63\alpha$  Isoform die CCL2 Expression aktivieren kann, wurde im Weiteren durch Überexpressionsanalysen untersucht. In HaCaT WT Zellen wurde die  $\Delta Np63\alpha$  Isoform unter Verwendung des pcDNA3.1+Hygro Vektors in einer Konzentrationsreihe transient überexprimiert (Abbildung 25). Es ist zu erwähnen, dass das überexprimierte  $\Delta Np63\alpha$  Konstrukt eine Punktmutation in der cDNA-Sequenz enthält, die zu einer S59G Mutation im Protein führt.



**Abbildung 25. Die Überexpression von  $\Delta Np63\alpha$  erhöht die CCL2 Expression in HaCaT WT Zellen.** HaCaT WT Zellen wurden mit dem pcDNA3.1+Hygro Leervektor (Kontrolle) oder dem pcDNA3.1+Hygro  $\Delta Np63\alpha$  Konstrukt (800 ng, 400 ng und 200 ng pro  $1,5 \times 10^5$  Zellen) transfiziert und nach 48 h geerntet. **A+C:** Aus den Zellen wurde RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. In einer qRT-PCR wurde die Expression von (A)  $\Delta Np63\alpha$  und (C) CCL2 quantifiziert. Die Werte wurden auf die Expression des Haushaltgens RPL13a normiert. **B:** Aus den Zellen wurden Proteine extrahiert und in einem Western Blot wurde die p63 Proteinexpression detektiert. Die Werte wurden auf die Expression des Referenzgens GAPDH normiert. **D:** Aus dem jeweiligen Zellüberstand wurde in einem ELISA die CCL2 Proteinkonzentration bestimmt. **E:** HaCaT WT Zellen wurden mit 500 ng pcDNA3.1+Hygro Leervektor oder  $\Delta Np63\alpha$  und 300 ng eines p21 Promotor Reportergenkonstrukts co-transfiziert und nach 48 h geerntet. Die Werte der gemessenen Luciferase Aktivität wurden auf die jeweilige Proteinkonzentration normiert. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

Die  $\Delta Np63\alpha$  Transfektion resultierte in einer konzentrationsabhängigen  $\Delta Np63\alpha$  Überexpression auf mRNA- und Proteinebene. Mit abnehmender Konzentration der transfizierten DNA stieg die  $\Delta Np63\alpha$  mRNA-Expression um das 24-, 18- und 11-fache und die entsprechende Proteinexpression um das 4,6-, 2,6- und 2-fache im Vergleich zur pcDNA3.1+ Leervektor Kontrolle (Abbildung 25A+B). In allen Konzentrationen der Überexpression war eine Aktivierung der CCL2 Expression zu beobachten. Auffallend war, dass obwohl  $\Delta Np63\alpha$  in den Ansätzen unterschiedlich stark induziert wurde, CCL2 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in gleichem Maße stimuliert (etwa 2-fach) wurde (Abbildung 25C+D). Aufgrund der S59G Mutation erfolgte eine funktionelle Überprüfung der  $\Delta Np63\alpha$  Überexpression in einem Luciferase Assay unter Verwendung eines p21 Promotor Konstrukts.  $\Delta Np63\alpha$  bindet

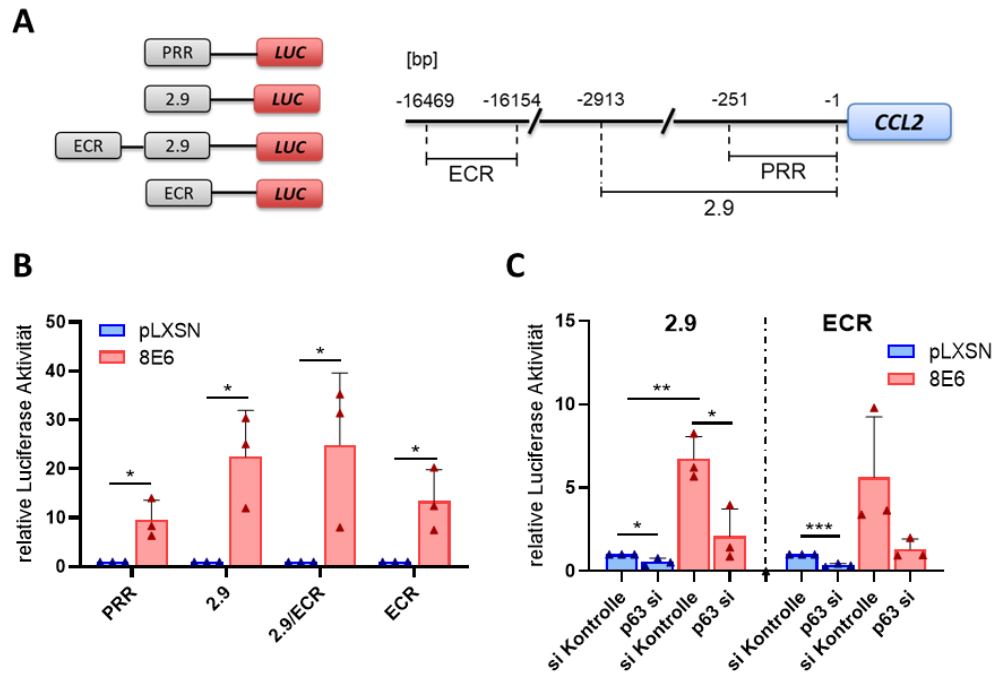
kompetitiv an den p21 Promotor und wurde in dieser Hinsicht in der Literatur umfassend als Repressor beschrieben (Westfall et al., 2003). Der Luciferase Assay zeigte, dass die  $\Delta$ Np63 $\alpha$  Überexpression in HaCaT WT Zellen die Aktivität des p21 Promotors signifikant auf das 0,1-fache reduzierte, wie für ein funktionelles  $\Delta$ Np63 $\alpha$  Protein erwartet (Abbildung 25E).

Diese Experimente wiesen darauf hin, dass 8E6 die CCL2 Expression in Keratinozyten über den C/EBP $\alpha$ -miR-203-p63 Signalweg induziert wird. Im Folgenden wurde die Regulation des CCL2 Promotors weiter analysiert.

### **3.4 Die CCL2 Induktion durch HPV8 E6 verläuft auf Transkriptionsebene in Abhängigkeit von p63**

Die bisherigen Daten haben gezeigt, dass das HPV E6 Protein die CCL2 Expression auf mRNA- und Proteinebene induziert. Inwieweit die CCL2 Induktion auf der Transkriptionsebene stattfindet, war bisher unklar und wurde daher genauer untersucht. Der CCL2 Promotor ist in verschiedene Bereiche gegliedert, die jeweils Bindestellen für diverse Transkriptionsfaktoren enthalten (s. 1.6.2). Um den Effekt von 8E6 auf die Aktivierung des CCL2 Promotors zu analysieren und die dafür relevanten Promotorregionen einzugrenzen, wurden verschiedene CCL2 Promotor Reportergenkonstrukte herangezogen. Diese wurden von Bonello et al. (2011) freundlicherweise zur Verfügung gestellt und umfassen die PRR-, ECR- und 2.9- Promotorregionen des CCL2 Gens sowie eine Kombination aus der 2.9- und ECR-Region (Abbildung 26A).

8E6-exprimierende und pLXSN Leervektor enthaltende HaCaT Zellen wurden mit den verschiedenen CCL2 Reportgenkonstrukten transfiziert und dann in einem Luciferase Assay analysiert (Abbildung 26B). Aus dem Luciferase Assay ging hervor, dass durch 8E6 alle untersuchten CCL2 Promotorregionen in HaCaT Zellen signifikant induziert wurden. Während die eher kleinen PRR- und ECR-Promotorregionen durch 8E6 etwa 10-fach aktiviert wurden, wurde die große 2.9-Region 22-fach induziert (Abbildung 26B). Die Aktivierung der Kombination aus 2.9 und ECR verhielt sich dabei ähnlich zum 2.9-Konstrukt und wies somit keinen synergistischen Effekt auf.



**Abbildung 26. Das HPV8 E6 Protein induziert die Aktivität von CCL2 Promotorregionen in Abhängigkeit von p63.** **A:** Übersicht der eingesetzten Reporter-genkonstrukte des CCL2 Promotors mit Angaben zur jeweiligen Länge und Lokalisation. **B:** pLXSN-enhaltende und 8E6-exprimierende HaCaT Zellen wurden mit den angegebenen Reporter-genkonstrukten transfiziert. Nach 48 h wurden die Ansätze geerntet und die Luciferase Aktivität bestimmt. Messwerte wurden auf die jeweilige Proteinkonzentration und Transfektionseffizienz (s. Anhang Abbildung 44) normiert. **C:** pLXSN-enhaltende und 8E6-exprimierende HaCaT Zellen wurden 24 h vor Transfektion der Reporter-genkonstrukte zusätzlich mit *non-targeting* (si Kontrolle) oder siRNA gegen p63 (si Pool) transfiziert und dann in einem Luciferase Assay analysiert. LUC=Luciferase Gen, bp=Basenpaare, PRR=proximale regulatorische Region, ECR=evolutionär konservierte Region. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Auf Grundlage der vorangegangenen Ergebnisse nimmt der Transkriptionsfaktor  $\Delta Np63\alpha$  eine bedeutende Rolle bei der 8E6-abhängigen CCL2 Induktion ein. Deshalb wurde untersucht, ob  $\Delta Np63\alpha$  die Aktivität der CCL2 Promotorregionen regulieren kann. Zu diesem Zweck wurden pLXSN-enhaltende und 8E6-exprimierende HaCaT Zellen mit den 2.9- und ECR-Reporter-genkonstrukten, die die gesamte relevante Promotorregion abdecken und siRNA gegen p63 co-transfiziert (Abbildung 26C). In den pLXSN Kontrollansätzen wurde die Aktivität der CCL2 Promotorregionen 2.9 und ECR durch den p63 *Knockdown* signifikant auf das 0,55-fache und 0,35-fache reduziert. Im Vergleich zur pLXSN Kontrolle wurde die Aktivierung der 2.9- (6,7-fach) und ECR-Regionen (5,6-fach) durch 8E6 im p63 *Knockdown* auf das 2,1-fache bzw. 1,3-fache reduziert (Abbildung 26C). Letzteres ging mit den CCL2 Expressionsanalysen von 8E6-exprimierenden Keratinozyten einher (s. 3.3.2).

Da  $\Delta Np63\alpha$  die Expression bestimmter Zielgene nicht nur hemmen, sondern anderer Zielgene auch aktivieren kann und sich  $\Delta Np63\alpha$  hier als positiver Regulator und Komponente der 8E6-

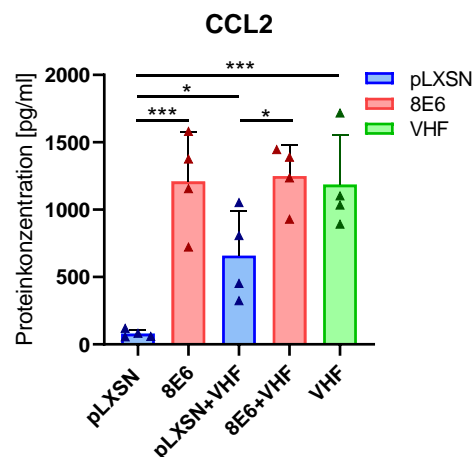
abhängigen CCL2-Transkription und -Expression entpuppte, wurde der CCL2-Promotor auf potenzielle  $\Delta$ Np63 $\alpha$  Bindestellen untersucht. Auf der Grundlage bereits veröffentlichter Bindemotive wurde mit dem FIMO-Online-Tool ein Screening nach potenziellen  $\Delta$ Np63 $\alpha$ -Bindestellen in der 2.9- und ECR-Region des CCL2 Promotors durchgeführt (Tabelle 7). Die  $\Delta$ Np63 $\alpha$  Isoform bindet an p53 Konsensus Motive oder an abgewandelte Formen davon, die sich in der Kern- oder Flankierungssequenz unterscheiden können. Basierend auf diesen Sequenzen ergaben sich im Screening neun potenzielle  $\Delta$ Np63 $\alpha$  Bindestellen (BS1-9), von denen sich BS1-8 in der 2.9- und BS9 in der ECR-Region befinden. Die potenziellen Bindestellen setzen sich aus 2-3 Bindemotiven zusammen, die im Abstand von 0-15 bp angeordnet sind. Insgesamt drei Bindestellen (BS6-8) befinden sich dicht hintereinander in der distalen regulatorischen Region (DRR) des CCL2 Promotors, die sich im hinteren Teil der 2.9-Region befindet. Zusammengenommen könnten diese potenziellen  $\Delta$ Np63 $\alpha$  Bindestellen entscheidend für die 8E6-abhängige CCL2 Induktion sein.

**Tabelle 7. Potenzielle  $\Delta$ Np63 $\alpha$  Bindestellen im CCL2 Promotor.** Die CCL2 Promotorregionen 2.9 und ECR wurden mit dem FIMO-Online-Tool (meme-suite.org) auf das Vorhandensein potenzieller  $\Delta$ Np63 $\alpha$  Bindestellen überprüft. Es wurde nach folgenden Bindemotiven gescreent: RRR-CWWG-YYY (p53 Konsensus, el-Deiry et. Al, 1992) RRR-CGTG-YYY (Perez und Pietenpol, 2007), WWW-C W/S TG-WWW (Westfall et al., 2003). Gefiltert wurde auf mindestens 2 Bindestellen in einem Abstand von 0-15 bp. Die Positionen beziehen sich auf die *upstream* Entfernung zum CCL2 Startcodon. R=Purin (A/G), Y=Pyrimidin (C/T), W=*weak* (A/T), S=*strong* (G/C), bp=Basenpaare, BS=Bindestelle, DRR=distale regulatorische Region, ECR=evolutionär konservierte Region.

Bezeichnung	Sequenzen potenzieller $\Delta$ Np63 $\alpha$ Bindestellen	Position [bp]	Anzahl der Bindemotive	Promotor-region
BS1	<u>CAGCGAGCCTGACATGCTTTC</u> <u>ATCTAGTTT</u>	398-427	3	2.9
BS2	<u>GGACTTGTACACGTTT</u>	899-914	2	2.9
BS3	<u>AGTCAGGCTTCCCAATTCCCG</u> <u>AAATACTCCTCCACTGCTTAC</u> <u>TCATGTCC</u>	1119-1168	3	2.9
BS4	<u>TCACTAGTCTTTGTATGCCCA</u> <u>TTGGGCAAGGGC</u>	1376-1408	2	2.9
BS5	<u>CATCAAGTCTAGTCC</u>	1742-1756	2	2.9
BS6	<u>TGACAACTCCTTCCTGAAGTA</u> <u>GAGACATGCTT</u>	2454-2485	2	2.9 (DRR)
BS7	<u>AGACTTCTTTTCTGATT</u>	2551-2568	2	2.9 (DRR)
BS8	<u>GGGCATCTTTTCTTGACA</u>	2607-2624	2	2.9 (DRR)
BS9	<u>AAGCGTGTGGACTTTCCC</u>	16406-16424	2	ECR

### 3.5 CCL2 wird auch im Co- und 3D-Kultur Modell von HPV8 E6 induziert

Die Verwendung von Monozellkulturen ist im Hinblick auf physiologische *in vivo* Bedingungen limitiert. In der Haut stehen Keratinozyten im Kontakt mit ihrem Mikromilieu. So kommunizieren sie unter anderem mit Fibroblasten im Bindegewebe und können so epithelial-mesenchymale Interaktionen beeinflussen. Um zu überprüfen, ob HPV8 E6 auch die CCL2 Expression in einem Co-Kultur Modell induzieren kann, wurden pLXSN-enthaltende und 8E6-exprimierende HaCaT Zellen zusammen mit Fibroblasten co-kultiviert. In einem ELISA wurde aus dem jeweiligen Überstand die CCL2 Proteinexpression quantifiziert (Abbildung 27).

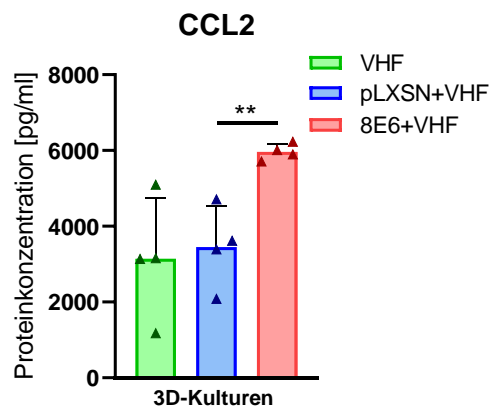


**Abbildung 27. HPV8 E6 induziert CCL2 in Co-Kulturen aus Fibroblasten und HaCaT Zellen.** pLXSN-enthaltende oder 8E6-exprimierende HaCaT Zellen und Fibroblasten (VHF) wurden als Mono- und Co-Kultur kultiviert. Die Ansätze wurden nach 48 h geerntet. Aus dem Zellüberstand wurde in einem ELISA die CCL2 Proteinkonzentration bestimmt. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Fibroblasten wiesen eine starke CCL2 Expression in Monokultur auf (ca. 1200 pg/ml), die der Konzentration der 8E6 abhängigen CCL2 Induktion in HaCaT Zellen entsprach. In Co-Kulturen aus pLXSN-enthaltenden HaCaT Zellen und VHF wurde 660 pg/ml CCL2 Protein exprimiert, was niedriger als die Basalexpression der VHF-Monokultur war (Abbildung 27). Im Vergleich zu Co-Kulturen aus pLXSN-enthaltenden HaCaT Zellen war die CCL2 Expression in Co-Kulturen aus 8E6-exprimierenden HaCaT Zellen und VHF (1250 pg/ml) jedoch signifikant induziert. Obwohl CCL2 in gleicher Konzentration auch in 8E6-exprimierenden HaCaT bzw. VHF-Monokulturen vorlag, wurde CCL2 in der Co-Kultur nicht synergistisch induziert.

Im Gegensatz zu Co-Kultur Modellen bilden organotypische 3D-Kulturen aufgrund der Kultivierung an der Luft-Medium-Grenze ein mehrschichtiges Epithel aus, das dem *in vivo* Epithel sehr ähnlich ist. In der vorliegenden Arbeit wurden aus pLXSN-enthaltenden und 8E6-

exprimierenden HaCaT Zellen organotypische 3D-Kulturen auf einer Fibroblasten-Kollagen Matrix angelegt, um zu untersuchen, inwieweit HPV8 E6 CCL2 auch im mehrschichtigen Epithel induzieren kann. Zunächst wurde die CCL2 Proteinkonzentration aus dem Überstand der organotypischen 3D-Kulturen ermittelt (Abbildung 28). Die CCL2 Expression in organotypischen 3D-Kulturen aus pLXSN-enhaltenden HaCaT Zellen war mit 3450 pg/ml nur geringfügig höher als die Expression in Ansätzen ohne Keratinozyten. Im Gegensatz dazu war die CCL2 Konzentration in 3D-Kulturen aus 8E6-exprimierenden HaCaT Zellen (ca. 6000 pg/ml) signifikant erhöht (Abbildung 28).

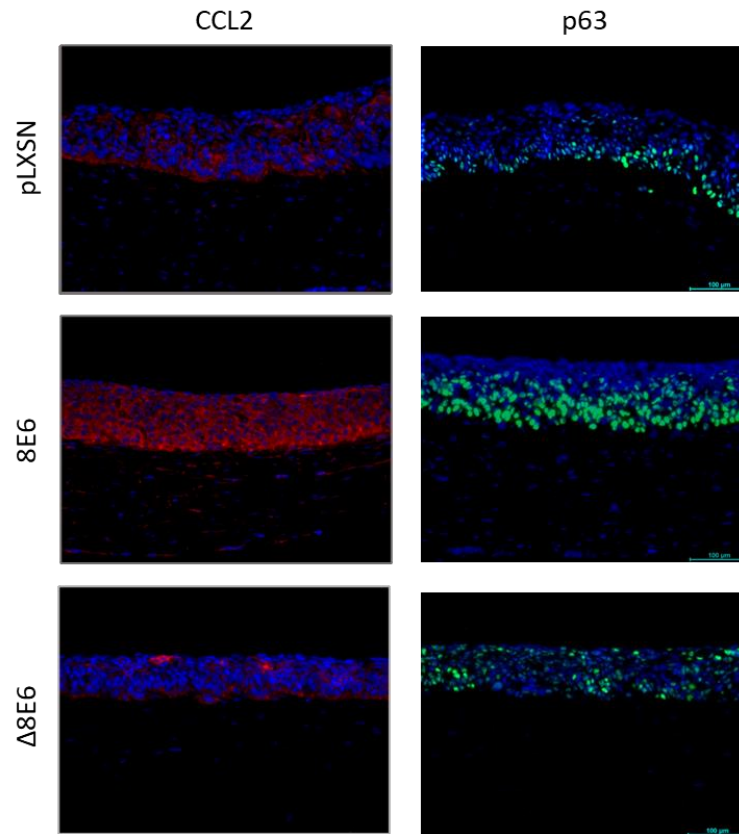


**Abbildung 28. HPV8 E6 induziert die CCL2 Expression in organotypischen 3D-Kulturen.** Organotypische 3D-Kulturen ohne Keratinozyten (VHF) und aus pLXSN-enhaltenden oder 8E6-exprimierenden HaCaT Zellen wurden nach 7 Tagen Kultivierung an der Luft-Medium Grenze geerntet. Aus dem Zellüberstand wurde in einem ELISA die CCL2 Proteinkonzentration bestimmt. \*\* $p < 0,01$ .

Zwar wurde die CCL2 Expression neben Mono- und Co-Kultur Modellen auch in 3D-Kulturen durch 8E6 induziert, jedoch ließ sich anhand des ELISAs nicht zuordnen, ob die CCL2 Induktion auf die Keratinozyten oder die Fibroblasten zurückzuführen ist. In diesem Zusammenhang wurde die CCL2 Expression in einer Immunfluoreszenzfärbung von FFPE-Schnitten organotypischer 3D-Kulturen analysiert. Da die CCL2 Induktion durch 8E6 in Monokulturen p63 abhängig ist, wurde außerdem eine Immunfluoreszenzfärbung spezifisch für p63 durchgeführt (Abbildung 29). Bei den Färbungen wurden zusätzlich 3D-Kulturen aus HPV8  $\Delta$ E6-exprimierenden HaCaT Zellen einbezogen, die bereits in der Arbeitsgruppe (AG Smola) vorlagen und von Anna Sternjakob (geb. Schneider) generiert und in Paraffin eingebettet wurden. Im mutierten  $\Delta$ 8E6 Protein sind die Aminosäuren 132-136 deletiert, was die Bindung an p300 verhindert und dadurch C/EBP $\alpha$ , der negative Regulator der  $\Delta$ Np63 $\alpha$  Expression, nicht mehr supprimiert wird (Marthaler et al., 2017).

Die Immunfluoreszenzfärbung zeigte wie erwartet, dass in 3D Kulturen die 8E6-abhängige CCL2 Induktion in Keratinozyten und weniger in Fibroblasten hervorgerufen

wurde (Abbildung 29). Dahingegen wurde CCL2 in  $\Delta$ 8E6-exprimierenden 3D Kulturen nicht induziert. Darüber hinaus war auch hier ein Zusammenhang zwischen CCL2 und der Expression von p63 zu erkennen. Während p63 in suprabasalen Keratinozyten durch 8E6 verstärkt exprimiert wurde, was mit einer erhöhten CCL2 Expression einherging, wurde in  $\Delta$ 8E6-exprimierenden 3D-Kulturen weder p63 noch CCL2 induziert.



**Abbildung 29. Induktion der CCL2 und p63 Expression in 8E6-exprimierenden organotypischen 3D-Kulturen.** 3D-Kulturen aus pLXSN-enthaltenden, 8E6- und  $\Delta$ 8E6-exprimierenden HaCaT Zellen wurden nach 7 Tagen Kultivierung an der Luft-Medium Grenze geerntet und in Paraffin eingebettet. Die  $\Delta$ 8E6 3D Kulturen (n=2) wurden von Anna Sternjakob (geb. Schneider) generiert. FFPE-Schnitte der 3D Kulturen wurden in einer Immunfluoreszenzfärbung gegen CCL2 (rot) und p63 (grün) gefärbt. Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Vergrößerung: 16x. Skalierung: 100  $\mu$ m.

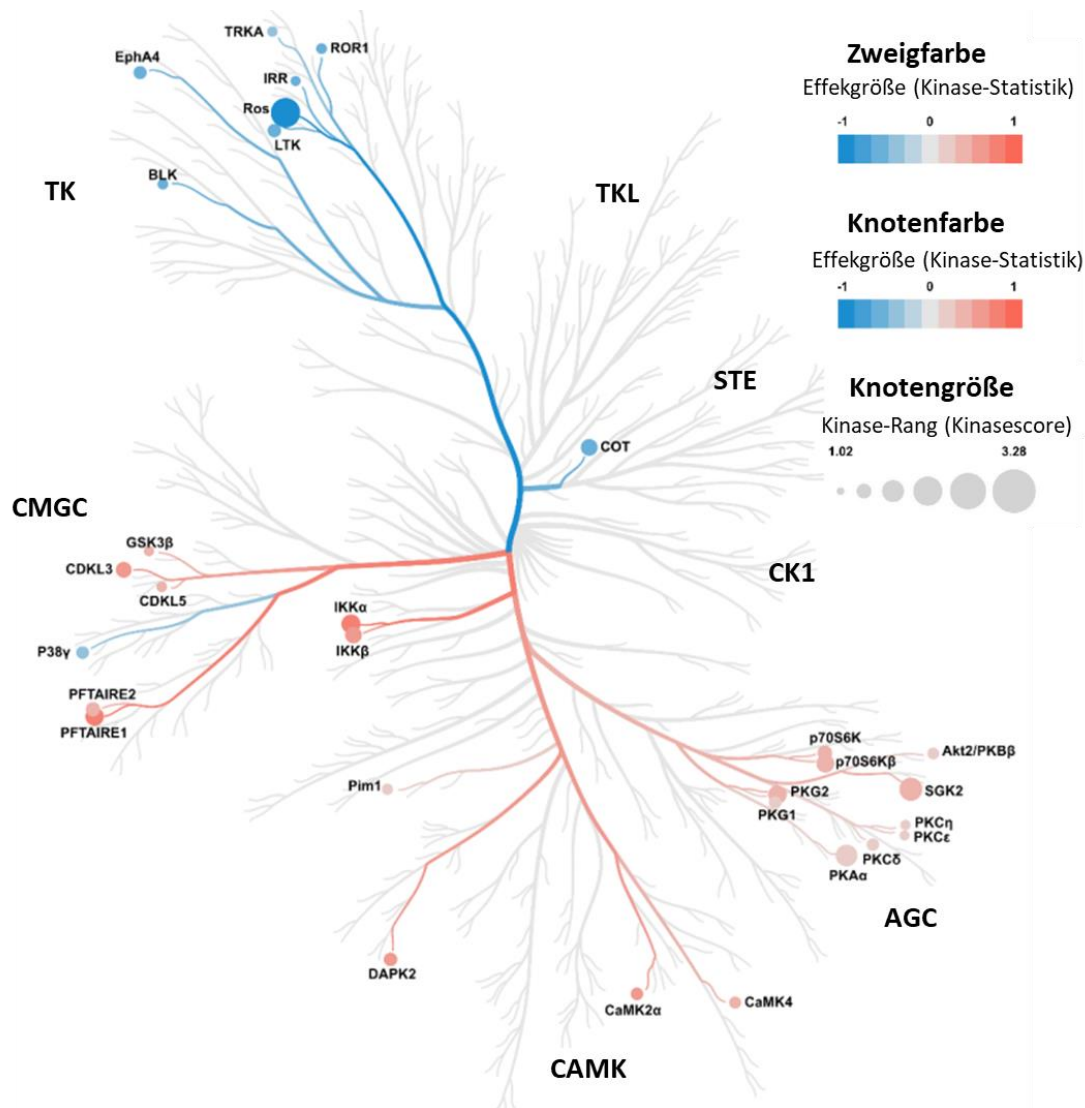
Die Ergebnisse implizierten nochmals die Beteiligung des C/EBP $\alpha$ -p63-Signalwegs an der 8E6-vermittelten CCL2 Induktion. Allerdings wiesen die durchgeführten *Knockdown*-, Überexpressions- und Reportergen-Experimente darauf hin, dass  $\Delta$ Np63 $\alpha$  nicht als alleiniger regulatorischer Faktor der 8E6-abhängigen CCL2 Induktion fungiert. Vielmehr müssen neben  $\Delta$ Np63 $\alpha$  noch andere Faktoren an diesem Prozess beteiligt sein. Die komplexe Regulation von Zytokinen, einschließlich CCL2, umfasst diverse Signalkaskaden, bei denen unter anderem Kinasen und die Phosphorylierung ihrer Zielproteine von zentraler Bedeutung sind. Aus diesem Grund wurde im Weiteren die Rolle von Kinasen bei der 8E6-abhängigen CCL2 Induktion weitergehend analysiert.



### **3.6 HPV8 E6 reguliert die Aktivität von Kinasen die potenziell in die CCL2 Regulation involviert sind**

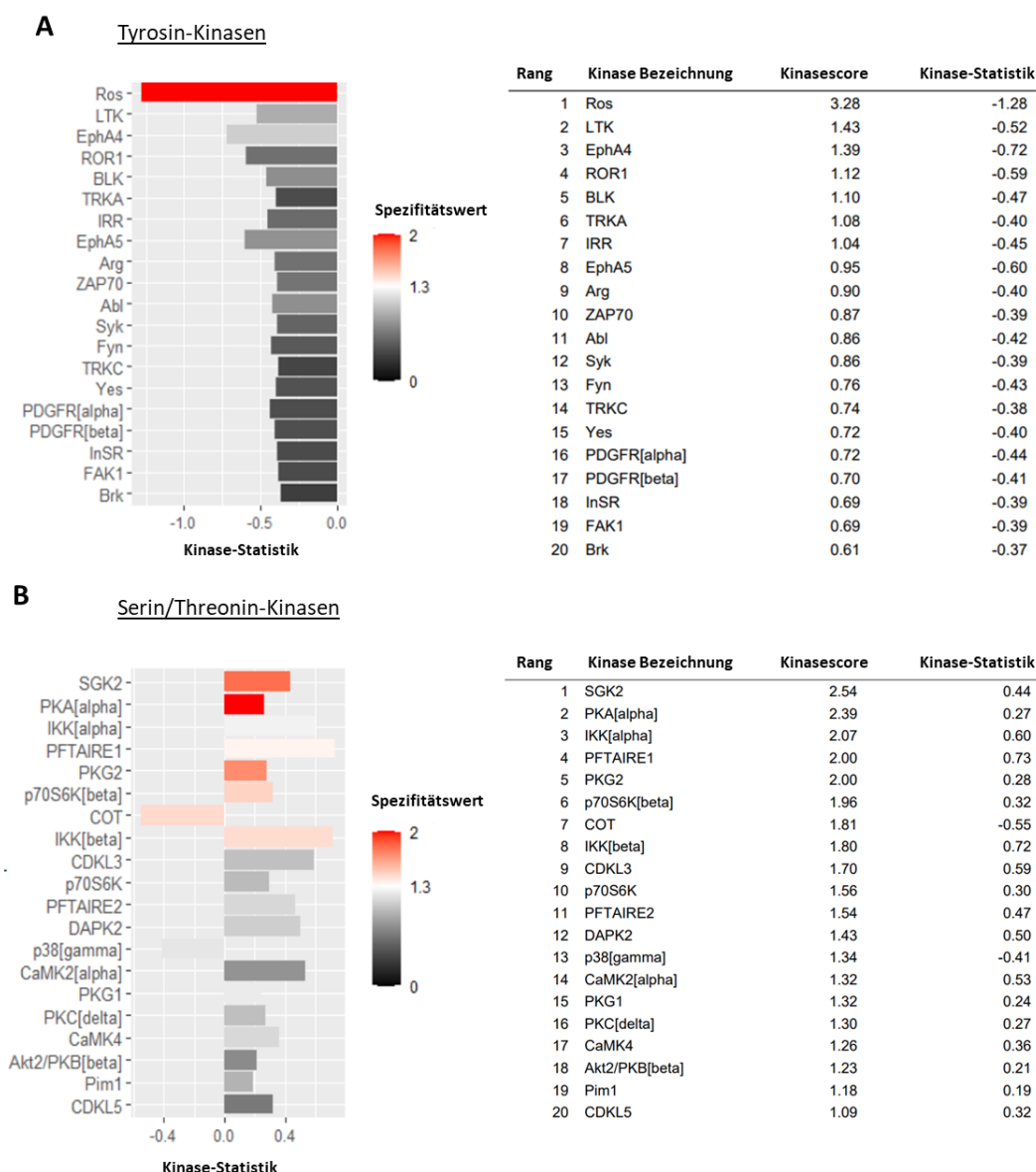
#### **3.6.1 Das Kinase-Profil HPV8 E6-exprimierender Keratinozyten**

Kinasen regulieren ein breites Spektrum an zellulären Prozessen, indem sie die Aktivität ihrer nachgeschalteten Zielproteine durch Phosphorylierungen steuern. Einige Kinase besitzen das Potenzial, je nach zellulärem Stimulus die Expression von Zytokinen regulieren. Demnach könnten Kinasen potenzielle Faktoren darstellen, über die HPV8 E6 die CCL2 Genexpression zusätzlich zum C/EBP $\alpha$ -p63 Signalweg induziert. Um einen Überblick über 8E6-regulierte Kinasen zu erhalten, wurde ein Kinase-Aktivitätsprofil in 8E6-exprimierenden primären Vorhautkeratinozyten erstellt, welches das gesamte humane Kinom umfasst. Von HPV8 E6-exprimierenden und pLXSN Leervektor enthaltenden NFK wurden M-PER-Proteinextrakte hergestellt, die in Kooperation mit PamGene International BV (Herzogenbusch, Niederlande) zur Durchführung eines Kinase-Aktivitäts-Assay verwendet wurden. Das Prinzip beruht auf einer Antikörper-basierten Quantifizierung spezifischer Peptid-Phosphorylierungen auf einem Chip, die Rückschlüsse auf die potenziell verantwortlichen Kinasen zulässt. Es wurde die Aktivität von Protein-Tyrosin-Kinasen (PTK) und Serin/Threonin-Kinasen (STK) analysiert. Der phylogenetische Stammbaum der humanen Proteinkinasen Familie (Abbildung 30) gibt einen Überblick über die Veränderungen der HPV8 E6-abhängigen Kinase-Aktivitäten. Aus dem Kinase-Aktivitäts-Assay ging hervor, dass in 8E6-exprimierenden NFK im Allgemeinen die Aktivität von Tyrosin-Kinasen verringert und von Serin/Threonin-Kinasen erhöht vorlag. Insbesondere wurden Mitglieder der beiden STK-Familien AGC und CMGC aktiviert. Zu den beiden einzigen STKs, deren Aktivität durch 8E6 verringert wurde zählten COT (MAP3K8) aus der STE- und p38 $\gamma$  (MAPK12) aus der CMGC-Familie.



**Abbildung 30. Kinase Stammbaum zur Übersicht HPV8 E6-regulierter Kinase-Aktivitäten.** Von pLXSN-enthaltenden und 8E6-exprimierenden NFK wurden M-PER-Proteinextrakte generiert und in einem Kinase-Aktivitäts-Assay analysiert. Die Effektgröße gibt den Unterschied zwischen den Peptid-Phosphorylierungen in 8E6-exprimierenden und pLXSN-enthaltenden Zellen an und ist durch die Farbskalierung definiert. Der Kinase-Rang basiert auf der Kombination von Effektgröße und Spezifitätswert und ist durch die Knotengröße definiert. Der Spezifitätswert beschreibt dabei das aus aktuellen Datenbanken abgeleitete Peptid-Kinase Verhältnis. TK=Tyrosin-Kinasen, TKL=Tyrosin-Kinase-ähnliche Kinasen, STE=MAPK-aktivierende Kinasen, CK1=Casein-Kinasen, AGC=PKA-, PKG- und PKC-Familie, CAMK=Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängige Kinasen, CMGC=CDK, MAPK, GSK und CLK. Die Abbildung wurde von PamGene International BV erstellt und hier modifiziert.

Um das Spektrum der HPV8 E6-regulierten Kinasen in Hinblick auf potenzielle CCL2 Regulatoren weiter einzugrenzen, wurden zunächst nur die Kinasen mit dem höchsten Kinase-Rang berücksichtigt (Abbildung 31). Dieser wird durch die Differenz der Peptid-Phosphorylierungen im Vergleich zur pLXSN Kontrolle und dem aus Datenbanken abgeleiteten Peptid-Kinase Verhältnis (Spezifitätswert) definiert.



**Abbildung 31. Ranking der HPV8 E6-regulierten Tyrosin- und Serin/Threonin-Kinasen-Aktivität.** pLXSN-enthaltende und 8E6-exprimierende NFK wurden in einem Kinase-Aktivitäts-Assay analysiert. Dargestellt ist jeweils der Spezifitätsrang (links) und die Rangfolge (rechts) für HPV8 E6-regulierte (A) Tyrosin- und (B) Serin/Threonin-Kinasen. Der aus Datenbanken abgeleitete Spezifitätswert bildet das Peptid-Kinase-Verhältnis und ist neben der Kinase-Statistik ausschlaggebend für das Kinase-Ranking. Die Kinase-Statistik gibt dabei die Gruppenunterschiede (8E6 vs. pLXSN), mit Effektgröße (Werte) und Richtung ( $>0$ =Aktivierung oder  $<0$ =Hemmung) an. Die Abbildungen wurden von PamGene International BV erstellt und hier modifiziert.

Um zunächst die am stärksten regulierten Kinasen zu berücksichtigen, wurden vorerst nur Kinasen mit einem Kinase-Score  $\geq 1,5$  betrachtet. Unter den Tyrosin-Kinasen, die in 8E6-exprimierenden NFK eine verringerte Aktivität aufwiesen, war ROS1 die einzige PTK, die den Cut-off-Wert mit einem Kinase-Score von 3,28 überschritten hat und einen hohen Spezifitätswert aufwies (Abbildung 31A). Bei den Serin/Threonin-Kinasen hatten dagegen insgesamt 11 Kinasen einen Kinase-Score von  $\geq 1,5$  (Abbildung 31B). Mit Ausnahme von

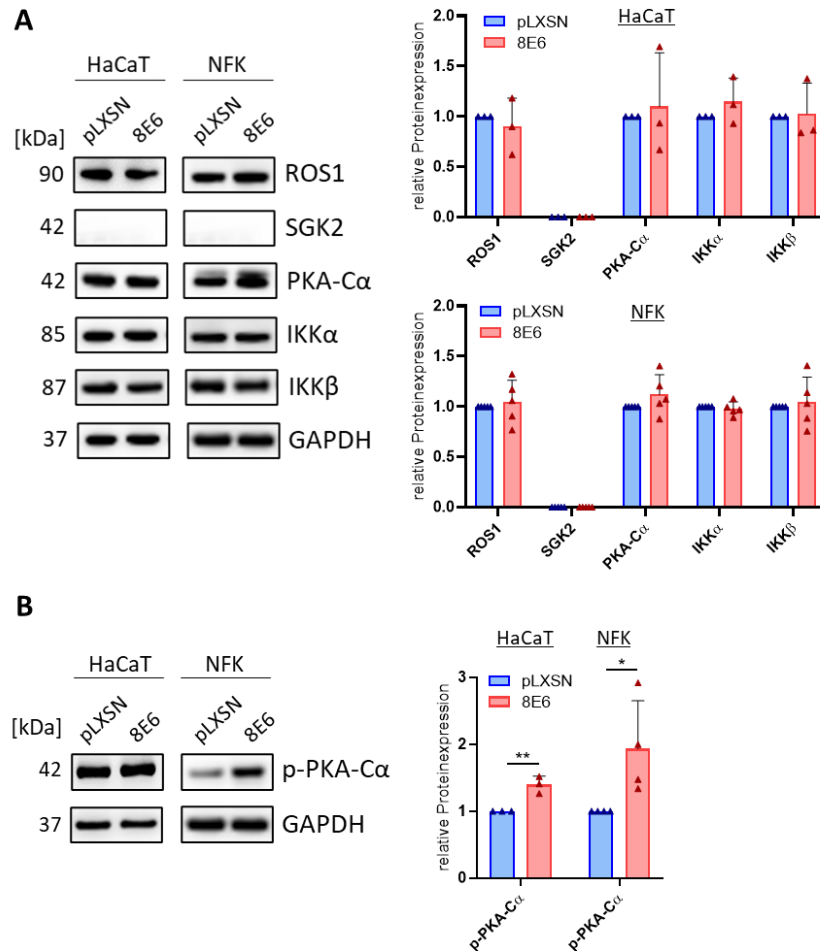
COT, zeigten unter diesen Kinasen alle eine erhöhte Aktivität. Für STKs der Top 5 im Ranking wurde ein Kinase-Score von  $\geq 2$  ermittelt, wobei neben IKK $\alpha$  und PFTAIRE1, insbesondere SGK2, PKA-C $\alpha$  und PKG2 einen hohen Spezifitätswert aufwiesen.

Der Kinase-Aktivitäts-Assay ist kein direkter Nachweis der Kinase-Aktivität, sondern stützt sich auf ein Analysetool, das auf der Grundlage des Peptid-Phosphorylierungsmusters eine Liste potenzieller Kinasen erstellt, die für die Phosphorylierungen verantwortlich sind. Aus diesem Grund wurden die Ergebnisse des Kinase-Aktivität Profils als spekulativ betrachtet, um Arbeitshypothesen zu erstellen.

### **3.6.2 HPV8 E6 induziert die PKA-C $\alpha$ Aktivität und reguliert dadurch potenziell CCL2**

Im Weiteren wurden zunächst die Kinasen mit dem höchsten Kinase-Score näher untersucht. Dazu gehörten ROS1, SGK2, PKA-C $\alpha$  und IKK $\alpha$ , wobei auch IKK $\beta$  einbezogen wurde, da IKK $\beta$  zusammen mit IKK $\alpha$  einen Proteinkomplex bildet und selbst einen erhöhten Kinase-Score (1,8) aufwies (Abbildung 31B).

Im ersten Schritt wurde überprüft ob und in welchem Ausmaß die oben genannten Kinasen exprimiert werden. Dazu wurden Proteinextrakte von 8E6-exprimierenden bzw. pLXSN-enthaltenden HaCaT Zellen und NFK in einem Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen die jeweiligen Kinasen analysiert (Abbildung 32). Von den fünf untersuchten Kinasen (ROS1, SGK2, PKA-C $\alpha$ , IKK $\alpha$  und IKK $\beta$ ) konnte die Expression des Gesamtproteins für alle außer SGK2 nachgewiesen werden (Abbildung 32A). Die Funktionalität des SGK2 Antikörpers wurde erfolgreich in RPTEC Zellen überprüft (s. Anhang Abbildung 45), die ein hohes Expressionsniveau von SGK2 aufweisen (proteinatlas.org). Von den exprimierten Kinasen war durch 8E6 keine Veränderung des Gesamtproteins nachweisbar. Bei Kinasen steigern vor allem spezifische Phosphorylierungen durch vorgeschaltete Kinasen deren Aktivität und weniger deren Expressionsniveau. Aus diesem Grund wurde im Western Blot die Expression von phosphorylierten (aktivierten) Kinasen untersucht. Aufgrund der Verfügbarkeit von funktionierenden Antikörpern in der Arbeitsgruppe erfolgte letzteres nur für p-PKA-C $\alpha$  (Thy197). Die PKA-C $\alpha$  Kinase war in ihrer aktiven Form (pThy197) in 8E6-exprimierenden HaCaT Zellen (1,4-fach) und insbesondere NFK (1,93-fach) signifikant erhöht (Abbildung 32B).

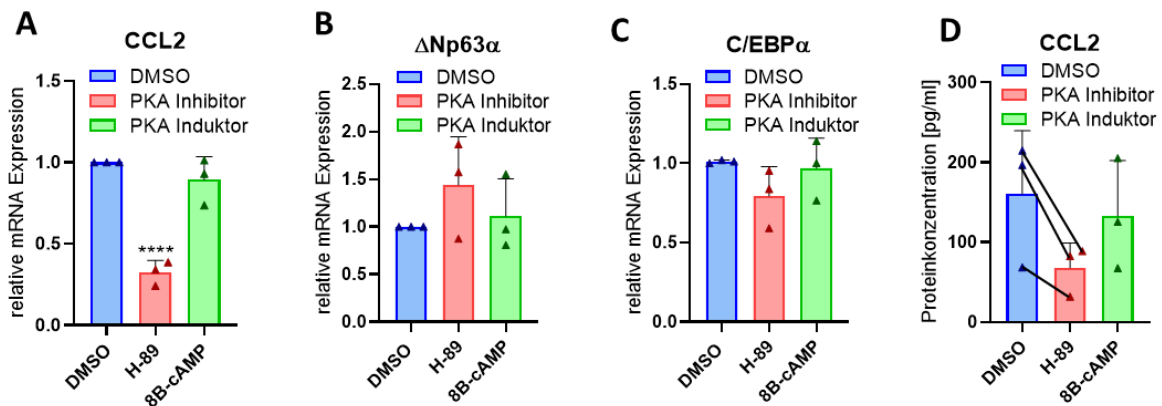


**Abbildung 32. Expressionsanalyse von Kinasen in 8E6-exprimierenden HaCaT Zellen und NFK.**

Proteinextrakte von pLXSN-enthaltenden und 8E6-exprimierenden HaCaT Zellen bzw. NFK wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend im Western Blot auf die jeweilige Proteinexpression untersucht. **A:** Detektion des jeweiligen Gesamtproteins. **B:** Detektion von Phospho-spezifischem Protein (p-PKA-Cα Thr197). Die Werte wurden auf die Expression des Referenzgens GAPDH normiert. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

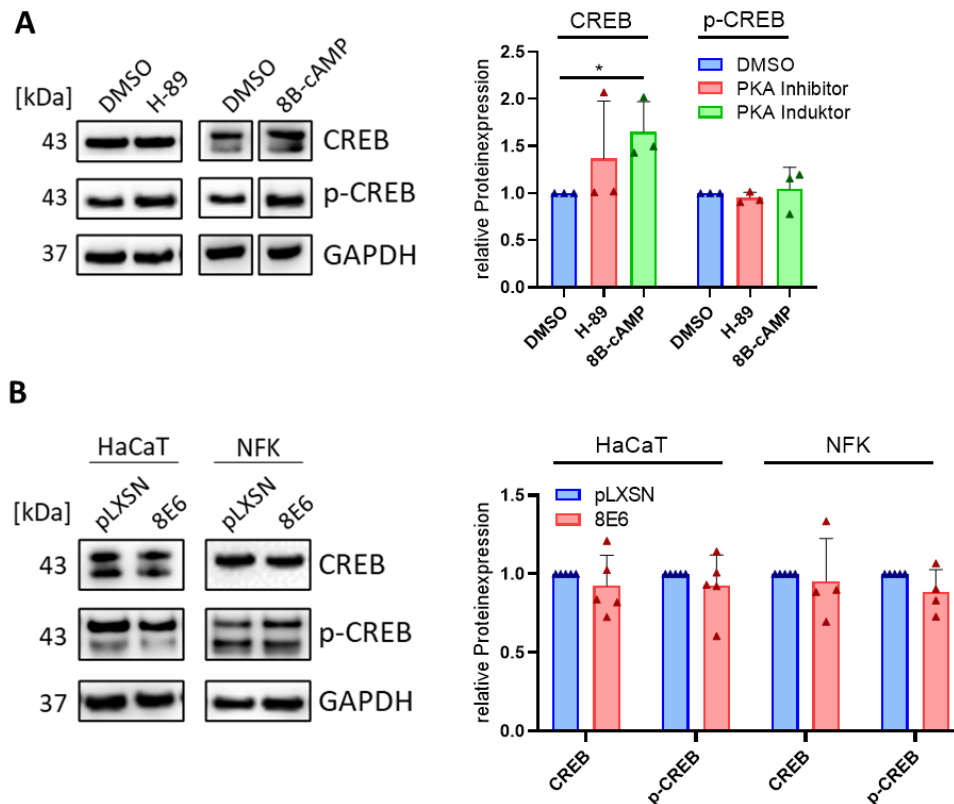
Nachdem im Kinase-Aktivitäts-Assay PKA-Cα als Kinase mit potenziell erhöhter Aktivität in 8E6-exprimierenden NFK identifiziert wurde und eine erhöhte p-PKA-Cα Expression in den Proteinextrakten nachgewiesen wurde, sollte im Folgenden der PKA-Cα Signalweg weiter untersucht werden, insbesondere in Hinblick auf die 8E6-abhängige CCL2 Induktion. Um herauszufinden, ob PKA-Cα das Potenzial hat, die CCL2 Genexpression zu regulieren, wurden HaCaT WT Zellen mit dem PKA-spezifischen Inhibitor H-89 und dem PKA-Induktor 8-Bromo-cAMP behandelt und anschließend wurde die Auswirkung auf CCL2 analysiert (Abbildung 33). Der PKA Inhibitor H-89 bewirkte eine starke und signifikante Reduktion der CCL2 Genexpression (auf 0,32-fach) und verringerte im Vergleich zu DMSO-Kontrollansätzen (160 pg/ml) auch die CCL2 Proteinexpression (68 pg/ml) (Abbildung 33A+D). Dahingegen war die CCL2 Expression in 8-Bromo-cAMP behandelten HaCaT WT Zellen unverändert. Um

zu überprüfen, ob die starke CCL2 Reduktion in PKA-inhibierten Zellen in irgendeiner Weise mit dem C/EBP $\alpha$ -p63-Signalweg in Zusammenhang steht, wurde die C/EBP $\alpha$  und  $\Delta$ Np63 $\alpha$  Genexpression in den Ansätzen bestimmt (Abbildung 33B+C). Die C/EBP $\alpha$  und  $\Delta$ Np63 $\alpha$  Genexpression war in H-89 behandelten Zellen unverändert. Somit stand die potenziell PKA-abhängige CCL2 Regulation auf mRNA-Ebene nicht in Verbindung mit dem C/EBP $\alpha$ -p63-Signalweg.



**Abbildung 33. Zusammenhang zwischen CCL2 Expression und PKA-C $\alpha$  Aktivität in HaCaT WT Zellen.** HaCaT WT Zellen wurden mit DMSO (Kontrolle), 10  $\mu$ M H-89 oder 10  $\mu$ M 8-Bromo-cAMP behandelt und nach 16 h geerntet. **A-C:** Aus den Zellen wurde RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. In einer RT-PCR wurde die Genexpression von (A) CCL2, (B)  $\Delta$ Np63 $\alpha$  und (C) C/EBP $\alpha$  quantifiziert. Die Werte wurden auf die Expression des Haushaltgens RPL13a normiert. **D:** Aus dem jeweiligen Zellüberstand wurde in einem ELISA die CCL2 Proteinexpression quantifiziert. \*\*\*\*p<0,0001.

Auf der Suche nach Faktoren, die potenziell die PKA-abhängige CCL2 Regulation vermitteln könnten, wurden PKA nachgeschaltete Faktoren analysiert. Der Transkriptionsfaktor CREB wird in der Literatur häufig als PKA-Target beschrieben, der durch Phosphorylierung aktiviert wird und dann die Expression seiner Zielgene stimuliert. Dementsprechend wurde die Menge der CREB-Phosphorylierung zum einen in 8E6-exprimierenden Keratinozyten analysiert und zum anderen als Maß für die Wirksamkeit des PKA-Inhibitors und -Induktors verwendet (Abbildung 34). Obwohl das CREB-Gesamtprotein in den mit 8-Bromo-cAMP behandelten Ansätzen etwas erhöht war, wurde die p-CREB (Ser133) Expression weder durch H-89 noch durch 8-Bromo-cAMP verändert (Abbildung 34A). Des Weiteren zeigte die Expressionsanalyse, dass auch 8E6, welches die PKA-C $\alpha$  Aktivität erhöhte, keinen Einfluss auf die Expression von CREB oder seiner aktiven p-CREB (Ser133) Form in HaCaT Zellen und NFK hatte (Abbildung 34B). Einerseits bestand damit kein Nachweis der Wirksamkeit der PKA-Inhibition bzw. -Induktion, andererseits konnte die Beteiligung von CREB an der CCL2 Repression in H-89 behandelten Zellen ausgeschlossen werden.



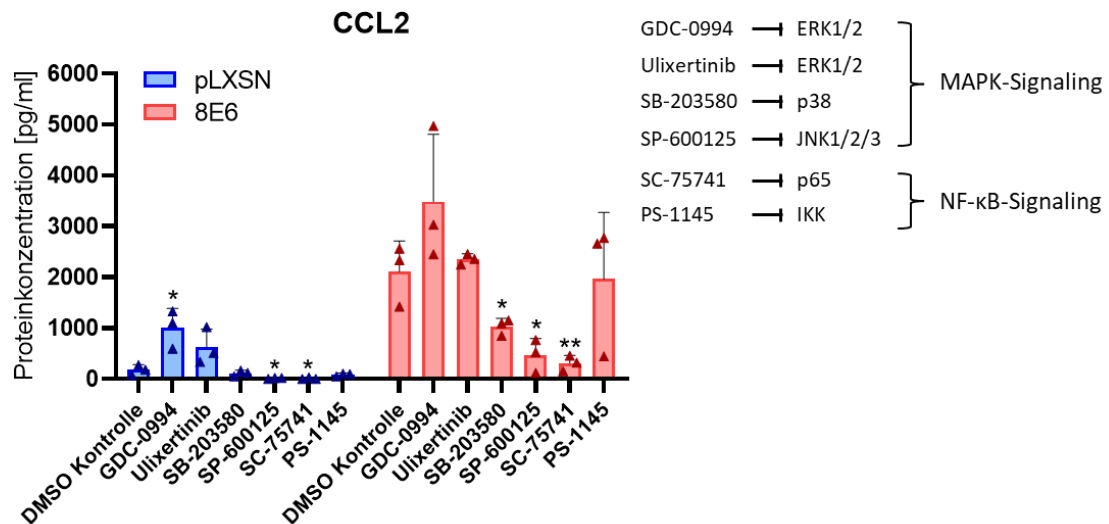
**Abbildung 34. Einfluss der PKA-Inhibition/Induktion und HPV8 E6 auf die CREB und p-CREB Expression.** Proteinextrakte der jeweiligen Ansätze wurden in einem Western Blot auf die Expression von CREB und p-CREB (Ser133) untersucht. **A:** HaCaT WT Zellen wurden mit DMSO (Kontrolle), 10  $\mu$ M H-89 oder 10  $\mu$ M 8-Bromo-cAMP behandelt und nach 16 h geerntet. **B:** Von pLXSN-enthaltenden und 8E6-exprimierenden HaCaT Zellen und NFK wurden Proteinextrakte hergestellt und in einem Western Blot wurde die CREB und p-CREB (Ser133) Proteinexpression untersucht. Die Werte wurden auf die Expression des Referenzgens GAPDH normiert. \* $p < 0,05$ .

### 3.6.3 Relevanz des MAPK- und NF- $\kappa$ B-Signalings in der Signalweg-Konvergenz in HPV8 E6-exprimierenden HaCaT Zellen

Die Induktion der CCL2 Genexpression durch HPV8 E6 war in der HaCaT Zelllinie stärker ausgeprägt als in primären Vorhautkeratinozyten. Daher wurde im Weiteren analysiert, ob zusätzliche Faktoren von 8E6 in HaCaT Zellen reguliert werden, die die CCL2 Induktion verstärken. Da das Kinase-Aktivitätsprofil von 8E6-exprimierenden NFK erstellt wurde und somit keine Informationen über HaCaT Zellen vorliegen, wurden zunächst MAP-Kinasen aufgrund ihrer ausführlich beschriebenen Funktion bei der CCL2 Regulation näher betrachtet. Unter Verwendung diverser Inhibitoren von MAP-Kinasen (ERK1/2, p38 und JNK1/2/3) und NF- $\kappa$ B-Faktoren wurde die CCL2 Expression in pLXSN-enthaltenden und 8E6-exprimierenden HaCaT Zellen analysiert (Abbildung 35). Die Verwendung von ERK1/2 und IKK-Inhibitoren verringerte die 8E6-abhängige CCL2 Induktion nicht, während ERK1/2



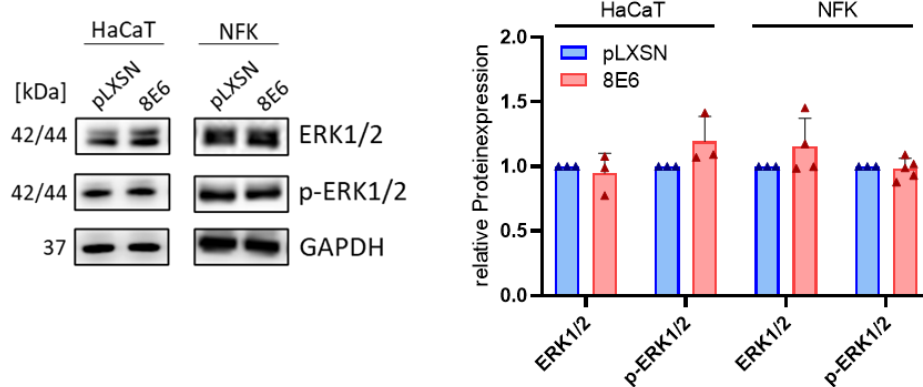
Inhibitoren die CCL2 Expression sogar verstärkten, insbesondere in pLXSN Kontrollansätzen. Im Gegensatz dazu exprimierten 8E6-exprimierende HaCaT Zellen signifikant weniger CCL2, wenn sie mit Inhibitoren für p38 (auf 0,49-fach), JNK1/2/3 (auf 0,22-fach) und p65 (auf 0,15-fach) behandelt wurden.



**Abbildung 35. Einfluss von MAPK- und NF-κB-Signalwegen bei der CCL2 Induktion durch 8E6 in HaCaT WT Zellen.** HaCaT WT Zellen wurden mit DMSO (Kontrolle) bzw. mit 10 μM der angegebenen MAPK- und NF-κB-Inhibitoren behandelt und nach 16 h geerntet. Aus dem jeweiligen Überstand wurde in einem ELISA die CCL2 Proteinkonzentration quantifiziert. Signifikanzen beziehen sich die jeweilige DMSO-Kontrolle. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

Die Rolle von MAPK- und NF-κB-Signalwegen sollte im Weiteren durch eine Expressionsanalyse von inaktiven und aktiven in 8E6-exprimierenden HaCaT Zellen näher charakterisiert werden. Dafür wurden die Proteinextrakte in einem Western Blot auf die jeweilige Gesamtproteinexpression sowie die Expression ihrer aktiven phosphorylierten Form untersucht werden. Aufgrund der Verfügbarkeit von Antikörpern und zeitlicher Limitierung wurde nur das Expressionslevel von ERK1/2 und p-ERK1/2 (Thr202/Thr204) in pLXSN-enthaltenden und 8E6-exprimierenden HaCaT Zellen analysiert (Abbildung 36). Weder ERK1/2 noch die Expression der aktiven p-ERK1/2 (Thr202/Thr204) Form wurden durch 8E6 in HaCaT Zellen und NFK beeinflusst.



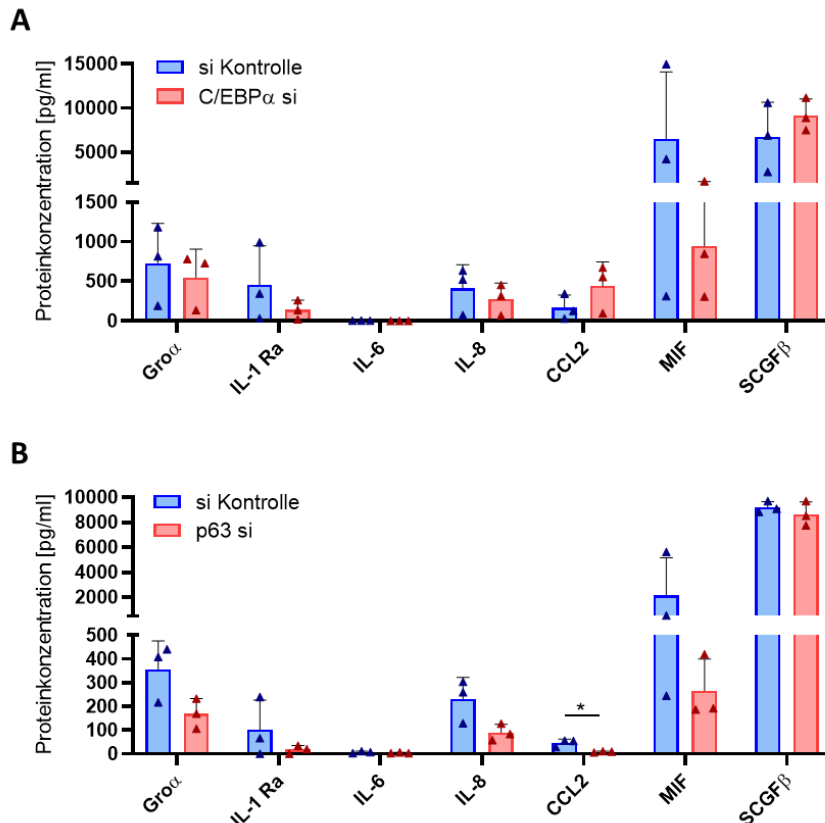


**Abbildung 36. ERK und p-ERK Expression in 8E6-exprimierenden HaCaT Zellen und NFK.** Von pLXSN-enthaltenden bzw. 8E6-exprimierenden HaCaT Zellen und NFK wurden Proteine extrahiert, in einer SDS-PAGE aufgetrennt und in einem Western Blot auf die Expression von ERK1/2 und p-ERK1/2 (Thr202/Thr204) untersucht. Die Werte wurden auf die Expression des Haushaltgens GAPDH normiert.

### 3.7 Charakterisierung des HPV8 E6-C/EBP $\alpha$ -p63-abhängigen Sekretoms und Transkriptoms

#### 3.7.1 Analyse sezernierter Zytokine

Nachdem in der vorliegenden Arbeit die HPV8 E6-abhängige CCL2 Regulation über den C/EBP $\alpha$ -p63-Signalweg ausführlich beschrieben wurde, sollte im Weiteren ein Zytokin-Screening Aufschluss darüber geben, ob HPV8 über diesen Mechanismus auch andere Zytokine reguliert. Obwohl in 8E6-exprimierenden HaCaT Zellen mit CCL2 und IL1 Ra nur zwei regulierte Zytokine identifiziert wurden (s. 3.2, Abbildung 11), wurde zur Vollständigkeit in HaCaT WT Zellen die C/EBP $\alpha$ - und p63-abhängige Zytokin Expression untersucht. Dazu wurde mit Überständen aus C/EBP $\alpha$ - bzw. p63 *Knockdown* Ansätzen ein Multiplex Immuno Assay durchgeführt (Abbildung 37). Neben CCL2 war im C/EBP $\alpha$  *Knockdown* auch eine erhöhte SCGF $\beta$  Expression detektierbar. Dahingegen wurde in diesen Ansätzen weniger MIF und IL-1 Ra exprimiert (Abbildung 37A). IL-6 wurde in HaCaT WT Zellen nicht exprimiert. Aus der Zytokin Expressionsanalyse im p63 *Knockdown* ging hervor, dass mit Ausnahme von IL-6 und SCGF $\beta$  die Expression der restlichen Zytokine reduziert war (Abbildung 37B). Bis auf CCL2 und IL1 Ra wurden die Zytokine, die hier potenziell von C/EBP $\alpha$  und p63 reguliert werden allerdings nicht in 8E6-exprimierenden HaCaT Zellen reguliert (Abbildung 11).



**Abbildung 37. Zytokin-Screening in HaCaT WT Zellen nach einem C/EBPα und p63 Knockdown.** HaCaT WT Zellen wurden mit *non-targeting* (si Kontrolle) oder siRNA gegen (A) C/EBPα und (B) p63 transfiziert und nach 48 h geerntet. In den Überständen wurde in einem Multiplex Immuno Assay die Proteinkonzentration von 48 Zytokinen bestimmt (s. Anhang Tabelle 9). Es sind die Zytokine dargestellt, die in 8E6-exprimierenden HaCaT Zellen >30 pg/ml exprimiert wurden. \*p<0,05.

Der Einfluss von HPV8 E6 in Bezug auf die Zytokin Expression wurde neben der HaCaT Zelllinie zusätzlich auch in primären Vorhautkeratinozyten analysiert. Im Vordergrund standen dabei ebenfalls Zytokine, die potenziell von 8E6 über den C/EBPα-p63-Signalweg reguliert werden. Aus diesem Grund wurden Zellüberstände von 8E6-exprimierenden NFK, C/EBPα und p63 *Knockdown* NFK WT und von einer Kombination aus 8E6-exprimierenden NFK mit p63 *Knockdown* in einem Multiplex Immuno Assay untersucht (Abbildung 38). Von insgesamt 48 gemessenen Zytokinen (s. Anhang Tabelle 9) wurden für die Auswertung nur Zytokine berücksichtigt, die in mindestens einem Set in einer Proteinkonzentration von  $\geq 30$  pg/ml vorlagen. Im Allgemeinen wurden in primären NFK deutlich mehr Zytokine exprimiert als in der HaCaT Zelllinie. Auch die Anzahl der Zytokine, deren Expression sich durch 8E6 veränderte, war in NFK höher. Während GROα, G-CSF, IP-10, TNF-α und insbesondere IL-6 von 8E6 induziert werden, war bei MIF, IL-1α, VEGF und ähnlich zu HaCaT Zellen auch bei IL-1 Ra eine signifikante Repression durch 8E6 zu beobachten. Von den 8E6-induzierten Zytokinen sind GROα und TNF-α die einzigen Zytokine, die im C/EBPα *Knockdown* verstärkt

und im p63 *Knockdown* weniger exprimiert wurden und könnten somit neben CCL2 potenziell auch über den C/EBP $\alpha$ -p63-Signalweg reguliert werden. Jedoch ist zu erwähnen, dass die Proteinkonzentration von TNF- $\alpha$  in einem sehr niedrigen Bereich lag (10,7 pg/ml in pLXSN-enthaltenden und 33,6 pg/ml in 8E6-exprimierenden NFK). Wie der p63 *Knockdown* zeigte, können zwar auch die anderen 8E6-induzierten Zytokine IL-6, G-CSF und IP10 p63-abhängig reguliert werden, jedoch erwies sich hier C/EBP $\alpha$  nicht als negativer Regulator. Die durch 8E6-supprimierten Zytokine waren tendenziell auch im C/EBP $\alpha$  *Knockdown* schwächer exprimiert und entgegen den Erwartungen wurden diese im p63 *Knockdown* schwächer exprimiert. Während sich hier C/EBP $\alpha$  als potenzieller positiver Regulator 8E6-unterdrückten Zytokine herausstellte, hatte p63 das Potenzial, eine Vielzahl der in NFK exprimierten Zytokine positiv zu regulieren.

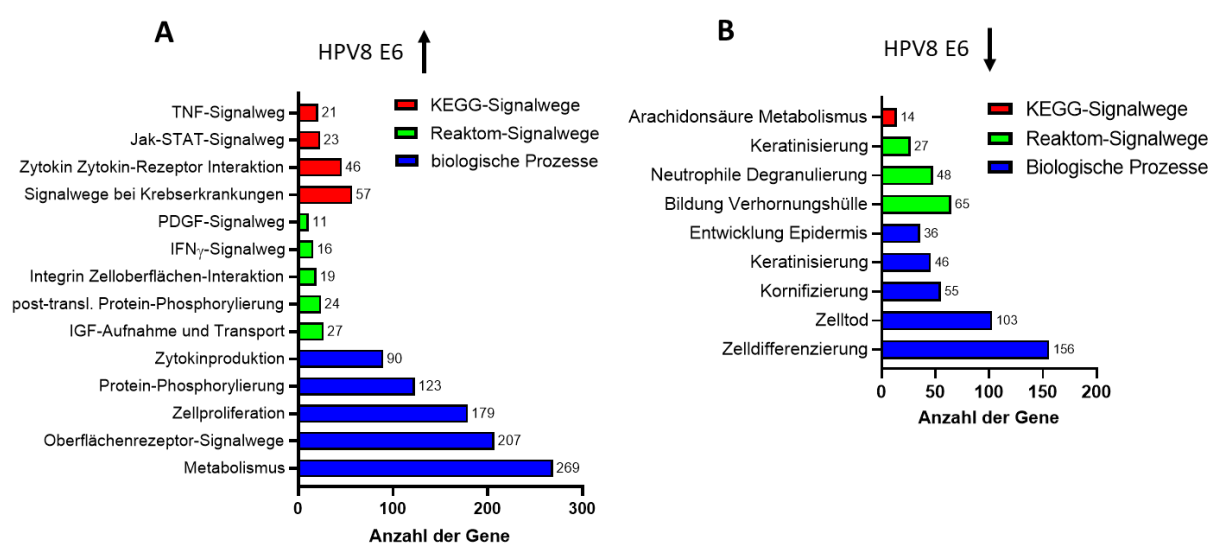


**Abbildung 38 Zytokin-Screening zur Analyse HPV8 E6-, C/EBP $\alpha$ - und p63-regulierter Zytokine in NFK.** In Zellüberständen der angegebenen Ansätze wurde in einem Multiplex Immuno Assay die Konzentration von 48 Zytokinen bestimmt (s. Anhang Tabelle 9). Links: Überstand von pLXSN-enthaltenden bzw. 8E6-exprimierenden NFK. Mitte: NFK WT wurden mit *non-targeting* (si Kontrolle) oder siRNA gegen C/EBP $\alpha$  bzw. gegen p63 transfiziert und nach 48 h geerntet. Rechts: pLXSN-enthaltenden bzw. 8E6-exprimierende NFK wurden mit *non-targeting* (si Kontrolle) oder siRNA gegen p63 transfiziert und nach 48 h geerntet. Dargestellt sind Zytokine deren Konzentration mindestens in einem Set  $\geq 30$  pg/ml war. Absolute Proteinkonzentrationen sind über die Farbskalierung definiert. Relative Werte sind mit Standardabweichung in den jeweiligen Boxen angegeben und stehen in Relation zur jeweiligen Kontrolle des Sets. Signifikanzen in der oberen rechten Ecke beziehen sich auf die absoluten Proteinkonzentrationen in Bezug auf die jeweilige Kontrolle. Signifikanzen in der unteren linken Ecke beziehen sich auf die absoluten Proteinkonzentrationen in Bezug auf die 8E6 si Kontrolle. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

### 3.7.2 Analyse der Genexpression

Das HPV8 E6 Onkoprotein hat das Potenzial, mit zahlreichen zellulären Mechanismen zu interagieren und reguliert auf diese Weise die Expression verschiedener Gene. Ein entscheidender bereits beschriebener Mechanismus von 8E6 stellt der C/EBP $\alpha$ -p63-Signalweg dar (Marthaler et al., 2017). Dieser stimuliert nicht nur die Proliferation von suprabasalen Keratinozyten, sondern beeinflusst, wie hier gezeigt, auch Komponenten des Immunsystems, durch die Regulation der Genexpression von Zytokinen, insbesondere CCL2.

Angesichts des breiten regulatorischen Spektrums von 8E6, das den C/EBP $\alpha$ -p63-Signalweg einbezieht, sollten im Weiteren Genexpressionsanalysen durchgeführt werden, um weitere Gene zu identifizieren, die potenziell durch 8E6 über diesen Mechanismus reguliert werden. Zu diesem Zweck wurde RNA aus C/EBP $\alpha$ - und p63 *Knockdown* Ansätzen in NFK WT und 8E6-exprimierenden bzw. pLXSN-enthaltenden NFK, zur Durchführung eines mRNA- und miRNA-Microarrays verwendet, der eine Analyse des gesamten Transkriptoms ermöglicht. In den Ansätzen wurde zunächst in einer qRT-PCR der Erfolg der beiden *Knockdowns* und die Funktionalität des C/EBP $\alpha$ -p63-Signalwegs in 8E6-exprimierenden NFK verifiziert (s. Anhang Abbildung 46). Gene die im Microarray einen Fold Change  $\geq 1,5$  wurden als hochreguliert und  $\leq 0,66$  als herunterreguliert angesehen. Zunächst wurde mit HPV8 E6 hoch- und herunterregulierten Genen mit dem GeneTrail 3.2 Online Tool eine Überrepräsentationsanalyse (ORA) durchgeführt, mit der die Anreicherung von Gensets in verschiedenen zellulären Mechanismen ermittelt werden kann (Abbildung 39) (Gerstner et al., 2020).

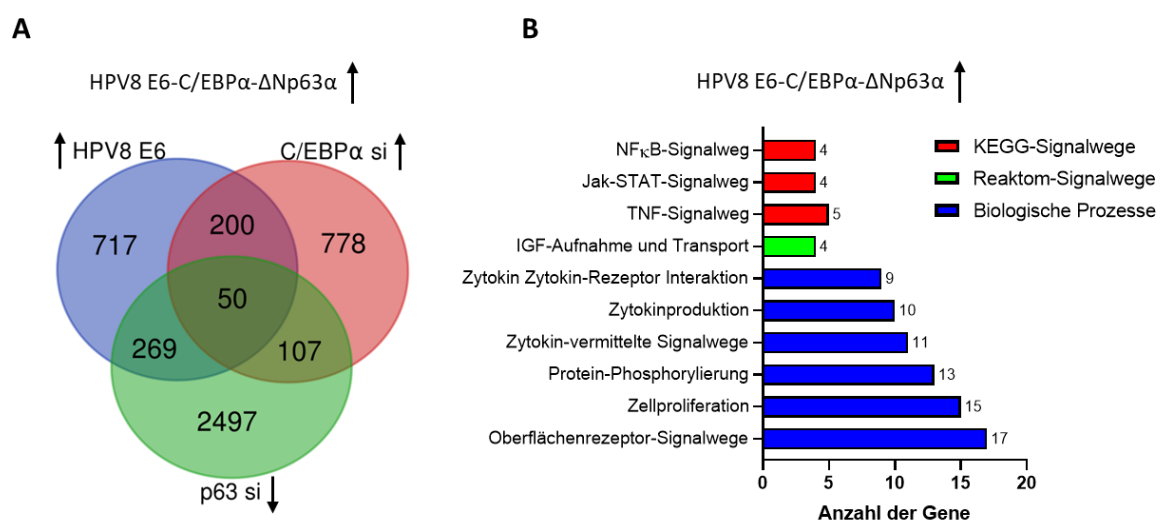


**Abbildung 39. Überrepräsentationsanalyse von HPV8 E6-regulierten Genen.** RNA aus pLXSN-enthaltenden und 8E6-exprimierenden NFK wurde zur Durchführung eines mRNA-Microarrays verwendet. Mit dem GeneTrail 3.2 Online Tool wurde für HPV8 E6 (A) hochregulierte Gene (Fold Change  $\geq 1,5$ ) (CCL2 aus qRT-PCR) und (B) herunterregulierte Gene (Fold Change  $\leq 0,66$ ) eine

Überrepräsentationsanalyse durchgeführt. Dargestellt sind signifikante ( $p < 0,05$ ) Anreicherungen von Genen aus den relevantesten biologischen Prozessen und KEGG- oder Reaktom-Signalwegen.  $N=2$ .

Insgesamt waren in 8E6-exprimierenden NFK 1236 Gene hochreguliert und 1166 Gene herunterreguliert (s. Anhang Tabelle 10). Angereicherte Gene, die von 8E6 induziert wurden, sind neben Mechanismen wie Metabolismus und Proliferation, auch vor allem an der Regulation und Produktion von Zytokinen beteiligt, insbesondere der TNF- und Jak-STAT-Signalweg (Abbildung 39A). Darüber hinaus war eine signifikante Anreicherung von Genen zu beobachten, die eine Rolle bei Protein-Phosphorylierungen spielen und in Wachstumsfaktor-abhängige Prozesse involviert sind, die sich um PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*) und IGF (*Insulin-like Growth Factor*) drehen. Im Gegensatz dazu waren 8E6-herunterregulierte Gene signifikant bei Signalwegen angereichert, die hauptsächlich die (terminale-) Differenzierung betreffen und die Degranulierung von Neutrophilen regulieren (Abbildung 39B). Mechanismen und Signalwege von Zytokinen waren dahingegen von 8E6-herunterregulierten Genen weniger betroffen.

Um Gene und Signalwege zu identifizieren, die potenziell durch 8E6 über den C/EBP $\alpha$ -p63-Signalweg reguliert werden, wurde aus dem Transkriptom der jeweiligen Sets die Schnittmenge (8E6 vs. C/EBP $\alpha$  si vs. p63 si) der regulierten Gene bestimmt. Da die  $\Delta$ Np63 $\alpha$  Isoform seine Zielgene sowohl aktivieren als auch inhibieren kann, sollten Gene identifiziert werden, die über den C/EBP $\alpha$ -p63-Signalweg induziert oder inhibiert werden. Aus diesem Grund wurde mit der Schnittmenge von potenziell hochregulierten (induziert in 8E6 und C/EBP $\alpha$  si, reprimiert in p63 si) und potenziell herunterregulierten Genen (reprimiert in 8E6 und induziert in C/EBP $\alpha$  si und p63 si) eine ORA-Analyse durchgeführt (Abbildung 40).



**Abbildung 40. Überrepräsentationsanalyse von potenziell durch HPV8 E6-C/EBP $\alpha$ -p63-induzierten Genen.** RNA aus pLXSN-enthaltenden bzw. 8E6-exprimierenden NFK und C/EBP $\alpha$ - bzw. p63 *Knockdown* Ansätzen (48 h) wurde zur Durchführung eines mRNA-Microarrays verwendet. A: Mit

dem Venn-Webtool Tool (bioinformatics.psb.ugent.be) wurde die Schnittmenge von Genen ermittelt, die durch 8E6 und im C/EBP $\alpha$  *Knockdown* hochreguliert (Fold Change  $\geq 1,5$ ) und im p63 *Knockdown* herunterreguliert (Fold Change  $\leq 0,66$ ) waren. **B:** Mit potenziell durch HPV8 E6-C/EBP $\alpha$ -p63 induzierten Genen (50) wurde eine ORA-Analyse durchgeführt. Dargestellt sind signifikante ( $p < 0,05$ ) Anreicherungen von Genen aus den relevantesten biologischen Prozessen und KEGG- oder Reaktom-Signalwegen. N=2.

Aus den mRNA-Microarray Daten gingen 87 Gene hervor, die möglicherweise über den 8E6-C/EBP $\alpha$ -p63-Signalweg herunterreguliert werden (s. Anhang Abbildung 47 und Tabelle 11). Eine ORA-Analyse ergab hier jedoch keine signifikante Anreicherung von biologischen Prozessen und KEGG- oder Reaktom-Signalwegen. Für potenziell über den 8E6-C/EBP $\alpha$ -p63-Signalweg hochregulierte Gene wurden insgesamt 50 Gene identifiziert (Abbildung 40A und Anhang Tabelle 11). Hier zeigte die ORA-Analyse dieses Gensets Anreicherung von Genen, die überwiegend an inflammatorischen Prozessen beteiligt sind. Dazu gehörte zum einen einerseits die Zytokinproduktion selbst und zum anderen die vorgeschalteten NF- $\kappa$ B-, Jak-STAT- und TNF- Signalwege (Abbildung 40B). Des Weiteren fanden sich in der ORA-Analyse angereicherte Gene, die an Proliferations- und Wachstumsprozessen (IGF) sowie an der Regulation von Protein-Phosphorylierungen beteiligt sind.

Neben der Analyse des mRNA-Expressionsprofils sollten in einem Screening-Verfahren ebenfalls miRNAs identifiziert werden, die durch HPV8 E6 oder den 8E6-C/EBP $\alpha$ -p63-Signalweg reguliert werden. Dazu wurde ein miRNA-Microarray mit RNA aus 8E6-exprimierenden NFK und aus C/EBP $\alpha$ - und p63 *Knockdown* Ansätzen in NFK WT durchgeführt. In 8E6-exprimierenden NFK waren insgesamt 31 miRNAs hochreguliert (Fold Change  $\geq 1,5$ ) und 9 miRNAs herunterreguliert (Fold Change  $\leq 0,66$ ) (Tabelle 8). Die miR-203 befand sich hier wie zu erwarten unter den 8E6-reprimierten miRNAs.

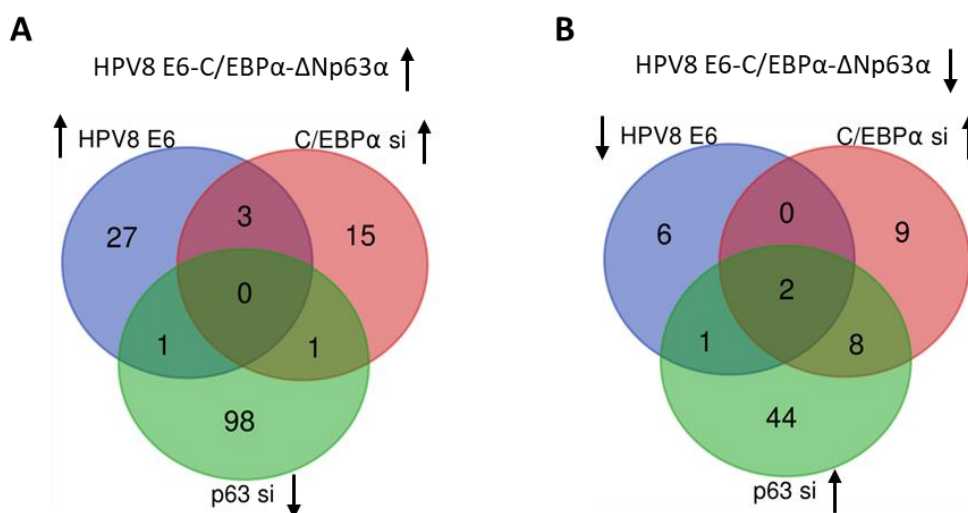
**Tabelle 8. HPV8 E6-regulierte miRNAs.** Aus pLXSN-enthaltenden bzw. 8E6-exprimierenden NFK wurde RNA isoliert und anschließend zur Durchführung eines miRNA-Microarrays verwendet. Dargestellt sind alle miRNAs, die in 8E6-exprimierenden NFK im Vergleich zur Leervektor Kontrolle hochreguliert (Fold Change  $\geq 1,5$ ) und herunterreguliert (Fold Change  $\leq 0,66$ ) waren (alphabetisch sortiert). N=2.

induzierte miRNAs			reprimierte miRNAs
hsa-miR-197-3p	hsa-miR-466	hsa-miR-6739-5p	hsa-miR-138-5p
hsa-miR-210-3p	hsa-miR-4668-5p	hsa-miR-6751-3p	hsa-miR-203a-3p
hsa-miR-21-5p	hsa-miR-4730	hsa-miR-6779-3p	hsa-miR-224-5p
hsa-miR-3170	hsa-miR-4793-3p	hsa-miR-6815-3p	hsa-miR-23c
hsa-miR-34b-3p	hsa-miR-4800-5p	hsa-miR-6873-3p	hsa-miR-4465
hsa-miR-3591-3p	hsa-miR-574-3p	hsa-miR-6886-3p	hsa-miR-513a-5p
hsa-miR-3935	hsa-miR-574-5p	hsa-miR-6894-3p	hsa-miR-6132
hsa-miR-4254	hsa-miR-619-5p	hsa-miR-8071	hsa-miR-642a-3p

hsa-miR-4290	hsa-miR-6514-3p	hsa-miR-8485	hsa-miR-6789-5p
hsa-miR-4436b-5p	hsa-miR-6716-3p		

HPV8 E6-regulierte miRNAs wurden in einer Überrepräsentationsanalyse mit dem Online Tool miEAA 2.0 (Kern et al., 2020) auf Anreicherungen im Zusammenhang mit der Regulation gemeinsamer Zielgene und Signalwege (u. a. KEGG) untersucht. Dabei wurden keine signifikanten Anreicherungen für 8E6-induzierte miRNAs festgestellt. Ebenso wurden für die durch 8E6-unterdrückten miRNAs keine signifikante Überrepräsentationen für Signalwege festgestellt, während die ORA-Analyse zwei Zielgene offenbarte, bei denen miRNAs signifikant angereichert waren. Dies waren die Gene E-Cadherin CDH1 (miR-203a-3p, -138-5p und -224-5p) und Endothelinrezeptor A (EDNRA) (miR-203a-3p und -224-5p).

Um miRNAs zu identifizieren, die durch HPV8 E6 potenziell über den C/EBP $\alpha$ -p63-Signalweg reguliert werden, wurde die Schnittmenge der regulierten miRNAs bestimmt, die in NFK durch einen C/EBP $\alpha$ - und p63 *Knockdown* oder durch 8E6 reguliert werden. Dafür wurden miRNAs betrachtet, die über den 8E6-C/EBP $\alpha$ -p63-Signalweg potenziell hochreguliert (induziert in 8E6 und C/EBP $\alpha$  si, reprimiert in p63 si) oder herunterreguliert werden (reprimiert in 8E6 und induziert in C/EBP $\alpha$  si und p63 si) (Abbildung 41).



**Abbildung 41. HPV8 E6-regulierte miRNAs unter Beteiligung des C/EBP $\alpha$ -p63-Signalwegs.** RNA aus pLXSN-enthaltenden bzw. 8E6-exprimierenden NFK und C/EBP $\alpha$ - bzw. p63 *Knockdown* Ansätzen (48 h) wurde zur Durchführung eines miRNA-Microarrays verwendet. Mit dem Venn-Webtool (bioinformatics.psb.ugent.be) wurde die Schnittmenge von miRNAs ermittelt, die durch 8E6, C/EBP $\alpha$  und  $\Delta$ Np63 $\alpha$  reguliert werden. **A:** Induzierte miRNAs durch 8E6 und im C/EBP $\alpha$  *Knockdown* und reprimierte miRNAs im p63 *Knockdown*. **B:** Reprimierte miRNAs durch 8E6 und induzierte miRNAs im C/EBP $\alpha$ - und p63 *Knockdown*. Hochreguliert=Fold Change  $\geq 1,5$ , herunterreguliert=Fold Change  $\leq 0,66$ .

Aus der Schnittmengenanalyse von HPV8 E6, C/EBP $\alpha$  und p63 regulierten miRNAs ging hervor, dass keine der 31 durch 8E6-induzierten miRNAs über den 8E6-C/EBP $\alpha$ -p63-



Signalweg hochreguliert wird (Abbildung 41A). Im Gegensatz dazu wurden zwei miRNAs identifiziert, deren Unterdrückung durch 8E6 möglicherweise über C/EBP $\alpha$  und p63 verläuft (Abbildung 41B). Zu diesen beiden miRNAs zählen miR-642a-3p und miR-4465. Die miR-203 war an dieser Stelle nicht bei den herunterregulierten miRNAs zu erwarten, da diese zum einen im Signalweg  $\Delta$ Np63 $\alpha$  vorangeschaltet ist und zum anderen durch C/EBP $\alpha$  positiv reguliert wird. Für miR-642a-3p und miR-4465 zeigte eine Überrepräsentationsanalyse mit dem miEEA 2.0 Online Tool eine signifikante Anreicherung bei der Regulation der gemeinsamen Zielgene 1-AGP Acyltransferase 5 (AGPAT5), G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase 2 (GRK2), Myotubularin-verwandtes Protein 12 (MTMR12), SOGA-Familienmitglied 3 (SOGA3) und dem bisher nicht charakterisierten Gen KIAA0408.



## 4 Diskussion

Das kutane Humane Papillomvirus 8 stellt einen bedeutenden Co-Faktor der UV-induzierten kutanen Karzinogenese bei EV-Patienten dar, indem es die Regulation von Differenzierungsprozessen, DNA-Reparatur Mechanismen und Immunfaktoren vor allem durch die E6 und E7 Onkoproteine manipuliert. Die Rekrutierung von Makrophagen in EV-Läsionen sowie die Induktion des CCL2 Chemokins, die sich in vorangegangenen Ergebnissen der Arbeitsgruppe (AG Smola) angedeutet haben (Sperling, 2009, Vella, 2019), wurden in dieser Arbeit tiefergehend analysiert, insbesondere die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen. Dabei wurde gezeigt, dass das HPV8 E6 Onkoprotein die CCL2 Expression in Keratinozyten stimuliert und dadurch die CCL2/CCR2-abhängige *in vitro* Migration von CD14<sup>+</sup> Monozyten antreibt. Darüber hinaus wurde PKA-C $\alpha$  als neues Target von HPV8 identifiziert, das in 8E6-exprimierenden Zellen vermehrt in seiner aktiven Form (p-PKA-C $\alpha$ ) vorliegt und das Potenzial hat, die CCL2 Expression zu regulieren. In 8E6-exprimierenden HaCaT Zellen wurde des Weiteren beobachtet, dass MAP-Kinasen die CCL2 Expression möglicherweise weiter verstärken können. Screening-Verfahren für Zytokine, mRNAs und miRNAs zeigten außerdem, dass der 8E6-C/EBP $\alpha$ -p63-Signalweg, neben der Aktivierung der Proliferation und der CCL2 Expression, auch andere Faktoren und zelluläre Prozesse regulieren kann.

### 4.1 Mechanismen der HPV8 E6-abhängigen CCL2 Induktion

#### 4.1.1 CCL2 Induktion in Keratinozyten durch HPV8 E6

Die chronische Inflammation gehört zu den wichtigsten Co-Faktoren der  $\beta$ -HPV-assoziierten Karzinogenese (Tampa et al., 2020). In vorherigen Experimenten der Arbeitsgruppe (AG Smola), deuteten präliminäre Analysen der Immunhomöostase von EV-Läsionen auf eine Infiltration mit CD68<sup>+</sup> Makrophagen sowie auf eine erhöhte Expression des CCL2 Chemokins in Keratinozyten hin (Sperling, 2009). Daher wurde letzteres im Rahmen der vorliegenden Arbeit aufgegriffen und weiter untersucht. Dabei wurde immunhistochemisch gezeigt, dass Keratinozyten in läsionaler Haut von EV-Patienten, in denen HPV8 DNA nachgewiesen werden konnte, vermehrt CCL2 exprimieren. Eine hohe CCL2 Expression wurde weniger in der Basalschicht, sondern vielmehr in suprabasalen Zellschichten der Epidermis detektiert, wo vor allem die frühen HPV8 E6 und E7 Onkoproteine stark exprimiert werden (Lazarczyk et al., 2009). Alterationen von Komponenten des Immunsystems durch die E6 und E7 Onkoproteine

von mukosalen und kutanen HPV sind in der Literatur auf vielfältige Weise beschrieben worden (Smola et al., 2017, Venuti et al., 2019). Während sich die molekularen Mechanismen und ihre Targets zwischen dem  $\alpha$ - und  $\beta$ -Genus unterscheiden, spielen sie in beiden Fällen eine entscheidende Rolle bei der viralen Persistenz und der malignen Transformation von Tumoren. Aufgrund ihrer regulatorischen Funktion bei inflammatorischen Prozessen wurde untersucht, ob die 8E6 und 8E7 Proteine die CCL2 Expression beeinflussen. Ergebnisse aus retroviral infizierten HaCaT Zellen, die im Rahmen meiner Masterarbeit (Vella, 2019) generiert wurden, zeigten, dass CCL2 auf mRNA- und Proteinebene in HPV8 E6, aber nicht in E7-exprimierenden Zellen induziert wird. In der vorliegenden Arbeit wurde die 8E6-abhängige CCL2 Induktion in primären Vorhautkeratinozyten bestätigt. Dies bedeutet auch, dass die CCL2 Induktion unabhängig vom p53 Tumorsuppressor Protein ist, welches in HaCaT Zellen mutiert ist. Reportergergenversuche mit CCL2 Promotor Konstrukten bestätigten, dass die CCL2 Induktion durch 8E6 auf Transkriptionsebene über mehrere Promotorregionen (PRR, 2.9, ECR) verläuft. Eine Post-transkriptionelle Regulation der CCL2 Expression kann an dieser Stelle jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Im Tumormikromilieu können Immunfaktoren auch über parakrine Signalwege reguliert werden. So wurde unter anderem beim HPV-assoziierten Zervixkarzinom gezeigt, dass Epithelzellen über IL-6 eine parakrine CCL20 Induktion in stromalen Fibroblasten hervorrufen und dadurch die Rekrutierung von T<sub>H</sub>17-Zellen bewirken können (Walch-Rückheim et al., 2015). Allerdings konnten in dieser Arbeit parakrine Signale zwischen Fibroblasten und Keratinozyten, die möglicherweise die 8E6-abhängige CCL2 Induktion beeinflussen, durch Proteinexpressionsanalysen von Co-Kulturen und organotypischen 3D-Kulturen aus VHF und pLXSN-enhaltenden bzw. 8E6-exprimierenden HaCaT Zellen ausgeschlossen werden. VHF zeigten hier eine basale CCL2 Expression, die sich durch die Kultivierung mit pLXSN-enhaltenden HaCaT Zellen nicht veränderte, aber durch die Kultivierung mit 8E6-exprimierenden HaCaT Zellen signifikant erhöht wurde. Insbesondere zeigten die Immunfluoreszenz Färbungen von 3D-Kulturen, dass die CCL2 Induktion durch 8E6 in Keratinozyten stattfindet. Diese Ergebnisse decken sich mit der CCL2 Expressionsanalyse in EV-Läsionen. In den EV-Läsionen wurde CCL2 jedoch nur in suprabasalen Keratinozyten detektiert, während in 3D-Kulturen aus HaCaT Zellen CCL2 zusätzlich in basalen Zellen exprimiert wird. Ein möglicher Grund dafür könnte sein, dass bei 3D-Kulturen in allen Zellen des Epithels das 8E6 Protein exprimiert wird und somit in allen Zellschichten präsent ist, wohingegen in epidermalen Basalschichten von EV-Patienten HPV8 E6 nur schwach exprimiert wird. Dies unterstreicht erneut die Abhängigkeit der CCL2 Induktion vom 8E6

Protein. An dieser Stelle würde insbesondere eine Co-Färbung von EV-Läsionen für CCL2 und HPV8 E6 mRNA oder Protein mehr Aufschluss über die *in vivo* Induktion von CCL2 durch  $\beta$ -HPV geben.

Eine Regulation von CCL2 wurde ebenfalls für das kutane HPV5 beschrieben, wobei eine verstärkte CCL2 Expression in HPV5 E6/E7-exprimierenden HaCaT Zellen und primären Keratinozyten detektiert wurde, der Mechanismus jedoch noch nicht entschlüsselt werden konnte (de Andrea et al., 2007). Dies stellt einen wesentlichen Unterschied zu mukosalen HR-HPV dar, welche die CCL2 Expression in frühen Phasen über die E6 und E7 Onkoproteine in Epithelzellen unterdrücken (Kleine-Lowinski et al., 2003), aber die CCL2 Expression in späten Phasen über das Tumormikromilieu induzieren (Schröer et al., 2011). Die Tatsache, dass sowohl kutane als auch mukosale HR-HPV CCL2 regulieren, unterstreicht dessen Bedeutung im HPV-Lebenszyklus. Hinsichtlich des  $\beta$ -HPV-Lebenszyklus könnten Faktoren, die durch eine chronische Inflammation hervorgerufen werden, den HPV8 Promotor bzw. die virale Genexpression, neben der UV-Strahlung (Akgül et al., 2005b) und dem IRF-7 Transkriptionsfaktor (Oldak et al., 2011), zusätzlich verstärken und dadurch die virale Replikation fördern. Inflammationen, die somit einen positiven Effekt auf den  $\beta$ -HPV-Lebenszyklus ausüben könnten, könnten sich über sekundäre Mechanismen negativ auf den Patienten auswirken, indem sie die kutane Karzinogenese antreiben.

#### 4.1.2 Regulation von CCL2 über den HPV8 E6-C/EBP $\alpha$ -p63-Signalweg

Der Transkriptionsfaktor C/EBP $\alpha$  wurde von unserer Arbeitsgruppe als neues Target des HPV8 E6 Proteins identifiziert (Marthaler et al. 2017). Die Bindung von 8E6 an p300 unterdrückt die C/EBP $\alpha$  Expression, was zu einer schwächeren Expression von miR-203 führt und somit die mRNA des Stammzellfaktors  $\Delta$ Np63 $\alpha$  nicht mehr post-transkriptionell degradiert wird. Dieser Mechanismus induziert nicht nur die Proliferation suprabasaler Keratinozyten und gewährleistet die virale Replikation, sondern aktiviert auch die Expression des CCL2 Chemokins, wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt wurde.

Aus *Knockdown* Experimenten in Keratinozyten geht C/EBP $\alpha$  als negativer Regulator der CCL2 Expression hervor und bestätigt damit frühere mRNA-Daten (Vella, 2019). Die Funktion von C/EBP $\alpha$  als Regulator von CCL2 oder anderen Zytokinen ist in der Literatur bisher nicht beschrieben worden. Dahingegen ist die Rolle der C/EBP-Familienmitglieder C/EBP $\beta$ , C/EBP $\delta$  und CHOP bei der Aktivierung inflammatorischer Gene ausführlich beschrieben worden (Tolomeo und Grimaudo, 2020). Mitglieder der C/EBP-Familie können in verschiedenen Zelltypen durch TNF- $\alpha$  reguliert werden, ein multifunktionales Zytokin, das die Expression

zahlreicher Zytokine einschließlich CCL2 aktiviert. Während die TNF- $\alpha$  Stimulation in Hepatozyten zu einem Anstieg der C/EBP $\beta$  und C/EBP $\delta$  Proteinkonzentration im Zellkern führt, resultiert die TNF- $\alpha$  Stimulation bzw. die Aktivierung von TNF-Rezeptor-Signalwegen in einer Repression der C/EBP $\alpha$  Gen- und Proteinexpression in Adipo- bzw. Hepatozyten (Yin et al., 1996, Stephens und Pekala, 1991). In diesem Zusammenhang geht aus den Ergebnissen dieser Arbeit ebenfalls in Keratinozyten C/EBP $\alpha$  als Komponente des TNF- $\alpha$  Signalwegs hervor. Hier war die C/EBP $\alpha$  Repression durch TNF- $\alpha$  und 8E6 jeweils proportional zur CCL2 Induktion in HaCaT Zellen, wobei die Kombination aus 8E6 und TNF- $\alpha$  den Effekt synergistisch verstärkt hat. Demnach liegt es nahe, dass das HPV8 E6 Onkoprotein über die Repression von C/EBP $\alpha$  in einen inflammatorischen Signalweg von TNF- $\alpha$  eingreift. Da im Zytokin Screening insbesondere der IL-1 Rezeptorantagonist (IL-1 Ra) durch HPV8 E6 unterdrückt wurde, könnte die Dysbalance zwischen IL-1 und IL-1 Ra zusätzlich sekundäre inflammatorische Effekte und Signalkaskaden über den IL-1-Signalweg auslösen (Palomo et al., 2015). Außerdem könnte die leicht erhöhte TNF- $\alpha$  Konzentration, die in 8E6-exprimierenden NFK zu beobachten war, ebenfalls für die Aktivierung inflammatorischer Signalwege verantwortlich sein.

In basalen Epithelzellen werden zur Aufrechterhaltung der proliferativen Kapazität überwiegend Isoformen des  $\Delta$ Np63 Proteins exprimiert, denen die N-Terminale Transaktivierungsdomäne fehlt und dominant-negative Varianten der Aktivität von p53 und TAp63 Proteinen darstellen (Yang et al., 1998). Die Isoformen p63 $\alpha$  und p63 $\beta$  können jedoch die Expression von Zielgenen über eine zweite Transaktivierungsdomäne (TA2) aktivieren (Ghioni et al., 2002). Anhand von p63 *Knockdown*- und  $\Delta$ Np63 $\alpha$  Überexpressionsanalysen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die  $\Delta$ Np63 $\alpha$  Isoform ein positiver Regulator von CCL2 ist, über den das HPV8 E6 Protein die CCL2 Expression aktiviert. Obwohl die dabei verwendete siRNA gegen alle p63 Isoformen gerichtet war, ist davon auszugehen, dass die  $\Delta$ Np63 Form für den Effekt verantwortlich war, zumal sich der *Knockdown* auf mRNA-Ebene spezifisch für  $\Delta$ Np63 $\alpha$  erwiesen hat und hauptsächlich die  $\Delta$ Np63 Isoformen in Keratinozyten exprimiert werden (Yang et al., 1998). Darüber hinaus ist es weniger wahrscheinlich, dass die anderen  $\Delta$ Np63 Isoformen ( $\gamma$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$ ) positive Regulatoren der Genexpressionen sind, da ihnen die C-terminale TA2 fehlt (Pokorná et al., 2021). Letzteres wird auch durch das Experiment bestärkt, bei dem die miR-203 Mimic Transfektion, welche die Degradation von  $\Delta$ Np63 $\alpha$  und  $\Delta$ Np63 $\beta$  mRNA bewirkt (DeCastro et al., 2013), den gleichen Effekt auf die 8E6-abhängige CCL2 Induktion hervorrief wie siRNA gegen p63. Des Weiteren bestätigt die  $\Delta$ Np63 $\alpha$  Überexpression dessen Rolle als positiver Regulator der CCL2 Expression. Aufgrund der

begrenzten erwerbbaren Verfügbarkeit von  $\Delta$ Np63 $\alpha$ -Expressionsplasmiden wurde ein Konstrukt mit einer S59G Mutation verwendet. Inwieweit die Mutation den Effekt auf CCL2 beeinflusst, ist unklar. Zumindest die Funktionalität von  $\Delta$ Np63 $\alpha$  (S59G) als Repressor des p21 Promotors und damit die Expression eines funktionellen  $\Delta$ Np63 $\alpha$  Proteins (Westfall et al., 2003) wurde in einem Reporter Assay bestätigt. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass die Mutation die Funktionalität als Aktivator beeinträchtigt, da die S59G Mutation vor der N-terminalen DNA-Bindedomäne lokalisiert ist und die TA2 sich zwischen den Aminosäuren 410-512 am C-Terminus befindet (Ghioni et al., 2002). Dass es sich bei dem Serin an Position 59 um eine Phosphorylierungsstelle handelt, die sich möglicherweise auf die Funktionalität des Proteins auswirkt, wurde bisher nicht beschrieben (phosphosite.org).

Die Involvierung von  $\Delta$ Np63 $\alpha$  an der Regulation von Zytokinen und der damit verbundenen Rekrutierung inflammatorischer Zellen wurde bereits in transgenen Mäusen belegt, bei denen  $\Delta$ Np63 $\alpha$  induzierte Entzündungsreaktionen als zentrale Komponente der Tumorprogression beschrieben wurden (Du et al., 2014). Die Überexpression von  $\Delta$ Np63 $\alpha$  in der Basalschicht von Mäusen resultierte dabei in einer Aktivierung zahlreicher inflammatorischer Zytokine, einschließlich CCL2. In der gleichen Studie wurden ebenfalls mehrere Zytokine identifiziert, die durch die  $\Delta$ Np63 $\alpha$  Überexpression in humanen HNSCC Zellen (UM-SCC1) induziert werden. Auch für inflammatorische Faktoren wie iRhom2 (Arcidiacono et al., 2018), IL-31 und IL-33 (Rizzo et al., 2016) wurde eine  $\Delta$ Np63 $\alpha$ -abhängige positive Regulation in Keratinozyten beschrieben. Darüber hinaus wurde von unserer Arbeitsgruppe beim HPV16-assoziierten Peniskarzinom gezeigt, dass erhöhte p63 Konzentrationen eine verstärkte Produktion des Neutrophilen-rekrutierenden Chemokins CXCL8 bewirken (Bernhard et al., 2021). Dementsprechend sind die Beobachtungen aus dieser Arbeit, dass  $\Delta$ Np63 $\alpha$  ein positiver Regulator von CCL2 in 8E6-exprimierenden Keratinozyten ist, in Einklang mit den Erkenntnissen in Mäusen und humanen Tumorzelllinien aus der Literatur.

In epidermalen Keratinozyten ist für die Aktivierung der Genexpression durch  $\Delta$ Np63 weniger die Bindung von  $\Delta$ Np63 selbst von Bedeutung, sondern vielmehr kann die Kooperation mit anderen Transkriptionsfaktoren dessen Aktivität beeinflussen (Kouwenhoven et al., 2015). Interaktionen mit anderen Proteinen können über die C-terminale SAM-Domäne erfolgen, die nur in p63 $\alpha$  Isoformen vorhanden ist (Scoumanne et al., 2005). Ein solches Co-Faktor Modell wäre auch für die HPV8 E6-abhängige CCL2 Induktion denkbar. Denn trotz der hohen Effizienz des p63 *Knockdowns* ist die CCL2 Induktion durch 8E6 nicht vollständig reversibel. Das gleiche gilt für die p63-abhängige Aktivierung der 2.9- und ECR-Promotorregionen des CCL2 Promotors durch 8E6. Folglich könnte es sein, dass durch 8E6 zusätzliche Co-Faktoren

reguliert werden, die an  $\Delta\text{Np63}\alpha$  binden und anschließend gemeinsam die CCL2 Genexpression aktivieren. Dies würde auch erklären, weshalb bei der  $\Delta\text{Np63}\alpha$  Überexpression in HaCaT Zellen kein konzentrationsabhängiger Effekt auf die CCL2 Expression zu beobachten ist und die CCL2 Induktion bereits bei niedrigen Konzentrationen  $\Delta\text{Np63}\alpha$  gesättigt zu sein scheint, da ein potenzieller Co-Faktor nicht vorhanden ist. Ein weiterer Aspekt, der für ein  $\Delta\text{Np63}\alpha$  Co-Faktor Modell spricht, geht aus der CCL2 Färbung von EV-Läsionen und organotypischen 3D-Kulturen hervor. Obwohl  $\Delta\text{Np63}\alpha$  stark exprimiert wird (Yang et al., 1998), war in den Basalschichten von EV-Läsionen und nicht-läsionaler Haut keine CCL2 Expression nachweisbar, wohingegen in 3D-Kulturen aus 8E6-exprimierenden HaCaT Zellen CCL2 in allen Zellschichten erhöht war. Dies deutet darauf hin, dass  $\Delta\text{Np63}\alpha$  allein für eine starke CCL2 Induktion nicht ausreichend ist und HPV8 E6 neben  $\Delta\text{Np63}\alpha$  auch einen potenziellen Co-Faktor induziert, zumal 8E6 in 3D-Kulturen in allen Zellschichten und in EV-Läsionen vorwiegend in suprabasalen Zellschichten exprimiert wird. Eine Co-Expression von p63 und CCL2 in Keratinozyten von EV-Läsionen konnte nachträglich in unserer Arbeitsgruppe (AG Smola) durch eine Doppel-Immunfluoreszenzfärbung gezeigt werden. Zu den Transkriptionsfaktoren, die als Interaktionspartner von  $\Delta\text{Np63}\alpha$  beschrieben wurden und zusammen mit  $\Delta\text{Np63}\alpha$  als Co-Faktor ihre Target Gene induzieren zählen unter anderem SOX2 und c-Rel (Watanabe et al., 2014, King et al., 2008). Bei c-Rel handelt es sich um ein Mitglied der NF- $\kappa$ B Familie, das in seiner aktiven phosphorylierten Form am C-Terminus von  $\Delta\text{Np63}\alpha$  bindet und der Komplex anschließend Gene aktiviert, die das unkontrollierte Wachstum von Keratinozyten bzw. Plattenepithelkarzinomen fördern (King et al., 2008). Die Interaktion zwischen  $\Delta\text{Np63}\alpha$  und c-Rel kann in HNSCC Zellen durch TNF- $\alpha$  hervorgerufen werden. Dabei bewirkt TNF- $\alpha$  die Degradation von I $\kappa$ B und führt zur Phosphorylierung von c-Rel und seiner Translokation in den Zellkern. Der c-Rel- $\Delta\text{Np63}\alpha$  Komplex verdrängt anschließend das TAp73 Protein von seinen Bindestellen und verhindert dadurch die Expression Wachstums-inhibierender Gene (Lu et al., 2011). Des Weiteren wurde beschrieben, dass  $\Delta\text{Np63}\alpha$  ein breites Genexpressionsprogramm reguliert, das sich mit dem NF- $\kappa$ B Transkriptom und seinem regulatorischen Netzwerk überschneidet (Yang et al., 2011). Erste Hinweise, dass HPV8 E6 auch NF- $\kappa$ B-regulierte Gene aktivieren kann, ging aus dem Kinase-Aktivitätsprofil hervor. Hier wiesen IKK $\alpha$  und IKK $\beta$ , die NF- $\kappa$ B durch die Phosphorylierung von I $\kappa$ B aktivieren können (Zhong et al., 1997), eine erhöhte Aktivität auf. Allerdings konnte dies aufgrund der Verfügbarkeit von Antikörpern im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht werden und müsste in weiteren Studien analysiert werden. Hinsichtlich des p63- und NF- $\kappa$ B-regulierten Transkriptoms wurden benachbarte und teilweise überlappende p63 und NF- $\kappa$ B Bindestellen in

den Promotorregionen mehrerer co-regulierter Gene identifiziert, an die der c-Rel- $\Delta$ Np63 $\alpha$  Komplex binden und die Genexpression aktivieren kann. Anhand ihrer Erkenntnisse implizieren Yang et al. (2011) einen Mechanismus, bei dem  $\Delta$ Np63 $\alpha$ , das in Karzinomen überexprimiert sein kann, zusammen mit c-Rel, das über einen TNF- $\alpha$ -abhängigen Signalweg aktiviert wird, die epitheliale Proliferation stimuliert und Entzündungsreaktionen auslöst. Eine Analyse auf p63 Bindestellen im CCL2 Promotor, dessen 2.9- und ECR-Region HPV8 E6-p63-abhängig induziert wird, ergab insgesamt neun potenzielle p63 Bindestellen. Von diesen befinden sich die potenziellen Bindestellen in der DRR-Region BS6 (2454-2486), BS7 (2551-2568) und BS8 (2607-2624), sowie in der ECR-Region BS9 (16406-16424) in unmittelbarer Nähe und überschneiden sich teilweise mit NF- $\kappa$ B Bindestellen (2603-2612, 2632-2640 und 16406-16416), die in der Literatur als essenziell für eine CCL2 Induktion nach TNF- $\alpha$  Stimulation beschrieben wurden (Bonello et al., 2011). Auf der Basis der Daten dieser Arbeit und der Literatur lässt sich die Hypothese formulieren, dass die CCL2 Induktion durch 8E6 über  $\Delta$ Np63 $\alpha$  mit c-Rel als Co-Faktor über die oben beschriebenen Bindestellen verläuft. Insbesondere kommen dafür die potenziellen p63 Bindestellen BS8 und BS9 in Frage, die mit NF- $\kappa$ B Bindestellen überlappen, sowie BS6, die in der Literatur bereits als p53 Bindestelle beschrieben wurde (Hacke et al., 2010). Dies müsste jedoch mit weiteren Reporter-, Interaktions- und DNA-Bindungs-Analysen näher untersucht werden. Zwar wurde in der vorliegenden Arbeit die Rolle von c-Rel bei der 8E6-abhängigen CCL2 Induktion nicht näher untersucht, jedoch wurde auf der Suche nach potenziellen Co-Faktoren im Kinase-Aktivitätsprofil PKA-C $\alpha$  als neues Target des 8E6 Proteins identifiziert, deren Aktivität die CCL2 Expression in Keratinozyten beeinflusst hat.

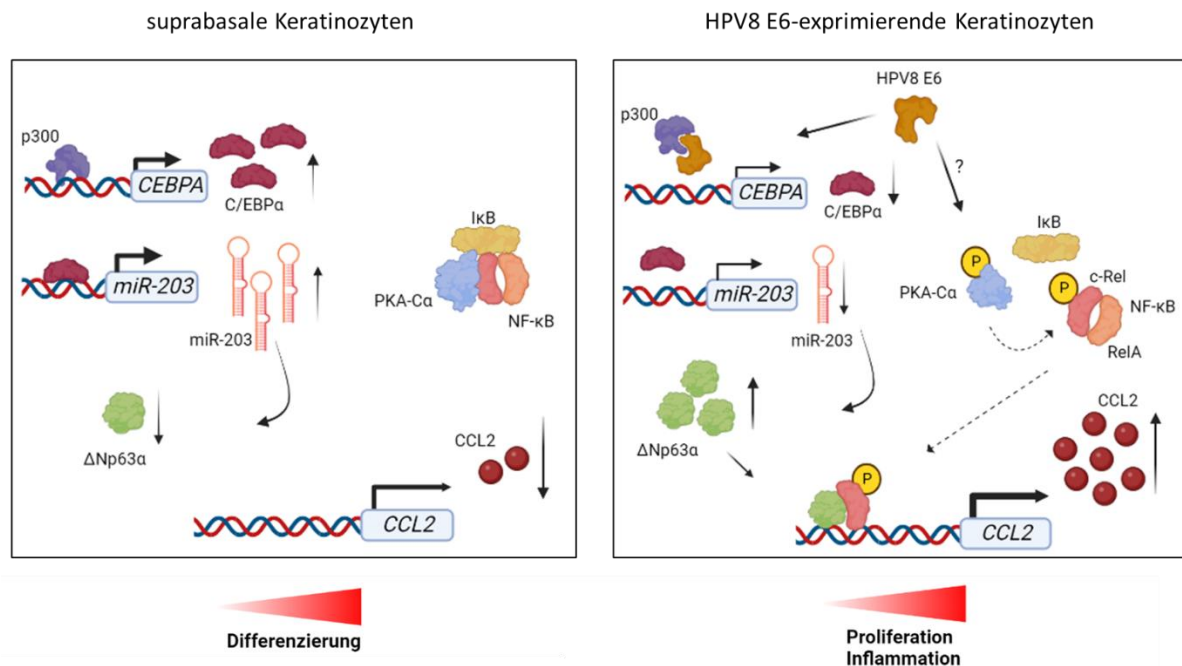
#### 4.1.3 Einfluss der HPV8 E6-regulierten PKA-C $\alpha$ Aktivität auf die CCL2 Expression

Proteinkinasen spielen eine fundamentale Rolle bei der Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse, einschließlich der von Zytokinen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Kinase-Aktivitätsprofil von HPV8 E6-exprimierenden Keratinozyten erstellt, um Kinasen zu identifizieren, die potenziell an der 8E6-abhängigen CCL2 Induktion beteiligt sind. Unter den Mitgliedern der Serin/Threonin-Kinasen Familie ging eine erhöhte Aktivität der Proteinkinase A Untereinheit C $\alpha$  hervor. In einem Western Blot wurde bestätigt, dass PKA-C $\alpha$  in seiner aktiven p-PKA-C $\alpha$  Form (Thy197) (Steinberg et al., 1993) in 8E6-exprimierenden Zellen erhöht ist. PKA-C Untereinheiten werden bei ansteigender intrazellulären cAMP-Konzentration durch die Freisetzung aus den PKA-R Untereinheiten aktiviert und phosphorylieren nachgeschaltete Substrate wie Bad, ATF-1, GSK-3 und vor allem CREB

(Zhang et al., 2020). In 8E6-exprimierenden Zellen war die p-CREB Expression jedoch nicht verändert und die anderen Substrate wurden nicht untersucht. ATF-1 wird auch durch p38 Kinasen reguliert (Han et al., 2020), deren Aktivität (p38 $\gamma$ ) im Kinase-Aktivitätsprofil durch 8E6 etwas verringert wurde. Inwiefern und über welche Kinasen ATF-1 durch HPV8 E6 reguliert wird müsste in weiteren Studien untersucht werden.

Für PKA-C $\alpha$  wurde in einer anderen Studie die Existenz eines cAMP-unabhängigen Mechanismus zur Regulation der transkriptionellen Aktivität von NF- $\kappa$ B beschrieben (Zhong et al., 1997). Dabei wurde gezeigt, dass PKA-C $\alpha$ , aber keine der anderen C- oder R-Untereinheiten, mit NF- $\kappa$ B und seinem Inhibitor I $\kappa$ B einen zytosolischen PKA-C $\alpha$ -I $\kappa$ B-NF- $\kappa$ B Komplex bildet, der die NF- $\kappa$ B Aktivität unterdrückt. Während der C-Terminus von PKA-C $\alpha$  mit RelA interagiert, ist die N-terminale ATP-Bindedomäne an I $\kappa$ B gebunden und unterdrückt dessen katalytische Aktivität. Bei NF- $\kappa$ B aktivierenden Stimuli wie TNF- $\alpha$  wird I $\kappa$ B degradiert, was die Phosphorylierung von RelA (Ser276) durch PKA-C $\alpha$  und dessen Translokation in den Zellkern zur Folge hat, wo RelA p63-unabhängig die CCL2 Transkription aktiviert (Bonello et al., 2011). Für c-Rel ist ein solcher Mechanismus jedoch noch nicht beschrieben worden. Da c-Rel auch von I $\kappa$ B gebunden werden kann und in seiner REL-Homologie-Domäne (RHD) ähnlich zu RelA ein PKA-C Phosphorylierungsmotiv (RRXS) (Ser267) besitzt (Christian et al., 2016), ist es naheliegend, dass auch c-Rel von PKA-C $\alpha$  aktiviert werden könnte. Ein solcher cAMP-unabhängiger Mechanismus, bei dem durch PKA-C $\alpha$  NF- $\kappa$ B Faktoren reguliert werden, könnte auch in HPV8 E6-exprimierenden Keratinozyten von statten gehen, zumal die PKA-C $\alpha$  Aktivität durch 8E6 erhöht war aber keine aktivierten cAMP-abhängigen Signalwege nachgewiesen werden konnten. Insbesondere eine PKA-C $\alpha$ -abhängige Aktivierung von c-Rel wäre hinsichtlich p63 interessant, da nur phosphoryliertes c-Rel aber nicht RelA nach seiner Translokation im Zellkern in Kooperation mit  $\Delta$ Np63 $\alpha$  die Expression seiner Target Gene stimuliert (King et al., 2008) (s. 4.1.2). Dementsprechend wäre es möglich, dass HPV8 E6 einerseits  $\Delta$ Np63 $\alpha$  über den C/EBP $\alpha$  Mechanismus induziert und andererseits über PKA-C $\alpha$  den  $\Delta$ Np63 $\alpha$  Co-Faktor c-Rel aktiviert, die anschließend gemeinsam die CCL2 Genexpression stimulieren (Abbildung 42). In diesem Modell reguliert HPV8 über das E6 Protein zwei unabhängige TNF- $\alpha$ -assoziierte Signalwege, über die der  $\Delta$ Np63 $\alpha$ -c-Rel-Komplex potenziell die CCL2 Transkription durch Bindung an die überlappenden p63 und NF- $\kappa$ B Bindestellen in der DRR und ECR des CCL2 Promotors aktiviert (s. 4.1.2), welche als essenziell für die maximale CCL2 Induktion nach TNF- $\alpha$  Stimulation beschrieben wurden (Bonello et al., 2011).





**Abbildung 42. Molekularer Mechanismus der HPV8 E6-abhängigen CCL2 Induktion.** Links: In suprabasalen Keratinozyten stimuliert C/EBPα die Differenzierung und unterdrückt die Proliferation über die miR-203-abhängige Repression des Stammzellfaktors ΔNp63α. NF-κB Proteine sind durch die Komplexierung mit IκB und PKA-Cα inaktiv. Rechts: HPV8 E6 stimuliert durch die Repression von C/EBPα die Proliferation über ΔNp63α (Marthaler et al., 2017). Zusätzlich erhöht 8E6 über einen noch unbekannten Mechanismus die katalytische Aktivität von PKA-Cα. In Folge aktiviert PKA-Cα den ΔNp63α Co-Faktor c-Rel durch Phosphorylierung. Der ΔNp63α-c-Rel Komplex stimuliert die CCL2 Expression und reguliert dadurch inflammatorische Prozesse. Gestrichelte Pfeile geben potenzielle Mechanismen an, die auf Daten aus der Literatur basieren. Erstellt mit BioRender.com

Diese Hypothese wird zum Teil durch Experimente mit dem PKA Inhibitor H-89 gestützt. In HaCaT Zellen, welche mit H-89 behandelt wurden, war die CCL2 Expression stark reduziert, was auf eine Beteiligung von PKA an der CCL2 Regulation in Keratinozyten hindeutet. H-89 bindet kompetitiv an die ATP-Bindedomäne und unterdrückt dadurch, ähnlich wie IκB, die katalytische Aktivität der C-Untereinheit (Engh et al., 1996), die sich in Keratinozyten relevant für die CCL2 Expression zeigte. Darüber hinaus zeigten die Genexpressionsanalysen der vorliegenden Arbeit, dass die PKA-Cα-abhängige CCL2 Regulation unabhängig vom C/EBPα-p63-Signalweg sein muss, da deren Expressionsstärke unverändert blieb. Der cAMP-unabhängige Mechanismus könnte auch erklären, weshalb der Erfolg der PKA-Inhibition durch H-89 über p-CREB nicht nachgewiesen werden konnte und das cAMP Analog 8-Bromo-cAMP keinen Effekt auf die CCL2 Expression hatte. Allerdings war durch 8-Bromo-cAMP die p-CREB Expressionsstärke unverändert, während erhöhte CREB Mengen detektiert wurden. Es ist jedoch unklar, auf welchem cAMP-unabhängigen Mechanismus die PKA-Cα Aktivierung durch HPV8 E6 beruht. Zum einen könnte dies über einen durch TGFβ-Signalwege gebildeten Smad3/Smad4 Komplex erfolgen, der die PKA-R Untereinheiten bindet (Zhang et al., 2004).

Dieser Mechanismus kommt jedoch eher weniger in Frage, da das HPV8 E6 Protein Smad2 und Smad3 binden kann und dadurch nachgeschaltete Signalwege supprimiert (Meyers et al., 2017). Zum anderen könnte die Degradierung von I $\kappa$ B zu einer PKA-C $\alpha$  Aktivierung führen, welche über die beiden I $\kappa$ B-Kinasen IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  hervorgerufen wird (Zhong et al., 1997). Sowohl IKK $\alpha$  als auch IKK $\beta$  zeigten im Kinase-Aktivitäts-Assay eine erhöhte Aktivität in 8E6-exprimierenden Zellen. Eine potenzielle Beteiligung von IKK und I $\kappa$ B bei der PKA-C $\alpha$  Aktivierung müsste in Folgestudien untersucht werden. Für das HPV16 E7 Protein wurde bereits eine IKK-abhängige I $\kappa$ B Degradation beschrieben, die zur Ausbildung eines Repressor-Komplexes führt, der die TLR9 Expression unterdrückt (Hasan et al., 2013). Inwiefern HPV8 E6 die CCL2 Expression über IKK, PKA-C $\alpha$  und c-Rel als Co-Faktor von  $\Delta$ Np63 $\alpha$  stimuliert muss jedoch durch tiefergehende Analysen bewiesen werden.

Die Assoziation der Proteinkinase A bei der Regulation von inflammatorischen Zytokinen in Keratinozyten wurde bereits beschrieben (Grandjean-Laquerriere et al., 2003). Hier wurde gezeigt, dass für die UV-induzierte Expression von TNF- $\alpha$  und IL-6, die PKA-Aktivität von wesentlicher Bedeutung ist. Demnach könnte HPV8, das einen Co-Faktor der UV-induzierten kutanen Karzinogenese darstellt, über die Regulation der PKA-C $\alpha$  Aktivität, UV-induzierte Mechanismen verstärken. Außerdem könnten Mutationen, die bei EV-Patienten durch das Zusammenspiel von HPV8 und UV-Strahlung akkumulieren, die Produktion inflammatorischer Zytokine wie CCL2 verstärken.

#### **4.1.4 HPV8 E6-abhängige CCL2 Induktion in primären NFK vs. HaCaT Zellen**

Das HPV8 E6 Protein induziert die CCL2 Expression in der HaCaT Zelllinie und in primären Vorhautkeratinozyten. Einerseits ist in HaCaT Zellen die basale CCL2 Expression, andererseits auch der Effekt von 8E6 viel stärker als in NFK. Die gleichen Erkenntnisse gehen auch aus einer Studie hervor, bei welcher der Einfluss von HPV5 E6/E7 Onkoproteinen auf die CCL2 Expression analysiert wurde (de Andrea et al., 2007). Der Effekt auf die CCL2 Induktion war in HPV5 E6/E7-exprimierenden HaCaT Zellen deutlich ausgeprägter als in primären Keratinozyten. Es könnte an der p53 Mutation in HaCaT Zellen liegen, dass zusätzliche Mechanismen die CCL2 Induktion durch kutane HPV verstärken, die in normalen Keratinozyten durch p53 unterdrückt werden. Da mukosale HR-HPV die CCL2 Expression in Keratinozyten unterdrücken (Kleine-Lowinski et al., 2003) und dabei p53 als positiver Regulator hervorgeht, dessen Degradation zu einer reduzierten CCL2 Expression führt (Hacke et al., 2010), müssen andere oder sekundäre Mechanismen existieren, über welche die Onkogene kutaner HPV CCL2 in HaCaT Zellen induzieren.

Ein Mechanismus über den p53 die CCL2 Expression beeinflussen kann, beinhaltet die Interaktion zwischen p53 und CBP (CREB-Bindeprotein) (Huang et al., 2007). Nach TNF- $\alpha$  Stimulation kann CBP durch IKK phosphoryliert werden und anschließend einen Komplex mit NF- $\kappa$ B (p50/p65) bilden, der die Expression seiner Zielgene aktiviert. Das p65 Protein könnte auch bei der 8E6-abhängigen CCL2 Induktion in HaCaT Zellen eine Rolle spielen, insbesondere da der Effekt von 8E6 auf CCL2 durch den SC-75741 Inhibitor, der die DNA-Bindung von p65 blockiert (Ehrhardt et al., 2013), stark reduziert wurde. Die Inhibition der JNK und p38 Kinasen führte ebenfalls zu einer verringerten CCL2 Proteinkonzentration in 8E6-exprimierenden HaCaT Zellen. Sowohl p38 als auch JNK können neben zahlreichen anderen Faktoren auch die Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 induzieren (Whitmarsh, 2010, Ventura et al., 2003). In vorangegangenen Experimenten konnte in HaCaT Zellen keine 8E6-abhängige Regulation von AP-1 Untereinheiten auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden (Vella, 2019). Auch die Analyse der DNA-Bindung verschiedener AP-1 Untereinheiten an potenzielle AP-1 Bindestellen ergab keinen Unterschied zwischen pLXSN-enthaltenden und 8E6-exprimierenden HaCaT Zellen. Basierend auf diesen Ergebnissen kann jedoch eine Rolle von AP-1 bei der 8E6-abhängigen CCL2 Regulation nicht ausgeschlossen werden. Generell muss in diesem Zusammenhang die Rolle von MAP-Kinasen und p65 durch zusätzliche Experimente weiter charakterisiert werden. Dazu zählt unter anderem die Verifizierung der jeweiligen Inhibitor-Funktionalitäten sowie der Expressionsnachweis aktiver und inaktiver JNK bzw. p38 Kinasen und eine eingehendere Analyse ihrer nachgeschalteten Substrate. Des Weiteren könnte es sein, dass der 8E6-C/EBP $\alpha$ -p63-Signalweg in HaCaT Zellen zusätzlich verstärkt wird, da p53 als Reaktion auf DNA-Schäden die C/EBP $\alpha$  Expression induziert (Yoon und Smart, 2004) und dies durch die p53 Mutation vermutlich nicht mehr erfolgen kann. Obwohl es sich bei HaCaT Zellen um eine Zelllinie handelt, sind die hier ablaufenden Prozesse auch für *in vivo* Mechanismen bei EV-Patienten von Bedeutung. HPV8- und UV-assoziierte Akkumulationen von Mutationen betreffen nämlich auch das p53 Protein bei EV-Patienten (Padlewska et al., 2001). Dementsprechend könnten p53 Mutationen bei EV-Patienten die 8E6-abhängige CCL2 Induktion verstärken und dadurch inflammatorische Prozesse sowie die Tumorprogression fördern.

#### **4.2 Physiologische Relevanz der CCL2-abhängigen Rekrutierung von Makrophagen für den HPV8 Lebenszyklus und die Tumorprogression**

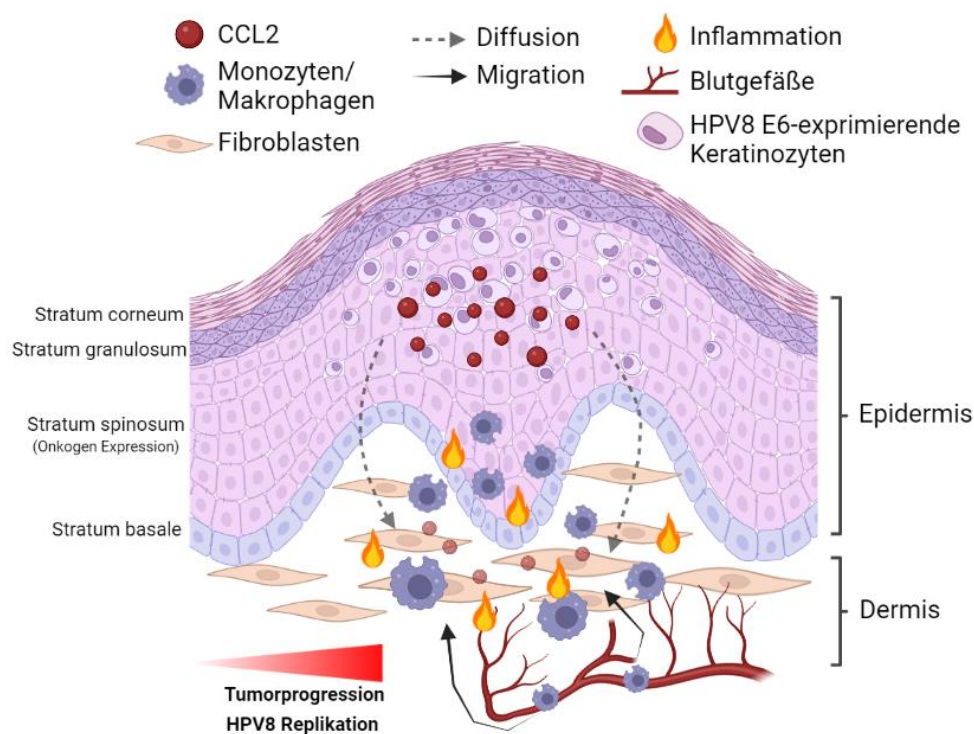
Zu den *Hallmarks of cancer* gehört eine tumorfördernde Inflammation, bei welcher inflammatorische Zellen eine Schlüsselkomponente darstellen. Insbesondere Tumor-assoziierte

Makrophagen fördern das Tumorwachstum über verschiedene Mechanismen (Hanahan, 2022, Mantovani et al., 2022). Durch die Sekretion verschiedener Faktoren fördern TAMs einerseits die genetische Instabilität, Angiogenese und die Proliferation bzw. das Überleben von Tumorzellen, andererseits unterdrücken sie angeborene und adaptive Immunantworten. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass läsionale Haut von EV-Patienten stark mit CD68<sup>+</sup> Makrophagen infiltriert ist, wodurch erste Hinweise aus vorangegangenen Ergebnissen der Arbeitsgruppe reproduziert werden konnten (Sperling, 2009). Dabei wurden Makrophagen sowohl im Gewebe als auch im Epithel nachgewiesen. Darüber hinaus ging aus Migrations-Assays hervor, dass die Migration von CD14<sup>+</sup> Monozyten durch 8E6-exprimierende Zellen, in denen über den C/EBP $\alpha$ -p63-Signalweg und potenziell über PKA-C $\alpha$  die CCL2 Expression induziert wird, stark stimuliert wird. Andere Zytokine, die chemotaktisch auf Monozyten wirken (MCP-3, MIP-1 $\alpha/\beta$ , RANTES, M-CSF und GM-CSF (Pollard, 2004)) wurden in Überständen 8E6-exprimierender HaCaT Zellen nicht detektiert und können daher für den Effekt von 8E6 auf die Monozyten-Migration ausgeschlossen werden. Die Bedeutung der CCR2/CCL2 Achse bei der 8E6-stimulierten Monozyten-Migration wird insbesondere durch den Migrations-Assays mit dem CCR2 Antagonisten RS-102895 deutlich. Durch die Blockierung von CCR2 wurde die 8E6-stimulierte Monozyten-Migration in einer konzentrationsabhängigen Weise unterdrückt. Demnach könnte die HPV8 E6-induzierte Rekrutierung von Monozyten ein entscheidender Faktor für die virale Persistenz und Replikation sein. In transgenen Mäusen, die HPV8 E6 in epidermalen Keratinozyten exprimieren, wurden nämlich sowohl zirkulierende Monozyten als auch die CCR2/CCL2 Achse als essenziell für die Ausbildung UV-induzierter kutaner Plattenepithelkarzinome beschrieben (Lelios et al., 2021).

Deregulationen von Komponenten des Immunsystems sind in Tumoren häufig auf genetische Mutationen oder anomale Genexpressionen zurückzuführen und können verschiedene Faktoren und Signalwege betreffen (Mantovani et al., 2008). Für die CCL2-induzierte Rekrutierung von Tumor-assoziierten Makrophagen wurde in verschiedenen Krebsformen eine Assoziation von Mitgliedern der p53 Tumorsuppressor Familie beschrieben. Bei Brustkrebs Patienten, die eine niedrige TAp73 Expression aufweisen, wurde eine verstärkte Makrophagen Infiltration in Tumoren beobachtet (Wolfsberger et al., 2021). Dabei wurde gezeigt, dass der Verlust von TAp73 zu einer Hyperaktivierung von NF- $\kappa$ B führt, die in einer starken CCL2 Produktion resultiert. Des Weiteren wurde bei Kopf-Hals-Karzinomen der  $\Delta$ Np63 $\alpha$ -NF- $\kappa$ B Komplex als Aktivator der Expression inflammatorischer Gene charakterisiert, die Entzündungsreaktionen auslösen und einen malignen Phänotyp fördern (King et al., 2008, Yang et al., 2011). Das

Zusammenspiel zwischen TAp73 und  $\Delta$ Np63 $\alpha$  in Bezug auf die Expression von NF- $\kappa$ B-induzierten Genen wurde von Lu et al. (2011) genauer analysiert. In inflammatorischen Kopf-Hals-Karzinomen wurden erhöhte Mengen des  $\Delta$ Np63 $\alpha$ -c-Rel Komplexes im Zellkern detektiert, wohingegen TAp73 im Zytoplasma lokalisiert war. Dabei entpuppte sich TAp73 als Repressor von NF- $\kappa$ B regulierten Zytokinen, der nach TNF- $\alpha$  Stimulation durch den  $\Delta$ Np63 $\alpha$ -c-Rel Komplex von seinen Bindestellen verdrängt und inaktiviert wird, wodurch die Genexpression wiederum aktiviert wird. Das Wechselspiel zwischen TA- und  $\Delta$ N-Isoformen, bei dem  $\Delta$ N-Isoformen dominant-negative Varianten der TA-Isoformen sind (Moses et al., 2019), scheint basierend auf den Daten dieser Arbeit und der Literatur (Lu et al., 2011) im Hinblick auf die Regulation inflammatorischer Zytokine genau umgekehrt zu sein.

Zusammengenommen untermauern die Ergebnisse aus der Literatur die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit, dass HPV8 E6 über die CCL2 Induktion die Rekrutierung von Makrophagen induziert und somit zu einem inflammatorischen Mikromilieu beisteuert, welches mit einer malignen Progression einhergeht und möglicherweise die HPV8 Replikation verstärken kann (Abbildung 43). Darüber hinaus unterstützen die oben beschriebenen Studien die Hypothese, dass die 8E6-abhängige CCL2 Induktion nicht nur über  $\Delta$ Np63 $\alpha$  allein, sondern über einen  $\Delta$ Np63 $\alpha$ -c-Rel Komplex verläuft, an dessen Ausbildung PKA-C $\alpha$  möglicherweise beteiligt ist.



**Abbildung 43. Modell der CCL2-abhängigen Rekrutierung von Makrophagen durch HPV8 E6 bei EV-Patienten.** In suprabasalen Keratinozyten wird die CCL2 Expression durch das HPV8 E6 Protein induziert. Dies führt zu einer Gradienten-abhängigen Migration von zirkulierenden Monozyten

aus dem Blut in das Gewebe, wo sie zu Makrophagen differenzieren. Während Faktoren des inflammatorischen Mikromilieus die virale Genexpression und somit die virale Replikation verstärken könnten, könnten sie über sekundäre Mechanismen eine maligne Progression begünstigen. Erstellt mit BioRender.com.

Die Exposition der Haut gegenüber UV-Strahlung induziert neben der Antwort auf DNA-Schäden auch inflammatorische Prozesse, wodurch UV-Strahlung ein inflammatorisches Mikromilieu erzeugt, das bei der Entwicklung von nicht-melanozytärem Hautkrebs eine Rolle spielt (Kim und He, 2014). Dieses inflammatorische Mikromilieu scheint von kutanen HPV nicht nur zu toleriert, sondern über verschiedene Mechanismen sogar zusätzlich induziert zu werden, zu denen die 8E2-abhängige Rekrutierung myeloischer Zellen über S100A8/A9 Proteine (Podgórska et al., 2018) und die 8E6-induzierte CCL2 Expression und Makrophagen Rekrutierung gehören. Dies stellt einen großen Unterschied zum HPV-assoziierten Zervixkarzinom dar, bei dem mukosale HR-HPV die Keratinozyten-intrinsische CCL2 Expression unterdrücken (Kleine-Lowinski et al., 2003) und CCL2 erst in späten Phasen über das Tumormikromilieu induzieren (Schröer et al., 2011). Demnach könnte die HPV8 E6-abhängige CCL2 Induktion eine Form der Adaptation an das UV-induzierte inflammatorische Mikromilieu der Haut darstellen, in dem optimierte Bedingungen für die viralen Persistenz und Replikation herrschen. Eine Form der Adaptation an das UV-exponierte Mikromilieu der Haut wurde bereits für  $\beta$ -HPV beschrieben. Dabei wurde gezeigt, dass UV-Strahlung unter anderem die HPV8 Promotoraktivität über IRF-7 stimuliert (Akgül et al., 2005b, Oldak et. al., 2011). Demzufolge könnten auch weitere inflammatorische Faktoren den HPV8-Promotor bzw. die -Genexpression aktivieren und dadurch die virale Replikation verstärken. In diesem Zusammenhang deutet die erhöhte PKA-C $\alpha$  Aktivität durch 8E6 auch auf eine Adaptation an UV-assoziierte Bedingungen hin, da PKA-C $\alpha$  bei UV-Exposition aktiviert wird und an der Produktion inflammatorischer Zytokine beteiligt ist (Grandjean-Laquerriere et al., 2003). Somit stellt HPV8 nicht nur durch die Unterdrückung der Antwort auf DNA-Schäden einen Co-Faktor der UV-induzierten kutanen Karzinogenese dar, sondern auch durch die Induktion eines inflammatorischen Tumormikromilieus, in dem Tumor-assoziierte Makrophagen über die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies das humane Genom zusätzlich destabilisieren könnten. Somit könnte HPV8 über die Induktion inflammatorischer Faktoren nicht nur die eigene Replikation steigern, sondern könnte als Nebeneffekt über sekundäre Mechanismen auch die kutane Karzinogenese fördern.

### 4.3 HPV8 E6-regulierte Kinasen

Die Analyse der Kinase Aktivitäten in 8E6-exprimierenden Keratinozyten ergab, dass regulierte Serin/Threonin-Kinasen mit wenigen Ausnahmen eine erhöhte Aktivität und regulierte Tyrosin-Kinasen alle eine verringerte Aktivität aufwiesen. Die erhöhte Aktivität von PKA- $\alpha$  konnte in einem Western Blot bestätigt werden und ihre Funktion bei der Regulation von Immunfaktoren wurde neben der von IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  bereits ausführlich beschrieben (s. 4.1.3). Für die beiden IKKs müsste jedoch die Aktivität in 8E6-exprimierenden Keratinozyten bestätigt werden. Entgegen den Erwartungen konnte für SGK2, deren Aktivität am stärksten durch 8E6 erhöht wurde, keine Expression nachgewiesen werden. In einer Studie von Baldwin et al. (2010) wurde SGK2 jedoch in Vorhautkeratinozyten als essenziell für die Aufrechterhaltung der Zellviabilität und -Proliferation bei Verlust des p53 Proteins beschrieben. Aus diesem Grund sollte die SGK2 Expression in 8E6-exprimierenden erneut mit anderen Antikörpern untersucht werden. Außerdem wäre in dieser Hinsicht eine 8E6-abhängige Induktion der SGK2 Aktivität auch für den HPV8 Lebenszyklus interessant, da bei EV-Patienten p53 Mutationen auftreten können (Padlewska et al., 2001) und in dem Fall SGK2 für die Zellviabilität relevant sein könnte. Einige der Kinasen, deren Aktivität durch 8E6 erhöht wurde, gehören zur Familie der Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKL3, CDKL5, PFTAIRES1 und PFTAIRES2), die regulatorische Funktionen im Zell-Zyklus einnehmen. Dies steht im Einklang mit Ergebnissen aus der Literatur, dass HPV8 E6 die Differenzierung unterdrückt und die Proliferation induziert (Marthaler et al., 2017, Meyers et al., 2017). Der Kinase-Aktivitäts-Assay könnte Aufschluss darüber geben, welche spezifischen CDKs die Proliferation induzieren. Unter den STKs war COT (MAP3K8) die einzige Kinase mit einem Kinasescore  $\geq 1,5$ , die eine verringerte Aktivität aufwies. COT aktiviert unter anderem inflammatorische Signalwege, indem es MAPK phosphoryliert und die Proteolyse des NF- $\kappa$ B-Inhibitor-Proteins (NF- $\kappa$ B1/p105) induziert, wodurch die aktive p50 Untereinheit entsteht (George und Salmeron, 2009, Belich et al., 1999). Inwiefern die COT-Aktivität die Expression von Zytokinen in 8E6-exprimierenden Zellen beeinflusst, kann nicht beurteilt werden und müsste in weiteren Experimenten untersucht werden. Es könnte möglicherweise erklären, warum der Effekt von 8E6 auf die CCL2 Induktion in NFK geringer ist als in HaCaT Zellen. Allerdings müsste auch die COT-Aktivität in HaCaT Zellen untersucht werden, um hierüber eine Aussage treffen zu können.

Unter den PTKs war ROS1 die Kinase, deren Aktivität durch 8E6 am stärksten verringert wurde. Die Funktion von ROS1 ist bis heute nicht gut verstanden. Da bisher kein Ligand der Rezeptor-Tyrosin-Kinase bekannt ist, wurden nachgeschaltete Signalwege nur mit

Fusionsproteinen (EGFR-ROS und TRK-ROS) untersucht, bei denen transformierende Aktivitäten beobachtet wurden (Acquaviva et al., 2009). Es wird angenommen, dass ROS1 durch den Kontakt mit Proteinen der extrazellulären Matrix aktiviert wird. Aufgrund der spärlichen Datenlage in der Literatur können keine Aussagen über seine potenzielle Funktion im HPV8 Lebenszyklus gemacht werden. Da es sich um keinen direkten Nachweis der Kinasen handelt, sollten generell die Ergebnisse des Kinase-Aktivitäts-Assays als spekulativ betrachtet werden, um Arbeitshypothesen zu generieren. Eine detailliertere Analyse (z. B. Immunoblots und IHC) HPV8 E6-regulierter Kinasen könnte zu einem besseren Verständnis der kutanen Karzinogenese beitragen.

#### 4.4 HPV8 E6-regulierte Gene und Zytokine über den C/EBP $\alpha$ -p63-Signalweg

Um zu untersuchen, ob weitere Zytokine durch HPV8 E6 reguliert werden, insbesondere über den C/EBP $\alpha$ -p63-Signalweg, die möglicherweise zusätzlich inflammatorische Prozesse regulieren, wurde ein Zytokin-Screening in 8E6-exprimierenden und C/EBP $\alpha$  bzw. p63 *Knockdown* Zellen durchgeführt. In HaCaT Zellen wurde neben der CCL2 Induktion auch eine Repression des IL-1 Rezeptorantagonist (IL-1 Ra) festgestellt. Bei den *Knockdown* Ansätzen erwiesen sich sowohl C/EBP $\alpha$  als auch p63 als positive Regulatoren von IL-1 Ra und MIF, wobei MIF in HaCaT Zellen jedoch nicht durch 8E6 reguliert wurde. Somit könnte es sein, dass HPV8 E6 nicht nur indirekt über  $\Delta$ Np63 $\alpha$  Zytokine induziert, sondern auch Zytokine unterdrückt, die normalerweise positiv von C/EBP $\alpha$  reguliert werden. Die Rolle von C/EBP $\alpha$  als positiver Regulator von Zytokinen (MIF, IL-1 $\alpha$ , und VEGF) wurde auch in primären Vorhautkeratinozyten beobachtet. Die gleichen Zytokine wurden auch in 8E6-exprimierenden Zellen unterdrückt. Ob letzteres mit der Repression von C/EBP $\alpha$  durch 8E6 assoziiert ist lässt sich nicht beurteilen und müsste in weiteren Experimenten untersucht werden. Die Repression von IL-1 Ra durch 8E6, die sowohl in HaCaT Zellen als auch in NFK beobachtet wurde, scheint nicht mit dem C/EBP $\alpha$ -p63-Signalweg verbunden zu sein. Dennoch wäre eine eingehendere Analyse von IL-1 Ra bzw. IL-1 $\alpha$  hinsichtlich einer 8E6-abhängigen Regulation interessant, da der IL-1-Signalweg einen wichtigen Regulator der Keratinozyten-Inflammation darstellt und eine Dysbalance zwischen IL-1 Ra und IL-1 $\alpha$  verantwortlich für die Aktivierung inflammatorischer Signalwege sein könnte (Palomo et al., 2015). Letzteres könnte auch auf TNF- $\alpha$  zutreffen, obwohl es in einer nur geringen Proteinkonzentration exprimiert wurde (etwa 30-60 pg/ml in 8E6-exprimierenden NFK).



Durch den p63 *Knockdown* in NFK wurde die Expression aller Zytokine mit Ausnahme von SCGF $\beta$  und IL-15 reduziert und impliziert die bedeutende Rolle von p63 bei der Regulation von Zytokinen, die auch in der Literatur beobachtet wurde (Yang et al., 2011, Du et al., 2014). Aus dem Zytokin-Screening gehen Gro $\alpha$  und TNF- $\alpha$  als einzige Zytokine neben CCL2 hervor, die potenziell durch 8E6 über den C/EBP $\alpha$ -p63-Signalweg induziert werden. Für die Induktion des Gro $\alpha$  Gens CXCL1, das die Chemotaxis von Neutrophilen steuert und an chronischen Inflammationen in Tumoren beteiligt ist, wurde bereits eine p63-abhängige Regulation beschrieben, wobei die Kooperation mit NF- $\kappa$ B die CXCL1 Expression weiter verstärkt (Korbecki et al., 2022). Eine leicht erhöhte, aber nicht signifikante Gro $\alpha$  Expression wurde auch für das HPV8 E2 Protein beschrieben (Podgórska et al., 2018). Die meisten der durch HPV8 E6 hochregulierten (Gro $\alpha$ , IL-6, IP-10, IL-8 und tendenziell auch G-CSF) bzw. herunterregulierten (MIF, IL-1 Ra, IL-1 $\alpha$  und VEGF) Zytokine haben eine Funktion in Wundheilungsprozessen (Ridiandries et al., 2018). Die molekularen Mechanismen und die Rolle dieser Zytokine bei der HPV8-assoziierten Karzinogenese müsste in Folgestudien analysiert werden. Insbesondere müssten dabei auch HPV8 E7- bzw. E6/E7-exprimierende Zellen berücksichtigt werden, da sich Effekte der beiden Onkoproteine verstärken oder sogar gegenseitig aufheben können. Ein Beispiel dafür wäre, dass C/EBP $\beta$  durch PKA phosphoryliert werden kann (Chinery et al., 1997), welches die Expression inflammatorischer Zytokine (IL-6, IL-8, G-CSF und TNF) induziert (Akira et al., 1990). Da durch HPV8 E6 die PKA-C $\alpha$  Aktivität erhöht wird, könnte die Induktion von IL-6 und G-CSF mit einem C/EBP $\beta$ -abhängigen Mechanismus erklärt werden, jedoch wird die Aktivität von C/EBP $\beta$  von HPV8 E7 über eine direkte Interaktion im Zellkern unterdrückt (Sperling et al., 2012).

Die Bedeutung von HPV8 E6 bei der Regulation von Zytokinen geht auch aus dem mRNA-Microarray hervor. Gene, die durch 8E6 induziert wurden, waren signifikant in Zytokin-regulatorischen Prozessen und insbesondere in inflammatorischen Signalwegen (u.a. TNF-Signalweg) angereichert. Dies untermauert auch die Erkenntnisse, dass HPV8 E6 über C/EBP $\alpha$  und PKA-C $\alpha$  in TNF- $\alpha$  abhängige Signalwege eingreift. Die Überrepräsentationsanalyse von Genen, die über den 8E6-C/EBP $\alpha$ -p63-Signalweg induziert wurden, bestätigte zudem, dass dieser Mechanismus nicht nur die Proliferation reguliert, sondern auch an der Regulation Zytokin-abhängiger Prozesse beteiligt ist, die insbesondere mit den TNF- und NF- $\kappa$ B-Signalwegen assoziiert sind. Darüber hinaus reguliert 8E6 IGF-Signalwege über den C/EBP $\alpha$ -p63-Signalweg, deren  $\Delta$ Np63-abhängige Regulation bereits in Kopf-Hals-Karzinomen beschrieben wurde (Frezza et al., 2018). Im Allgemeinen sind die Ergebnisse des mRNA-Microarrays in Einklang mit der Literatur, zumal 8E6 die Proliferation induziert und

Differenzierungsprozesse unterdrückt (Marthaler et al., 2017) und aus der ORA-Analyse Gene hervorgehen, die dies widerspiegeln. Des Weiteren wurden unter den HPV8 E6-regulierten miRNAs miR-642a-3p und miR-4465 identifiziert, die über den C/EBP $\alpha$ -p63-Signalweg unterdrückt werden und gemeinsame Targets besitzen. Die 8E6-abhängige Unterdrückung der miR-203 (Marthaler et al., 2017), ging ebenfalls aus den miRNA-Array Daten hervor, jedoch ist diese nicht in den Schnittmengenanalysen enthalten, da die miR-203 zwar 8E6- und C/EBP $\alpha$ -abhängig, aber nicht p63-abhängig reguliert wird.

Zusammengenommen eröffnen diese Ergebnisse neue Wege zum besseren Verständnis der HPV8-assoziierten Karzinogenese, wobei insbesondere die Bedeutung des 8E6-C/EBP $\alpha$ -p63-Signalweg hervorgehoben wird und potenziell einen Therapieansatzpunkt kutaner SCCs bei EV-Patienten darstellen könnte.

#### **4.5 Therapieansätze der HPV8-assoziierten kutanen Karzinogenese**

Bei etwa 30-60 % der EV-Patienten entwickeln sich aus benignen Läsionen aggressive Plattenepithelkarzinome, die überwiegend mit HPV5 und HPV8 assoziiert sind (Pfister, 2003). Bislang gibt es keine effektive Behandlung für EV-Patienten. Zu den bevorzugten Behandlungsmethoden gehören die chirurgische Entfernung von SCCs und Präventivmaßnahmen, wie das Vermeiden von Sonnenexposition (Myers et al., 2022, Emsen und Kabalar, 2010). Da mit Ausnahme des E1 Proteins kein anderes HPV Onkoprotein eine enzymatische Aktivität aufweist und  $\beta$ -HPV in späten Phasen der Karzinogenese keine Rolle spielen sind es weniger die Onkoproteine selbst, sondern vielmehr die nachgeschalteten regulierten Mechanismen, die als indirekter Ansatzpunkt zur antiviralen Therapie in Frage kommen (Zheng et al., 2022). In dieser Hinsicht zählen Immunfaktoren, die durch HPV Onkoproteine reguliert werden und pro-tumorale Inflammationen unterstützen, zu einem vielversprechenden Ansatzpunkt zur Therapie der HPV-assoziierten Karzinogenese (Smola et al., 2017). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass das kutane HPV8 die CCL2 Expression über den 8E6-C/EBP $\alpha$ -p63-Signalweg und potenziell über PKA-C $\alpha$  in Keratinozyten induziert und dadurch die Migration von Monozyten bzw. Makrophagen in läsionale Haut von EV-Patienten stimuliert. Da Makrophagen für die Entwicklung von kutanen SCCs, die durch HPV8 E6 und UV-Strahlung induziert wurden, von wesentlicher Bedeutung sind (Lelios et al., 2021) und die Dichte Tumor-assoziiierter Makrophagen mit einer schlechten Prognose einhergeht (Bingle et al., 2002), könnte die HPV8-induzierte Makrophagen Rekrutierung einen potenziellen Therapieansatzpunkt darstellen. Makrophagen stehen als Ansatzpunkt zur Behandlung zahlreicher Krebsformen im Fokus. Insbesondere stehen dafür

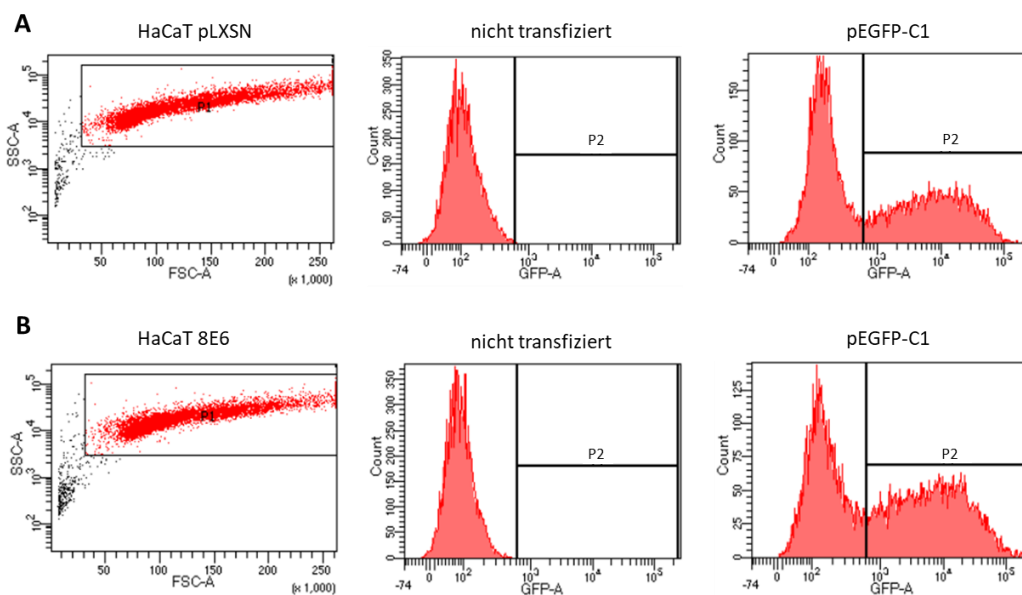
Medikamente in Aussicht, welche die Rekrutierung von Monozyten blockieren und die Apoptose Tumor-assoziiierter Makrophagen induzieren oder deren Funktion umprogrammieren (Cassetta und Pollard, 2018, Mantovani et al., 2022). Für die Unterdrückung der Monozyten-Migration wird dabei unter anderem die CCR2/CCL2 Achse anvisiert, für dessen Inhibition CCR2-Antagonisten und CCL2-neutralisierende Antikörper Verwendung finden. Die Entschlüsselung des zugrundeliegenden Mechanismus der HPV8 E6-abhängigen CCL2 Induktion könnte eine zusätzliche Möglichkeit bieten, die Rekrutierung von Makrophagen zu unterdrücken. Dies beinhaltet zum einen PKA-C $\alpha$ , die potenziell an der 8E6-abhängigen CCL2 Induktion beteiligt ist und zum anderen den C/EBP $\alpha$ -p63-Signalweg, der neben der Induktion von CCL2 auch an der Regulation weiterer Prozesse beteiligt ist. Wie Microarray Analysen zeigten reguliert der C/EBP $\alpha$ -p63-Signalweg neben der Proliferation (Marthaler et al., 2017) auch weitere inflammatorische Signalwege und Komponenten des IGF-Signalwegs. Somit könnten durch den 8E6-C/EBP $\alpha$ -p63-Signalweg als Target einer antiviralen Therapie gleich mehrere Mechanismen ausgeschaltet werden, die für den HPV8 Lebenszyklus von Bedeutung sind und möglicherweise die maligne Progression von benignen Läsionen bei EV-Patienten verhindern.

## 5 Anhang

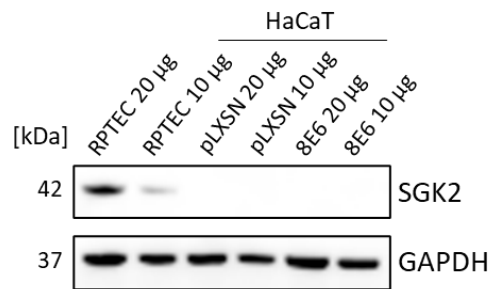
**Tabelle 9. Zytokine aus dem Multiplex-Immuno-Assay.** Insgesamt wurde die Proteinkonzentration von 48 verschiedenen Zytokinen gemessen. Zytokine mit einer Konzentration <30 pg/ml wurden für die Auswertung ausgeschlossen. Außerdem ist für jedes Zytokin der gemessene Konzentrationsbereich angegeben.

**Zytokine (Synonym) [Konzentrationsbereich in pg/ml]**

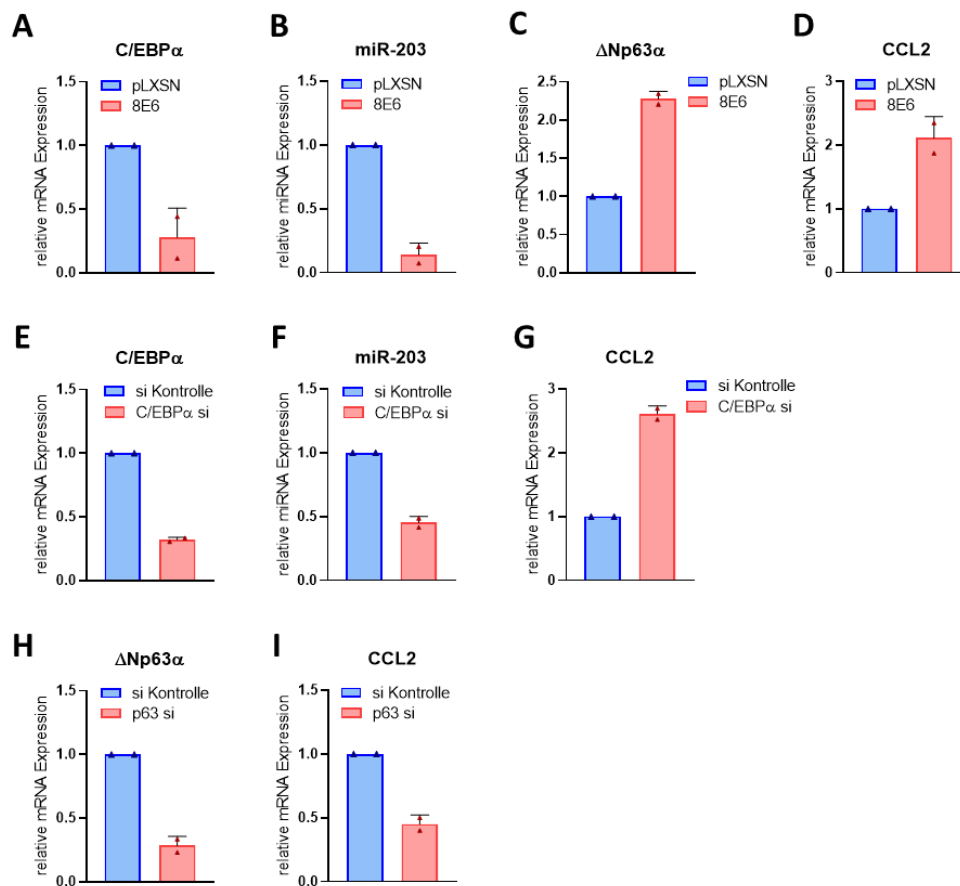
CTACK (CCL27) [0,86-14022]	IL-18 [0,92-15110]	MCP-3 (CCL7) [0,15-2388]
Eotaxin [0,11-1864]	IL1-RA [9,02-147798]	M-CSF [0,81-13316]
FGF basic [8,35-136753]	IL-1 $\alpha$ [2,08-34116]	MIF [2,62-42956]
G-CSF [6,48-106241]	IL-1 $\beta$ [0,26-4336]	MIG (CXCL9) [1,54-25261]
GM-CSF [0,55-8976]	IL-2 [1,57-25657]	MIP-1 $\alpha$ (CCL3) [0,08-1288]
GRO $\alpha$ (CXCL1) [7,1-116260]	IL-2RA [2,06-33804]	MIP-1 $\beta$ (CCL4) [0,4-6608]
HGF [5,89-96545]	IL-3 [0,11-1802]	PDGF-BB [2,42-39583]
IFN- $\alpha$ 2 [0,77-12550]	IL-4 [0,26-4231]	RANTES (CCL5) [0,75-12318]
IFN- $\gamma$ [0,3-4866]	IL-5 [5,11-83648]	SCF [1,62-26619]
IL-10 [0,96-15741]	IL-6 [0,33-5461]	SCGF- $\beta$ [119,99-1,97 $\times 10^6$ ]
IL-12 (p40) [8,8-94956]	IL-7 [1,71-28079]	SDF-1 $\alpha$ (CXCL12) [2,19-35923]
IL-12 (p70) [2,34-38401]	IL-8 [0,65-10668]	TNF- $\alpha$ [4,38-71757]
IL-13 [0,34-5625]	IL-9 [1,41-23110]	TNF- $\beta$ [1,17-19200]
IL-15 [17,71-290097]	IP-10 (CXCL10) [1,38-22568]	TRAIL [0,42-6909]
IL-16 [1,35-22106]	LIF [4,65-76209]	VEGF [4,64-75963]
IL-17A [2,46-40311]	MCP-1 (CCL2) [0,65-10649]	$\beta$ -NGF [0,23-3707]



**Abbildung 44. Transfektionseffizienz von HaCaT pLXSN und 8E6 Zellen.** HaCaT Zellen, die (A) den pLXSN Leervektor enthalten oder (B) das HPV8 E6 Onkogen exprimieren wurden mit dem pEGFP-C1 Plasmid transfiziert und nach 48 h geerntet. Anschließend wurde im Durchflusszytometer die Anzahl von GFP-exprimierenden Zellen bestimmt.



**Abbildung 45. Funktionalität des SGK2 Antikörpers.** Von RPTEC (Positivkontrolle) und pLXSN-enthaltenden bzw. 8E6-exprimierenden HaCaT Zellen wurden Proteinextrakte generiert. Jeweils 10 µg und 20 µg wurde auf eine SDS-PAGE aufgetragen und anschließend wurde in einem Western Blot die SGK2 Expression detektiert. GAPDH wurde als Referenzprotein mitgeführt.



**Abbildung 46. Verifizierung des 8E6-C/EBPα-p63 Signalwegs in Ansätzen die im mRNA- und miRNA-Microarray analysiert wurden.** Von pLXSN-enthaltenden bzw. 8E6-exprimierenden NFK und C/EBPα- bzw. p63 *Knockdown* Ansätzen (48 h) in NFK WT wurde RNA isoliert. RNA wurde in cDNA umgeschrieben und in einer qRT-PCR wurde die Expression von (A, E) C/EBPα, (C, H) ΔNp63α und (D, G, I) CCL2 quantifiziert. Die Werte wurden auf die Expression des Haushaltsgens RPL13a normiert. B+F: RNA wurde in cDNA spezifisch für miRNA-203 und RUN6B umgeschrieben. In einer qRT-PCR wurde die Expression von miR-203 quantifiziert. Die Werte wurden auf die Referenz miRNA RNU6B normiert. Analysiert wurden die RNAs (N=2), die im mRNA- und miRNA-Microarray eingesetzt wurden.

**Tabelle 10. HPV8 E6-regulierte Gene.** Mit RNA aus pLXSN Leervektor enthaltenden bzw. 8E6-exprimierenden NFK wurde ein mRNA-Microarray durchgeführt. Gene in 8E6-exprimierenden Zellen (vs. pLXSN-enthaltende) mit einem Fold Change  $\geq 1,5$  wurden als hochreguliert (CCL2 aus qRT-PCR) und mit einem Fold Change  $\leq 0,66$  als herunterreguliert angesehen. Alphabetische Sortierung. N=2.

induzierte Gene				reprimierte Gene			
A1BG	EDN2	MAP6	SERPINA1	A2ML1	ETV3L	METTL7A	SH3TC1
AAMDC	EFCAB10	MAP7D2	SERPINA3	A4GALT	EVA1C	MFSD3	SH3TC1
ABCA13	EFEMP1	MARCKSL1	SERPINE1	AADACL2	EVA1C	MGAT3	SHF
ABCC4	EFNA1	MAT2B	SERPINE2	ABCA12	EVA1C	MGAT4A	SIAE
ABCC6	EFNB2	MATN2	SERTAD3	ABCG1	EV12B	MGP	SIGIRR
ABHD8	EGF	MATN3	SES3	ABCG4	EVPL	MIEF1	SLC10A2
ABI3BP	EGLN3	MBD5	SETBP1	ABHD14A	EVPLL	MINDY1	SLC12A5
ABL2	EIF5A2	MC2R	SGCB	ABLM1	EYA4	MKNK2	SLC12A6
ACADM	ELOVL2	MCAM	SGCE	ABLM2	EYS	MKNK2	SLC13A5
ACKR3	EMILIN2	MCC	SGPP1	ABLM3	FA2H	MKRN3	SLC15A1
ACOXL	ENAH	MCOLN3	SH3BP4	ACER1	FABP5	MMP1	SLC16A4
ACP5	ENC1	MDGA2	SHANK2	ACKR4	FABP7	MMP10	SLC16A5
ACSBG2	ENOX2	MDK	SHC	ACOX2	FAM110C	MMP28	SLC16A7
ACSL4	EPB41	MED23	SHC4	ACP7	FAM120C	MMRN2	SLC22A18
ACSS1	EPB42	MEDAG	SHOX2	ACSL1	FAM153C	MPRIP	SLC22A18AS
ACTG1	EPO	MEGF9	SIGLECL1	ACSS2	FAM25A	MPZL2	SLC25A37
ACTG2	ERCC6L	MEIOB	SIPA1L3	ACY1	FAM25E	MPZL3	SLC26A9
ACVR1	ERICH5	MELTF	SIRPA	ADAM8	FAM3D	MROH6	SLC28A3
ACVRL1	ERO1A	MEST	SIRT4	ADAM8	FAM43A	MRV11	SLC29A2
ADA2	ERO1B	MEX3B	SIX1	ADAMTS16	FAM49A	MS4A12	SLC2A14
ADAM12	ESYT1	MFAP2	SLAMF6	ADAMTS9	FAM71A	MSMP	SLC2A9
ADAM19	ETS1	MFHAS1	SLC12A3	ADAMTS14	FAM81A	MST1R	SLC30A8
ADAM23	ETS2	MGAM	SLC15A3	ADAP1	FAM83C	MTHFD2L	SLC37A2
ADAMTS1	ETV7	MGARP	SLC17A4	ADAP2	FAM83E	MTHFD2L	SLC37A2
ADAMTS14	EVA1A	MGLL	SLC17A9	ADCY8	FBLN1	MTMR7	SLC38A11
ADAMTS3	EVA1A	MGST1	SLC1A1	ADD2	FBLN1	MTSS1	SLC39A2
ADAMTS4	EVC	MICAL3	SLC1A4	ADGRE2	FBP1	MTSS1	SLC43A1
ADAMTS6	EXD2	MICAL3	SLC24A4	ADGRE5	FBXO27	MUC15	SLC43A3
ADCY4	F2R	MINPP1	SLC25A10	ADGRF1	FCGRT	MUC20	SLC44A4
ADGRL3	FABP6	MINPP1	SLC25A29	ADGRF1	FCHO2	MUCL1	SLC46A2
ADM	FADS3	MIXL1	SLC25A29	ADGRL2	FCRLB	MXD1	SLC48A1
ADPRH	FAM110B	MMP2	SLC25A31	ADGRL2	FETUB	MXI1	SLC4A4
AEBP1	FAM114A1	MMP23B	SLC27A6	ADIRF	FEV	MYC	SLC5A1
AFAP1	FAM131A	MMP7	SLC2A10	ADSSL1	FGD3	MYF5	SLC6A14
AFP	FAM171B	MNX1	SLC2A5	AIF1L	FGFR1	MYH11	SLC7A2
AGBL3	FAM20C	MOSPD1	SLC2A6	AIF1L	FGFR1	MYH7B	SLC7A8
AHRR	FAM221A	MOXD1	SLC35B3	AKAP14	FLG	MYLIP	SLC9A9
AKAP1	FAM241B	MPDZ	SLC35F3	ALDH1A1	FLG2	MYO5B	SLCO3A1
AKAP10	FAM71F1	MPO	SLC37A3	ALDH1A2	FLI1	MYZAP	SLCO4A1
AKAP12	FANCD2	MPP1	SLC38A4	ALDH1L1	FLVCR2	NAGS	SLIT2
AKAP12	FAP	MRAP2	SLC39A10	ALDH3B2	FLYWCH1	NALCN	SLPI
AKAP2	FARP1	MRAS	SLC39A6	ALOX12B	FNDC11	NAPRT	SLURP1
AKR1C3	FARP1	MRC2	SLC41A2	ALOX15B	FNDC7	NBEAL2	SMIM5
AKT3	FAT4	MSANTD3	SLC4A3	ALS2CL	FOS	NCCRPI	SMOC1
ALDH1A3	FAXC	MSANTD3	SLC50A1	ANK3	FOXA2	NCF1	SMOC1
ALDH2	FBLN2	MSANTD3-	SLC5A8	ANK3	FOXQ1	NCF2	SMOC2
ALOX5AP	FBLN5	TMEFF1	SLC6A2	ANKFN1	FRMPD1	NCKAP5	SMOX
AMACR	FBLN7	MSRB3	SLC7A5	ANKMY1	FSCN3	NDRG2	SMPD3
AMACR	FBN1	MT1G	SLC7A6	ANKMY1	FSIP1	NDRG4	SMPDL3A
AMTN	FBN2	MT1H	SLC7A9	ANKRD2	FTCDNL1	NEBL	SNAI1
ANKRD10	FBXL16	MTM1	SLC9A2	ANKRD22	FTCDNL1	NECTIN4	SNAPC5
ANKUB1	FBXO2	MTMR12	SLC9B1	ANKRD31	FUCA1	NEMP2	SNCG
ANLN	FBXO32	MTUS1	SLCO2A1	ANKRD35	FUT3	NEURL1	SNTB1
ANO1	FBXO40	MTUS1	SLCO5A1	ANKRD50	G0S2	NFASC	SOD3
ANO4	FBXO43	MVB12A	SLF2	ANXA9	GAB4	NFIX	SORBS2
ANO6	FERMT2	MVB12B	SLFN11	APCDD1	GADD45G	NGEF	SORD
ANOS1	FEZ1	MX2	SLFN12	APOBEC3H	GALE	NID2	SORT1
ANXA10	FGL1	MXRA5	SLFN13	APOBEC3H	GALK1	NLRP10	SOWAHB
APAF1	FGR	MYADM	SLIT3	APOM	GALNT5	NLRP14	SOX11
APBB1	FHL2	MYB	SLITRK5	AQP3	GAPDH5	NLRP2	SOX2
APCDD1L	FHL2	MYBL1	SMARCD3	AQP3	GAREM1	NLRX1	SP140
APLN	FHOD3	MYBPHL	SMO	AQP9	GASK1A	NMU	SPACA4
APOBEC2	FIGLN1	MYL7	SNAI2	ARAP1	GAST	NOG	SPATA13
APOE	FILIP1L	MYL9	SNCA	ARC	GATA3	NOS1AP	SPATA6L
APOL1	FMNL3	MYLK	SNTA1	ARG1	GBA3	NOS3	SPATC1L
APOL2	FN1	MYO10	SNX10	ARHGAP18	GBP6	NOTCH3	SPESP1

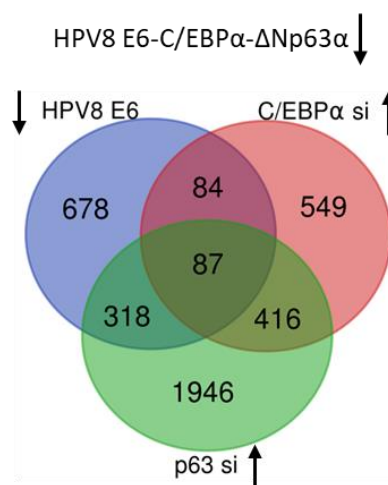
APOL6	FOLR3	MYO16	SNX10	ARHGAP23	GCNT4	NOVA1	SPIN4
APP	FOXD4	MYOM3	SOC53	ARHGAP30	GCSAM	NOXA1	SPINK1
ARHGAP21	FOXD4L5	MYSM1	SOST	ARHGAP32	GDA	NR1D1	SPINK5
ARHGEF6	FOXL2NB	NANOS3	SOWAHA	ARHGEF10L	GDF10	NRARP	SPINK5
ARID4A	FRG2B	NAP1L3	SOX4	ARHGEF2	GDPD2	NRGN	SPINK5
ARID4B	FSD1	NAP1L5	SPAG1	ARHGEF4	GDPD3	NSG1	SPINK6
ARL13B	FTHL17	NDUFA4L2	SPANXA1	ARRDC1	GGT6	NT5M	SPINK7
ARL14	FZD1	NECAB1	SPANXC	ARRDC3	GJB5	NTSR1	SPINK8
ARL6IP5	FZD5	NECTIN3	SPARC	ASB13	GJB6	NUDT8	SPNS2
ARL8A	FZR1	NECTIN3	SPATA22	ASCL2	GJC2	NUPR1	SPRR1A
ARL9	GABARAPL1	NEDD4	SPATA22	ASNS	GKN1	NUTM2B	SPRR1B
ARMH4	GABRB2	NEDD9	SPATA31D1	ASPG	GLRA2	NWD2	SPRR2A
ARSH	GALNT2	NEFL	SPDYE2	ASPRV1	GLRX	NXNL2	SPRR2B
ARSI	GATA6	NEXN	SPEG	ATG9B	GLTP	OAF	SPRR2D
ASB2	GBP1	NFATC2	SPHK1	ATOH1	GNAO1	OASL	SPRR2E
ASPHD2	GBX2	NFATC4	SP1	ATP10B	NGT2	ODC1	SPRR2F
ASRGL1	GCH1	NFE2	SPINDOC	ATP12A	GNRHR	ODF3	SPRR2G
ATL1	GCH1	NFKB2	SPOCD1	ATP2B4	GOLT1A	OLAH	SPRR3
ATP2A3	GEMIN2	NHLH1	SPOCK1	ATP2C2	GP6	OR10G8	SPRR4
ATP2C1	GFM2	NHS	SPON2	ATP5MPL	GPA33	OR10H5	SPRY2
ATP2C1	GOD1	NINL	SPP1	ATP6V1C2	GPAT2	OR13D1	SPTBN2
ATP7B	GFPT1	NKX3-1	SPSB1	ATP8A2	GPAT2	OR13H1	SPTBN5
ATP9A	GFRAL	NLGN2	SRD5A2	AZGP1	GPAT2	OR1Q1	SPTLC3
B2M	GGT2	NLRP12	SREK1	B3GALT4	GPAT3	OR2T34	SPTLC3
B3GALT1	GGTLC1	NLRP3	SRGN	B3GNT3	GPCPD1	OR4M1	SPTSSB
BBOF1	GGTLC2	NLRP8	SRPX	B3GNTL1	GPM6B	OR51F2	SREBF1
BBS7	GHR	NME5	SRSF12	BAIAP2	GPR1	OR52K1	SRPX2
BBS9	GHR	NNMT	ST18	BAIAP2L2	GPR45	OSBP2	SSTR3
BCL3	GIMAP8	NODAL	ST3GAL2	BATE2	GPR82	OSBP15	ST3GAL1
BEND6	GJA3	NOL4L	ST3GAL5	BBOX1	GPX3	OVOL1	ST6GALNAC3
BEND7	GJE1	NOSTRIN	ST8SIA1	BCHE	GPX3	P2RX7	STAMBPL1
BEX1	GLB1L3	NOX4	STAC	BCL2	GRAMD1C	P2RY12	STEAP1
BHLHE40	GLDC	NPAS2	STAR	BCL2L1	GRAMD2A	P2RY8	STEAP1B
BHLHE41	GLI1	NPDC1	STARD13	BDH1	GRHL1	P4HA3	STEAP3
BIRC2	GLIPR1	NPR2	STARD13	BICDL2	GRHL3	PABPC3	STEAP4
BMPR2	GLIS1	NPTN	STARD13	BLMH	GRM2	PABPC4	STK32C
BOC	GLIS2	NR2F1	STAT1	BLNK	GSDMA	PACSIN1	STK40
BPGM	GLS	NREP	STAT4	BMP5	GUCY1A1	PADI1	STX19
BRINP1	GLT8D2	NREP	STBD1	BMP6	GUCY1A2	PADI3	STXBP6
BRIP1	GMPR	NRG1	STK32B	BNIP1	GUCY1B1	PAG1	SULT2B1
BST1	GNAT1	NRG1	STK38	BNIP1	GVQW3	PAGE3	SUSD3
BST2	GNG4	NRP1	STON1	BOK	H2AFJ	PANK1	SVIP
BTBD10	GPC4	NTN1	STON2	BPIFB1	HAGHL	PAQR5	SYNGR1
BVES	GNPMB	NTRK2	STOX2	BPIFC	HAL	PARD6B	SYNGR1
C12orf54	GPR155	NUAK1	STRIP2	BSPRY	HBB	PATZ1	SYNPO2L
C14orf28	GPR171	NUDT10	STX3	BTBD11	HCAR3	PAX7	SYNPR
C16orf45	GPR173	NUDT11	STYK1	BTG1	HDAC5	PAX9	SYT14
C17orf78	GPR180	ODAPH	SUGCT	C10orf99	HES5	PCDH1	SYT14
C17orf99	GPR68	OLFM2	SULT4A1	C11orf87	HES6	PCDH8B	SYT15
C19orf57	GPRIN2	OLFML3	SUMO1	C11orf96	HIST1H1B	PCDHGA9	SYT17
C1QTNF1	GPX2	OOEP	SUSD1	C12orf56	HIST1H2AL	PCDHGB2	SYT7
C1QTNF4	GRASP	OPN3	SUSD5	C15orf32	HIST1H2BF	PCDHGB6	SYT8
C1QTNF8	GRIA3	OR4C11	SUSD6	C15orf62	HIST2H3PS2	PCDHGB7	SYTL1
C1R	GRIN3B	OR4D11	SVIL	C16orf74	HIST4H4	PCNX1	TBL1X
C1S	GRIP1	OR4D5	SWAP70	C1orf210	HMGAI1	PDE2A	TBL1Y
C1S	GRK5	OR51Q1	SYBU	C1orf226	HMOX1	PDE4B	TBX1
C2CD6	GTSF1	OR5AC2	SYCP2L	C1orf68	HNMT	PDGFRA	TBX6
C2orf83	GUCY2F	OR8A1	SYNDIG1	C3	HNMT	PDP2	TCEA3
C2orf88	GULP1	OXER1	SYNPO	C3orf67	HOPX	PDYN	TCF15
C3orf52	H2AFB1	P2RY6	SYNPO2	C3orf86	HOPX	PDZD7	TCF7
C4orf47	H2AFV	P3H1	SYT1	C6orf15	HOXA6	PELI1	TCHH
C7orf66	H2BFM	P3H2	SYT1	CACNA2D4	HOXA7	PENK	TCHHL1
C9orf47	HAPLN3	P4HA1	SYT12	CADM1	HOXB4	PER2	TCN1
CA9	HAS2	P4HA2	TACC1	CALB1	HOXD8	PER3	TCN2
CABP7	HAS3	P4HA2	TAF2	CALB2	HPGD	PEX11G	TCP10
CABYR	HDAC9	PABPC1L2B	TAGLN	CALML5	HPSE	PEX5L	TEKT4
CACHD1	HDAC9	PAK3	TAOK3	CAMK1D	HRASLS2	PGBD5	TEX101
CACNB2	HEG1	PALM	TAP1	CAMK1D	HRG	PGLYRP3	TFP12
CALCRL	HERC5	PAM	TAS2R42	CAND1	HRNR	PGLYRP4	TGFBR3
CALHM2	HHIPL1	PAMR1	TAS2R50	CAPN6	HS3ST1	PHACTR2	TGM1
CALHM5	HIP1R	PAPPA	TBC1D8B	CAPNS2	HS3ST2	PHACTR3	TGM3
CALHM6	HIST2H2AA4	PAPSS1	TBC1D9	CAPSL	HS3ST3A1	PHF8	TGM5
CAP2	HIVEP3	PARP9	TBX3	CARD11	HS3ST6	PHGDH	THBD
CARD16	HLA-B	PATJ	TBXA2R	CARD14	HSBP1L1	PHYHD1	THEM5
CARHSP1	HLA-C	PAX3	TCAF2	CASZ1	HSD11B1	PHYHIP	THRA
CASC10	HLA-DQB1	PBXIP1	TCEAL7	CAVIN2	HSD3B7	PII5	TIMP1

CASD1	HLA-DQB1	PCDH7	TCF12	CCDC152	HSFX4	PI3	TIMP2
CASP7	HLA-DQB1	PCDH9	TDO2	CCDC169	HSH2D	PIM1	TKFC
CAV1	HLA-DQB2	PCDHA5	TDOD7	CCDC178	HSPA2	PIR	TM4SF19
CAV2	HLA-DRA	PCDHB12	TEAD2	CCDC60	HSPB8	PITPNC1	TM7SF2
CAV3	HLA-F	PCDHB2	TENM1	CCDC85B	HYAL1	PITPNC1	TMC7
CBLB	HLA-F	PCDHB9	TENM2	CCDC88B	ICAM2	PITX1	TMCC3
CCDC112	HLA-G	PCOLCE2	TENT5C	CCDC89	ID2	PIWIL2	TMED7-
CCDC121	HMCN1	PDE11A	TEPP	CCN5	IFFO1	PKIB	TICAM2
CCDC136	HMGB3	PDE4A	TESC	CD1D	IFITM10	PKP1	TMEM114
CCDC146	HMGCLL1	PDE4DIP	TET1	CD36	IGF2	PLA2G3	TMEM125
CCDC68	HMGCLL1	PDE4DIP	TFRC	CD40	IGFBP6	PLA2G4D	TMEM143
CCDC82	HMGN4	PDE4DIP	TGFB111	CD40	IGFL1	PLA2G4E	TMEM156
CCDC92	HOMER2	PDE4DIP	TGFB2	CD52	IGFL2	PLA2G4F	TMEM170B
CCL2	HOXB5	PDGFB	TGM2	CD8B	IGSF9	PLA2G7	TMEM184A
CCL28	HOXB8	PDGFC	THBS1	CDH16	IKZF2	PLB1	TMEM233
CCL3	HOXC13	PDLIM4	THBS2	CDH4	IL18RAP	PLBD1	TMEM236
CCL4	HOXC9	PDP1	THNSL2	CDKN1C	IL1F10	PLCD1	TMEM238
CCN1	HPS1	PDPN	THY1	CDSN	IL1RN	PLCE1	TMEM45A
CCN2	HSD17B1	PDZK1IP1	TIAM2	CEACAM1	IL20RA	PLCXD1	TMEM45B
CCNJL	HSD17B2	PDZRN3	TLI1	CEACAM6	IL33	PLEKHA7	TMEM63C
CCNO	HSF5	PF4V1	TMCC2	CEBPA	IL36B	PLEKHG2	TMEM79
CD47	HSPA12A	PGBD1	TMCO3	CEMIP	IL36G	PLEKHG5	TMEM86A
CD53	HTR1D	PGF	TMCO3	CERS1	IL36RN	PLEKHH3	TMPRSS11B
CD70	HTR4	PGK2	TMEM106A	CERS3	IL37	PLEKHN1	TMPRSS11E
CDC20B	ICAM1	PGM2L1	TMEM132A	CERS3	IL6R	PLLP	TMPRSS11F
CDH10	ICAM5	PGM3	TMEM14A	CES1	ISL1	PLPPR5	TMPRSS13
CDH11	ID4	PHLPP2	TMEM158	CES2	ISLR	PLXDC2	TMPRSS13
CDH2	IDO2	PIGZ	TMEM200A	CFAP57	ITGB2	PLXNA4	TMPRSS4
CDIP1	IFI6	PIK3CD	TMEM200B	CFHR3	ITGB7	PMEL	TMPRSS5
CDK8	IFIT1B	PIK3CG	TMEM217	CGN	ITGBL1	PNLIPRP3	TMTC1
CDKL2	IFIT2	PILRB	TMEM229B	CHAC1	IVL	PODN	TNFAIP2
CDKN2D	IFIT3	PIP4K2C	TMEM249	CHN2	JDP2	POF1B	TNFAIP8L3
CDR2	IFNGR1	PLA2G10	TMEM255B	CIDEA	JMJD7	POF1B	TNFRSF10C
CELSR1	IFNK	PLA2G1B	TMEM272	CLC	JMJD7-	PPFIBP2	TNFRSF21
CEMIP2	IGF1R	PLAGL1	TMEM47	CLCA4	PLA2G4B	PPL	TNFRSF25
CENPV	IGFBP2	PLAT	TMEM67	CLCF1	KALRN	PPM1F	TNFRSF6B
CEP112	IGFBP5	PLCD4	TMEM74	CLDN17	KAZALD1	PPP1R1C	TNFSF15
CFAP47	IGFBP7	PLCZ1	TMEM74B	CLDN4	KCNG1	PPP1R3C	TNNI2
CFAP58	IKBIP	PLEKHA4	TMEM87B	CLDN5	KCNK12	PPP2R2C	TNNT2
CFB	IKZF1	PLEKHO1	TMEM92	CLDN7	KCNK2	PRB2	TNS2
CFI	IL11	PLIN3	TMIGD3	CLIC3	KCNK7	PRDM1	TNXB
CGAS	IL12RB2	PLOD2	TMOD2	CLMN	KCNMA1	PRMT8	TOR4A
CGNL1	IL15	PLPP1	TMSB15B	CLU	KCNMA1	PRODH	TP53I11
CGRRF1	IL17RD	PLSCR4	TMSB4X	CLUL1	KCNN4	PROM2	TP53I11
CH13L2	IL1A	PLXNA3	TNC	CMTM1	KCP	PROZ	TPPP
CHODL	IL1R1	PMP22	TNF	CMTM2	KIAA1211L	PRR15L	TPRG1
CHRD	IL20	POMC	TNFAIP6	CNFN	KIAA1257	PRR23C	TREX2
CHRNA6	IL23A	PON3	TNFSF10	COL13A1	KIAA1671	PRR9	TRIB2
CHRNA7	IL24	POPDC3	TNFSF4	COL8A1	KIF13B	PRRG3	TRIM38
CHST14	IL32	POSTN	TNS3	COL9A1	KIF26A	PRRT4	TRIM63
CHST15	IL32	POU2AF1	TOX2	COL9A3	KLF2	PRSS1	TRPV3
CKB	IL5RA	POU6F1	TOX3	COX7A1	KLF3	PRSS2	TSC22D3
CLDN10	IL6	PPFIA4	TP53	CPA6	KLF4	PRSS21	TSPAN1
CLDN11	IL7R	PPP1R3B	TP53AIP1	CPLX3	KLK10	PRSS22	TSPYL5
CLEC2B	INHBA	PPP2R2B	TP53AIP1	CRABP2	KLK11	PRSS27	TTCC39A
CLIP2	INHBB	PPP3CA	TP53INP1	CRCT1	KLK12	PRSS3	TTC39A
CLIP3	INSM2	PPP3CB	TP53INP2	CREG1	KLK13	PRSS35	TUBA3D
CLK1	IQCA1	PPP4R4	TP53TG3	CREG2	KLK4	PSAPL1	TUBAL3
CLVS1	IQCD	PQLC2L	TP53TG3D	CRIP1	KLK5	PSORS1C2	TXNIP
CMPK2	IQCI-SCHIP1	PREX1	TPBG	CRNN	KLK6	PTAFR	TYRO3
CNBD2	IRAK3	PRKDC	TPM1	CRTAM	KLK7	PTGDR2	TYSND1
CNIH2	IRF1	PROK2	TPM1	CRYAB	KLK9	PTGER3	UGT2A3
CNN1	IRGQ	PRPH	TPM1	CSGALNACT1	KPNA7	PTGER3	UNC13A
CNPY4	IRX1	PRRG4	TPST1	CST3	KPRP	PTGES	UNC5B
CNTNAP3B	ISLR2	PRRT2	TRAPPC3L	CST5	KRBOX1	PTGS1	UPK1B
CNTNAP4	ISM1	PRSS23	TREM2	CST6	KRT1	PTK2B	UPP1
COBL	ITGA4	PRSS53	TRIM22	CSTA	KRT10	PTPN22	USH1G
COL15A1	ITGA4	PSD2	TRIM36	CSTB	KRT13	PTPN22	USP2
COL1A1	ITGAV	PSD3	TRIM46	CTRB2	KRT15	PTPRJ	VASN
COL1A2	ITGB8	PSG1	TRIM49D1	CTSC	KRT16	PTPRU	VEGFA
COL27A1	ITSN1	PSG2	TRIML2	CTSD	KRT18	PYGB	VEGFA
COL3A1	IVNS1ABP	PSG8	TRPC1	CTSD	KRT2	PYROXD2	VEGFD
COL4A1	JAG1	PSMB9	TSHZ2	CWH43	KRT222	QRFPR	VG
COL4A2	JAZF1	PSTPIP2	TSHZ3	CXCL17	KRT23	R3HDML	VGLL1
COL5A2	KANK4	PTCHD3	TSPAN10	CXCR2	KRT24	RAB11FIP1	VILL
COL6A1	KATNAL1	PTGER4	TSPAN13	CXCR6	KRT27	RAB11FIP1	VIP



COPZ2	KBTBD11	PTGFR	TSPAN14	CXXC5	KRT34	RAB17	VSIG10L
CORO1A	KCNA7	PTHLH	TSPAN15	CYP2C18	KRT35	RAB25	VSIG8
CORO6	KCNIP3	PTK7	TSPAN9	CYP3A5	KRT37	RAB27B	VSNL1
CPN1	KCNJ12	PTPN20	TTC16	CYP3A5	KRT4	RAB7B	WFDC12
CPNE2	KCNJ18	PTPRK	TTC28	CYP3A7	KRT6B	RABGGTA	WFDC5
CRHR2	KCNK10	PTPRK	TTLL7	CYP4B1	KRT77	RAC3	WT1
CRIP2	KCNMB3	PTPRK	TTLL7	CYP4F11	KRT78	RAET1E	XDH
CROT	KCNMB4	PTX3	TTN	CYP4F12	KRT80	RAMP1	XK
CRYGC	KCNN2	PXDC1	TUB	CYP4F2	KRT81	RAMP1	XKRX
CSF1R	KCNS1	QPCT	TUBB3	CYP4F22	KRTAP19-7	RAPGEF3	YOD1
CSF2	KCNS2	RAB15	TULP4	CYP4F3	KRTAP2-3	RAPGEF3	ZDHH11
CSGALNACT2	KCNS3	RAB30	TVP23C	CYP4F8	KRTAP3-3	RAPGEFL1	ZDHH11B
CSGALNACT2	KCTD11	RAB40B	TXNRD1	CYP7B1	KRTAP4-2	RARG	ZFYVE28
CSPG4	KCTD14	RAB42	UAP1	CYP8B1	KRTAP9-8	RASAL1	ZG16B
CSRNP2	KDELC2	RAB6B	UBASH3A	CYSRT1	KRTCAP3	RASD1	ZMYND8
CSRNP2	KDM3A	RAB8B	UBASH3B	DAAM1	KRTDAP	RASEF	ZNF185
CTAGE15	KDM6A	RAD51	UBE2L6	DAB1	KYAT1	RASGRP1	ZNF239
CTSB	KIAA0825	RAD51AP1	UBE2Q2L	DACT3	LAIR2	RASSF3	ZNF280A
CTSF	KIAA0895	RAP2A	UBXN4	DAPL1	LAMA2	RASSF5	ZNF423
CTSS	KIAA1841	RAPGEF4	UCN2	DBP	LAMA4	RASSF5	ZNF662
CTTNBP2	KIF12	RASAL2	UGT8	DDC	LCE1B	RBBP8NL	ZNF730
CUL4A	KIF26B	RASGEF1A	ULBP1	DDI2	LCE1C	RCSD1	ZNF750
CX3CL1	KIF3C	RASL10B	USB1	DDIT4	LCE1E	RDH12	
CXCL1	KIF7	RASSF9	USP14	DDIT4L	LCE2A	REC8	
CXCL10	KIT	RBFOX3	USP18	DEFB1	LCE2B	REPIN1	
CXCL11	KLHL13	RBM11	UXS1	DEFB103B	LCE2C	RGS17	
CXCL14	KLHL2	RBM24	VAV3	DEFB129	LCE2D	RGS2	
CXCL6	KLHL24	RBM38	VAX1	DENND2C	LCE3A	RGS22	
CXCR4	KLHL34	RBP7	VCAN	DENND2C	LCE3B	RHBG	
CYLD	KLHL6	RCBTB1	VEPH1	DGAT2	LCE3C	RHCG	
CYP27A1	KMT5B	REC114	VEPH1	DGLUCY	LCE3D	RHOBTB3	
CYP2S1	KRBA1	REEP2	VIM	DHRS11	LCE3E	RHOV	
CYP2U1	KRT7	REG3G	VLDLR	DHRS3	LCE5A	RHOXF1	
CYS1	KRT8	RELB	VN1R2	DHRS9	LCE6A	RNASE6	
CYTL1	KRT82	REPS2	VNN1	DLC1	LCK	RNASE7	
CYYR1	KRTAP2-2	RET	VOPP1	DLX2	LCN2	RNF165	
DAB2	KRTAP4-6	RETREG1	VPS53	DLX3	LEMD1	RNF208	
DACT1	KYNU	RFK	VSX1	DLX5	LENG9	RNF212	
DAPK1	LICAM	RFLNB	VXN	DMBT1	LETM2	RNF222	
DCAF4	LAMA1	RGCC	WDPCP	DMKN	LHX1	RNF39	
DCLK3	LAMP2	RGN	WDPCP	DMRTC1	LHX3	RORA	
DCUN1D2	LAMP3	RGPD1	WDR44	DNAAF3	LIMCH1	RORC	
DDR1	LARGE1	RHEBL1	WDR47	DNAH2	LINC01835	RPS29	
DDX43	LARP6	RHOB	WDR63	DNASE1L2	LINGO1	RPS6KA2	
DEFA4	LATS2	RIMS3	WDR91	DNMBP	LIPH	RPS6KA5	
DEFB128	LAYN	RIPK3	WDR91	DOCK4	LIPK	RPTN	
DEFB4A	LCA5	RIPK4	WFDC10A	DOK2	LIPM	RRAD	
DENND2A	LCAT	RIPPLY3	WFDC2	DOK7	LIPN	RREB1	
DENND5A	LCOR	RNASE4	WNK3	DSC1	LNK1	RRNAD1	
DENND5B	LCP1	RNASE9	WNT5B	DSC2	LOC100130449	RSPH1	
DEPP1	LCTL	RND2	WNT9B	DSG1	LOC388780	RTKN2	
DERL1	LEF1	RND3	XAF1	DUSP10	LOC389831	RXRA	
DGKG	LGALS1	RNF122	XCL1	DUSP2	LOC79999	S100A12	
DIPK1A	LGI4	RNF152	XG	E2F2	LOR	S100A7	
DIRAS1	LHX2	RNF182	XPR1	ECM1	LPAR3	S100A8	
DISC1	LIF	RNFT1	XRRA1	EEF1A2	LRAT	S100A9	
DKK3	LIFR	ROR2	ZBP1	EFL1	LRRC20	S100P	
DKK3	LIG4	RSPO4	ZBTB10	EFL1	LRRC4	SALL3	
DKK4	LILRB3	RTL8B	ZC3H12A	EFNA3	LRRC8B	SAMD10	
DLGAP1	LIMS2	RTN4RL1	ZFHX2	EFR3B	LRRD1	SAMD5	
DLGAP3	LINGO2	RTP4	ZFHX4	EGFL6	LSP1	SAMSN1	
DLL1	LMBRD2	RTTN	ZFP42	EGR2	LTB4R	SAPCD2	
DLL3	LMCD1	RUBCNL	ZHX2	EGR3	LY6D	SATB1	
DLX4	LMF1	RUNDC3B	ZNF107	EHBP1L1	LY6G6C	SBSN	
DNA2	LMO1	RUNX1	ZNF114	EHF	LY9	SCARA3	
DNAH5	LOC112577516	RUNX2	ZNF177	EIF4B	LYNX1-	SCARA3	
DNAJB4	LOC389895	RUNX3	ZNF181	ELF3	SLURP2	SCEL	
DNAJB6	LOC728485	RUSC2	ZNF214	ELF5	LYPD3	SCG5	
DNAJB9	LOXL2	S100A7A	ZNF267	ELF5	LYPD5	SCGN	
DNAJC12	LOXL3	S1PR3	ZNF28	ELFN2	LYRM9	SCLY	
DNAJC6	LPIN2	SAA1	ZNF319	ELMOD1	MAB21L4	SCNN1A	
DNMT3B	LPXN	SAA2	ZNF347	EML6	MACC1	SCNN1B	
DOCK10	LRRC32	SAA4	ZNF385D	EMP1	MAL	SCNN1G	
DOK1	LRRC39	SACS	ZNF439	ENG	MAL2	SDCBP2	
DPF1	LRRC66	SALL4	ZNF451	ENTPD2	MALL	SDR9C7	
DPP4	LRRC7	SAMD14	ZNF461	EOMES	MANSC1	SEMA3A	

DPYSL2	LTB	SAMD9	ZNF468	EPB41L3	MANSC4	SEMA3F
DQX1	LTBP1	SAMD9L	ZNF549	EPB41L4A	MAP3K20	SEMA4D
DSCAM	LTBP2	SBSPON	ZNF559	EPB41L4B	MAP3K5	SERPINA12
DST	LUM	SCN2B	ZNF560	EPGN	MAP3K8	SERPINB13
DST	LY6K	SCN3B	ZNF582	EPHA4	MARCH3	SERPINB2
DST	LY75	SCN5A	ZNF582	EPHB1	MARCH4	SERPINB3
DUSP9	LY96	SCOC	ZNF608	EPHB2	MARCO	SERPINB4
DZIP1	LYSMD3	SCP2	ZNF667	EPHB3	MAST4	SERPINB9
DZIP1	LZTFL1	SEC61A2	ZNF699	EPHB6	MBD2	SERTAD4
DZIP1L	MAK	SELENOP	ZNF711	EPHX3	MBOAT1	SFRP1
EBI3	MAN1A1	SELENOP	ZNF788P	EPS8L1	MBOAT2	SFTA2
ECT2	MAP1A	SELL	ZNF878	ERCC1	MCF2	SGPP2
EDEM1	MAP1B	SEMA3C	ZP4	ERP27	MCTP1	SH2D4A
EDIL3	MAP3K12	SEMA3D	ZSWIM6	ESYT3	MDM2	SH3KBP1
EDN1	MAP4K3	SEMA5A	ZYG11A	ESYT3	MERTK	SH3KBP1
		SEMA5B			METRNL	
					METTL27	



**Abbildung 47. Gene die potenziell über den 8E6-C/EBP $\alpha$ -p63-Signalweg reprimiert werden.** RNA aus pLXSN-enthaltenden und 8E6-exprimierenden NFK und C/EBP $\alpha$ - bzw. p63 *Knockdown* Ansätzen (48 h) wurde zur Durchführung eines mRNA-Microarrays verwendet. Mit dem Venn-Webtool ([bioinformatics.psb.ugent.be](http://bioinformatics.psb.ugent.be)) wurde die Schnittmenge von Genen ermittelt, die durch 8E6 herunterreguliert (Fold Change  $\leq 0,66$ ) und im C/EBP $\alpha$ - und p63 *Knockdown* hochreguliert (Fold Change  $\geq 1,5$ ) waren.

**Tabelle 11. Gene die von HPV8 E6 potenziell über den C/EBP $\alpha$ -p63-Signalweg reguliert werden.** Aufgelistet sind Gene, die basierend auf den mRNA-Microarray Daten und Schnittmengenanalysen potenziell durch HPV8 E6 hochreguliert (durch 8E6 und im C/EBP $\alpha$  *Knockdown* induziert) und herunterreguliert (durch 8E6 reprimiert und im C/EBP $\alpha$ - und p63 *Knockdown* induziert) sind. Alphabetische Sortierung.

potenziell induzierte Gene			potenziell reprimierte Gene			
ADAM19	IL7R	ST3GAL5	ABLIM3	FAM25A	LYRM9	SLC16A4
ADAMTS4	IRF1	STK32B	ADAP1	FAM25E	MAL	SLC22A18
AEBP1	LAYN	TENT5C	ADIRF	FAM49A	METTL7A	SLC22A18AS
ANO1	LTB	TGM2	APCDD1	FCGRT	NALCN	SLURP1
CCL2	LY75	TMEM200A	APOBEC3H	GAST	NGEF	SNCG
CCN1	MAP1B	TNF	AQP3	HES5	NOS3	SOD3

CCNJL	MATN3	AQP3	IGF2	NOXA1	SYT17
CDH11	MCAM	B3GNT3	IGFL1	PACSIN1	SYT8
CLDN11	MELTF	CCDC88B	IGFL2	PAGE3	TCN2
CSF2	NODAL	CDKN1C	IL6R	PCDH1	THRA
CYLD	NRP1	CGN	ITGB2	PDE4B	TMEM63C
CYP2S1	PAPPA	CHN2	KCNK12	PEX11G	TNFRSF21
DOK1	PGM2L1	CLU	KCNN4	PLCD1	TNNI2
FAM241B	PLAT	CRABP2	KIAA1211L	PLCE1	TNNT2
FHOD3	PLCD4	CREG2	KLK5	PLLP	TNXB
FZD5	PTHLH	CRIP1	KRT13	PRR15L	TSPAN1
GPR68	RAB42	CRNN	KRT15	RAB7B	USH1G
HEG1	RNF182	CXXC5	LEMD1	RAMP1	VSIG8
ICAM1	SERPINE1	CYP3A5	LINC01835	RAMP1	ZFYVE28
IL11	SERPINE2	CYP3A7	LOC79999	RORC	ZG16B
IL23A	SLIT3	DAPL1	LSP1	SCARA3	
IL32	SPOCD1	EMP1	LYNX1-	SHF	
			SLURP2		

## 6 Verzeichnisse

### 6.1 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
8E6	HPV8 E6 Protein
8E7	HPV8 E7 Protein
8E6/E7	HPV8 E6 und E7 Protein
A	Adenin
AG	Arbeitsgruppe
AML	akute myeloische Leukämie
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
AP-1	Aktivator Protein 1
ATF-1	aktivierender Transkriptionsfaktor 1
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BS	Bindestelle
BSA	Rinderserumalbumin
bZIP-Domäne	basische Leucin-Zipper Domäne
C	Cytosin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CCL	CC-Chemokin-Ligand
CCR	CC-Chemokin-Rezeptor
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
C/EBP	<i>CCAAT-Enhancer-Binding-Proteins</i>
CIB1	<i>Calcium- and Integrin-Binding Proteins</i>
CIN	Cervikale intraepitheliale Neoplasie
CREB	<i>cAMP Response Element-Binding Protein</i>
cRNA	<i>complementary RNA</i>
cSCC	cutaneous squamous cell carcinoma
DAG	Diacylglycerine
DBD	DNA-Bindedomäne
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNA-abhängige Proteinkinase
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DRR	distale regulatorische Region
E. Coli	<i>Escherichia coli</i>
E6-AP	E6 assoziiertes Protein
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECR	Evolutionär konservierte Region

ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ERK	<i>Extracellular-signal Regulated Kinases</i>
EV	<i>Epidermodysplasia verruciformis</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FFPE	<i>Formalin Fixed Paraffin Embedded</i>
FKS	Fetales Kälberserum
FSC	Forward Scatter
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
G	Guanin
G-CSF	<i>Granulocyte-Colony Stimulating Factor</i>
GRO $\alpha$	<i>Growth-regulated <math>\alpha</math> protein</i>
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
h	Stunde(n)
HaCaT	<i>Human adult low calcium high temperature</i>
HNSCC	<i>Head and Neck Squamous Cell Carcinoma</i>
HPV	Humane Papillomviren
HR-HPV	<i>High Risk HPV</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
hsa	<i>homo sapiens</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IFN	Interferon
IGF	<i>Insulin-like Growth Factor</i>
IHC	Immunhistochemie
IKK	I $\kappa$ B Kinase
IL	Interleukin(e)
IL-1 Ra	IL-1 Rezeptorantagonist
IP-10	IFN $\gamma$ -induziertes Protein 10
JNK	<i>Jun-N-terminal Kinase</i>
kb	kilo Basenpaare
kDa	Kilo Dalton
KGM	<i>Keratinocyte Growth Medium</i>
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LCR	<i>Long Control Region</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LR-HPV	<i>Low Risk HPV</i>
LTR	<i>Long Terminal Repeats</i>
LUC	Luciferase
m	Milli
M	Molar
mA	Milliampere
MACS	<i>Magnetic-Activated Cell Sorting</i>
MAML1	<i>Mastermind-like transcriptional coactivator 1</i>

MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MAPKK	MAPK-Kinase
MAPKKK	MAPKK-Kinase
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein 1</i>
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
MIF	<i>Macrophage migration Inhibitory Factor</i>
min	Minute(n)
miRNA	micro RNA
MMP	Matrix-Metalloprotease
mRNA	<i>messenger RNA</i>
μ	Mikro
n	Nano
NFK	<i>Normal Foreskin Keratinocytes</i>
NF-κB	<i>Nuclear Factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NK-Zellen	Natürliche Killer Zellen
nm	Nanometer
NMSC	<i>Non-Melanoma Skin Cancer</i>
ORA	<i>Over-Representation Analysis</i>
Ori	<i>Origin of replication</i>
p	Piko
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PKA	Protein Kinase A
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
POX	Peroxidase
PRR	Proximale Regulatorische Region
PTK	Protein Tyrosin Kinase
qRT-PCR	<i>quantitative real time PCR</i>
Rb	Retinoblastoma
rhCCL2	rekombinantes humanes CCL2
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
ROS	<i>Reactive Oxygene Species</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkriptase
SAM	Steriles Alpha Motiv
SCC	<i>Squamous Cell Carcinoma</i>
SCGFβ	<i>Stem Cell Growth Factor β</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SSC	<i>Side Scatter</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
STK	Serin/Threonin Kinase
T	Thymin

TAD	Transaktivierungsdomäne
TAM	Tumor-assoziierte Makrophage
TE-SS	Tris-EDTA- <i>salmon sperm</i> DNA
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TLR	Toll-like Receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
UPL	<i>Universal Probe Library</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VHF	Vorhaut Fibroblasten
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
ZnT1	Zink Transporter 1

## 6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Schematische Darstellung des HPV-Genoms und der Kapsidstruktur..	5
Abbildung 2. HPV-Lebenszyklus in der Epidermis.....	6
Abbildung 3. Modell der $\beta$ -HPV/UV-induzierten kutanen Karzinogenese..	9
Abbildung 4. EV-spezifische benigne Läsionen und maligne Plattenepithelkarzinome..	12
Abbildung 5. Transkriptionelle Regulation des CCL2 Promotors.....	20
Abbildung 6. Überblick der verwendeten Vektoren.....	29
Abbildung 7. Aufbau des Migrations-Assays.....	49
Abbildung 8. CD68 Färbung von EV-Läsionen.....	67
Abbildung 9. CCL2 Färbung von EV-Läsionen.....	68
Abbildung 10. CCL2 Induktion in HPV8 E6-exprimierenden HaCaT Zellen.....	68
Abbildung 11. Zytokin-Screening in HPV8 E6-exprimierenden HaCaT Zellen.....	69
Abbildung 12. Reinheitsbestimmung aufgereinigter CD14 <sup>+</sup> Monozyten.....	70
Abbildung 13. 8E6 induziert die in vitro Migration von Monozyten.....	71
Abbildung 14. 8E6 stimuliert CCL2/CCR2-abhängig die in vitro Migration von Monozyten. .....	72
Abbildung 15. Einfluss von RS-102895 auf die Zellviabilität von Monozyten.....	73
Abbildung 16. Zusammenhang zwischen C/EBP $\alpha$ Repression und CCL2 Induktion durch TNF $\alpha$ und HPV8 E6..	74
Abbildung 17 Zusammenhang zwischen C/EBP $\alpha$ und CCL2 in HPV8 E6-exprimierenden NFK. .....	75
Abbildung 18. C/EBP $\alpha$ -abhängige CCL2 Regulation in HaCaT WT.....	76
Abbildung 19. C/EBP $\alpha$ -abhängige CCL2 Regulation in NFK WT.....	77
Abbildung 20. Die CCL2 Expression ist durch den Knockdown von p63 in HaCaT WT Zellen reduziert.....	78
Abbildung 21. In NFK WT ist die CCL2 Expression durch den Knockdown von p63 verringert. .....	79
Abbildung 22. In HaCaT Zellen reduziert der Knockdown von p63 die 8E6-abhängige CCL2 Induktion.....	81
Abbildung 23. Die Transfektion eines miR-203 Mimic verringert den Effekt von 8E6 auf die CCL2 Genexpression in HaCaT Zellen.....	82
Abbildung 24 Die CCL2 Induktion durch HPV8 E6 ist in NFK p63-abhängig.....	83
Abbildung 25. Die Überexpression von $\Delta$ Np63 $\alpha$ erhöht die CCL2 Expression in HaCaT WT Zellen.....	84



Abbildung 26. Das HPV8 E6 Protein induziert die Aktivität von CCL2 Promotorregionen in Abhängigkeit von p63. ....	86
Abbildung 27. HPV8 E6 induziert CCL2 in Co-Kulturen aus Fibroblasten und HaCaT Zellen. ....	88
Abbildung 28. HPV8 E6 induziert die CCL2 Expression in organotypischen 3D-Kulturen...	89
Abbildung 29. Induktion der CCL2 und p63 Expression in 8E6-exprimierenden organotypischen 3D-Kulturen.. ....	90
Abbildung 30. Kinase Stammbaum zur Übersicht HPV8 E6-regulierter Kinase-Aktivitäten.	92
Abbildung 31. Ranking der HPV8 E6-regulierten Tyrosin- und Serin/Threonin-Kinasen-Aktivität.....	93
Abbildung 32. Expressionsanalyse von Kinasen in 8E6-exprimierenden HaCaT Zellen und NFK.....	95
Abbildung 33. Zusammenhang zwischen CCL2 Expression und PKA-C $\alpha$ Aktivität in HaCaT WT Zellen. ....	96
Abbildung 34. Einfluss der PKA-Inhibition/Induktion und HPV8 E6 auf die CREB und p-CREB Expression. ....	97
Abbildung 35. Einfluss von MAPK- und NF- $\kappa$ B-Signalwegen bei der CCL2 Induktion durch 8E6 in HaCaT WT Zellen.. ....	98
Abbildung 36. ERK und p-ERK Expression in 8E6-exprimierenden HaCaT Zellen und NFK. ....	99
Abbildung 37. Zytokin-Screening in HaCaT WT Zellen nach einem C/EBP $\alpha$ und p63 Knockdown.. ....	100
Abbildung 38 Zytokin-Screening zur Analyse HPV8 E6-, C/EBP $\alpha$ - und p63-regulierter Zytokine in NFK.. ....	101
Abbildung 39. Überrepräsentationsanalyse von HPV8 E6-regulierten Genen. ....	102
Abbildung 40. Überrepräsentationsanalyse von potenziell durch HPV8 E6-C/EBP $\alpha$ -p63-induzierten Genen. ....	103
Abbildung 41. HPV8 E6-regulierte miRNAs unter Beteiligung des C/EBP $\alpha$ -p63-Signalwegs. ....	105
Abbildung 42. Molekularer Mechanismus der HPV8 E6-abhängigen CCL2 Induktion. ....	115
Abbildung 43. Modell der CCL2-abhängigen Rekrutierung von Makrophagen durch HPV8 E6 bei EV-Patienten. ....	119
Abbildung 44. Transfektionseffizienz von HaCaT pLXSN und 8E6 Zellen. ....	126
Abbildung 45. Funktionalität des SGK2 Antikörpers.....	127

Abbildung 46. Verifizierung des 8E6-C/EBP $\alpha$ -p63 Signalwegs in Ansätzen die im mRNA- und miRNA-Microarray analysiert wurden. ....	127
Abbildung 47. Gene die potenziell über den 8E6-C/EBP $\alpha$ -p63-Signalweg reprimiert werden. ....	132

### 6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Verwendete Primer für die qRT-PCR. ....	31
Tabelle 2. Verwendete Antikörper.. ....	32
Tabelle 3. Verwendete Enzyme und Puffer. ....	33
Tabelle 4. Verwendete Inhibitoren.....	34
Tabelle 5. Verwendete Kits.....	34
Tabelle 6. Übersicht der Anzahl ausgesäter Zellen.....	43
Tabelle 7. Potenzielle $\Delta$ Np63 $\alpha$ Bindestellen im CCL2 Promotor. ....	87
Tabelle 8. HPV8 E6-regulierte miRNAs.....	104
Tabelle 9. Zytokine aus dem Multiplex-Immuno-Assay.....	126
Tabelle 10. HPV8 E6-regulierte Gene. ....	128
Tabelle 11. Gene die von HPV8 E6 potenziell über den C/EBP $\alpha$ -p63-Signalweg reguliert werden.. ....	132

## 6.4 Literaturverzeichnis

- Acquaviva J, Wong R, Charest A (2009): The multifaceted roles of the receptor tyrosine kinase ROS in development and cancer. *Biochim. Biophys Acta*. 1795(1):37-52.
- Akgül B, García-Escudero R, Ghali L, Pfister H, Fuchs P, Navsaria H, Storey A (2005a): The E7 Protein of Cutaneous Human Papillomavirus Type 8 Causes Invasion of Human Keratinocytes into the Dermis in Organotypic Cultures of Skin. *Cancer Res*. 65(6):2216-23.
- Akgül B, Lemme W, Garcia-Escudero R, Storey A, Pfister H. (2005b): UV-B irradiation stimulates the promoter activity of the high-risk, cutaneous human papillomavirus 5 and 8 in primary keratinocytes. *Arch. Virol*. 150, 145–151.
- Akira S, Isshiki H, Tanabe O, Kinoshita S, Nishio Y, Nakajima T, Hirano T, Kishimoto T (1990): A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *EMBO J*. 9(6): 1897–1906.
- Antonsson A, Forslund O, Ekberg H, Sterner G, Hansson B (2000): The ubiquity and impressive genomic diversity of human skin papillomaviruses suggest a commensalic nature of these viruses. *J. Virol*. 74:11636–41.
- Antonsson A, Karanfilovska S, Lindqvist PG, Hansson BG (2003): General acquisition of human papillomavirus infections of skin occurs in early infancy. *J. Clin. Microbiol*. 41(6):2509-14. doi: 10.1128/jcm.41.6.2509-2514.2003.
- Arcidiacono P, Webb C, Brooke M, Zhou H, Delaney P, Ng K, Blaydon D, Tinker A, Kelsell D, Chikh A (2018): p63 is a key regulator of iRHOM2 signalling in the keratinocyte stress response. *Nat. Commun*. 9(1):1021.
- Ardito F, Giuliani M, Perrone D, Troiano G, Lo Muzio L (2017): The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). *Int. J. Mol. Med*. 40(2):271-280.
- Arias-Pulido H, Peyton C, Joste N, Vargas H, Wheeler C (2006): Human Papillomavirus Type 16 Integration in Cervical Carcinoma In Situ and in Invasive Cervical Cancer. *J. Clin. Microbiol*. 44(5): 1755–1762.
- Arron S Ruby J, Dybbro E, Ganem D, DeRisi J (2011): Transcriptome sequencing demonstrates that human papillomavirus is not active in cutaneous squamous cell carcinoma. *J. Invest. Dermatol*. 131:1745–1753.
- Baggiolini M (1998): Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*. 392(6676):565-8.
- Baldwin A, Grueneberg D, Hellner K, Sawyer J, Grace M, Li W, Harlow E, Munger K (2010): Kinase requirements in human cells: V. Synthetic lethal interactions between p53 and the protein kinases SGK2 and PAK3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 107(28): 12463–12468.
- Bandolin L, Borsetto D, Fussey J, da Mosto M, Nicolai P, Menegaldo A, Calabrese L, Tommasino M, Boscolo-Rizzo P (2020): Beta human papillomaviruses infection and skin carcinogenesis. *Rev. Med. Virol*. 30(4):e2104.

- Barron L, Wynn T (2011): Fibrosis is regulated by Th2 and Th17 responses and by dynamic interactions between fibroblasts and macrophages. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 300(5): G723–G728.
- Belich M, Salmerón A, Johnston L, Ley S (1999): TPL-2 kinase regulates the proteolysis of the NF-kappaB-inhibitory protein NF-kappaB1 p105. *Nature.* 397(6717):363-8.
- Bernhard M, Zwick A, Mohr T, Gasparoni G, Khalmurzaev O, Matveev V, Loertzer P, Prylukhin A, Hartmann A, Geppert C, Loertzer H, Wunderlich H, Naumann C, Kalthoff H, Junker K, Smola S, Lohse S (2021): The HPV and p63 Status in Penile Cancer Are Linked with the Infiltration and Therapeutic Availability of Neutrophils. *Mol. Cancer Ther.* 20(2):423-437.
- Bingle L, Brown N, Lewis C (2002): The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J. Pathol.* 196(3):254-65.
- Blume-Jensen P, Hunter T (2001): Oncogenic kinase signalling. *Nature.* 411(6835):355-65.
- Bravo I, Alonso A (2004): Mucosal human papillomaviruses encode four different E5 proteins whose chemistry and phylogeny correlate with malignant or benign growth. *J. Virol.* 78(24):13613-26.
- Bonello G, Pham M, Begum K, Sigala J, Sataranatarajan K, Mummidi S (2011): An evolutionarily conserved TNF-alpha-responsive enhancer in the far upstream region of human CCL2 locus influences its gene expression. *J. Immunol.*, 186(12):7025-38.
- Boukamp P, Petrussevska R, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig N (1988): Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell. Biol.* 106(3):761-71.
- Bouvard V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Freeman C, Galichet L, Coglianò V WHO IARC Group (2009): A review of human carcinogens--Part B: biological agents. *Lancet Oncol.* 10(4):321-2.
- Boxman I, Berkhout R, Mulder L, Wolkers M, Bouwes Bavinck J, Vermeer B, ter Scheggett J (1997): Detection of human papillomavirus DNA in plucked hairs from renal transplant recipients and healthy volunteers. *J. Invest. Dermatol.* 108:712–5.
- Cassetta L, Pollard J (2018): Targeting macrophages: therapeutic approaches in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* 17(12):887-904.
- Chatterjee A, Upadhyay S, Chang X, Nagpal J, Trink B, Sidransky D (2008): U-box-type ubiquitin E4 ligase, UFD2a attenuates cisplatin mediated degradation of DeltaNp63alpha. *Cell Cycle.* 7(9):1231-7.
- Chinery R, Brockman J, Dransfield D, Coffey R (1997): Antioxidant-induced nuclear translocation of CCAAT/enhancer-binding protein beta. A critical role for protein kinase A-mediated phosphorylation of Ser299. *J. Biol. Chem.* 272(48):30356-61.

- Christian F, Smith E, Carmody R (2016): The Regulation of NF- $\kappa$ B Subunits by Phosphorylation. *Cells*. 5(1): 12.
- Christofides A, Strauss L, Yeo A, Cao C, Charest A, Boussiotis V (2022): The complex role of tumor-infiltrating macrophages. *Nature Immunol*. 23(8):1148-1156.
- Conway S, Meyers C (2009): Replication and Assembly of Human Papillomaviruses. *J. Dent. Res.* 88(4): 307–317.
- Dacus D, Wallace N (2021): Beta-Genus Human Papillomavirus 8 E6 Destabilizes the Host Genome by Promoting p300 Degradation. *Viruses*. 13(8):1662.
- Day P, Schelhaas M (2014): Concepts of papillomavirus entry into host cells. *Curr. Opin. Virol.* 0: 24–31.
- da Cruz Silva L, de Oliveira W, Sotto M (2019): Epidermodysplasia verruciformis: revision of a model of carcinogenic disease. *Surg. Exp. Pathol.* 2, 20.
- deCastro A, Dunphy K, Hutchinson J, Balboni A, Cherukuri P, Jerry D, diRenzo J (2013): MiR203 mediates subversion of stem cell properties during mammary epithelial differentiation via repression of  $\Delta$ NP63 $\alpha$  and promotes mesenchymal-to-epithelial transition. *Cell Death Dis.* 4(2): e514.
- de Andrea M, Mondini M, Azzimonti B, Dell'Oste V, Germano S, Gaudino G, Musso T, Landolfo S, Gariglio M (2007): Alpha- and betapapillomavirus E6/E7 genes differentially modulate pro-inflammatory gene expression. *Virus Res.* 124(1-2):220-5.
- S, Créquer A, Matos I et al. (2018a): The human CIB1–EVER1–EVER2 complex governs keratinocyte-intrinsic immunity to  $\beta$ -papillomaviruses. *J. Exp. Med.* 215(9): 2289–2310.
- de Jong S, Imahorn E, Itin P, Uitto J, Orth G, Jouanguy E, Casanova J, Burger B (2018b): Epidermodysplasia Verruciformis: Inborn Errors of Immunity to Human Beta-Papillomaviruses. *Front. Microbiol.* 9:1222.
- de Koning M, Struijk L, Bavinck J, Kleter B, ter Schegget J, Quint W, Feltkamp M (2007): Betapapillomaviruses frequently persist in the skin of healthy individuals. *J. Gen. Virol.* 88:1489–1495.
- de Oliveira W, da Cruz Silva L, Neto C, Tying S (2015): Deleterious Effect of Radiation Therapy on Epidermodysplasia Verruciformis Patients. *J. Cutan. Med. Surg.* (4):416-21.
- Deyoung M, Ellisen L (2007): p63 and p73 in human cancer: defining the network. *Oncogene*. 26(36):5169-83.
- Doorbar J (2005): The papillomavirus life cycle. *J. Clin. Virol.* 1:S7-15.
- Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo I, Stoler M, Broker T, Stanley M (2012): The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*. 30 Suppl 5:F55-70.

- Du J, Romano R, Si H, Mattox A, Bian Y, Yang X, Sinha S, Van Waes C, Chen Z (2014): Epidermal overexpression of transgenic  $\Delta$ Np63 promotes type 2 immune and myeloid inflammatory responses and hyperplasia via NF- $\kappa$ B activation. *J. Pathol.* 232(3):356-68.
- Egawa N., Egawa K., Griffin H. und Doorbar J. (2015): Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. *Viruses.* 7(7): 3863–3890.
- Ehrhardt C, Rückle A, ..., Ludwig S (2013): The NF- $\kappa$ B inhibitor SC75741 efficiently blocks influenza virus propagation and confers a high barrier for development of viral resistance. *Cell Microbiol.* 15(7):1198-211.
- el-Deiry W, Kern S, Pietenpol J, Kinzler K, Vogelstein B (1992): Definition of a consensus binding site for p53. *Nat. Genet.* 1(1):45-9.
- Emsen I, Kabalar M (2010): Epidermodysplasia verruciformis: An early and unusual presentation. *Can. J. Plast. Surg.* 18(1): 21–24.
- Engh R, Girod A, Kinzel V, Huber R, Bossemeyer D (1996): Crystal structures of catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in complex with isoquinolinesulfonyl protein kinase inhibitors H7, H8, and H89. Structural implications for selectivity. *J. Biol. Chem.* 271(42):26157-64.
- Ezegbunam W, Foronjy R (2018): Posttranscriptional control of airway inflammation. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.* 9(1).
- Frezza V, Fierro C, Gatti E, Peschiaroli A, Lena A, Petruzzelli M, Candi E, Anemona L, Mauriello A, Pelicci P, Melino G, Bernassola F (2018):  $\Delta$ Np63 promotes IGF1 signalling through IRS1 in squamous cell carcinoma. *Aging (Albany NY).* 10(12): 4224–4240.
- George D, Salmeron A (2009): Cot/Tpl-2 protein kinase as a target for the treatment of inflammatory disease. *Curr. Top. Med. Chem.* 9(7):611-22.
- Gerstner N, Kehl T, Lenhof K, Müller A, Mayer C, Eckhart L, Grammes N, Diener C, Hart M, Walter J, Wyss-Coray T, Meese E, Keller A, Lenhof HP (2020): GeneTrail 3: advanced high-throughput enrichment analysis. *Nucleic Acids Res.* 48(W1):W515-W520.
- Gery S, Tanosaki S, Bose S, Bose N, Vadgama J, Koeffler P (2005): Down-regulation and growth inhibitory role of C/EBP $\alpha$  in breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 11, 3184–3190.
- Ghioni P, Bolognese F, Duijf PH, Van Bokhoven H, Mantovani R, Guerrini L (2002): Complex transcriptional effects of p63 isoforms: identification of novel activation and repression domains. *Mol. Cell. Biol.* 22:8659–8668.
- Gordon S, Taylor P (2005): Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Rev. Immunol.* 5:953–964.
- Grandjean-Laquerriere A, Le Naour R, Gangloff C, Guenounou M (2003): Differential regulation of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-10 in UVB-irradiated human keratinocytes via cyclic AMP/protein kinase A pathway. *Cytokine.* 23(4-5):138-49.

- Gu L, Tseng S, Horner R, Tam C, Loda M, Rollins B (2000): Control of TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. *Nature*. 404(6776):407-11.
- Guan P, Howell-Jones R, Li N, Bruni L, de Sanjosé S, Franceschi S, Clifford G (2012): Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: A meta-analysis from cervical infection to cancer. *Int. J. Cancer*. 131(10):2349-59.
- Gschwandtner M, Derler R, Midwood K (2019): More Than Just Attractive: How CCL2 Influences Myeloid Cell Behavior Beyond Chemotaxis. *Front. Immunol.* 10: 2759.
- Hacke K, Rincon-Orozco B, Buchwalter G, Siehler S, Wasyluk B, Wiesmüller L, Rösl F (2010): Regulation of MCP-1 chemokine transcription by p53. *Mol. Cancer*. 20;9:82.
- Hadaschik D, Hinterkeuser K, Oldak M, Pfister H, Smola-Hess S (2003): The Papillomavirus E2 Protein Binds to and Synergizes with C/EBP Factors Involved in Keratinocyte Differentiation. *J. Virol.*
- Han J, Wu J, Silke J (2020): An overview of mammalian p38 mitogen-activated protein kinases, central regulators of cell stress and receptor signaling. *F1000Res*. 9: F1000 Faculty Rev-653.
- Hanahan D (2022): Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 12(1):31-46.
- Hasan U, Zannetti C, Parroche P, Goutagny N, Malfroy N, Roblot G, Carreira C, Hussain I, Müller M, Taylor-Papadimitriou J, Picard D, Sylla B, Trinchieri G, Medzhitov R, Tommasino M (2013): The Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein induces a transcriptional repressor complex on the Toll-like receptor 9 promoter. *J. Exp. Med.* 210(7): 1369–1387.
- Hernández Borrero L, El-Dieiry W (2021): Tumor Suppressor p53: Biology, Signaling Pathways, and Therapeutic Targeting. *Biochim. Biophys. Acta. Rev. Cancer*. 1876(1): 188556.
- Howley P, Pfister H (2015): Beta genus papillomaviruses and skin cancer. *Virology*. 479-480:290-6. 77(9): 5253–5265.
- Hsu J. Y, Chen AC, Keleher A, McMillan NA, Antonsson A (2009): Shared and persistent asymptomatic cutaneous human papillomavirus infections in healthy skin. *J. Med. Virol.*, 81(8):1444-9.
- Hsueh P (2009): Human papillomavirus, genital warts, and vaccines. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 42(2):101-6.
- Huang W, Ju T, Hung M, Chen C (2007): Phosphorylation of CBP by IKK $\alpha$  Promotes Cell Growth by Switching the Binding Preference of CBP from p53 to NF- $\kappa$ B. *Mol Cell*. 26(1): 75–87.
- Huibregtse J, Scheffner M, Howley P (1993): Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53. *Mol. Cell. Biol.* 13(2): 775–784.



- Jablonska S, Dabrowski J, Jakubowicz K (1972): Epidermodysplasia verruciformis as a model in studies on the role of papovaviruses in oncogenesis. *Cancer Res.* 32 583–589.
- Kern F, Fehlmann T, Solomon J, Schwed L, Grammes N, Backes C, Keuren-Jensen K, Craig D, Meese E, Keller A (2020): miEAA 2.0: integrating multi-species microRNA enrichment analysis and workflow management systems. *Nucleic Acids Res.* (48):W521-W528.
- Kiguchi N, Saika F, Kobayashi Y, Kishioka S (2014): Epigenetic regulation of CC-chemokine ligand 2 in nonresolving inflammation. *Biomol. Concepts.* 5(4):265-73.
- King K, Ponnamperna R, Allen C, Lu H, Duggal P, Chen Z, Van Waes C, Weinberg W (2008): The p53 homologue  $\Delta Np63\alpha$  interacts with the NF- $\kappa$ B pathway to modulate epithelial cell growth. *Cancer Res.* 68(13): 5122–5131.
- Kim I, He Y (2014): Ultraviolet radiation-induced non-melanoma skin cancer: Regulation of DNA damage repair and inflammation. *Genes Dis.* 1(2): 188–198.
- Kleine-Lowinski K, Rheinwald J, Fichorova R, Anderson D, Basile J, Münger K, Daly C, Rösl F, Rollins B (2003): Selective suppression of monocyte chemoattractant protein-1 expression by human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins in human cervical epithelial and epidermal cells. *Int. J. Cancer.* 107(3):407-15.
- Köhler A, Forschner T, Meyer T, Ulrich C, Gottschling M, Stockfleth E, Nindl I (2007): Multifocal distribution of cutaneous human papillomavirus types in hairs from different skin areas. *Br. J. Dermatol.* 156(5):1078-80.
- Korbecki J, Barczak K, Gutowska I, Chlubek D, Beranowska-Bosiacka I (2022): CXCL1: Gene, Promoter, Regulation of Expression, mRNA Stability, Regulation of Activity in the Intercellular Space. *Int. J. Mol. Sci.* 23(2):792.
- Kouwenhoven E, Oti M, Niehues H, van Heeringen S, Schalkwijk J, Stunnenberg H, van Bokhoven H, Zhou H (2015): Transcription factor p63 bookmarks and regulates dynamic enhancers during epidermal differentiation. *EMBO Rep.* 16(7):863-78.
- Lanfredini S, Olivero C, Borgogna C, Calati F, Powell K, Davies K, De Andrea M, Harries S, Tang H, Pfister H, Gariglio M, Patel G (2017): HPV8 Field Cancerization in a Transgenic Mouse Model Is due to Lrig1+ Keratinocyte Stem Cell Expansion. *J. Invest. Dermatol.* 137(10): 2208–2216.
- Lazarczyk M, Cassonnet P, Pons C, Jacob Y, Favre M (2009): The EVER Proteins as a Natural Barrier against Papillomaviruses: a New Insight into the Pathogenesis of Human Papillomavirus Infections. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 73(2): 348–370.
- Lazarczyk, M, Pons C, Mendoza J, Cassonnet P, Jacob Y, Favre M (2008): Regulation of cellular zinc balance as a potential mechanism of EVER-mediated protection against pathogenesis by cutaneous oncogenic human papillomaviruses. *J. Exp. Med.* 205:35–42.
- Lelios I, Stifter S, Cecconi V, Petrova E, Lutz M, Cansever E, Utz S, Becher B, van den Broek M, Greter M (2021): Monocytes promote UV-induced epidermal carcinogenesis. *Eur. J. Immunol.* 51(7):1799-1808.

- Lewandowsky F, Lutz W (1922): Ein Fall einer bisher nicht beschriebenen hautoerkrankung (Epidermodysplasia verruciformis). *Arch. Dermatol. Syphilol.* 141 193–203.
- Lim S, Garzino-Demo A (2000): The human immunodeficiency virus type 1 Tat protein up-regulates the promoter activity of the beta-chemokine monocyte chemoattractant protein 1 in the human astrocytoma cell line U-87 MG: role of SP-1, AP-1, and NF-kappaB consensus sites. *J. Virol.* 74(4):1632-40.
- Livak K, Schmittgen T (2001): Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 25(4):402-8
- Lopez R, Garcia-Silva S, Moore S, Bereshchenko O, Martinez-Cruz A, Ermakova O, Kurz E, Paramio J, Nerlov C (2009): C/EBPalpha and beta couple interfollicular keratinocyte proliferation arrest to commitment and terminal differentiation. *Nat. Cell. Biol.* 11(10):1181-90.
- Lu H, Yang X, Duggal P, Allen C, Yan B, Cohen J, Nottingham L, Romano R, Sinha S, King K, Weinberg W, Chen Z, und Van Waes C (2011): TNF- $\alpha$  promotes c-REL/ $\Delta$ Np63 $\alpha$  interaction and TAp73 dissociation from key genes that mediate growth arrest and apoptosis in head and neck cancer. *Cancer Res.* 71(21): 6867–6877.
- Majewski S, Jablonska S (1997): Skin autografts in epidermodysplasia verruciformis: human papillomavirus-associated cutaneous changes need over 20 years for malignant conversion. *Cancer. Res.* 57:4214–4216.
- Manning G, Whyte D, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S (2002): The protein kinase complement of the human genome. *Science.* 298(5600):1912-34.
- Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F (2008): Cancer-related inflammation. *Nature.* 454(7203):436-44.
- Mantovani A, Allavena P, Marchesi F, Garlanda C (2022): Macrophages as tools and targets in cancer therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 21(11):799-820.
- Mantovani A, Marchesi F, Malesci A, Laghi L, Allavena P (2017): Tumor-Associated Macrophages as Treatment Targets in Oncology. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 14(7): 399–416.
- Marcuzzi G, Hufbauer M, Kasper H, Weissenborn S, Smola S, Pfister H (2009): Spontaneous tumour development in human papillomavirus type 8 E6 transgenic mice and rapid induction by UV-light exposure and wounding. *J. Gen. Virol.* 90(Pt 12):2855-64.
- Marthaler AM, Podgórska M, Feld P, Fingerle A, Knerr-Rupp K, Grässer F, Smola H, Roemer K, Ebert E, Kim YJ, Bohle RM, Müller CSL, Reichrath J, Vogt T, Malejczyk M, Majewski S, Smola S (2017); Identification of C/EBP $\alpha$  as a novel target of the HPV8 E6 protein regulating miR-203 in human keratinocytes. *PLoS Pathog.* 13(6): e1006406.
- Matsushima K, Larsen C, DuBois G, Oppenheim J (1989): Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line. *J. Exp. Med.* 169(4): 1485–1490.

- McLaughlin-Drubin M, Münger K (2008): The Human Papillomavirus Type 8 E2 Gene Encodes a Transforming Activity Sufficient for Skin Tumor Formation in Transgenic Mice. *J. Invest. Dermatol.* 128(9):2142-4.
- Meyers J, Grace M, Uberoi A, Lambert P, Munger K (2018): Inhibition of TGF- $\beta$  and NOTCH Signaling by Cutaneous Papillomaviruses. *Front. Microbiol.* 9: 389.
- Meyers J, Uberoi A, Grace M, Lambert P, Munger K (2017): Cutaneous HPV8 and MmuPV1 E6 Proteins Target the NOTCH and TGF- $\beta$  Tumor Suppressors to Inhibit Differentiation and Sustain Keratinocyte Proliferation. *PLoS Pathog.* 13(1): e1006171.
- Mitchell L, Hansen R, Beaupre A, Gustafson D, Dow S (2012): Optimized dosing of a CCR2 antagonist for amplification of vaccine immunity. *Int. Immunopharmacol.* 15(2).
- Moses M George A, Sakakibara N, Mahmood K, Ponnampersuma R, King K, Weinberg W (2019): Molecular Mechanisms of p63-Mediated Squamous Cancer Pathogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 20(14): 3590.
- Müller M, Jacob Y, Jones I, Weiss A, Brino L, Chantier T, Lotteau V, Favre M, Demeret C (2012): Large scale genotype comparison of human papillomavirus E2-host interaction networks provides new insights for e2 molecular functions *PLoS Pathog.* 8(6): e1002761.
- Muñoz N, Bosch X, de Sanjosé S et al. (2003): Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *N. Engl. J. Med.* 348(6):518-27.
- Murray P, Wynn T (2012): Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.* 11(11): 723–737.
- Myers D, Kwan E, Fillman E (2022): Epidermodysplasia Verruciformis. [Updated 2022 Sep 12]. *StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls.*
- Nakatsumi H, Matsumoto M, Nakayama K (2017): Noncanonical Pathway for Regulation of CCL2 Expression by an mTORC1-FOXK1 Axis Promotes Recruitment of Tumor-Associated Macrophages. *Cell Rep.* 21(9):2471-2486.
- Newton A, Bootman M, Scott J (2016): Second Messenger. *Cold. Spring. Harb. Perspect. Biol.* 8(8): a005926.
- Oldak M, Tolzmann L, Wnorowski A, Podgórska M, Silling S, Lin R, Hiscott J, Müller C, Vogt T, Smola H, Smola S (2011): Differential Regulation of Human Papillomavirus Type 8 by Interferon Regulatory Factors 3 and 7. *J. Virol.* 85(1): 178–188.
- Orth G (1986): Epidermodysplasia verruciformis: a model for understanding the oncogenicity of human papillomaviruses. *Ciba. Found. Symp.* 120:157-74.
- Orth G (2006): Genetics of epidermodysplasia verruciformis: Insights into host defense against papillomaviruses. *Semin. Immunol.* 18 362–374.
- Orth G (2008): Host defenses against human papillomaviruses: lessons from epidermodysplasia verruciformis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 321:59-83.

- Orth G, Jablonska S, Favre M, Croissant O, Jarzabek-Chorzelska M, Rzeska G (1978): Characterization of two types of human papillomaviruses in lesions of epidermodysplasia verruciformis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 75(3):1537-41.
- Osterburg C. und Dötsch V. (2022): Structural diversity of p63 and p73 isoforms. *Cell. Death Differ.* 29(5): 921–937.
- Pabst T, Mueller B, Zhang P, Radomska H, Narravula S, Schnittger S, Behre G, Hiddemann W, Tenen D (2001): Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia. *Nat. Genet.* 27:263–270.
- Pacini L, Savini C, Ghittoni R, Saidj D, Lamartine J, Hasan U, Accardi R, Tommasino M (2015): Downregulation of Toll-Like Receptor 9 Expression by Beta Human Papillomavirus 38 and Implications for Cell Cycle Control. *J. Virol.* 89(22): 11396–11405.
- Padlewska K, Ramoz N, Cassonnet P, Riou G, Barrois M, Majewski S, Croissant O, Jablonska S, Orth G (2001): Mutation and abnormal expression of the p53 gene in the viral skin carcinogenesis of epidermodysplasia verruciformis. *J. Invest. Dermatol.* 117(4):935-42.
- Palomo J, Dietrich D, Martin P, Palmer G, Gabay C (2015): The interleukin (IL)-1 cytokine family – Balance between agonists and antagonists in inflammatory diseases. *Cytokine.* 76(1):25-37.
- Perez C, Pietenpol J (2007): Transcriptional programs regulated by p63 in normal epithelium and tumors. *Cell Cycle.* 6(3):246-54.
- Pfefferle R, Marcuzzi G, Akgül B, Kasper H, Schulze F, Haase I, Wickenhauser C, Pfister H (2008): The human papillomavirus type 8 E2 protein induces skin tumors in transgenic mice. *J. Invest. Dermatol.* 128(9):2310-5.
- Pfister H (2003): Chapter 8: Human papillomavirus and skin cancer. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* (31):52-6.
- Podgórska M, Oldak M, Marthaler A, Fingerle A, Walch-Rückheim B, Lohse S, Müller C, Vogt T, Ustav M, Wnorowski A, Malejczyk M, Majewski S, Smola S (2018): Chronic Inflammatory Microenvironment in Epidermodysplasia Verruciformis Skin Lesions: Role of the Synergism Between HPV8 E2 and C/EBP $\beta$  to Induce Pro-Inflammatory S100A8/A9 Proteins. *Front. Microbiol.* 9: 392.
- Pokorná Z, Vysloužil J, Hrabal V, Vojtěšek B, Coates P (2021): The foggy world(s) of p63 isoform regulation in normal cells and cancer. *J. Pathol.* 254(4):454-473.
- Pollard J (2004): Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat. Rev. Cancer.* 4(1):71-8.
- Raman M, Chen W, Cobb M (2007): Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene.* 26(22):3100-12.
- Ramji D, Foka, P (2002): CCAAT/enhancer-binding proteins: Structure, function and regulation. *Biochem. J.* 365, 561–575.

- Ridiandries A, Tan J, Bursill C (2018): The Role of Chemokines in Wound Healing. *Int. J. Mol. Sci.* 19(10): 3217.
- Rizzo J, Oyelakin A, Min S, Smalley K, Bard J, Luo W, Nyquist J, Guttman-Yassky E, Yoshida T, De Benedetto A, Beck L, Sinha S, Romano R (2016):  $\Delta$ Np63 regulates IL-33 and IL-31 signaling in atopic dermatitis. *Cell Death Differ.* 23(6):1073-85.
- Rogic A, Pant I, Grumolato L, Fernandez-Rodriguez R, Edwards A, Das S, Sun A, Yao S, Qiao R, Jaffer S, Sachidanandam R, Akturk G, Karlic R, Skobe M, Aaronson S (2021): High endogenous CCL2 expression promotes the aggressive phenotype of human inflammatory breast cancer. *Nat. Commun.* 12(1):6889.
- Rollison D, Viarisio D, Amorrortu R, Gheit T, Tommasino M (2019): An Emerging Issue in Oncogenic Virology: the Role of Beta Human Papillomavirus Types in the Development of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *J. Virol.* 93(7):e01003-18.
- Römer K (2012): Notch and the p53 clan of transcription factors. *Adv. Exp. Med. Biol.* 727:223-40.
- Roskoski R (2015): A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors. *Pharmacol Res.* 100:1-23.
- Sabio G, Davis R (2014): TNF and MAP kinase signaling pathways. *Semin. Immunol.* 26(3): 237–245.
- Sapp M, Fligge C, Petzak I, Harris J, Streeck R (1998). Papillomavirus assembly requires trimerization of the major capsid protein by disulfides between two highly conserved cysteines. *J. Virol.* 72:6186-6189.
- Schaper I, Marcuzzi G, Weissenborn S, Kasper H, Dries V, Smyth N, Fuchs P, Pfister H (2005): Development of skin tumors in mice transgenic for early genes of human papillomavirus type 8. *Cancer. Res.* 65(4):1394-400.
- Schmitt A, Harry J, Rapp B, Wettstein F, Iftner T (1994): Comparison of the properties of the E6 and E7 genes of low- and high-risk cutaneous papillomaviruses reveals strongly transforming and high Rb-binding activity for the E7 protein of the low-risk human papillomavirus type 1. *J. Virol.* 68(11): 7051–7059.
- Schneider A (2015): Das Humane Papillomvirus Typ 8 E6 Protein unterdrückt die miR-203 über die Transkriptionsregulatoren p300 und JunB. Dissertation, Universität des Saarlandes.
- Schröer N, Pahne J, Walch B, Wickenhauser C, Smola S (2011): Molecular pathobiology of human cervical high-grade lesions: paracrine STAT3 activation in tumor-instructed myeloid cells drives local MMP-9 expression. *Cancer Res.* 71(1):87-97.
- Scoumanne A, Harms K, Chen X (2005): Structural basis for gene activation by p53 family members. *Cancer Biol. Ther.* 4(11):1178-85.

- Shim M, Powers K, Ewing S, Zhu S, Smart R (2005): Diminished expression of C/EBP $\alpha$  in skin carcinomas is linked to oncogenic Ras and reexpression of C/EBP $\alpha$  in carcinoma cells inhibits proliferation. *Cancer Res.* 65:861–867
- Singh R, Berry K, Matsushima K, Yasumoto K, Fidler I (1993): Synergism between human monocyte chemotactic and activating factor and bacterial products for activation of tumoricidal properties in murine macrophages. *J. Immunol.* 151(5):2786-93.
- Singh S, Anshita D, Ravichandiran V (2021): MCP-1: Function, regulation, and involvement in disease. *Int. Immunopharmacol.* 101: 107598.
- Skalhegg B, Tasken K (2000): Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Front. Biosci.* 5:D678-93.
- Smola S (2019): Immune deviation and cervical carcinogenesis. *Papillomavirus Res.* 7:164-167.
- Smola S (2020): Human Papillomaviruses and Skin Cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1268:195-209.
- Smola S, Trimble C, Stern P (2017): Human papillomavirus-driven immune deviation: challenge and novel opportunity for immunotherapy. *Ther. Adv. Vaccines.* 5(3):69-82.
- Smola-Hess S, Pahne J, Mauch C, Zigrino P, Smola H, Pfister H (2005): Expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase in papillomavirus-positive cells: role of the human papillomavirus (HPV) 16 and HPV8 E7 gene products. *J. Gen. Virol.* 86(Pt 5):1291-1296.
- Sperling T (2009): Einfluss des humanen Papillomvirus 8 auf die Immunhomöostase der Haut. Dissertation. Universität zu Köln.
- Sperling T, Oldak M, Walch-Rückheim B, Wickenhauser C, Doorbar J, Pfister H, Malejczyk M, Majewski S, Keates AC, Smola S (2012): Human Papillomavirus Type 8 Interferes with a Novel C/EBP $\beta$ -Mediated Mechanism of Keratinocyte CCL20 Chemokine Expression and Langerhans Cell Migration. *PLoS. Pathog.* 8(7): e1002833.
- Ständige Impfkommission (STIKO) am Robert-Koch-Institut (RKI) (2018): Wissenschaftliche Begründung für die Empfehlung der HPV-Impfung für Jungen im Alter von 9 bis 14 Jahren. *Epidemiologisches Bulletin.* 26/2018.
- Steinberg R, Cauthron R, Symcox M, Shuntoh H (1993): Autoactivation of catalytic (C  $\alpha$ ) subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase by phosphorylation of threonine 197. *J. Biol. Chem.* 268(13): 2332–2341.
- Stephens J, Pekala P (1991): Transcriptional repression of the GLUT4 and C/EBP genes in 3T3-L1 adipocytes by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* 266(32):21839-45.
- Stout R, Jiang C, Matta B, Tietzel I, Watkins S, Suttles J (2005): Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J. Immunol.* 175(1):342-9.

- Tampa M, Mitran C, Mitran M, Nicolae I, Dumitru A, Matei C, Manolescu L, Popa G, Caruntu C, Georgescu S (2020): The Role of Beta HPV Types and HPV-Associated Inflammatory Processes in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *J. Immunol. Res.* 2020: 5701639.
- Tolomeo M, Grimaudo S (2020): The “Janus” Role of C/EBPs Family Members in Cancer Progression. *Int. J. Mol. Sci.* 21(12): 4308.
- Torgersen K, Vang T, Abrahamsen H, Yaqub S, Taskén K (2002): Molecular mechanisms for protein kinase A-mediated modulation of immune function. *Cell Signal.* 14(1):1-9.
- Ueda A, Okuda K, Ohno S, Shirai A, Igarashi T, Matsunaga K, Fukushima J, Kawamoto S, Ishigatsubo Y, Okubo T (1994): NF-kappa B and Sp1 regulate transcription of the human monocyte chemoattractant protein-1 gene. *J. Immunol.* 153(5):2052-63.
- Underbrink M, Howie H, Bedard K, Koop J, Galloway D (2008): E6 Proteins from Multiple Human Betapapillomavirus Types Degrade Bak and Protect Keratinocytes from Apoptosis after UVB Irradiation. *J. Virol.* 82(21): 10408–10417.
- Valente A, Xie J, Abramova M, Wenzel U, Abboud H, Graves D (1998): A complex element regulates IFN-gamma-stimulated monocyte chemoattractant protein-1 gene transcription. *J. Immunol.* 161(7):3719-28.
- Van Doorslaer K, Li Z, Xirasagar S, Maes P, Kaminsky D, Liou D, Sun Q, Kaur R, Huyen Y, McBride A (2017): The Papillomavirus Episteme: a major update to the papillomavirus sequence database. *Nucleic. Acids. Res.* 45:D499–D506.
- Vella L (2019): Mechanismen der HPV8-vermittelten Regulation von CCL2 in humanen Keratinozyten und die Rolle von C/EBPα. Masterarbeit, Universität des Saarlandes.
- Ventura J, Kennedy N, Lamb J, Flavell R, Roger D (2003): c-Jun NH2-Terminal Kinase Is Essential for the Regulation of AP-1 by Tumor Necrosis Factor. *Mol Cell Biol.* 23(8): 2871–2882.
- Venuti A, Lohse S, Tommasino M, Smola S (2019): Cross-talk of cutaneous beta human papillomaviruses and the immune system: determinants of disease penetrance. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 374(1773): 20180287.
- Venuti A, Paolini F, Nasir L, Corteggio A, Roperto S, Campo M, Borzacchiello G (2011): Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. *Mol. Cancer.* 10:140.
- Walboomers J, Jacobs M, Manos M, Bosch F, Kummer J, Shah K, Snijders P, Peto J, Meijer C, Muñoz N (1999): Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.* 189(1):12-9.
- Walch-Rückheim B, Mavrova R, Henning M, Vicinus B, Kim Y, Bohle R, Juhasz-Böss, Solomayer E, Smola S (2015): Stromal Fibroblasts Induce CCL20 through IL6/C/EBPβ to Support the Recruitment of Th17 Cells during Cervical Cancer Progression. *Cancer Res.* 75(24):5248-59.

- Wang J, Roden R (2013): L2, the minor capsid protein of papillomavirus. *Virology*. 445(0): 175–186.
- Watanabe H, Ma Q, Peng S, Adelmant G, Swain D, Song W, Fox C, Francis J, Pedamallu C, DeLuca D, Brooks A, Wang S, Que J, Rustgi A, Wong K, Ligon K, Liu XS, Marto J, Meyerson M, Bass A (2014): SOX2 and p63 colocalize at genetic loci in squamous cell carcinomas. *J. Clin. Invest.* 124(4):1636-45.
- Weissenborn SJ, de Koning MN, Wieland U, Quint WG, Pfister HJ (2009): Intrafamilial transmission and family-specific spectra of cutaneous betapapillomaviruses. *J. Virol.* (2):811-6.
- Weissenborn S, Nindl I, Purdie K, Harwood C, Proby C, Breuer J, Majewski S, Pfister H, Wieland U (2005): Human papillomavirus-DNA loads in actinic keratoses exceed those in non-melanoma skin cancers. *J. Invest. Dermatol.* 125:93–97.
- Westfall M, Mays D, Sniezek J, Pietenpol J (2003): The  $\Delta Np63\alpha$  Phosphoprotein Binds the p21 and 14-3-3 $\sigma$  Promoters In Vivo and Has Transcriptional Repressor Activity That Is Reduced by Hay-Wells Syndrome-Derived Mutations. *Mol. Cell. Biol.* 23(7): 2264–2276.
- Whitmarsh A (2010): A central role for p38 MAPK in the early transcriptional response to stress. *BMC Biol.* 8:47
- Wolfsberger J, Sakil H, Zhou L, van Bree N, Baldisseri E, de Souza Ferreira A, Zubillaga V, Stantic M, Fritz N, Hartman J, Rolny C, Wilhelm M (2021): TAp73 represses NF- $\kappa$ B-mediated recruitment of tumor-associated macrophages in breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 118(10): e2017089118.
- Yang A, Kaghad M, Yang Y, Gillett E, Fleming M, Dötsch V, Andrews N, Caput D, McKeon F (1998): p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol. Cell.* 2(3):305-16.
- Yang X, Lu H, Yan B, Romano R, Bian Y, Friedman J, Duggal P, Allen C, Chuang R, Ehsanian R, et al. (2011): DeltaNp63 versatily regulates a Broad NF-kappaB gene program and promotes squamous epithelial proliferation, migration, and inflammation. *Cancer Res.* 71:3688–3700.
- Yang Z, Guo Z, Dong J, Sheng S, Wang Y, Yu L, Wang H, Tang L (2018): miR-374a Regulates Inflammatory Response in Diabetic Nephropathy by Targeting MCP-1 Expression. *Front Pharmacol.* 9: 900.
- Yin M, Yang S, Lin H, Lane M, Chatterjee S, Diehl A (1996): Tumor necrosis factor alpha promotes nuclear localization of cytokine-inducible CCAAT/enhancer binding protein isoforms in hepatocytes. *J Biol Chem.*, 271(30):17974-8.
- Yoon K, Smart R (2004): C/EBPalpha is a DNA damage-inducible p53-regulated mediator of the G1 checkpoint in keratinocytes. *Mol Cell Biol.* 24(24):10650-60.
- Yoshimura T (2018): The chemokine MCP-1 (CCL2) in the host interaction with cancer: a foe or ally? *Cell. Mol. Immunol.* 15(4):335-345.



- Yu L, Majerciak V, Zheng Z (2022): HPV16 and HPV18 Genome Structure, Expression, and Post-Transcriptional Regulation. *Int. J. Mol. Sci.* 23(9):4943.
- Zhang G, Kong Q, Wang J, jiang Y, Hua H (2020): Complex roles of cAMP–PKA–CREB signaling in cancer. *Exp. Hematol. Oncol.* 9: 32.
- Zhang L, Duan C, Binkley C, Li G, Uhler M, Logsdon C, Simeone D (2004): A transforming growth factor beta-induced Smad3/Smad4 complex directly activates protein kinase A. *Mol Cell Biol.* 24(5):2169-80.
- Zheng K, Egawa N, Shiraz A, Katakuse M, Okamura M, Griffin H, Doorbar J (2022): The Reservoir of Persistent Human Papillomavirus Infection; Strategies for Elimination Using Anti-Viral Therapies. *Viruses.* 14(2):214.
- Zhong H, SuYang H, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Ghosh S (1997): The transcriptional activity of NF-kappaB is regulated by the IkappaB-associated PKAc subunit through a cyclic AMP-independent mechanism. *Cell.* 89(3):413-24.
- zur Hausen H (2009): Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology.* 384(2):260-5.

## 7 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei Frau Prof. Dr. Sigrun Smola für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die Betreuung meines Projektes bedanken, für das ich mich von Beginn an begeistert habe. Danke auch dafür, dass Sie mir das wissenschaftliche Arbeiten und Denken näher gebracht haben.

Ein weiterer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Klaus Römer für die Erstellung des Erstgutachtens dieser Arbeit.

Vielen Dank an Dr. Nicole Ludwig von der Nachwuchsgruppe Humangenetik für die Durchführung der micro-Arrays und die freundliche Einführung in die Thematik. In diesem Sinne geht auch ein Dank an Viktoria Wagner von der klinischen Bioinformatik für das Anleiten bei der Auswertung der micro-Arrays. Bei Janine Becker von der experimentellen Chirurgie bedanke ich mich für das Einbetten der 3D-Kulturen.

Außerdem möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Instituts für Virologie, einschließlich Diagnostik, für die schönen und aufregenden Jahre bedanken, die mir stets in Erinnerung bleiben werden. Ein besonderer Dank geht dabei an Dr. Stefan Lohse für die zahlreichen Diskussionen bezüglich meines Projekts und die Unterstützung in jeder Hinsicht! Danke auch an Barbara Best und Katrin Thieser für die stetige Hilfe im Laboralltag. Insbesondere danke ich Phillip Lapp für seine sehr hilfreiche Assistenz und Unterstützung bei meinen letzten Experimenten. Ich möchte mich auch bei Dr. Anna Sternjakob-Marthaler, Dr. Lise Lauterbach-Rivière, Dr. Julia Vicari, Anabel Zwick, Katharina Schmitt, Julia Gallinger und Islam Mohamed, sowie den ehemaligen Mitarbeitern Michael Döring, Katharina Denk und Dr. Markus Vogelgesang für das gute Arbeitsklima und die schöne Zeit bedanken. Vor allem danke an die Kollegen aus dem Büro, dass ich viele lustige, aber manchmal auch verzweifelte Momente mit euch teilen durfte. Vielen Dank auch an Prof. Dr. Friedrich Grässer und vor allem Priv.-Doz. Dr. Barbara Walch-Rückheim und Tanja Tänzer, die immer ein offenes Ohr hatten und mir stets zur Seite standen.

Abschließend möchte ich meinen Eltern Giuseppe (Pino) Vella und Myriam Vella, meinem Bruder David Vella, meiner restlichen Familie und meinen Freunden, die mich auf meinem Werdegang immer motiviert und unterstützt haben, meinen größten Dank aussprechen.

Herzlichen Dank!

## 8 Lebenslauf und Publikationen

Name	Luca Giuseppe Vella
Geburtsdatum	30.04.1995
Geburtsort	Saarlouis

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

### Publikationen

German federal-state-wide seroprevalence study of 1st SARS-CoV-2 pandemic wave shows importance of long-term antibody test performance.

Lohse S, Sternjakob-Marthaler A, Lagemann P, Schöpe J, Rissland J, Seiwert N, Pfuhl T, Müllendorff A, Kiefer LS, Vogelgesang M, Vella L, Denk K, Vicari J, Zwick A, Lang I, Weber G, Geisel J, Rech J, Schnabel B, Hauptmann G, Holleczeck B, Scheiblaue H, Wagenpfeil S, Smola S

Communications Medicine (2022), 2:52

The human papillomavirus type 8 protein E6 supports the chronic inflammatory microenvironment in Epidermodysplasia Verruciformis skin lesions by a CEBP $\alpha$ -p63-CCL2-monocyte dependent mechanism. Vella L, Sternjakob-Marthaler A, Lohse S, Fingerle A, Sperling T, Stöckle M, Malejczyk M<sup>†</sup>, Majewski S, Smola S

Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, in Vorbereitung.