

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

**Das Humane Papillomvirus Typ 8 E6 Protein
unterdrückt die miR-203 über die
Transkriptionsregulatoren p300 und JunB**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der Medizinischen Fakultät der
UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

April 2015

vorgelegt von
Anna Martha Schneider

Geb. am 30.06.1984 in Ochsenfurt

Die experimentellen Arbeiten im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden am Institut für Virologie des Universitätsklinikum des Saarlandes in Homburg/Saar durchgeführt.

Dekan der medizinischen Fakultät:

Herr Prof. Dr. Michael Menger

Erstgutachterin:

Frau Prof. Dr. Sigrun Smola

Zweitgutachter:

Herr Prof. Dr. Klaus Römer

INHALTSVERZEICHNIS

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	SUMMARY.....	2
3	EINLEITUNG	3
3.1	Aufbau und Entwicklung der Haut.....	3
3.2	Humane Papillomviren (HPV)	5
3.2.1	Aufbau und Genom von Papillomviren	6
3.2.2	Replikationszyklus	7
3.2.3	Die frühen Proteine E6 und E7 mukosaler und kutaner HPV-Typen	9
3.2.4	HPV8-assoziierte Krankheiten: Epidermodysplasia verruciformis	13
3.3	p63, ein Mitglied der p53-Tumorsuppressorfamilie	16
3.3.1	Struktur und Familie.....	16
3.3.2	p63 als Masterregulator in der Epidermis.....	17
3.3.3	p63 und Notch	18
3.3.4	p63 und miR-203	20
3.4	microRNAs	20
3.4.1	Prozessierung und Funktion	20
3.4.2	Regulation von miRNAs.....	21
3.4.3	miR-203 und HPV	22
3.5	Der Transkriptionsregulator p300.....	23
3.6	AP-1 Signalweg.....	23
3.7	Ziele der Doktorarbeit.....	25
4	MATERIAL UND METHODEN.....	26
4.1	Material.....	26
4.1.1	Eukaryontische Zelllinien	26
4.1.2	Bakterienstämme.....	26
4.1.3	Kulturmedien und Reagenzien für die Zellkultur.....	26
4.1.3.1	Medien und Zusätze.....	26
4.1.3.2	Reagenzien für Transfektion	28
4.1.4	Plasmide	28
4.1.4.1	Expressionsplasmide	28
4.1.4.2	Luziferase-Konstrukte	29
4.1.4.3	qRT-PCR Standards	29
4.1.5	Oligonukleotide	29
4.1.5.1	cDNA Synthese	30
4.1.5.2	Realtime PCR	30
4.1.5.3	Klonierung	31
4.1.5.4	Bisulphitsequenzierung	31
4.1.5.5	Electromobility Shift Assay (EMSA)	31
4.1.5.6	Mutagenese PCR.....	32
4.1.5.7	Mykoplasmen-PCR	32
4.1.5.8	siRNA und miR-203 Mimic	32
4.1.5.9	Sondenherstellung für Northern Blot	33

4.1.7	Antikörper.....	34
4.1.9	Molekulargewichtsmarker	35
4.1.10	Enzyme	35
4.1.11	Reagenziensysteme	35
4.1.12	Radioaktive Isotope	35
4.1.13	Chemikalien und Membranen.....	35
4.1.14	Puffer und Lösungen	37
4.1.15	Plastikware.....	41
4.1.16	Geräte	41
4.2	Methoden	42
4.2.1	Zellkultur	42
4.2.1.1	Auftauen von Zellen	42
4.2.1.2	Kultivieren von Zellen.....	42
4.2.1.3	HaCaT Zellen	42
4.2.1.4	NFK.....	42
4.2.1.5	Vorhautfibroblasten	42
4.2.1.6	Mycoplasmen PCR und Mycoplasmenelimination (Firma Invivogen).....	42
4.2.1.7	Bestimmung der Zellzahl.....	43
4.2.1.8	Retrovirale Infektion	43
4.2.1.9	Calcium-Stimulation	44
4.2.1.10	5-Aza-2'-deoxycytidin (DAC) Stimulation von HaCaT Zellen.....	44
4.2.1.11	Bisulphitsequenzierung	44
4.2.1.12	PMA Stimulation.....	45
4.2.1.13	siRNA und miR-203 Mimic Transfektion mit Lipofectamine RNAiMax	45
4.2.1.14	Transiente Transfektion.....	46
4.2.1.15	Luziferase-Assay.....	46
4.2.1.16	Proliferationsassay	47
4.2.1.17	Organotypische Kulturen.....	47
4.2.1.18	Einfrieren von Zellen	48
4.2.2	Molekularbiologische Methoden	48
4.2.2.1	Nukleinsäure	48
4.2.2.2	Proteine.....	60
4.2.3	<i>In silico</i> Analysen und Computerprogramme.....	62
4.2.4	Statistische Auswertung	63
5	ERGEBNISSE.....	64
5.1	HPV8 E6 stört die Differenzierung und Proliferation in Keratinozyten durch Unterdrückung der miR-203.....	64
5.1.1	HPV8 E6 induziert p63 und die Isoform Δ Np63 α in primären Keratinozyten	64
5.1.2	HPV8 E6 induziert p63 und die Isoform Δ Np63 α in der Keratinozyten Zelllinie HaCaT.....	65
5.1.3	HPV8 E6 reduziert die miR-203 Expression in NFK und HaCaT Zellen	67
5.1.4	p63 und miR-203 sind in HPV8-positiven EV-Läsionen gegenläufig exprimiert	68
5.1.5	HPV8 E6 induziert Proliferation in Keratinozyten	69
5.1.6	HPV8 E6 unterdrückt Gene der Keratinozytendifferenzierung in NFK.....	71
5.1.7	HPV8 E6 unterdrückt die Involucrin-Expression in HaCaT Zellen	73
5.1.8	Involucrin-Expression ist in EV-Läsionen stark reduziert	75
5.1.9	HPV8 E6 induzierte p63 Expression ist für reduzierte Involucrin Expression und verstärkte Proliferation verantwortlich	75

5.1.11	HPV8 E6 vermittelte miR-203 Suppression ist für reduzierte Involucrin Expression und verstärkte Proliferation verantwortlich	78
5.1.12	WNT-Inhibitor Dickkopf 1 (DKK1) ist über miR-203 durch HPV8 E6 reguliert	81
5.2	Regulation der miR-203 in Keratinozyten	82
5.2.1	miR-203 ist in HPV8 E6 positiven Keratinozyten nicht über epigenetische Mechanismen reguliert	82
5.2.2	siRNA Transfektion von MAML, JunB und p300 reduziert miR-203	86
5.2.3	Einfluss des Notch-Signalwegs auf die miR-203 Expression	87
5.2.4	JunB beeinflusst die miR-203 Expression	88
5.2.4.1	HPV8 E6 unterdrückt JunB und die PMA- vermittelte miR-203 Induktion	88
5.2.4.2	AP-1 Bindestellen im miR-203 Promotor	90
5.2.5	p300 beeinflusst die miR-203 Expression	94
5.2.5.1	HPV8 E6-vermittelte Degradation von p300 ist für die Involucrin Suppression verantwortlich	94
5.2.5.2	miR-203 Promotor Aktivität ist p300- und JunB-abhängig	96
5.2.7	JunB und p300 beeinflussen die Involucrin Expression	98
5.2.9	p300 und miR-203 Expression werden in EV-Läsionen unterdrückt	99
5.2.11	miR-203 Reduktion in HPV8 E6 ist p300 abhängig	100
6	DISKUSSION	101
6.1	HPV8 E6 stört den miR-203/p63 Signalweg und dadurch Differenzierung und Proliferation in Keratinozyten	101
6.1.1	HPV8 stört den p63/miR-203 Signalweg in NFK und HaCaT Zellen	101
6.1.2	p63 und miR-203 in EV-Läsionen und anderen Tumoren	102
6.1.3	HPV8 und Notch	103
6.1.4	Effekte von HPV8 E6 auf Differenzierung und Proliferation	104
6.2	miR-203 Regulation	107
6.2.1	Epigenetik	108
6.2.2	JunB und p300 regulieren miR-203 in Keratinozyten	110
6.2.3	p300 und miR-203 in HPV8 Δ E6-exprimierenden Zellen und in EV-Läsionen	113
7	VERZEICHNISSE	115
7.1	Abkürzungsverzeichnis	115
7.2	Abbildungsverzeichnis	117
7.3	Tabellenverzeichnis	119
7.4	Literaturverzeichnis	120

1 Zusammenfassung

Patienten, die an der Genodermatose *Epidermodysplasia verruciformis* (EV) leiden, zeigen eine erhöhte Suszeptibilität für die persistierende Infektion mit kutanen HPV Typen des Genus beta, vor allem HPV5 und HPV8. Daraus resultiert ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von nicht melanozytärem Hautkrebs. Die Mechanismen, wie kutane Papillomviren die Haut-Karzinogenese in EV-Patienten fördern, sind im Vergleich zu mukosalen Hochrisikotypen weniger gut verstanden. Die Frage, in welche Signalwege HPV8 eingreift, ist Gegenstand dieser Arbeit.

In HPV8-positiven Hautläsionen von EV-Patienten war die Expression der microRNA-203 (miR-203) in läsionalen Bereichen fast komplett aufgehoben. Im Gegensatz dazu war der Transkriptionsfaktor p63 stark exprimiert. p63 wird durch die miR-203 negativ reguliert. qRT-PCR Analysen zeigten, dass in HPV8 E6-exprimierenden primären Keratinozyten und der Zelllinie HaCaT die miR-203 unterdrückt und Δ Np63 α induziert wurde. Δ Np63 α stellt die hauptsächlich exprimierte Isoform von p63 in Keratinozyten dar. Auch die Analyse der Δ Np63 α Proteinexpression durch Western Blot sowie durch immunhistochemische (IHC)-Färbung von organotypischen Kulturen ergab eine Induktion durch HPV8 E6. IHC-Färbungen der EV-Läsionen zeigten außerdem eine Reduktion des Differenzierungsmarkers Involucrin. Dieser Effekt war ebenfalls auf HPV8 E6 zurückzuführen. BrdU- und Scratch-Assays sowie organotypischen Kulturen zeigten, dass HPV8 E6 die Proliferation induzierte. Die Effekte auf Differenzierung und Proliferation konnten durch p63-*Knockdown* oder miR-203 Überexpression wieder aufgehoben werden. Im zweiten Teil der Arbeit wurde die HPV8 E6-vermittelte Regulation der miR-203 aufgeklärt. In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass die miR-203 über die Acetyltransferase p300 sowie den AP-1 Faktor JunB reguliert wird. Reporter-Assays haben gezeigt, dass p300 und JunB den miR-203 Promotor aktivieren. *Knockdown* von p300 oder JunB reduzierten sowohl die Promotoraktivität als auch die endogene miR-203 Expression. Eine E6 Mutante Δ 8E6, welche p300 nicht binden kann, führte zu keiner Reduktion der miR-203 und p63 wurde nicht induziert. In EV-Biopsien korrelierte die Expression von p300 mit der miR-203 Expression, welche in läsionalen Bereichen massiv reduziert war. Die *in vivo* Daten der p300 Expression in HPV8-positiven Läsionen von EV Patienten validierte die Ergebnisse der *in vitro* Versuche. Über die p300-abhängige Beeinflussung der miR-203 greift das Virus in Mechanismen der Keratinozytenproliferation und -differenzierung ein, die beide zentral für den viralen Lebenszyklus sind.

2 Summary

Epidermodysplasia verruciformis (EV) is a genetic skin disease characterized by abnormal susceptibility to beta-HPV infection, mainly type 5 and 8, and development of non melanoma skin cancer. Extensive studies have linked the tumor promoting activities of mucosal HPV types (e.g., HPV16) to their major oncoproteins E6 and E7. However, little is known about the mechanism underlying tumorigenicity of HPV8. In contrast to cutaneous types, mucosal E6 induces proteasomal degradation of the tumor suppressor p53. The question, which cellular pathways are targeted by HPV8, is subject of this thesis.

It was demonstrated that expression of microRNA-203 (miR-203) was almost abolished in HPV8-positive EV-lesions. Δ Np63 α , a target of miR-203, was strongly upregulated. In vitro, miR-203 and Δ Np63 α expression were deregulated by HPV8 E6 protein. This was demonstrated by qRT-PCR, Western Blot and immunohistochemistry staining of organotypic cultures of retrovirally engineered primary keratinocytes and HaCaT cells stably expressing HPV8 E6. Suppression of miR-203 led to induction of Δ Np63 α . As a consequence, differentiation was disturbed in HPV8 E6 expressing keratinocytes, organotypic cultures and EV-lesions, reflected by involucrin expression. Furthermore, proliferation was enhanced which was demonstrated by BrdU-Assay, Scratch Assay and in organotypic cultures. HPV8 E6-mediated effects on differentiation and proliferation could be overcome by p63-knockdown or miR-203-mimic transfection. The acetyltransferase p300 and the AP-1 transcription factor JunB were identified as novel miR-203 regulators. Reporter-gene assays demonstrated that p300 and JunB activate the miR-203 promoter. Knockdown of p300 or JunB reduced promoter activity and endogenous miR-203 levels. The down-regulation of JunB by HPV8 E6 was demonstrated in the present thesis. Most importantly, miR-203 and Δ Np63 α levels were normal in keratinocytes expressing an E6 p300-binding mutant, Δ 8E6, which demonstrates the link between E6-mediated repression of p300 and miR-203. The expression pattern of p300 and miR-203 correlated in HPV8-positive EV-lesions, which were both reduced. These in vivo data of p300 expression proved in vitro experiments. HPV8 established a p300-dependent mechanism of controlling keratinocyte differentiation and proliferation via miR-203 inhibition which is important for viral lifecycle.

3 Einleitung

3.1 Aufbau und Entwicklung der Haut

Die Epidermis mit der darunter befindlichen Dermis bilden zusammen die menschliche Haut. Die Epidermis besteht aus mehreren Keratinozyten-Zellschichten. Sie stellt eine effektive physikalische Barriere gegen Bakterien und Viren dar und schützt vor Umwelteinflüssen (Abbildung 1). Sie kann auf Verletzungen reagieren und besitzt die Fähigkeit, sich ständig zu erneuern. Der Regenerationszyklus beträgt etwa 4 Wochen. Die Keratinozyten der untersten Zellebene, des *Stratum basale*, sind teilungsfähig, da sich in der Basallamina Stammzellen befinden. Diese dienen als stetige Quelle für neue, proliferierende Keratinozyten, zunächst als "*transit amplifying cells*" bezeichnet. Je nach Bedarf und Zustand der Haut entstehen durch Zellteilung Tochterzellen mit Differenzierungspotential oder solche die proliferieren. Ausdifferenzierte Keratinozyten der höheren Epidermisschichten verhornen, sterben und schilfern ab. Diese werden als Korneozyten bezeichnet. Man unterscheidet mukosales Epithel, Schleimhäute wie im Mund- oder Genitalbereich und kutanes Epithel, welches die äußere Körperhülle bildet (Candi et al., 2005). Zellen des *Stratum basale* werden über die Adhäsion von $\beta 1$ - und $\beta 4$ -Integrinen an Laminine gebunden, welche die extrazelluläre Matrix bilden und der Basalmembran aufliegen. Durch diese Interaktion wird die Differenzierung unterdrückt (Houben et al., 2007). Verschiedene Strukturproteine wie Keratin 14 und 15 charakterisieren die undifferenzierte Zellschicht (Hsu et al., 2014; Watt et al., 2000).

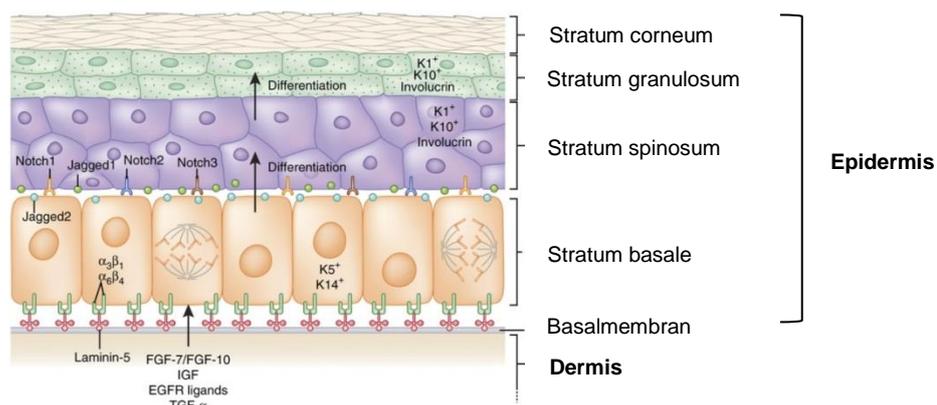


Abbildung 1. Aufbau der Epidermis.

Zellen des *Stratum basale* beinhalten Stammzellen, die über $\alpha 3\beta 1$ und $\alpha 6\beta 4$ Integrine an die Basalmembran der extrazellulären Matrix binden. Fibroblasten der Dermis sekretieren Wachstumsfaktoren und induzieren Proliferation. Über Notch/Jagged-Signalwege im *Stratum basale* und *Stratum spinosum* wird die Differenzierung induziert und es kommt zur Expression von Strukturproteinen wie Involucrin, Keratin 1 und 10. Das *Stratum corneum* besteht aus abgestorbenen Korneozyten (Hsu et al., 2014).

Nachdem die Tochterzellen das *Stratum basale* verlassen haben und in höhere Schichten gelangen, wird die Genexpression von Keratin 5, 14 und 15 vermindert und differenzierungsspezifisches Keratin 1 und 10 induziert, das sich über Heteropolymerbildung zu Intermediärfilamenten zusammen lagert (Fuchs et al., 1980; Waseem et al., 1999). Durch steigende intrazelluläre Calciumkonzentration bilden Strukturproteine wie Periplakin und Involucrin Proteinaggregate, die sich unter der Plasmamembran zum "*cornified cell envelope*" zusammenfinden. Bereits in den oberen Schichten des *Stratum spinosum* beginnt der Prozess der Kornifizierung (Kalinin et al., 2004; Kalinin et al., 2002). Die Keratinozyten beenden die Zellteilung und werden zu Korneozyten mit degradiertem DNA. Die Plasmamembran wird durch Keramide ersetzt und die kornifizierten Zellen sind in eine Lipidmatrix aus Cholesterol und Fettsäuren eingebettet (Weerheim et al., 2001). Der Zelltod wird sowohl über intrinsische Wege über die Ausschüttung von Cytochrom C, als auch über extrinsische, rezeptorvermittelte Wege induziert. Während der Kornifizierung werden nicht alle klassischen Caspasen aktiviert. Das Zytoskelett wird umorganisiert aber nicht zerstört. Aus diesen Gründen handelt es sich nicht um Apoptose im klassischen Sinn, sondern um eine besondere Form des Zelltods, der speziell in Korneozyten auftritt (Lippens et al., 2005; Takahashi et al., 2000; Tschachler, 2005).

Verschiedene Signalwege spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation des Gleichgewichtes von Proliferation und Differenzierung. Ein wichtiger Signalweg ist die Notch-Kaskade, die bei Aktivierung Differenzierung induziert und Transkriptionsfaktoren der Proliferation inhibiert (Koster et al., 2004). Induziert werden zum Beispiel C/EBP Faktoren, welche eine wichtige Rolle bei der Differenzierung spielen (Hsu et al., 2014).

3.2 Humane Papillomviren (HPV)

Die Familie der Papillomviren (PV) umfasst zum heutigen Zeitpunkt mehr als 180 Typen (Bernard et al., 2010). 120 Vertreter zählen zu den humanen und 69 zu den animalen Papillomviren. Die Klassifizierung erfolgt anhand von Sequenzhomologien im Leserahmens des Strukturproteins L1, welches das am höchsten konservierte Gen der PV darstellt (Abbildung 2). Der Name leitet sich von der Eigenschaft der Viren ab, Papillome, also Warzen, zu verursachen, in welchen das Virus stark repliziert. Viele Typen befallen nur mukosale Epithelien, wie Schleimhäute im Genitalbereich, andere Typen wiederum infizieren nur die verhornende Haut, was zu einer Gliederung in mukosale und kutane Gruppen führte. Alpha-Papillomviren können sowohl Schleimhaut als auch Haut infizieren (McLaughlin-Drubin et al., 2009). Viren der Genera beta, gamma, delta und mu infizieren nur die Haut. Eine weitere Einteilung erfolgt nach der Schwere der PV-assoziierten Krankheiten. Sogenannte "*low risk*", Niedrigrisiko-Typen sind epidemiologisch und genetisch nicht mit der Entstehung von Krebs assoziiert. Die WHO hat 12 Typen als "*High risk*", also als Hochrisiko-Typen definiert, da sie mit der Entstehung von Anogenital- und Zervixkarzinomen assoziiert sind (Bouvard et al., 2009; Doorbar et al., 2012). Zu letzter Gruppe zählen HPV 16 und 18. 2008 erhielt Harald zur Hausen den Nobelpreis für die Entdeckung des Zusammenhangs zwischen der Infektion mit mukosalen Hochrisiko-Papillomviren und der Entstehung von Zervixkarzinomen. Diese Forschungsarbeiten bildeten die Grundlage für die Entwicklung von Impfstoffen gegen Gebärmutterhalskrebs, gebildet aus rekombinant hergestellten L1-Proteinen, die nun seit einigen Jahren auf dem Markt sind (McLaughlin-Drubin et al., 2009; zur Hausen, 1996). Beta-Papillomviren, die in erster Linie die verhornende Haut infizieren, sind weniger gut erforscht.

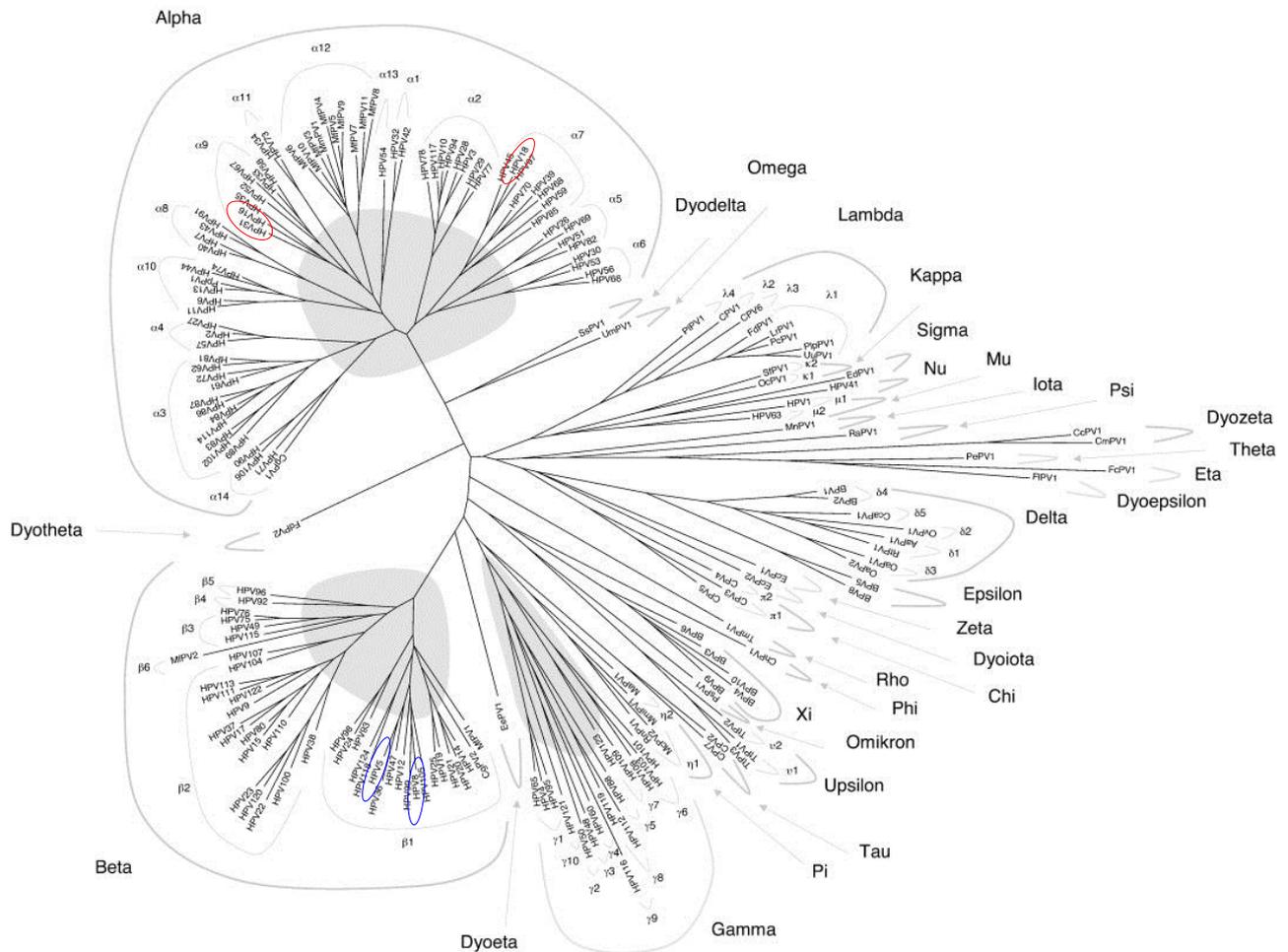


Abbildung 2. Ausschnitt aus dem phylogenetischen Stammbaum der Papillomviren

Die Gruppe der Alpha-, Beta- und Gamma-Papillomviren umfasst die meisten Vertreter der humanen Typen. Da der Leserahmen des Strukturproteins L1 das am stärksten konservierte Gen darstellt, wurde die Einteilung anhand von Sequenzähnlichkeiten in diesem Gen durchgeführt. Die roten Kreise markieren einige wichtige mukosale, die blauen einige wichtige kutane Typen Veränderter nach Bernard et al. (2010).

3.2.1 Aufbau und Genom von Papillomviren

Papillomviren sind DNA-Viren mit doppelsträngigem, zirkulärem Genom. Sie sind unbehüllt und im Vergleich zu Pockenviren mit einem Durchmesser von 55-60 nm klein. Das Kapsid besteht aus dem Protein L1 (57 kDa), das über Disulfidbrücken 72 miteinander verknüpfte Pentamere bildet. In das Kapsid sind größere L2 (75 kDa) Proteine eingelagert. Im ikosaedrischen Kapsid eingeschlossen befindet sich das ca. 8000 bp umfassende, zirkuläre Genom. Die DNA ist um Histonproteine gewickelt und liegt als Superhelix vor. Das Genom ist in allen Papillomvirustypen ähnlich aufgebaut, es liegen allerdings Unterschiede in der Aminosäuresequenz der einzelnen Proteine vor. In Abbildung 3 ist das Genom des Beta-Papillomvirus HPV8 dargestellt.

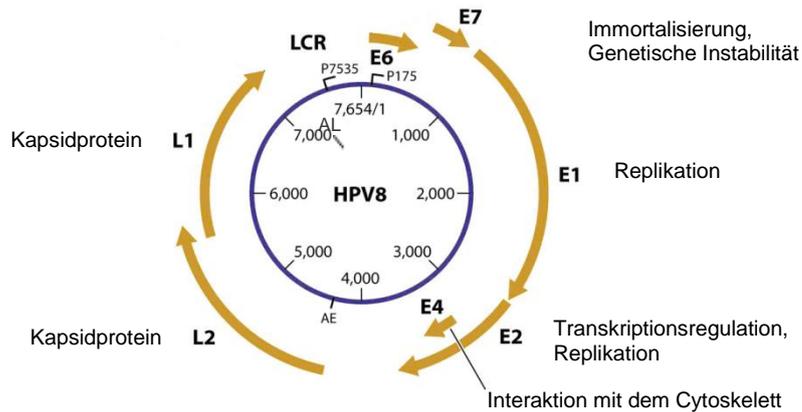


Abbildung 3. Genomische Organisation von HPV8

Die Hauptfunktionen der Proteine sind angegeben. Die frühen Gene E1 bis E7 werden von dem Promotor P175, die späten Gene L1 und L2 von P7535 abgelesen. AE gibt das Polyadenylierungssignal für die frühen, AL das Signal für die späten Proteine an. LCR (*Long control region*) bezeichnet den genomischen Abschnitt, der aus einem Enhancerelement und Bindestellen für virale (E2), sowie zelluläre Transkriptionsfaktoren besteht. Verändert nach Lazarczyk et al. (2008).

Das zirkuläre Genom kodiert für zwei Gruppen von Genen. Zu Beginn des Replikationszyklus von kutanen Papillomviren werden die sogenannten frühen Gene E1 bis E7 (eng. *early*) transkribiert. Das E5 Protein wird bei Beta-Papillomviren im Vergleich zu α -Papillomviren nicht gebildet. Der Beginn der Transkription der polycistronischen mRNA erfolgt von dem Promotor P175, es gibt ein Polyadenylierungssignal AE (Adenylierungssignal early). Anschließend entstehen durch Spleißvorgänge unterschiedliche kodierende mRNA Sequenzen. Der Promotor für die späten Gene L1 und L2 (P7535) befindet sich in der "*long control region*" (LCR), einem nicht kodierenden Bereich zwischen der Sequenz der Gene für frühe und späte Proteine. Bei der Transkription wird das frühe Poly-A Signal überlesen, und eine zweite Sequenz in der LCR dient als Poly-A-Signal für die späten Gene (AL). Durch überlappende offene Leserahmen (ORF) wird die kodierende Kapazität des relativ kleinen Genoms gut ausgenutzt (Conway et al., 2009).

3.2.2 Replikationszyklus

Humane Papillomviren sind epitheliotrop. Sie durchlaufen ihren Replikationszyklus nur in Epithelgewebe der Schleimhäute und der Haut. Dabei machen sich die Viren den natürlichen Entwicklungszyklus der Epidermis zu Nutze. Zunächst infizieren sie infolge kleiner Verletzungen die Keratinozyten des *Stratum basale*, der untersten Hautschicht. Keratinozyten in dieser Schicht proliferieren stark und sind noch undifferenziert. Das Virus gelangt über rezeptorvermittelte Endozytose in die Zelle. Die Mehrheit der Viren bindet über das Kapsidprotein L1 an Heparansulfat-Proteoglycane (HSPG). Die Internalisierung ist relativ langsam und dauert zwischen 4 Stunden (HPV 16) und 14

Stunden (HPV 31). Die Viruspartikel werden vermutlich in Endosomen über Ansäuerung in L1-Partikel und L2+DNA getrennt. Anschließend wird die L2 gekoppelte DNA entlang der Mikrotubuli zum Zellkern transportiert. Dort gelangt sie über Poren in den Zellkern (Bienkowska-Haba et al., 2011).

Zunächst werden die frühen Proteine E1, eine DNA-Helikase, und E2, ein Transaktivatorprotein, synthetisiert (Abbildung 4). E2 bindet an den Replikationsursprung ORI in der LCR und initiiert die Interaktion mit E1 und weiteren zellulären Transkriptionsfaktoren. Dies gewährleistet die virale Replikation mit etwa 50 bis 100 episomalen Kopien pro Zelle. Da zunächst keine viralen Gene für Strukturproteine transkribiert werden, wird dies als nicht-produktive Phase beschrieben. Jeder sich teilende Keratinozyt gibt Virusgenome an die Tochterzelle weiter. E1 und E2 initiieren die Expression der Gene E6 und E7. Diese werden translatiert und greifen in den Zellzyklus der Wirtszelle ein, mit dem Ziel, eine kontinuierliche Proliferation als essentielle Grundlage für die virale Replikation und Transkription aufrecht zu erhalten. Indem das E6 Protein mukosaler Hochrisiko-HPV Typen zum Beispiel die Ubiquitinierung und den proteasomalen Abbau des Tumorsuppressorproteins p53 induziert, wird aufgrund der ausbleibenden Aktivierung des Zellzyklusinhibitors p21 eine stetige Zellteilung gewährleistet. Die vegetative virale Amplifikation findet in differenzierten Keratinozyten statt. Die Expression der Hüllproteine L1 und L2 und somit die Zusammensetzung des Kapsids erfolgt im *Stratum granulosum*, da der Promotor der späten Gene erst in diesen Schichten aktiviert wird. Es wird eine Vielzahl an infektiösen Viren produziert, die zusammen mit den abschilfernden, toten Korneozyten die Haut verlassen und sich verbreiten können. Es wird angenommen, dass E1 und E4 den Abbau des Keratinnetzwerkes der Korneozyten fördern, um so die Freilassung und Ausbreitung der Viren zu verbessern. (Bienkowska-Haba et al., 2011; Conway et al., 2009; Klingelhutz et al., 2012)

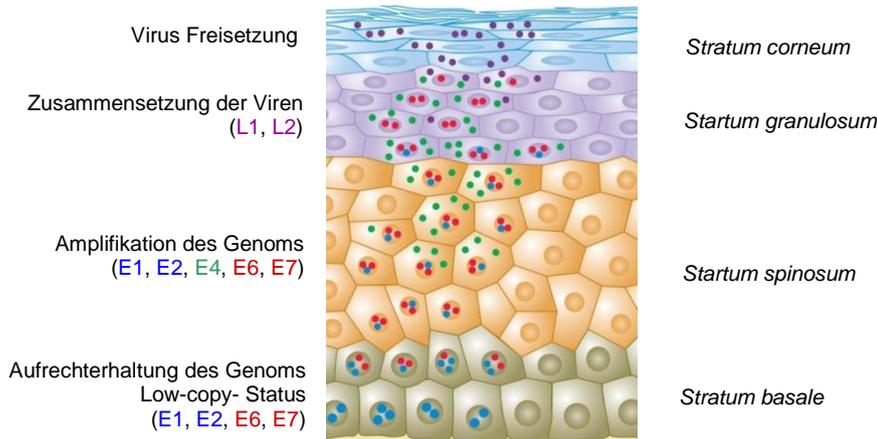


Abbildung 4. Der Replikationszyklus von HPV in der Epidermis

Die Viren infizieren das *Stratum basale* über kleine Läsionen und synthetisieren die frühen Proteine E1, E2 (blau) sowie E6 und E7 (rot). Mit dem Beginn des Differenzierungsprogramms werden mehr Virusgenome amplifiziert, die im *Stratum granulosum* zusammengesetzt werden. Erst spät werden die Hüllproteine L1 und L2 (lila) produziert, so dass die Viren mit den abschilfernden Korneozyten das *Stratum corneum* verlassen. Verändert nach Lazarczyk et al. (2008).

3.2.3 Die frühen Proteine E6 und E7 mukosaler und kutaner HPV-Typen

Papillomviren exprimieren früh während ihres Replikationszyklus die Proteine E6 und E7, welche Signalwege der Wirtszelle beeinflussen. Funktionell unterscheiden sich die Proteine mukosaler und kutaner HPV-Typen.

Das E6 Protein

Das E6 Protein besteht aus ca. 150 Aminosäuren und liegt vermutlich als Monomer in der Zelle vor. Es wurden bisher keine enzymatischen Funktionen, sondern nur direkte Protein-Protein Interaktionen beschrieben (Huibregtse et al., 1991; Munger et al., 2002; Patel et al., 1999; Thomas et al., 1999). Im Folgenden wird das E6 Protein im Hinblick auf sein Eingreifen in den Wirts-Zellzyklus, Apoptosemechanismen, DNA-Reparatur und Differenzierung, sowie seine Rolle als Onkoprotein in HPV8 beschrieben.

Zellzyklus

So ist bekannt, dass E6 von mukosalen Hochrisiko-, aber nicht von Niedrigrisiko-Typen, über die direkte Interaktion mit der E3 Ubiquitin Ligase E6AP (E6 assoziiertes Protein), die Ubiquitinierung und somit den proteasomalen Abbau von p53 bewirkt (Huibregtse et al., 1991; Scheffner et al., 1993; Scheffner et al., 1990). p53 ist ein Transkriptionsfaktor, der bei Zellschäden aktiviert wird und so Zellzyklusarrest, DNA-Reparatur oder Apoptose einleitet (Howie et al., 2009). Die Degradation von p53 ist direkt an den Lebenszyklus der Papillomviren gekoppelt. Durch den Stopp des Zellzyklusinhibitors p21 wird die Proliferation der Suprabasalzellen aufrechterhalten, um die Virus-Vermehrung zu gewährleisten.

Im Gegensatz zu E6 Proteinen mukosaler Hochrisiko-Typen ist bei dem kutanen Typ HPV8 eine Bindung von E6 mit E6AP an p53 nicht nachgewiesen (Kiyono et al., 1994; Steger et al., 1992), bzw. konnte für E6AP nur eine schwache Bindung gezeigt werden (Bedard et al., 2008). Wie E6 Proteine kutaner HPV-Typen in den Zellzyklus eingreifen ist wenig bekannt. Jedoch zeigten einige Arbeiten, dass diese E6 Proteine p53 E6AP-unabhängig regulieren können. HPV38 verhindert über die Bindung an p300 die p53-Acetylierung und unterdrückt somit dessen Aktivität (Muench et al., 2010). Diesen Mechanismus teilen sie sich mit mukosalen Hochrisiko-Typen (Patel et al., 1999; Zimmermann et al., 1999). Ob HPV5 und HPV8 E6 ebenso wie HPV38 E6 die direkte Acetylierung von p53 durch p300 verhindern, ist nicht bekannt.

Apoptose, DNA-Reparatur und Immortalisierung

Genau wie mukosale HPV greifen auch kutane Typen in Apoptosemechanismen ein (Thomas et al., 1998, 1999). Einige Vertreter der Beta-Papillomviren, darunter HPV8, inhibieren die Apoptose-Antwort auf UV-Schäden über E6-induzierte Degradation von Bak, einem proapoptotischen Protein der Bcl-2 Genfamilie (Jackson et al., 2000; Underbrink et al., 2008). Über diesen Weg wird die Apoptose unterdrückt und DNA-Schäden können akkumulieren. HPV8 E6 reduziert außerdem über die Interaktion mit XRCC1 (*X-ray cross complementing group 1 protein*) die Reparaturreffizienz in Wirtszellen (Iftner et al., 2002). Dieses Protein koordiniert die Interaktion wichtiger Enzyme für die Reparatur von Einzelstrang-DNA-Brüchen (London, 2015). Außerdem aktiviert das kutane HPV38 E6 ähnlich wie HPV16 E6 die Telomerase-Reverse-Transkriptase (TERT), wodurch die Immortalisierung der Zellen vorangetrieben wird. Für HPV8 E6 ist nur eine schwache Interaktion mit TERT nachgewiesen. Indem E6AP durch HPV38 E6 gebunden wird, wird ein Inhibitor der Telomerase ubiquitiniert und abgebaut (Bedard et al., 2008; Klingelhutz et al., 1996). Über die Destabilisierung von p300 durch HPV5 und HPV8 wird die Acetylierung zweier Serin/Threonin Proteinkinasen, ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*) und ATR (*Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein*), verhindert, was wiederum die aktivierende Acetylierung von p53 unterbindet und zur Anhäufung von Doppelstrangbrüchen und Thymindimeren führt (Wallace et al., 2013; Wallace et al., 2012).

Differenzierung

Der Lebenszyklus von Papillomviren ist eng mit dem der Wirtszellen, den Keratinozyten verknüpft. Deshalb greifen Virusproteine nicht nur in den Zellzyklus ein, um Proliferation zu steigern, sondern auch in das Differenzierungsprogramm, um zunächst eine ausreichende Replikation zu gewährleisten. Dass sowohl mukosale Hochrisiko-HPV-Typen als auch kutane Vertreter die Differenzierung inhibieren, ist in

Ansätzen gezeigt worden. HPV16 E6 verzögert unter Calcium-Einfluss die Expression von Involucrin (Alfandari et al., 1999). Auch Microarray Daten zeigten, dass eine Vielzahl an differenzierungsspezifischen Genen wie Involucrin und SPRR unterdrückt werden (Alfandari et al., 1999; Duffy et al., 2003). Die Expression von SPRR ist außerdem in Mäusen, welche transgen HPV8 E6 exprimierten, sowie in HPV8 E6-exprimierenden humanen Keratinozyten unterdrückt (Lazic et al., 2011). In beta HPV-positiven Läsionen von *Epidermodysplasia verruciformis* (EV) Patienten ist die Expression von Keratin 1 und 10 reduziert (Barcelos et al., 2009). Über welche Mechanismen die Differenzierung gestört ist, ist unklar. Ein wichtiger Signalweg, der Differenzierung in der Epidermis steuert, ist die Notch-Kaskade (siehe Kapitel 3.3.3.). In zervikalen Zelllinien ist der Notch-Signalweg unterdrückt, da p53, welcher als Aktivator von Notch beschrieben wird, durch HPV16 und HPV18 E6 degradiert wird (Yugawa et al., 2007). In kutanen Papillomviren wurde ein anderer Mechanismus aufgezeigt: HPV8 E6 bindet an das LXXL Motif des Mastermind-like-Proteins (MAML), den Notch-Coaktivator für Zielgene. Dadurch wird die Transaktivierung von Zielgenen wie Hes1 verhindert und Zelldifferenzierung gestört. Dieser Mechanismus scheint nur durch E6-Proteine kutaner Papillomviren wie HPV8 oder boviner Papillomviren (BPV) gestört zu sein (Brimer et al., 2012; Meyers et al., 2013; Tan et al., 2012). Auch über die Degradation von p300, einem wichtigen Coaktivator und zentralen Schalter in vielen Signalwegen, wird die Expression von Differenzierungsgenen wie Involucrin, Keratin 1 und Keratin 10 in HPV5 und HPV8 E6-exprimierenden Zellen verhindert (Howie et al., 2011). In dieser Publikation wurde beschrieben, dass p300 in HPV5 und HPV8 E6-exprimierenden Zellen E6AP-unabhängig, aber proteasomal-abhängig degradiert wird. In Zellen, welche die HPV8 E6-Mutante $\Delta 8E6$ exprimierten, wurde das p300 Proteinlevel nicht verändert. $\Delta 8E6$ kann p300 nicht binden. Es konnte weiter gezeigt werden, dass Aktivatoren der AKT-Kinase das p300-Level wieder induzierten, bzw. durch Inhibition der AKT-Kinase das p300-Level zurückging. Zwei p300-Varianten mit mutierten AKT-Phosphorylierungsstellen wurden in HPV5 und HPV8 E6-exprimierenden Zellen weniger degradiert. In *in-vitro*-Kompetitionsassays wurde die Konkurrenz von HPV8 E6 und AKT um die p300-Bindung dargestellt. Durch diese Experimente konnte gezeigt werden, dass HPV8 E6 die Bindung der AKT-Kinase an p300 verhindert, wodurch die Phosphorylierung von p300 verringert und das Protein destabilisiert wird. Daraus resultiert in HPV8 E6-exprimierenden Zellen eine verminderte Bindung von p300 an den Involucrinpromotor und eine verringerte Involucrin Expression.

Replikationszyklus

Eine weitere Funktion des E6-Proteins ist es, zelluläre Faktoren für die Expression viraler Proteine zu nutzen. In vitro wurde die Interaktion von HPV8 E6, aber auch von E2 und E7 an den Transkriptionsfaktor TBP (*TATA-binding protein*) und TBP-assozierte Proteine gezeigt (Enzenauer et al., 1998). Die Interaktion von p300 mit E2 führt zu einer Steigerung der HPV8 Genexpression, wobei die Bindung mit E6 vor allem den späten Promotor aktiviert (Muller-Schiffmann et al., 2006; Muller et al., 2002). Außerdem ist HPV8 in der Lage, IRF7, einen zellulären Transkriptionsfaktor der Immunantwort für die Promotoraktivierung zu nutzen (Oldak et al., 2011).

Das E7 Protein

Die meisten Protein-Interaktionen von E7 konnten nur für mukosale Hochrisiko-Typen gezeigt werden. Da es die Zelltransformation begünstigt, wird es in diesem Zusammenhang als Onkoprotein bezeichnet. Es besitzt Aminosäuresequenz-Homologien zum großen Tumorantigen von Simian-Virus 40 und dem E1A Protein des Adenovirus (Ad), und hat keine enzymatische Aktivität oder DNA-Bindedomäne. Über die sequenziellen Ähnlichkeiten zu Ad-E1A konnte gezeigt werden, dass E7 Proteine mukosaler Hochrisiko-Typen über ein LXCXE-Motiv einen Regulator des Zellzyklus, das Retinoblastoma Tumorsuppressorprotein (pRB), binden. (Dyson et al., 1989; Munger et al., 1989). Über eine weitere Bindung mit einem Protein-Ligase-Komplex wird, wie bei p53, die proteasomale Degradation induziert. Bei pRB handelt es sich um ein Tumorsuppressorprotein, das den Übergang zwischen G1- und S-Phase kontrolliert (Muller et al., 2000). Ähnlich wie p53 stoppt es den Zellzyklus bei fehlerhafter Replikation und schützt somit vor Anhäufung von Mutationen. Ein durch E7 induzierter proteasomaler Abbau von pRB hat zur Folge, dass der Zellzyklus unkontrolliert stattfindet (McLaughlin-Drubin et al., 2009). Zahlreiche andere Zellzyklus-kontrollierende Proteine sind Angriffspunkte von E7. Auch Zytokin-Signalwege und die Keratinozytendifferenzierung sind gestört (Roman et al., 2013). So wurde beispielsweise gezeigt, dass HPV16 E7 die Expression der differenzierungsspezifischen microRNA-203 (miR-203) über Inhibition des MAP-Kinase Signalweges unterdrückt (Melar-New et al., 2010). Mukosale HPV Typen mit niedrigem karzinogenen Potential und kutane Typen wie HPV5 und HPV8 zeigen nur eine schwache Bindung zu pRB und können Epithelzellen nicht transformieren (Schmitt et al., 1994; Yamashita et al., 1993). Jedoch konnte gezeigt werden, dass HPV8 E7 die pRB Proteinexpression reduziert (Akgul et al., 2007). Ob dies bereits auf transkriptioneller Ebene oder über Proteindegradation erfolgt, ist unklar. Auch über Inhibition des TGF- β -Signalweges greift das E7 Protein in die Regulation der

Proliferation ein. HPV11 und HPV16 E7 sowie HPV1 und HPV8 E7 binden an SMAD-Proteine (*signalling mother against decapentaplegic peptide*), wodurch anti-Proliferative TGF- β Signale nicht weitergeleitet werden (Habig et al., 2006; Lee et al., 2002). Nach Stimulation des TGF- β Signalwegs binden SMAD-Proteine zusammen mit anderen Transkriptionsregulatoren wie AP-1 und p300 an Promotorregionen von Zielgenen und transaktivieren diese (Zhao et al., 2014). Über die Induktion membrangebundener Metalloproteasen begünstigt HPV16 E7 und HPV8 E7 die Tumorerinvasion und die Proliferation, was wiederum den viralen Lebenszyklus fördert (Akgul et al., 2005; Smola-Hess et al., 2005). Bisher sind noch keine Daten über das onkogene Potential von HPV8 E7 in einem transgenen Mausmodell publiziert. Es wurden zwei transgene Mäuse erzeugt, welche HPV8 E6 und E7 zusammen exprimierten und ebenso wie HPV8 E6 alleine Tumore induzierten (Marcuzzi et al., 2009). Allerdings deuten auch Versuche mit HPV-CER-Mäusen, welche mit HPV8 E6-siRNA behandelt wurden, darauf hin, dass HPV8 E7 keinen Einfluss auf die Papillombildung hat (Hufbauer et al., 2010).

In vorherigen Arbeiten konnte unsere Arbeitsgruppe demonstrieren, dass HPV8 E7, aber nicht E6, an den differenzierungsspezifischen Transkriptionsfaktor CEBP β bindet. Dadurch wird die Transaktivierung von CCL20, einem Chemokin, das Langerhans-Zellen in der Haut rekrutiert, verhindert, was wiederum die Migration dieser Immunzellen zum Ort der Infektion stört (Sperling et al., 2012).

3.2.4 HPV8-assoziierte Krankheiten: Epidermodysplasia verruciformis

Die Genodermatose *Epidermodysplasia verruciformis* (EV) beschreibt eine seltene Hautkrankheit, der ein autosomal rezessives, selten ein X-gekoppeltes Vererbungsmuster zu Grunde liegt. Folge des Gendefekts ist eine abnormal hohe Suszeptibilität für kutane HPV Typen und ein deutlich erhöhtes Hautkrebsrisiko an sonnenexponierten Bereichen. Die ersten Symptome zeigen sich oft bereits in der Kindheit. Es bilden sich flache Warzen und rötlich-braune Flecken auf der Haut an Hals und Körper. EV wurde zuerst von Lutz und Lewandowski (1922) beschrieben. Mehr als 40 Jahre später wurden Viruspartikel in EV Läsionen entdeckt, die denen des 'Warzenvirus' ähnlich waren (Ruiter et al., 1966). 1977 wurden die ersten Papillomviren in der Haut von EV-Patienten identifiziert (Pass et al., 1977). Mittlerweile sind 19 Beta-Papillomvirus-Typen in EV-Läsionen entdeckt worden, wobei Patienten meist mit mehr als einem Typ infiziert sind und HPV5 und 8 in 90% der Fälle dedektiert werden (Orth, 2006).

Die der Krankheit zu Grunde liegenden Mutationen betreffen zwei Gene auf Chromosom 17: *EVER1* und *EVER2* (Lazarczyk et al., 2009). Dabei wurden bisher sehr unterschiedliche Mutationen entdeckt, Deletionen von Exons oder einzelnen

Nukleotiden oder *Nonsense*-Mutationen, die meist nur eines der beiden Gene betreffen. *EVER1* und *EVER2* kodieren für Transmembrankanal-ähnliche Proteine des Endoplasmatischen Retikulums, welche an den Zinktransporter ZnT-1 binden (Ramos et al., 2002). Welche Rolle die Mutationen im Bezug auf die höhere Anfälligkeit der Patienten für HPV5 und HPV8 einnehmen ist unklar. Eine Hypothese ist, dass *EVER1* und *EVER2* die Verfügbarkeit von intrazellulärem Zink als wichtigen Cofaktor für Enzyme und Transkriptionsfaktoren reduziert (Lazarczyk et al., 2009; Lazarczyk et al., 2008). Nach diesem Modell ist eine Folge davon die verringerte Aktivität des zellulären Transkriptionsfaktors Aktivator-Protein-1 (AP-1), der für die virale Transkription benötigt wird. Durch eine Mutation der *EVER* Proteine steht ausreichend Zink für AP-1 zur Verfügung und Beta-Papillomviren können replizieren. Die Bedeutung von AP-1 zeigt sich auch im Hinblick auf die unterschiedliche Infektiosität und das Auftreten von mukosalen und kutanen Papillomviren. Mukosale Papillomviren besitzen im Gegensatz zu den Beta-Papillomviren das Protein E5, wodurch sie in der Lage sind, die *EVER* Proteine zu inhibieren. Dadurch sind sie vermutlich wesentlich besser an zelluläre Prozesse adaptiert. Bisher konnte in ca 75 % der EV Patienten diese Mutationen nachgewiesen werden (Quint et al., 2014). Mutationen in *EVER1* und *EVER2* konnten auch in Cervixkarzinomen und Plattenepithelkarzinomen gezeigt werden (Castro et al., 2012; Patel et al., 2008). Diese Daten verstärken die Hypothese, dass Mutationen dieser Gene die Suszeptibilität für Papillomvirusinfektionen und die Entwicklung von Karzinomen begünstigt (Castro et al., 2012).

Die Durchseuchung mit Papillomviren ist in der Bevölkerung sehr hoch, die Infektionen bleiben jedoch meist asymptomatisch, da das Virus durch das Immunsystem kontrolliert wird. Ungefähr ein Drittel der EV-Patienten entwickeln im Laufe ihres Lebens nicht melanozytären Hautkrebs (*non melanoma skin cancer*: NMSC) (Lutzner, 1978). Besonders betroffen sind UV-exponierte Stellen des Körpers wie Stirn oder Nasenrücken. Das könnte damit zusammenhängen, dass manche kutane HPV-Typen über E6 die Degradation des proapoptotischen Proteins Bak unter UVB Strahlung bewirken, Reparaturenzyme stören oder die Zelle über p300/p53-abhängige Mechanismen Doppelstrangbrüche und Thymindimere fördern (Iftner et al., 2002; Jackson et al., 2000; Wallace et al., 2013; Wallace et al., 2012). Es wird vermutet, dass sich über diesen Weg UV-Licht induzierte DNA-Schäden in der Zelle anhäufen.

Onkogene Aktivität von HPV8

Die Eingliederung von HPV8 in die Gruppe der Tumoviren ist umstritten (Meyers et al., 2014). Die IARC (*International agency for research on cancer*) gibt an, dass für die Klassifizierung von HPV8 als Karzinogen keine ausreichenden Daten vorliegen (IARC Monograph, Vol. 100B). Im Zusammenhang mit EV-Patienten wird HPV8 als

„möglicherweise karzinogen“ (Gruppe 2B) eingestuft. Mukosale Hochrisiko-Typen wie HPV16 und HPV18 wurden aufgrund von epidemiologischen Daten (Seropositivität, Prävalenz, positive Korrelation in Tumoren), dem Nachweis viraler DNA im entsprechendem Gewebe und aufgrund des transformierenden Potentials der Onkoproteine E6 und E7, zum Teil auch E5, mit der Entstehung von Gebärmutterhalskrebs und Oropharynxkarzinomen assoziiert (zur Hausen, 1996). Mukosale Hochrisiko-Typen wie z.B. 16, 18 und 31 integrieren in das Wirtsgenom. Dieses Ereignis korreliert mit der Schwere der Erkrankung, da die Integration erst in späten Stadien der zervikalen Karzinogenese erfolgt (Williams et al., 2011). Kutane HPV Typen integrieren nicht, weshalb dies als ein Grund für die Klassifizierung als Niedrigrisiko-Typen aufgeführt wird (Feltkamp et al., 2008). Im Vergleich zu mukosalen Hochrisiko-Typen werden weniger virale Partikel kutaner Typen in der Haut detektiert (Akgul et al., 2006). Deshalb ist es fraglich, ob diese niedrige Kopienzahl biologische Relevanz für die Tumorinitiation und -aufrechterhaltung hat. Auch bei gesunden Personen wurden kutane HPV Typen detektiert, weshalb es schwierig ist, eine Kausalität zwischen HPV Infektion und NMSC herzustellen (Astori et al., 1998). Vertreter der Hit-and-Run-Hypothese sehen darin allerdings keinen Widerspruch: kutane HPV infizieren nur die Stammzellen der Haut und rufen dort Zellveränderungen, wie zum Beispiel die Degradation des proapoptotischen Proteins BAK, hervor (Meyers et al., 2014). Anschließend teilen sich diese Stammzellen permanent und geben die Veränderungen, wie eine gestörte DNA-Reparatur-Funktion, an ihre Tochterzellen weiter. Eine virale Persistenz wäre nach dieser Hypothese nicht nötig. Vor allem in Bereichen der Haut, die starkem Sonnenlicht ausgesetzt sind und somit eine gut funktionierende DNA-Reparaturmaschinerie benötigen, kommt es im Laufe der Jahre zur Anhäufung von DNA Schäden und der Ausbildung von NMSC (Wallace et al., 2012).

Versuche mit transgenen Mäusen zeigten, dass das frühe Protein E6 von HPV8 ebenso wie E6 von mukosalen Hochrisiko-Typen onkogenes Potential hat. Die komplette frühe Region (CER) des HPV8-Genoms wurde unter einem Keratin 14 Promotor in den Basalzellen der Epidermis exprimiert (Schaper et al., 2005). Dadurch wurden die viralen Proteine E1, E2, E4, E6 und E7 exprimiert. 91 % der heterozygoten Mäuse entwickelten nach 60 Wochen Tumore. Diese waren durch Papillome, Hyperkeratosen und verschiedengradige Dysplasien charakterisiert. 6 % der Mäuse entwickelten Plattenepithelkarzinome (SCC). Weitere Mausmodelle zeigten, dass die transgene Expression des HPV8 E6 Proteins für die Tumordinuktion ausreichend war (Marcuzzi et al., 2009). 97 % der heterozygoten Mäuse entwickelten Tumore mit den gleichen Charakteristika wie die CER-Mäuse. Bestrahlung mit UVA/UVB-Licht oder

Verletzung der CER- oder HPV8 E6-Mäuse bewirkte eine 100 %ige Tumorentwicklung nach nur 10-21 Tagen. Im Vergleich dazu entwickelten nur 8 % der heterozygoten HPV8 E2-transgenen Mäuse Tumore (Pfefferle et al., 2008). Die Tumore wuchsen außerdem langsamer und zeigten weniger Papillome und Hyperkeratosen.

3.3 p63, ein Mitglied der p53-Tumorsuppressorfamilie

3.3.1 Struktur und Familie

Das humane *p63*-Gen (weitere Bezeichnungen: *p40*, *p51*, *p71L*, *AIS*, *CUSP*, *KET*) wurde 1998 beschrieben und aufgrund der Sequenzhomologie der Genfamilie von p53 zugeordnet (Augustin et al., 1998; Osada et al., 1998; Trink et al., 1998; Yang et al., 1998). Es handelt sich um einen Transkriptionsfaktor. Die Homologien zu p53 und p73 beruhen auf der Aminosäuresequenz und der daraus resultierenden Quartärstruktur. Zwischen p53 und p63 besteht in der N-terminalen Transaktivierungsdomäne (TA) eine Sequenzähnlichkeit von 22%, die DNA-Bindedomänen (DBD) gleichen sich zu etwa 60%. Die Oligomerisierungsdomäne (OD) weist eine Homologie von 37% auf (Candi et al., 2008). Von p63 existieren zwei Isoformen mit unterschiedlichen N-Termini (Abbildung 5). Die Transkription erfolgt von zwei Promotoren. Die Volllängen-Form, TAp63, wird vom ersten Promotor P1 (A) abgelesen und besitzt die TA-, DBD- und OD-Domäne. Der interne Promotor P2 dient als Start für die zweite Isoform, wodurch ein um die TA-Domäne verkürztes Protein, Δ Np63, entsteht. Durch die fehlende TA-Domäne kann Δ Np63 zwar an DNA binden, die Expression von Zielgenen aber nicht aktivieren (Yang et al., 1998). Mittlerweile wurde eine weitere TA-Domäne (TA2) entdeckt, wodurch Δ Np63 Isoformen auch transaktivierende Funktion aufweisen (Dohn et al., 2001; Ghioni et al., 2002).

Durch differentielles Spleißen der mRNA entstehen C-terminal unterschiedliche Isoformen (Yang et al., 1998). Die α -Form von TAp63 und Δ Np63 besitzt als einzige Spleissvariante das sterile- α -Motiv (SAM) und die Transinhibitorische Domäne (TID). SAM ist eine klassische Protein-Interaktionsdomäne, die in vielen eukaryotischen Proteinen enthalten ist und dort die Oligomerisierung unterstützt (Ponting, 1995; Schultz et al., 1997; Thanos et al., 1999). In p63 übernimmt die OD-Domäne diese Funktion und SAM kann wegen seiner Bindung von Transkriptioninhibitoren als "Transkriptions-Repressions-Modul" beschrieben werden (Chi et al., 1999; Ghioni et al., 2002). Die TI-Domäne interagiert mit der N-terminalen TA-Domäne, wodurch die Transkription inhibiert wird. Die β - und γ - Isoform hingegen enthalten aufgrund transkriptioneller Modifikationen keine SAM und keine TID.

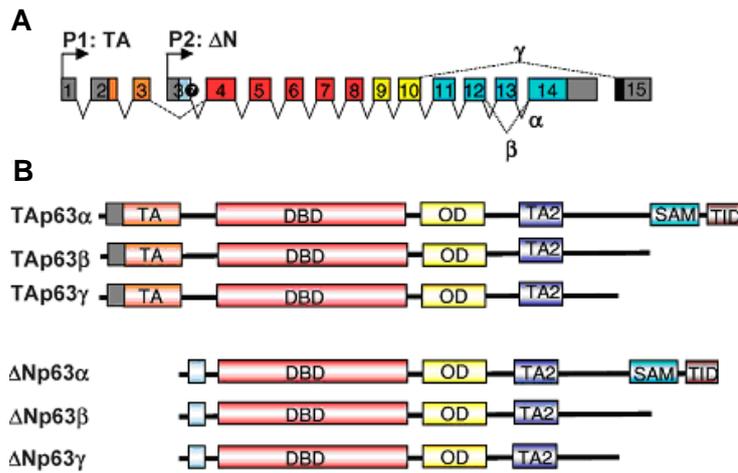


Abbildung 5. Gen- und Proteinstruktur von p63

(A) Struktur des p63 Gens: Die alternativen Promotoren P1 und P2 führen zu der Expression der TA und der N-terminal deletierten Isoform. Varianten (α , β , γ) entstehen durch alternatives Spleissen. (B) Schematische Darstellung der Proteindomänen von TAp63 und Δ Np63. Die wichtigsten Strukturdomänen sind angegeben: Transaktivierungsdomäne (TA), DNA-Bindedomäne (DBD), Oligomerisierungsdomäne (OD), Zweite TA Domäne (TA2), Steriles- α -Motif (SAM) und Transinhibitorische Domäne (TID) (Candi et al., 2008)

3.3.2 p63 als Masterregulator in der Epidermis

p63 ist ein entscheidender Transkriptionsfaktor für die Entwicklungsprozesse der Haut. Während der Embryogenese von Mäusen ist p63 das erste Mal an Tag 8,5 nachweisbar (Koster et al., 2004; Laurikkala et al., 2006; Mills et al., 1999). In adulten Keratinozyten wird hauptsächlich die Isoform Δ Np63 α exprimiert und ist in den Basalzellen detektierbar (Nylander et al., 2002; Parsa et al., 1999; Yang et al., 1998). Beginnen die Keratinozyten zu differenzieren, wird die Δ Np63 α Expression unterdrückt (Koster et al., 2004).

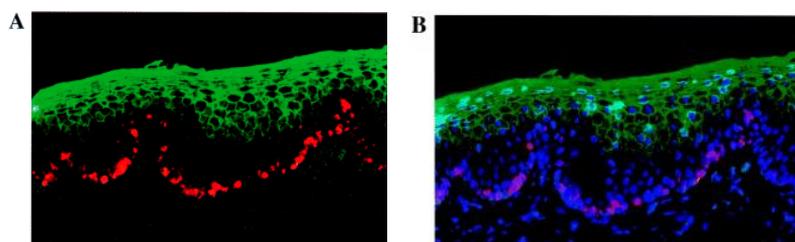


Abbildung 6. Schnitte humaner Vorhaut

(A) mit p63 (rot), Involucrin (grün) und (B) zusätzlicher Dapi-Färbung des Zellkernes (blau). (Parsa et al., 1999)

Abbildung 6 zeigt die Färbung von p63 in den Basalzellen humaner Vorhautepidermis. Die differenzierten Zellen der Haut exprimieren den Transkriptionsfaktor nicht mehr, hier kann der Differenzierungsmarker Involucrin in der Zellmembran der stratifizierten Schichten detektiert werden.

Die Hauptfunktionen von p63 sind trotz seiner Sequenzähnlichkeit zu p53 nicht die eines Tumorsuppressors, sondern die Aufrechterhaltung des Basalzell-Zustandes der Epidermis und der Entwicklung der Haut, wie Versuche an p63 *Knockout*-Mäusen ergaben (Mills et al., 1999; Yang et al., 1999). Mutationen im menschlichen p63 Gen erbrachten einen weiteren Beleg dafür, dass das Protein wichtig für epidermale Entwicklung ist. Bisher wurden fünf p63-Syndrome beschrieben, die schwerwiegende Entwicklungsdefekte zur Folge haben. Punktmutationen in der DBD führen zum EEC- (Ectrodactyly–Ektodermaldysplasi Clefing) Syndrom, einer Krankheit, die durch Fehlen von Fingern oder Zehen, der Bildung von Lippen-/Gaumenspalten und Anomalien ektodermaler Strukturen gekennzeichnet ist (Celli et al., 1999). Weitere Syndrome sind das AEC (Ankyloblepharon-Ektodermaldysplasie-Clefing)- oder Hay-Wells Syndrom, das ADULT (*Acro-dermato-ungual-lacrima-tooth*)-, SHFM (*split-hand/split-foot malformation*)- und LMS (*limb-mammary syndrome*)-Syndrom. Allen Defekten liegen Mutationen in unterschiedlichen Bereichen des p63 Gens zu Grunde und äußern sich in Entwicklungsfehlern an Händen, Füßen und im Kopfbereich (van Bokhoven et al., 2002).

Die molekularen Mechanismen, die der Aufrechterhaltung der Proliferation in den Basalzellen durch p63 zu Grunde liegen, sind nur teilweise verstanden. Einige Zielgene von p63 sind bekannt, wodurch sich die Abläufe in der Epidermis zum Teil erklären lassen. Ein bekanntes Zielgen ist p21, ein *cyclin-dependant-kinase* (CDK)-Inhibitor des Zellzyklus. Eine Bindestelle für p53 wird wegen der Sequenzhomologie in der DB-Domäne von p63 erkannt. p63 kompetitiert mit p53 um die Bindestelle und verdrängt das Protein am p21-Promotor. Aufgrund der fehlenden TA Domäne bleibt die Aktivierung des Gens aus. Normalerweise würde durch p53 eine Expression des Zellzyklusinhibitors erfolgen, was einen Arrest der Zellteilung zur Folge hätte. p63 treibt auf diesem Weg durch Inhibition des Inhibitors die Proliferation der Keratinozyten voran (Dohn et al., 2001; Westfall et al., 2003). Weitere Zielgene sind Differenzierungsmarker wie Loricrin und Involucrin, die in primären, humanen Keratinozyten direkt durch p63 aktiviert werden (De Laurenzi et al., 2000).

3.3.3 p63 und Notch

Ein Weg, wie p63 negativ reguliert werden kann, erfolgt über Notch (Nguyen et al., 2006). Notch Signalwege stellen eine wichtige Form der direkten Zell-Zellkommunikation dar und haben eine große Bedeutung in Differenzierungs- und Entwicklungsprozessen (Bray, 2006). Bei Notch handelt es sich um eine Familie von Rezeptoren, welche sich, im Zusammenhang mit der Epidermis, in den suprabasalen Keratinozyten befinden und Differenzierung induzieren (Abbildung 1) (Nickoloff et al., 2002; Rangarajan et al., 2001). Aktiviert wird Notch1, die Hauptform in der humanen

Epidermis, über die Bindung der basal exprimierten Liganden Delta-like1 (DL1), Jagged2 und des suprabasal exprimierten Liganden Jagged1 (Watt et al., 2008). Nach der Bindung an Notch1 wird der Rezeptor zweimal proteolytisch gespalten. Eine Spaltung erfolgt durch Metalloproteinasen (ADAM10/17 oder TACE), die zweite Spaltung erfolgt intrazellulär durch einen Gamma-Sekretase-Komplex, wodurch die intrazelluläre Notch Domäne frei wird (NICD). NICD gelangt in den Zellkern und bindet zusammen mit dem Coaktivator MAML1 an RBPJk, einen DNA-gebundenen Repressor. Dies bewirkt die Umwandlung in einen Aktivator-Komplex, wodurch Zielgene aktiviert werden (Watt et al., 2008). Weitere Faktoren wie die Acetyltransferase p300 stellen wichtige Coaktivatoren für MAML dar. Es wurde gezeigt, dass p300 über das C/H3 Motif den N-Terminalen Bereich von MAML bindet und acetyliert (Saint Just Ribeiro et al., 2007). Notch verändert über unterschiedliche Mechanismen die Differenzierung. Er wird als Tumorsuppressor in der Haut beschrieben, da beispielsweise eine Inhibition des Signalweges die spontane Entwicklung von Plattenepithelkarzinomen hervorruft (Proweller et al., 2006). Über die Aktivierung von p21 wird das Zellwachstum verlangsamt (Rangarajan et al., 2001). Außerdem reduziert Notch-Aktivität die Expression der $\alpha 6\beta 4$ -Integrine (Blanpain et al., 2009). Notch1 unterdrückt über IRF- und NF- κ B-Signalwege die Expression von p63 und induziert so die Differenzierung. Die Regulation erfolgt jedoch auch durch p63, das wiederum Notch1 hemmt (Abbildung 7) (Nguyen et al., 2006; Restivo et al., 2011).

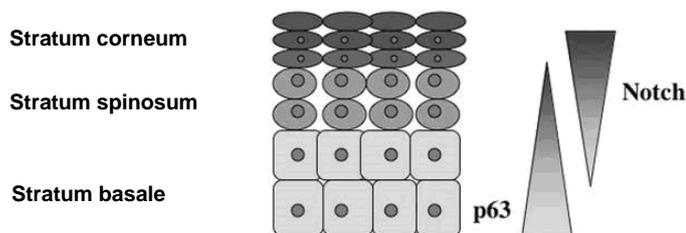


Abbildung 7. Dynamisches Modell der Notch-p63 Regulation

Das Schema der Epidermis illustriert den inversen p63 Expressionsgradienten versus Notch-Aktivität in den unterschiedlichen Schichten aufgrund der reziproken negativen Regulation. Verändert nach Nguyen et al. (2006).

Yugawa und Kollegen postulierten, dass die Überexpression von Δ Np63 in Plattenepithelkarzinom frühe Stadien der Onkogenese fördern, indem die Notch Expression reduziert wird und so Marker der Proliferation gefördert werden (Yugawa et al., 2010).

3.3.4 p63 und miR-203

Neben dem Notch-Signalweg wird Δ Np63 auch durch eine miRNA negativ reguliert. Die miR-203 wurde 2007 entdeckt und spielt eine entscheidende Rolle im Differenzierungsprozess der Haut (Sonkoly et al., 2007; Viticchie et al., 2012; Yi et al., 2008). Sie ist in den proliferierenden Keratinozyten des *Stratum basale* nicht detektierbar. Erst mit einsetzender Differenzierung im *Stratum corneum* ist eine Expression nachweisbar (Sonkoly et al., 2010; Wei et al., 2010). Luziferase-Assays haben gezeigt, dass miR-203 die 3'UTR von Δ Np63 binden kann und so die Bildung des Proteins verhindert wird (Lena et al., 2008; Yi et al., 2008). Mit beginnender Differenzierung der Keratinozyten wird also die Proliferation unterdrückt indem miR-203 p63 inhibiert. Wie die miR-203 selbst reguliert wird, ist weitgehend unklar.

3.4 microRNAs

3.4.1 Prozessierung und Funktion

MiRNAs sind kleine, nicht-kodierende RNAs mit einer Länge von etwa 22 Nukleotiden (nt), die posttranskriptionell Zielgene herunterregulieren. Diese kleinen RNAs wurden zunächst in dem Fadenwurm *C. elegans* entdeckt (Lee et al., 1993). Mittlerweile ist die essentielle Bedeutung in Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen erkannt und die regulatorischen RNAs wurden für Menschen, Tiere und Pflanzen nachgewiesen (Bartel, 2004).

MiRNAs werden mittels RNA-Polymerase II, seltener RNA-Polymerase III, aus genomischen Sequenzen transkribiert, die in kodierenden oder nicht kodierenden Regionen liegen (Borchert et al., 2006; Lee et al., 2004; Pfeffer et al., 2005; Rodriguez et al., 2004). Sie bilden über eine Schleife partielle doppelsträngige Bereiche aus. Zunächst wird aus diesen mehreren Kilobasen (kb)-langen Vorläuferprodukten, der *primary-miRNA* (pri-miRNA), eine etwa 60 nt lange *precursor-miRNA* (pre-miRNA) prozessiert. Beteiligt daran sind die RNase III Drosha und das RNA-bindende Protein DGCR8 (*DiGeorge syndrome chromosome region 8*) (Han et al., 2004). Die prozessierte pre-miRNA wird durch Exportin 5 aktiv in das Cytoplasma transportiert und durch eine weitere RNase, dem DICER-Komplex, auf 21-25 nt gekürzt (Grishok et al., 2001; Ketting et al., 2001; Lund et al., 2004). Dabei geht die Haarnadelstruktur verloren und es bleibt ein kurzes, doppelsträngiges RNA-Molekül mit 2 nt langen 3'-Überhängen. In den meisten Fällen wird entweder der 3'- oder der 5'-Arm als reife miRNA ausgewählt. Der andere Arm, auch als miRNA* bezeichnet, wird abgebaut (Dueck et al., 2014). Zusammen mit einem Protein aus der Argonautfamilie und TRBP (Transactivating Response RNA Binding Protein) bildet die miRNA den "*RNA induced silencing complex*" (RISC Komplex). Die miRNA bindet in der überwiegenden Zahl der

Fälle an die 3'UTR der Ziel-mRNA und leitet entweder deren Degradation ein oder inhibiert deren Translation. Welcher Mechanismus auftritt, hängt von der Sequenzübereinstimmung der miRNA mit der Ziel-mRNA ab (Chendrimada et al., 2005).

3.4.2 Regulation von miRNAs

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass miRNAs in Tumoren verstärkt oder verringert exprimiert werden, je nachdem ob sie als Onkogen oder Tumor-Suppressor wirken (Croce, 2009). Dies bewirkt die Deregulation von miRNA-Zielgenen, wodurch Metastasierung und Tumorwachstum verändert werden. Die Mehrzahl der Arbeiten beschäftigt sich mit der Identifikation potentieller miRNA-Ziel-mRNAs und untersucht weniger, wie die miRNAs selbst reguliert werden. Es gibt unterschiedliche Möglichkeiten, wie eine miRNA zur Expression gebracht werden kann. Zum einen kann die Sequenz innerhalb einer kodierenden Region eines anderen, Protein-kodierenden Genes liegen (Davis et al., 2009). In diesem Fall könnte die miRNA durch Spleißen oder alternatives Spleißen prozessiert werden. 50 % der miRNAs sind in fragilen genomischen oder Krebs-assoziierten Regionen kodiert, unter anderem auch nahe von HPV16-Integrationsstellen (Calin et al., 2004). Zum anderen kann die miRNA einen eigenen Promotor besitzen, der über epigenetische Mechanismen wie Methylierung von CpG-reichen Regionen oder Histonmodifikationen verändert ist, oder der direkt über Transkriptionsfaktor-Bindung aktiviert wird. So regulieren zum Beispiel c-Myc oder p53 die Transkription einiger miRNAs (He et al., 2007; O'Donnell et al., 2005). Die Analyse der Lokalisation aller humanen miRNAs (Stand Dezember 2014) ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1. Verteilung der Lokalisation humaner miRNAs

Berechnung erfolgte anhand der Seite <http://mirstart.mbc.nctu.edu.tw/>

5'UTR	3 %
Exon	5 %
Intron	45 %
Intergenisch	47 %

Über die Definition von CpG-reichen Regionen, Transkriptionsfaktorbindestellen, "Expressed Sequence Tags" (EST) und Transkriptionsstart-(TSS)-Analysen wird versucht, die pre-miRNA Transkripte von intergenischen miRNAs zu identifizieren (Saini et al., 2007). Dabei kann der TSS mehrere Kilobasen stromaufwärts der miRNA Sequenz liegen (Saini et al., 2007).

3.4.3 miR-203 und HPV

2010 wurde die Expression einiger HPV-kodierter microRNAs vorhergesagt (Gu et al., 2011). In einer Studie von 2013 wurden die ersten Sequenzen nachgewiesen und fünf miRNAs von HPV16 und je eine von HPV6, 45, 68 und 38 beschrieben (Qian et al., 2013). Die Funktionen dieser viralen miRNAs sind noch unbekannt. Die meisten Arbeiten fokussieren sich darauf, welche zellulären miRNAs durch das Virus dereguliert werden und welche Auswirkungen dies im Zusammenhang mit der Tumorentstehung und -progression hat, auch im Hinblick auf die Nutzung von miRNAs als prognostische Marker (Cai et al., 2006; Martinez et al., 2008; Ribeiro et al., 2014; Wang et al., 2009).

Eine für die Entwicklung und Differenzierung der Haut essentielle miRNA ist die miR-203, welche in differenzierten Keratinozyten induziert wird und den Proliferationsmarker p63 abbaut (siehe Kapitel 3.3.4). Neben p63 sind zahlreiche weitere Zielgene wie beispielsweise BMI1 oder SOCS3 identifiziert, welche in Proliferation und epidermale-mesenchymale Transition (EMT) involviert sind (Jackson et al., 2013; Lena et al., 2008; Wei et al., 2010; Wellner et al., 2009). Die Hairpin-Struktur ist auf Chromosom 14 in einem intergenischen Bereich kodiert. Induziert wird die miR-203 Expression mit beginnender Differenzierung der Keratinozyten (Viticchie et al., 2012; Yi et al., 2008). Experimentell wurde dies durch den Einsatz von Calcium oder Phorbol ester wie PMA (*phorbol 12-myristate 13 acetate*) erreicht. Durch diese Substanzen wird die Protein-Kinase-C aktiviert, deren Signalweg die Expression der Transkriptionsfaktoren AP-1 und C/EBP β induzieren (Angel et al., 1991; Goethe et al., 2007; Sperling et al., 2012). Sonkoly und Kollegen (2010) haben in einem Genabschnitt der miR-203, welcher vermutlich der Promotorregion entspricht, eine mögliche AP-1 Transkriptionsfaktor-Bindestelle identifiziert. In der Maus wurde der Transkriptionsstart der miR-203 identifiziert und 100 bp stromaufwärts der miR-203 Hairpin-Struktur lokalisiert (Jackson et al., 2013). Promotor-Reporteranalysen zeigten weiter, dass der murine miR-203 Promotor über Calcium induziert werden konnte. Außerdem wurden durch *in silico* Analysen zahlreiche mögliche Transkriptionsfaktorbindestellen für beispielsweise AP-1, IRF7 oder C/EBP β vorhergesagt.

Die Expression der miR-203 ist unter anderem in Zervixkarzinomen unterdrückt (Cheung et al., 2012; Lee et al., 2008; Zhang et al., 2011). Zwei Studien knüpfen in diesem Zusammenhang die Deregulation der miR-203 an die Aktivität der mukosalen HPV Onkoproteine E6 und E7. HPV31 E7 unterdrückt über Inhibition des PKC-Signalweges die Induktion der miR-203 unter differenzierungs-stimulierenden Bedingungen, wodurch die Expression des Zielgens p63 nicht mehr verringert wurde

(Melar-New et al., 2010). Der genaue molekulare Mechanismus blieb allerdings ungeklärt. Eine weitere Arbeit zeigte, dass HPV16 E6 über die Degradation von p53, welcher als miR-203 Aktivator beschrieben wurde, deren Expression unterdrückt (McKenna et al., 2010). Zur Deregulation der miR-203 in EV-Patienten im Kontext kutaner HPV-Typen ist noch nichts bekannt.

3.5 Der Transkriptionsregulator p300

Der Transkriptionsaktivator p300 wurde über die Bindung an das Ad-E1A Protein identifiziert (Eckner et al., 1994a; Eckner et al., 1994b). Es handelt sich um eine 300 kDa große Acetyltransferase. Über Acetylierung von Histonen, vorwiegend an H2B K12 und K15, H3 K14 und K18, H4 K5 und K8, wird das Chromatin für die Transkription geöffnet. Als Brückenprotein bindet es über Cystidin/Histidin reiche Regionen (C/H1-3) verschiedene Transkriptionsfaktoren und agiert über Acetylierung als Coaktivator (Kalkhoven, 2004). Akt-Kinasen sind wichtige Regulatoren der p300 Aktivität, da diese p300 an Serin-1834 phosphorylieren und somit die proteasomale Degradation von p300 verhindern (Chen et al., 2004). p300 spielt eine Schlüsselrolle in zahlreichen Signalwegen und wird als Onkogen diskutiert (Goodman et al., 2000). Über die Bindung und Acetylierung von p53 wird dessen DNA-Bindung und Transaktivierung von Zielgenen verstärkt (Gu et al., 1997). Im Zusammenhang mit Keratinozyten ist die p300-vermittelte Acetylierung von p53 wichtig für die Induktion der Differenzierung und die Suppression von Proliferation durch verstärkte p21 Expression (Wong et al., 2010). p300 bindet (Howie et al., 2011), zusammen mit AP-1-Transkriptionsfaktoren (Crish et al., 2008), an den Involucrin Promotor und aktiviert diesen. Exprimiert wird p300 in den differenzierten Schichten der Epidermis (Muller et al., 2002). Auch der Notch-Signalweg wird über die Bindung von p300 mit MAML beeinflusst (Saint Just Ribeiro et al., 2007). Es sind zahlreiche Interaktionen mit viralen Proteinen bekannt. Das humane T-lymphotrope Virus 1 (HTLV-1) und HPV nutzen p300 für die eigene Replikation (Goldman et al., 1997). HPV8 E2 interagiert, zusammen mit E6, mit p300 und aktiviert den frühen und späten viralen Promotor (Muller-Schiffmann et al., 2006; Muller et al., 2002). Wie bereits beschrieben können HPV5 und HPV8 E6 über die Bindung an p300 dessen Stabilisierung verhindern, wodurch die p300-Degradation induziert wird (Howie et al., 2011).

3.6 AP-1 Signalweg

Die Familie der AP-1 Transkriptionsfaktoren umfasst mehrere Mitglieder, die als Hetero- und Homodimere Zielgene aktivieren. Sie besteht aus JUN (v-Jun; c-Jun, JUND, JUNB), JDP (JDP1/2), FOS (v-Fos, c-Fos, Fra-1, Fra-2, FosB), ATF/CREB

(CREB, ATF1, ATF2, ATF4, ATF5, ATF6a, ATF6b, ATF7, ATF3/LRF1, B-ATF; ATFa0) and MAF (v-Maf, c-Maf, Nrl, MafB, MafF, MafG, MafK) (Kappelman et al., 2014). Die Transkriptionsfaktoren bestehen aus einer basischen DNA-Binde-Domäne, einer Leucin-Zipper-Domäne, über welche die Dimerisierung erfolgt, und einer Transaktivierungsdomäne. Die AP-1 Konsensus-DNA-Bindesequenz 5'-TGA(C/G)TCA-3' wird als TPA-responsives Element (TRE) bezeichnet (Angel et al., 1987; Nakabeppu et al., 1988). AP-1 Faktoren vermitteln die Genregulation nach Stimulation durch Zytokine oder Wachstumsfaktoren. Ihre Aktivierung erfolgt über den PKC-Signalweg, welcher experimentell über Calcium- oder Phorbol ester-Stimulation (PMA) aktiviert werden kann (Angel et al., 2001). AP-1 Faktoren spielen eine wesentliche Rolle in der Proliferation, Migration, Apoptose und Differenzierung. Auch in der Haut ist die Interaktion verschiedener AP-1 Faktoren im Zusammenspiel von Keratinozyten und Fibroblasten bedeutend, wobei die Funktion der einzelnen AP-1 Komponenten sehr unterschiedlich ist (Shaulian et al., 2002). In Bezug auf die Funktion in Keratinozyten sind mittlerweile eine Vielzahl von Zielgenen identifiziert worden, welche AP-1 Bindestellen aufweisen und über verschiedene Heterodimere reguliert werden (Angel et al., 2001). Dabei handelt es sich hauptsächlich um Gene der Zytokeratinfamilie wie Keratin 1 oder Transglutaminasen (Eckert et al., 1996). Der Involucrin Promotor wird durch Fra-1, JunB und JunD aktiviert (Welter et al., 1995). AP-1 Faktoren sind demnach wesentlich an der Induktion der Differenzierung beteiligt, können aber auch Einfluss auf die Proliferation nehmen. c-Jun inhibiert p53 und induziert Cyclin D1, während JunB die Proliferation über Induktion von p16 und Inhibition von Cyclin D1 negativ beeinflusst (Zenz et al., 2006). JunB aktiviert zusammen mit Fra-1 den β_4 -Integrin Promotor, wodurch Differenzierung unterdrückt wird (Oldak et al., 2010). HPV8 E2 verdrängt JunB/Fra-1 von der AP-1 Bindestelle des β_4 -Integrin Promotors und unterdrückt dadurch die ersten Schritte der Keratinozytendifferenzierung.

3.7 Ziele der Doktorarbeit

Im Zusammenhang mit der Genodermatose *Epidermodysplasia verruciformis* ist das humane Papillomvirus Typ 8 als mögliches Karzinogen beschrieben. Im Gegensatz zu mukosalen Hochrisiko-Papillomviren ist die Einflussnahme von HPV8 auf die Keratinozytendifferenzierung und -proliferation weniger gut verstanden. Ziel der Arbeit war es, neue Einblicke in diese Mechanismen zu erarbeiten, um sie auch im Hinblick auf das tumorigene Potential von HPV8 besser zu verstehen. Dabei sollte zunächst untersucht werden, wie der Transkriptionsfaktor $\Delta Np63\alpha$ und dessen Inhibitor, die miR-203, in EV-Läsionen, in HPV8 E6- und E7-exprimierenden Keratinozyten sowie in organotypischen Kulturen exprimiert wird. Desweiteren sollten die Mechanismen aufgeklärt werden, wie HPV8 E6 die miR-203 reguliert und welche zellulären Funktionen, die durch HPV8 E6 beeinflusst werden, vom miR-203/p63 Signalweg abhängen.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Eukaryontische Zelllinien

NFK (*Normal foreskin keratinocytes*)

Humane Keratinozyten, isoliert aus Vorhaut von Knaben. Die Spender wurden anonymisiert. Durchgeführt von Barbara Best, AG Smola.

HaCaT Zellen (*Human adult low calcium high temperature*)

Humane Keratinozytenzelllinie aus der Rückenhaut, durch spontane Transformation immortalisiert, mit mutiertem p53 Protein (Boukamp et al., 1988).

HaCaT pLXSN / HaCaT pLXSN 8E6 / HaCaT pLXSN 8E7 / HaCaT pLXSN 8E6/E7

Stabil retroviral infizierte HaCaT Zellen. Infiziert wurde mit dem Leervektor pLXSN, pLXSN-HPV8 E6, pLXSN-HPV8 E7 oder pLXSN HPV8 E6/E7.

NFK pLXSN / NFK pLXSN 8E6 / NFK pLXSN Δ 8E6 / NFK pLXSN 8E7 / NFK pLXSN 8E6/8E7

Stabil retroviral infizierte NFK. Infiziert wurde mit dem Leervektor pLXSN, pLXSN-HPV8 E6, pLXSN-HPV8 Δ E6, pLXSN-HPV8 E7 oder pLXSN HPV8 E6/E7.

VHF (*Vorhautfibroblasten*)

Humane Fibroblasten isoliert aus Vorhaut von Knaben. Die Spender wurden anonymisiert. Durchgeführt von Barbara Best, AG Smola.

4.1.2 Bakterienstämme

DH10B TonA	<i>E.coli</i>	Imagenes, Berlin
MOS Blue	<i>E.coli</i>	GE Healthcare, Solingen

4.1.3 Kulturmedien und Reagenzien für die Zellkultur

4.1.3.1 Medien und Zusätze

Adenin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ampicillin 100 mg/ml	Ratiopharm, Ulm
Choleratoxin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Sigma Aldrich, Steinheim
DMEM High Glucose (4,5 mg/ml) mit L-Glutamin	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMEM:F12 mit Glutamax	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim

Epidermal Growth Factor	Life Technologies, Darmstadt
Geneticin Sulphat (G-418)	PAA, Pasching
Fötale Kälberserum (FKS)	PAA, Pasching
HEPES buffered saline	Lonza, Köln
Hydrocortison	Sigma-Aldrich, Steinheim
Insulin	Sigma-Aldrich, Steinheim
KBM-Gold Medium	Lonza, Köln
KGM-Gold Single Quots	Lonza, Köln
Kollagen-Elastin Matrix	Medskin solutions, Billerbeck
LB-Medium:Difco LB Broth	BD Pharmingen, Heidelberg
OptiMem	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin, Streptomycin	Sigma Aldrich, Steinheim
Penicillin 10.000 Units/ml	
Streptomycin 10 mg/ml	
Plasmocin	Invivogen, Toulouse, Frankreich
Sodium-Pyruvat, 11 g/l	Sigma Aldrich, Steinheim
Trypsin, 2,5 mg/ml	Sigma Aldrich, Steinheim
Trypsin neutralizing solution	Lonza, Köln
Trypsin/EDTA, 0,25mg/ml	Lonza, Köln
Transferrin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Triiodothyronin	Sigma-Aldrich, Steinheim

Vollmedium für NFK

KBM-Gold Medium, mit allen Single Quots versetzt

Vollmedium für HaCaT Zellen/ VHF

DMEM, mit 10 % (v/v) FKS, 1 mM Natrium-Pyruvat und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin

Vollmedium für retroviral infizierte HaCaT Zellen

Vollmedium für HaCaT Zellen wurde zusätzlich mit 0,2 mg/ml G-418 versetzt

Vollmedium für organotypische Kulturen (RTS3b Medium)

DMEM high Glucose und DMEM:F12 mit Glutamax im Verhältnis 1:1

FKS	10 % (v/v)
Natrium-Pyruvat	1 mM
Penicillin/ Streptomycin	100 U/ml
Hydrocortison	0,4 µg/ml
Choleratoxin	10 ng/ml
Epidermal Growth Factor	10 ng/ml

Transferrin	20 µg/ml
Adenin	123,5 µg/ml
Insulin	20 µg/ml
Triiodothyronin	13,6 ng/ml

Einfriermedium

HaCaT Zellen, VHF: 90 % FKS mit 10 % DMSO

NFK: 10 % DMSO, 10 % FKS, 80 % KBM-Gold Medium

Kulturmedium für *E.coli*

500 ml LB-Medium wurde nach Herstellerangaben fertig gestellt, autoklaviert und mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt.

4.1.3.2 Reagenzien für Transfektion

- microRNA-Mimic Transfektion:

Synthetische hsa-miR-203	Dharmacon, Lafayette, USA
All Stars Negative Control siRNA	Qiagen, Hilden
Lipofectamine RNAiMax Transfektionsreagenz	Life Technologies, Darmstadt

- Transiente Transfektion in HaCaT

Lipofectamine 2000 Transfektionsreagenz	Life Technologies, Darmstadt
---	------------------------------

- Transiente Transfektion in NFK:

Transfast Transfektionsreagenz	Promega, Mannheim
--------------------------------	-------------------

- siRNA Transfektion:

ON-TARGETplus Human siRNA	Dharmacon, Lafayette, USA
Lipofectamine RNAiMax Transfektionsreagenz	Life Technologies, Darmstadt

4.1.4 Plasmide

4.1.4.1 Expressionsplasmide

pLXSN (5,9 kbp) (Clontech, Mountain View, USA)

Hierbei handelt es sich um einen Vektor zur Transfektion von Verpackungszelllinien zur Produktion von Überständen mit retroviralen Partikeln. Das Zielgen wird vom 5'LTR Promotor aus exprimiert. Der Vektor trägt ein Neomycin-Resistenz-Gen.

pLXSN-HPV8 E6 (6615bp) (freundlicherweise überlassen von H. Pfister)

Der ORF von HPV8 E6 wurde durch PCR amplifiziert und über die Schnittstellen für *Bam*HI und *Eco*RI in den pLXSN-Vektor inkloniert (Leverrier et al., 2007).

pLXSN-HPV8 ΔE6 (6600bp) (AG Smola)

In das pLXSN-HPV8 E6 Plasmid wurde über Mutagenese PCR eine Deletion von Aminosäure 132–136 eingefügt (Howie et al., 2011; Muller-Schiffmann et al., 2006).

pLXSN-HPV8 E7 (6212bp) (freundlicherweise überlassen von H. Pfister)

Das HPV8 E7 Gen wurde durch PCR amplifiziert und über die Schnittstellen für *Bam*HI und *Eco*RI in den pLXSN-Vektor eingebracht (Akgül et al., 2005).

pLXSN-HPV8 E6/E7 (freundlicherweise überlassen von H. Pfister)

Die E6 und E7 ORFs von HPV8 wurden zusammen durch PCR amplifiziert und in pCR-Blunt zwischenkloniert. Das HPV8 E6/E7 enthaltende DNA-Fragment wurde durch Verdau mit *Bam*HI und *Xho*I aus pCR-Blunt isoliert und in den pLXSN-Vektor eingebracht (Akgül et al., 2005).

pCG-JunB/JunB: (Bakiri et al., 2002)

pCMV-p300-HA: p300 wurde über PCR amplifiziert und über die Schnittstellen für *Not*I und *Hind*III in pCMV kloniert. (Eckner et al., 1994b)

pEGFP-C1: Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich

Alle Plasmide wurden über Sequenzierung überprüft.

4.1.4.2 Luziferase-Konstrukte

pGL3Basic-miR-203P1170 (5988bp): Der miR-203 Promotor wurde aus genomischer DNA durch PCR amplifiziert, in pGEM Vektor zwischenkloniert und anschließend durch Verdau mit *Mlu*I und *Xho*I in den pGL3-Basic Vektor eingebracht (Wellner et al., 2009). Das Plasmid wurde über Sequenzierung überprüft.

4.1.4.3 qRT-PCR Standards

Alle Plasmide wurden über Sequenzierung überprüft.

pCMV-Sport6-CDSN:	<i>Eco</i> RV, <i>Not</i> I; Imagenes, Berlin
pCR BluntII TOPO-CNFN:	TOPO Sites; Imagenes, Berlin
pOTB7-DKK1:	<i>Xho</i> I, <i>Eco</i> RI; Imagenes, Berlin
pCMV-Sport6-Involucrin:	<i>Eco</i> RV, <i>Not</i> I; Imagenes, Berlin
pSPORT1 sfi- JMJD1C:	sfi; Imagenes, Berlin
pCMV-Sport6-JMJD3:	<i>Eco</i> RV, <i>Not</i> I; Imagenes Berlin
pCMV-Sport6-Keratin 10:	<i>Eco</i> RV, <i>Not</i> I; Imagenes, Berlin
pCR BluntII TOPO-LCE2B:	TOPO Sites; Imagenes Berlin
pCMV-p53:	<i>Bam</i> HI (Baker et al., 1990)
pGex-ΔNp63α:	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Römer, Jose Carreras Zentrum, Homburg
pCMV-Sport6-RPL13A:	<i>Eco</i> RV, <i>Not</i> I; Imagenes, Berlin

4.1.5 Oligonukleotide

DNA-Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Aldrich, Steinheim, bezogen.

4.1.5.1 cDNA Synthese

Für die cDNA Synthese wurden Random Hexamer Oligonukleotide eingesetzt.

4.1.5.2 Realtime PCR

Die Sequenzen wurden mit dem Programm Universal ProbeLibrary (UPL) von der Firma Roche, Mannheim, erstellt, welches auch die passenden Sonden angibt. Dabei wurden die Sequenzen so gewählt, dass ein Primer mit zwei Exons hybridisiert, um keine genomische DNA zu amplifizieren (*'Intron-Spanning'*).

Tabelle 2. Primer für die RT-PCR und für die PCR benötigte MgCl₂ Konzentration und Sondennummern

Gen	Sense und Antisense Primer	MgCl ₂ Konzentration	Sonden Nr. von UPL
HPV8 E6	5'-CCGCAACGTTTGAATTTAATG-3' 5'-ATTGAACGTCTGTAGCTAATTCA-3'	5 mM	13
HPV8 E7	5'-AGGAATTACCAAACGAACAGGA-3' 5'-CACGGTGCAACAATTTTGAATA-3'	3 mM	63
CDSN	5'-TCCAAGGGACCCTGCTCT-3' 5'-GGTAGGGTAAACCGGAGCTG-3'	3 mM	3
CNFN	5'-ACTGCTGCAACGACATGC-3' 5'-GCACTCGCCAAAGTCGTC-3'	3 mM	82
Dickkopf1	5'-TTCTCCCTCTTGAGTCCTTCTG -3' 5'-CTACCATCGCGACAAAGACC -3'	4 mM	21
DNMT1	5'-CGATGTGGCGTCTGTGAG-3' 5'-TGTCTTGCAGGCTTTACATT-3'	5 mM	66
Involucrin	5'-AAGGGATCAGCAGCTAAAC AAA-3' 5'-TTGATCCAGTTGCTGGTCTAAG-3'	5 mM	11
JMJD1C	5'-TACATCACGACGCAGGTCTC-3' 5'-ATTTGCTTGGGCACGTGTAT-3'	4 mM	76
JMJD3	5'-AATCAGCGACCCCGACTT-3' 5'-TGGCAGTGCTTCATGGAC-3'	2 mM	40
JunB	5'-ATACACAGCTACGGGATACGG-3' 5'-GCTCGGTTTTCAGGAGTTTGT-3'	3 mM	49
ΔNp63α	5'-GGAAAACAATGCCCAGACTC-3' 5'-CTGCTGGTCCATGCTGTTTC-3'	4 mM	45
LCE2B	5'-TCCACCTAAGTGTCCTCCCTA-3' 5'-ACCACAGCAAGAAGAGACTGC-3'	3 mM	43
MAML1	5'-TATGCCTTTCCGATCACTGG-3' 5'-CTGGGTCCCAACTGGTAG-3'	3 mM	68
p53	5'-GGGAGCACTAAGCGAGCA -3' 5'-TTGAAAGCTGGTCTGGTCCT -3'	3 mM	17
p300	5'-CAAGCAAAGAACCAGCAGAA-3' 5'-CATTTACTCCCATAGGACTAGCACTC-3'	4 mM	64
RPL13A	5'-AGCGGATGAACCAACC-3' 5'-TTTGTGGGGCAGCATACTC-3'	4 mM	28

4.1.5.3 Klonierung

pGL3Basic-miR-203P1170

Folgende Oligonukleotide wurden für die Klonierung der miR-203 Promotorsequenz in den Reportervektor pGL3Basic verwendet.

Forward mit *MluI* Sequenz (Großbuchstaben): 5'- ACGCGTtgctgccaaccccatac -3'

Reverse mit *XhoI* Sequenz (Großbuchstaben): 5'- CTCGAGgagctgctggagagaggag -3'

4.1.5.4 Bisulphitsequenzierung

In Großbuchstaben sind die universellen Illumina Adapter Sequenzen angegeben, in Kleinbuchstaben die miR-203-Promotor spezifischen Sequenzen.

MiSeq_miR-203-1_F:

5'-TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTgttgagtagggattttt-3'

MiSeq_miR-203-1_R:

5'-GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTaccccctaccctactacaa-3'

MiSeq_miR-203-2_F:

5'-TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTgggtggttagtagggtag-3'

MiSeq_miR-203-2_R:

5'-GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTccctaactataactctaactccaaa-3'

MiSeq_miR-203-3_F:

5'-GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTcctggagtcagagtcacagtcaggggt-3'

MiSeq_miR-203-3_R:

5'-GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTgcagcctgatgggcagctcccagga-3'

MiSeq_miR-203-4_F:

5'-TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTggcttctgggagctgccatcaggc-3'

MiSeq_miR-203-4_R:

5'-GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTagaggacacagcaggccaggcagca-3'

4.1.5.5 Electromobility Shift Assay (EMSA)

Die AP-1 Bindestellen sind unterstrichen.

AP-1 consensus (Oldak et al., 2010)

Sense 5'-CGC TTG ATG ACT CAG CCG GAA-3'

antisense 5'-TTC CGG CTG AGT CAT CAA GCG-3'

miR-203 AP-1 BS-I

sense 5'-ACACCTCCAGGTGACTAAGTGGGTAGGACC-3'

antisense 5'-GGTCCTACCCACTTAGTCACCTGGAGGTGT-3'

miR-203 AP-1 BS-II

sense 5'-CGGGGCGGCCGCTGAGTCAGGGCCACCCCC-3'

antisense 5'-GGGGGTGGCCCTGACTCAGCGGCCGCCCCG-3'

miR-203 AP-1 BS-II Mut

sense 5'-GGCGGGGCGGCCGATAAGGCCGTGCCACCCCCGCGC-3'

antisense 5'-GCGCGGGGGTGGCACGGCCTTATCGGCCGCCCCGCC-3'

4.1.5.6 Mutagenese PCR

Die Mutagenese des pLXSN-HPV8E6 Plasmides zur Generierung der Δ 8E6 Mutante wurde von Alina Fingerle (AG Smola) nach Literaturangaben durchgeführt und durch Sequenzierung überprüft (Howie et al., 2011).

4.1.5.7 Mykoplasmen-PCR

Sense Primer:

5'-CGC CTG AGT AGT ACG TTC GC-3'

5'-CGC CTG AGT AGT ACG TAC GC-3'

5'-TGC CTG GGT AGT ACA TTC GC-3'

5'-TGC CTG AGT AGT ACA TTC GC-3'

5'-CGC CTG AGT AGT ATG CTC GC-3'

5'-CAC CTG AGT AGT ATG CTC GC-3'

5'-CGC CTG GGT AGT ACA TTC GC-3'

Antisense Primer:

5'-GCG GTG TGT ACA AGA CCC GA-3'

5'-GCG GTG TGT ACA AAA CCC GA-3'

5'-GCG GTG TGT ACA AAC CCC GA-3'

4.1.5.8 siRNA und miR-203 Mimic

siRNA und miR-203 Mimic wurden, wenn nicht anders indiziert, von der Firma Dharmacon, Lafayette, USA, bezogen. Die siRNA, außer die "non-targeting" Kontrolle, besteht aus einem Gemisch von vier Sequenzen.

ON-TARGETplus Non Targeting siRNA #2

Sequenz nicht öffentlich bekannt

ON-TARGETplus SMARTpool siRNA EP300

ggacuaccuaucaaguua

gacaaggauaugccuaa

guucauaaugccuggua

cgacaggaugcagcaaca

ON-TARGETplus SMARTpool siRNA TP73L (p63)

gaugaacuguuauacuuac

cgacagucuuguacaauuu

gcacacagacaaaugaauu

ucuaucagauugagcauuu

miRIDIAN Mimic Hsa-miR-203

gugaaauguuuaggaccacuag

miRNA Mimic Allstars negative control (Qiagen)

Sequenz nicht öffentlich bekannt

4.1.5.9 Sondenherstellung für Northern Blot

Das DNA Template hsa-miR-203 für die Synthese der miR-203 Sonde enthält eine Bindestelle für den T7 Promotor (unterstrichen).

hsa-miR-203 5'-GTGAAATGTTTAGGACCACTAGCCTGTCTC-3'

4.1.7 Antikörper

In Tabelle 3 sind die Antikörper aufgelistet, die für Western Blot, Immunhistochemie (IHC) und EMSA verwendet wurden.

Tabelle 3. Antikörper und eingesetzte Verdünnungen

Antigen	Isotyp/ Klon	Spezies	Verdünnung		EMSA	Firma
			WB	IHC		
Aktin	Monoklonal	Maus	1:5000	-	-	Sigma- Aldrich, Steinheim
c-Fos	Polyklonal 4X	Kaninchen	-	-	2 µg/Ansatz	Santa Cruz, Heidelberg
c-Jun	Polyklonal NX	Kaninchen	-	-	2 µg/Ansatz	Santa Cruz, Heidelberg
Involucrin	Monoklonal SY5	Maus	1:10000	1:80000	-	Sigma- Aldrich, Steinheim
JunB	Polyklonal 210X	Kaninchen	1:5000	-	2 µg/Ansatz	Santa Cruz, Heidelberg
JunD	Polyklonal 329X	Kaninchen	-	-	2 µg/Ansatz	Santa Cruz, Heidelberg
Fra-1	Polyklonal R-20X	Kaninchen	-	-	2 µg/Ansatz	Santa Cruz, Heidelberg
Fra-2	Polyklonal Q-20X	Kaninchen	-	-	2 µg/Ansatz	Santa Cruz, Heidelberg
Kaninchen IgG Peroxidase- konjugiert	Polyklonal	Ziege, IgG	1:5000	-	-	Sigma- Aldrich, Steinheim
Maus IgG Peroxidase- konjugiert	Polyklonal	Kaninchen, IgG	1:5000	-	-	Sigma- Aldrich, Steinheim
p300	Monoklonal RW128	Kaninchen	1:1000	1:1000	-	Millipore, Schwalbach
p63	Monoklonal 4A4	Maus	1:1000	1:400	-	Santa Cruz, Heidelberg

4.1.9 Molekulargewichtsmarker

Für die relative Molekulargewichtsbestimmung in SDS-Gelen wurde der 'Prestained und High Range Protein Molecular Weight' Marker von der Firma Fermentas, St. Leon Roth, verwendet.

4.1.10 Enzyme

Enzyme wurden von den Firmen Fermentas, St. Leon-Roth und New England Biolabs, Frankfurt am Main, bezogen.

4.1.11 Reagenziensysteme

Nukleinsäuren

mRNA Kit	Macherey & Nagel, Düren
miRNA Kit	Macherey & Nagel, Düren
Nucleobond PC100	Macherey & Nagel, Düren

Northern Blot

miRVana Kit	Ambion, Darmstadt
-------------	-------------------

Immunhistochemie

Vector, Burlingame, CA, USA

cDNA Synthese und RT-PCR

a) RT-PCR für cDNA aus mRNA

cDNA Synthese: SuperScriptII	Invitrogen, Karlsruhe
qRT- PCR: FastStart Taq DNA Polymerase, dNTPack 5 U/μl	Roche, Mannheim

b) RT-PCR für cDNA aus miRNA

cDNA Synthese: TaqMan MicroRNA RT Kit, TaqMan MicroRNA Assay	
qRT-PCR: TaqMan Universal PCR Master Mix	
Alle Produkte von	Life Technologies, Darmstadt

4.1.12 Radioaktive Isotope

γ - ³² P-dUTP	Hartmann Analytik, Braunschweig
γ - ³² P-dATP	Perkin Elmer, Rodgau

4.1.13 Chemikalien und Membranen

50 x Denhardt's Solution	Invitrogen, Karlsruhe
5-Aza-2'-deoxycytidin	Sigma Aldrich, Steinheim
Agarose Seakem®	Lonza, Köln
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ampicillin	Bayer, Leverkusen

ATP	Sigma Aldrich, Steinheim
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bisacrylamid	Serva, Heidelberg
Blocking Reagent	Boehringer, Mannheim
Bovines Serumalbumin (BSA)	Fermentas, St. Leon-Roth
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Chlorophorm	VWR, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DPBS	Gibco, Karlsruhe
Ethanol absolut	Roth, Karlsruhe
Ethanol, MEK vergällt	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fixierer Konzentrat	Kodak, Stuttgart
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Serva, Heidelberg
Hybond N+ Membran	Amersham, Freiburg
Hyperfilm ECL™	Amersham, Freiburg
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Luziferin	Applichem, Darmstadt
Magermilchpulver	Heirle
Methanol	VWR, Darmstadt
3-Mercapto-1,2-propandiol	Sigma-Aldrich, Steinheim
1-Methylimidazol, 99 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Nitrocellulosemembran (Protran™)	Schleicher & Schuell, Dassel
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Nukleotide (dNTPs)	PeqLab, Erlangen
PMA (Phorbol 12-myristate 13- acetate)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Polybrene	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Steinheim
Protran Nitrozellulose Transfermembran	Whatman, Dassel
Röntgen-Entwickler-Konzentrat	AGFA, Mortsel, Belgien
Rotiphorese Gel A 30 % Acrylamid	Roth, Karlsruhe

Rotiphorese Gel B	Roth, Karlsruhe
2 % Bisacrylamid	
Seakem LE Agarose	Lonza, Köln
SequaGel® Sequencing System	National Diagnostics, Atlanta, USA
Verdünner	
Urea Gel Konzentrat und Verdünnung	
Urea Gel Puffer	
SuperSignal West Dura Kit	Thermo Scientific, Braunschweig
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	ICN Biomedicals, Inc., Eschwege
Triton-X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trizol Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Serva, Heidelberg

4.1.14 Puffer und Lösungen

DNA und PCR

TAE-Puffer 50x:

Tris	2 M
Natriumacetat	25 mM
EDTA	0,5 M
ad pH 7,8 mit Essigsäure	

dNTPs

dATP, dCTP, dGTP, dTTP je 10 mM

Blaumarker:

Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
Glycerol	50 % (v/v)
EDTA	50 mM

Puffer 2: (Mycoplasmen PCR)

Tris HCL pH 8,85	750 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	200 mM
MgCl ₂	20 mM
Tween 20	1 %

Luziferase-Assay

Extraktionspuffer

KPO ₄ , pH 7,8	100 mM
Igepal 630	0,5 %

Reaktionspuffer

KPO ₄ , pH 7,8	100 mM
MgSO ₄	5 mM
ATP	5 mM
D-Luziferin	140 µg/µl

Northern Blot**Ethidiumbromidlösung:**

Ethidiumbromid	10 mg/ml H ₂ O
----------------	---------------------------

Hybridisierungspuffer

20 x SSC	7,5 ml
10 % SDS	21,0 ml
1 M Na ₂ HPO ₄	0,6 ml
50 x Denhardt's Solution	0,6 ml
Blockreagenz	2 mg

2x Bromphenolblau-Ladepuffer

Urea	8 M
EDTA	50 mM
Bromphenolblau	0,2-0,4 mg/ml

20x SSC-Puffer

NaCl	3 M
Tri-Natriumcitrat-2-hydrat	0,3 M

Stripping-Puffer

Tris/HCl, pH 8,0	5 mM
EDTA	0,2 mM
NaPP	0,05 % (w/v)
50 x Denhardt's Solution	0,1 % (v/v)

Kernextrakte**Puffer A**

HEPES, pH 7,9	10 mM
KCl	10 mM
EDTA, pH 8,0	0,1 mM
EGTA, pH 7,9	0,1 mM
DTT	1 mM
PMSF	0,5 mM

Puffer C

HEPES pH 7,9	20 mM
--------------	-------

NaCl	0,4 mM
EDTA, pH 8,0	1 mM
EGTA, pH 7,9	1 mM
DTT	1 mM
PMSF	1 mM

Western Blot**PBS:**

NaCl	140 mM
KCl	25 mM
MgCl ₂	0,5 mM
CaCl ₂	1 mM
KH ₂ PO ₄	2 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM

Laufpuffer

Tris, pH 6,8	25 mM
SDS	0,1 % (w/v)
Glycin	200 mM

Blocking-Puffer

Magermilchpulver (in PBS)	5 % (w/v)
------------------------------	-----------

Sammelgelstock

Tris, pH 6,8	0,5 M
SDS	0,4 % (w/v)

2x SDS-Probenpuffer

Tris, pH 6,8	130 mM
SDS	6 % (w/v)
3-Mercapto-1,2-propandiol	10 % (v/v)
Glycerol	10 % (v/v)
Bromphenolblau	0,05 % (w/v)

Stripping-Puffer

Tris, pH 6,8	1 M
SDS	10 % (w/v)
β-Mercaptoethanol	0,7 % (v/v)

Transferpuffer

Tris, pH 6,8	25 mM
Glycin	192 mM
Methanol	20 % (v/v)

SDS	0,05 % (w/v)
-----	--------------

Trenngelstock

Tris, pH 8,8	1,5 M
--------------	-------

SDS	0,4 % (w/v)
-----	-------------

Waschlösung

PBS

Tween 20	0,05 % (v/v)
----------	--------------

TBST-Puffer

Tris, pH 8	10 mM
------------	-------

NaCl	150 mM
------	--------

Tween 20	0,05%
----------	-------

EMSA**TBE-Puffer 10x:**

Tris	89 mM
------	-------

Borsäure	89 mM
----------	-------

EDTA	2 mM
------	------

AP-1 Bindepuffer

Hepes, pH 7,9 (mit KOH)	20 mM
-------------------------	-------

Glycerol	20 %
----------	------

KCl	100 mM
-----	--------

EDTA	0,2 mM
------	--------

PMSF	0,2 mM
------	--------

DTT	1 mM
-----	------

AP-1 10xMix

Hepes, pH 7,9 (mit KOH)	150 mM
-------------------------	--------

KCl	100 mM
-----	--------

MgCl ₂	20 mM
-------------------	-------

DTT	2,5 mM
-----	--------

BSA	2 mg/ml
-----	---------

Citratpuffer (IHC)

Trisodiumcitrat	1 mM
-----------------	------

1 x TBS, pH 7

1 % Formaldehydlösung (FACS-Fix)

Paraformaldehyd	1 % in PBS
-----------------	------------

4.1.15 Plastikware

Plastikware wurde von den Firmen Greiner, Frickenhausen; Nunc, Wiesbaden; Sarstedt, Nümbrecht; TPP, Trasadingen, Schweiz und VWR, Darmstadt bezogen.

4.1.16 Geräte

Blotkammer	LKB 2005 Transpher Electro Blotting Unit
DNA/RNA Messung	NanoDrop Modell 2000C, Thermo Scientific, Braunschweig
Mikroskop	Leica DMI600 B
Neubauer Zählkammer	NeoLab, Heidelberg
Phosphoimager	Phosphoimager TM -Typhoon
Photometer	Pharmacia Biotech Ultraspec 3000
RealTime PCR Cyclor	LightCycler 480 und 480II, Firma Roche, Mannheim
Semi-Dry-Blotter	2117 Multiphor, LKB Bromma
Ultraschallgerät	Bronson Sonfier 250
UV-Geldokumentation	BioRad ChemiDoc XRS+
Zentrifugen	Heraeus Megafuge 1,0; Rotor BS4402/A Sigma-Aldrich 1-15PR, Rotor 12132-H
ELISA Reader	Victor X4, Perkin Elmer
Gelkammer	Biorad, München

4.2 Methoden

4.2.1 Zellkultur

4.2.1.1 Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden in Kryoröhrchen schnell in der Hand aufgetaut und direkt in das entsprechende Medium in eine Zellkulturflasche gegeben. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel.

4.2.1.2 Kultivieren von Zellen

Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5 % kultiviert.

4.2.1.3 HaCaT Zellen

HaCaT Zellen wurden ein bis zwei Mal wöchentlich im Verhältnis 1:10 passagiert. Das verbrauchte Medium wurde verworfen und die Zellen mit 2 ml Trypsin gespült. Anschließend wurden die Zellen 10-12 Minuten in 3 ml Trypsin im Brutschrank inkubiert. Durch Zugabe von 7 ml DMEM wurde der enzymatische Prozess gestoppt und die Zellen mit der Pipette resuspendiert. 1 ml der Suspension wurde in eine neue 75 cm² Flasche mit 19 ml frischem Medium gegeben.

4.2.1.4 NFK

NFK wurden bei einer Konfluenz von ca. 80 % passagiert. Das Medium wurde abgenommen, die Zellen ein Mal in 10 ml HEPES gewaschen und mit 5 ml Trypsin/EDTA 5-7 Minuten bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in 10 ml Trypsin Neutralisationslösung aufgenommen, verbleibende Zellen mit 5 ml nachgespült und anschließend bei 1000 rpm 10 Minuten in der Heraeus Megafuge pelletiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml KBM-Gold Medium aufgenommen.

4.2.1.5 Vorhautfibroblasten

VHF wurden in T175 Flaschen kultiviert und bei einer Konfluenz von ca. 90 % verwendet. Das Medium wurde abgenommen, die Zellen ein Mal in 10 ml DPBS gewaschen und mit 6 ml Trypsin 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in 10 ml DMEM Vollmedium aufgenommen und gezählt.

4.2.1.6 Mycoplasmen PCR und Mycoplasmenelimination (Firma Invivogen)

Für den Test wurde 1 ml Zellkulturmedium abgenommen, 5 Minuten bei 1500 rpm abzentrifugiert (Sigma Aldrich 1-15PR) und aus dem Überstand DNA extrahiert. Die Überprüfung von Mycoplasmenkontamination erfolgte durch PCR nach folgendem Ansatz:

2,5 µl 10xPuffer 2	94°C – 1Minute	
0,2 µl dNTP Mix [10µM]	94°C – 30 Sekunden	} 35 Zyklen
10 µl PrimerMix [5µM]	62°C – 30 Sekunden	
1 µl Taq Polymerase	72°C – 30 Sekunden	
2 µl DNA	72°C – 3 Minuten	
8 µl Wasser		

Protokoll nach (Uphoff et al., 2013, 2014).

Zur Elimination von Mycoplasmen mit Plasmocin wurden die Zellen in 5 ml ihres Mediums in 25 cm² Flaschen ausgesät und 5 µl Plasmocin zugegeben. Alle zwei Tage wurden Medium und Plasmocin erneuert und die Zellen bei entsprechender Konfluenz passagiert. Nach 14 Tagen Behandlung sollten die Zellen mindestens eine Woche kultiviert werden, bevor zur Überprüfung ein erneuter Mycoplasmentest durchgeführt wird.

4.2.1.7 Bestimmung der Zellzahl

20 µl der Zellsuspension wurden mit 20 µl 0,5 % Trypanblaulösung 5 Minuten inkubiert und anschließend in einer Neubauer Zählkammer gezählt. Dabei wurden die Zellen in vier Quadraten gezählt und wie folgt berechnet:

$$\text{Gezählte Zellzahl} / 2 = \times 10^4 \text{ Zellen /ml}$$

4.2.1.8 Retrovirale Infektion

NFK und HaCaT Zellen lassen sich nur mit einer niedrigen Effizienz transfizieren. Deswegen wurde eine retrovirale Infektion durchgeführt, die den Vorteil hat, dass die Zellen die viralen Proteine stabil exprimieren. PT67-Zellen wurden als Verpackungszelllinie verwendet, um Überstände mit retroviralen Partikeln zur Infektion von Keratinozyten herzustellen. Die bereits mit pLXSN, pLXSN-HPV8 E6, pLXSN-HPV8 E7 oder pLXSN-HPV8 E6/E7 transfizierten Zellen wurden in einer 175 cm² Zellkulturflasche in DMEM mit 100 µg/ml G-418 zur Selektion in Kultur genommen. Bei einer Dichte von ca 90% wurde das verbrauchte Medium abgenommen und 12 ml DMEM ohne G-418 zugegeben. Zur Induktion der Produktion viraler Partikel wurden die Zellen für 24 h bei 32°C und 10 % CO₂ inkubiert. Die Zellüberstände wurden anschließend abgenommen, zentrifugiert und bei -80°C gelagert. 200 µl der Zellen wurden zuvor für RNA Isolation verwendet, um in der qRT-PCR HPV8 E6 und HPV8 E7 nachzuweisen.

Primäre Keratinozyten der Passage 0 wurden zu 1-1,2x10⁵ Zellen pro Loch einer 6-Well Platte ausgesät. 24 h nach Aussaat wurden 2 ml DMEM ohne Zusätze mit 5 µg/ml Polybrene auf die Zellen gegeben und 10 min bei 37°C inkubiert. Pro Loch wurde 2 ml

Überstand zugegeben. Nach einer 1-stündigen Zentrifugation bei Raumtemperatur und 300 g wurden die Zellen zwei Mal mit 5 ml PBS gewaschen und 2 ml KBM-Gold Medium zugegeben. 48 h nach Infektion wurden infizierte Zellen mit 100 µg/ml G-418 im KBM-Gold Medium selektioniert. Als Selektionskontrolle wurden nicht infizierte Zellen mitgeführt. Waren die Zellen vor Abschluss der Selektion bereits konfluent, wurden sie in 150cm²-Flaschen umgesetzt. Der Stress des Trypsinierens genügte als Nachselektion. Der Erfolg der Infektion wurde mittels qRT-PCR für HPV8 E6 und E7 bestimmt.

HaCaT Zellen wurden zu 1,7x10⁵ Zellen pro Loch einer 6-Well Platte ausgesät und gleichermaßen infiziert. Die Selektion wurde mit 1 mg/ml G-418 durchgeführt.

4.2.1.9 Calcium-Stimulation

Um in Keratinozyten die Differenzierung zu induzieren, wurden diese mit 1,2 mM Calcium stimuliert. Die Zellen wurden zunächst wie beschrieben trypsiniert und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde, sowohl bei HaCaT Zellen als auch bei NFK, in 10 ml KBM-Gold Medium aufgenommen, da es im Gegensatz zu DMEM-Vollmedium nur 0,09 mM Calcium enthält. 5 x 10⁵ Zellen wurden in 10 cm Zellkulturschalen in 10 ml KBM-Gold Medium ausgesät. Am nächsten Tag wurden 100 µl einer 120 mM Calciumlösung zu den Zellen pipettiert. Nach drei Tagen wurden die Zellen für Gesamt-RNA-Isolation oder Proteinextrakte geerntet.

4.2.1.10 5-Aza-2'-deoxycytidin (DAC) Stimulation von HaCaT Zellen

DAC ist ein synthetisches Nukleosid, das als DNA-Methyltransferase Inhibitor wirkt. Der Vorteil gegenüber dem verwandtem 5-Azacytidin liegt darin, dass es nur in DNA und nicht in RNA eingebaut wird. Dort bindet und inhibiert es DNA-Methyltransferasen und verhindert *de-novo* Methylierung von Cytidinen während der Replikation. HaCaT Zellen wurden 72 h mit 2 µM DAC in DMSO stimuliert. Als Kontrolle dienten mit DMSO behandelte Zellen. Für mRNA wurden 2,5 x 10⁵ Zellen pro Loch einer 6-Well Platte, für DNA 1x10⁶ in 10cm Schalen ausgesät.

4.2.1.11 Bisulphitsequenzierung

HaCaT pLXSN und HPV8 E6-exprimierende Zellen wurden wie in 4.2.1.10 behandelt. Nach 72 h wurden die Zellen in kaltem PBS abgeschabt und einmal mit PBS gewaschen. 20 % der Zellen wurde für RNA Extraktion verwendet, um das miR-203 Expressionslevel zu überprüfen. Der Rest der Zellen wurde pelletiert und bei -80°C eingefroren. DNA Extraktion, Bisulphit Behandlung und Sequenzierung wurde durch AG Prof. Jörn Walter, Saarbrücken, durchgeführt.

4.2.1.12 PMA Stimulation

NFK wurden für 24 h mit 50 ng/ml PMA stimuliert.

4.2.1.13 siRNA und miR-203 Mimic Transfektion mit Lipofectamine RNAiMax

Um die miR-203 in HaCaT Zellen transient zu exprimieren, wurden die Keratinozyten mit einer synthetischen, käuflich erworbenen miR-203 transfiziert. Die Zellen wurden in 6-Well Platten bzw. in 6-cm Schalen ausgesät und am nächsten Tag nach Herstellerangaben mit 20 nM negative Mimic oder miR-203 Mimic transfiziert (Tabelle 4). Es wurde DMEM Medium ohne Antibiotika verwendet und nach 24 h das Medium gewechselt. Die Zellen wurden nach weiteren 48 h für RNA bzw. Proteinextraktion geerntet. Der Erfolg der Überexpression wurde durch qRT-PCR überprüft. Auch von den Zellen, die für Proteinextrakte geerntet wurden, wurde ein Teil für RNA Isolation verwendet.

Tabelle 4. Pipettierschema miR-203 Mimic Transfektion in HaCaT Zellen

	6-Well / 4cm Schale	6 cm Schale
Zellzahl	3×10^5	5×10^5
OptiMem	250 μ l	500 μ l
Lipofectamine RNAiMax	5 μ l	10 μ l
OptiMem	250 μ l	500 μ l
Mimic [20 μ M Stock]	3 μ l	6 μ l
Medium (ohne Antibiotika)	2,5 ml	5 ml

Um transienten *Knockdown* von Transkripten zu erzielen, wurde siRNA transfiziert. Hierfür wurden NFK bzw HaCaT Zellen in 12-Well Platten und in 6-cm Schalen ausgesät. Am nächsten Tag wurde mit 10nM non-coding oder der entsprechenden siRNA transfiziert (Tabelle 5). Es wurde ebenfalls Medium ohne Antibiotika verwendet und dieses nach 24 h gewechselt. Die Zellen wurden nach weiteren 24 h für RNA bzw. Proteinextraktion geerntet. Der Erfolg des *Knockdowns* wurde auf mRNA- und Proteinebene überprüft.

Tabelle 5. Pipettierschema siRNA Transfektion mit Lipofectamine RNAiMax in HaCaT Zellen und NFK

	12-Well	6-Well / 4 cm Schale	6 cm Schale
Zellzahl			
• HaCaT	$1,2 \times 10^5$	3×10^5	6×10^5
• NFK	8×10^4	2×10^5	4×10^5
OptiMem + Lipofectamine RNAiMax	100 μ l 2 μ l	250 μ l 5 μ l	500 μ l 10 μ l
OptiMem siRNA [20 μ M Stock]	100 μ l 0,6 μ l	250 μ l 1,5 μ l	500 μ l 3 μ l
Medium (ohne Antibiotika)	1 ml	2,5 ml	5 ml

4.2.1.14 Transiente Transfektion

HaCaT und RTS3b Zellen wurden, wie in Tabelle 6 angegeben, ausgesät und am folgenden Tag transient transfiziert. In einem Ansatz wurde OptiMem Medium mit Lipofectamine 2000 gemischt, in einem weiteren Ansatz OptiMem Medium mit DNA. Beide Ansätze wurden 1:1 gemischt, 15 Minuten inkubiert und zu den Zellen pipettiert. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel.

Tabelle 6. Pipettierschema transiente Transfektion mit Lipofectamine 2000 in HaCaT Zellen

	12-Well	6-Well / 4 cm Schale	6 cm Schale
Zellzahl	1,2x10 ⁵	3x10 ⁵	6x10 ⁵
OptiMem	100 µl	250 µl	500 µl
Lipofectamine 2000	2 µl	5 µl	10 µl
OptiMem	100µl	250 µl	500 µl
DNA	0,8 µg	2 µg	4 µg
Medium (ohne Antibiotika)	1 ml	2,5 ml	5 ml

NFK wurden, wie in Tabelle 7 angegeben, ausgesät und am folgenden Tag transient transfiziert.

Tabelle 7. Pipettierschema transiente Transfektion mit Transfast in NFK

	12-Well	6-Well / 4 cm Schale	6 cm Schale
Zellzahl	0,8x10 ⁵	2x10 ⁵	4x10 ⁵
Transfast	2,4 µl	6 µl	12 µl
KBM-Gold Medium (ohne Zusätze)	400 µl	1000 µl	2000 µl
DNA	0,8 µg	2 µg	4 µg
KBM-Gold (Zugabe nach 2 h)	800 µl	2000 µl	4000 µl

4.2.1.15 Luziferase-Assay

Der Luziferase-Assay dient dem Nachweis der Promotoraktivität. Eine Promotorsequenz wird in einen Vektor kloniert, der ebenfalls ein Gen für die *Firefly*-Luziferase enthält. Bei Aktivierung des Promotors wird diese Luziferase exprimiert und setzt Luziferin mit ATP und Magnesium um. Dabei kommt es zur Biolumineszenz, die bei einer Wellenlänge von 560 nm detektiert werden kann.

Für den Assay wurden HaCaT Zellen und NFK in 12-Well Platten ausgesät und, wie in Tabelle 6 und 7 beschrieben, transfiziert. Pro 12-Well wurden 100 ng Luziferase-Plasmid und 100 ng pEGFP-C1 transfiziert. Die Konzentration der DNA wurde mit dem entsprechendem Leervektor auf 800 ng angeglichen. Nach 48 h wurden die Zellen trypsiniert, mit PBS gewaschen und ein Drittel in 100 µl FACS-Fix fixiert. Der Rest der Zellen wurde in 120 µl Luziferase-Extraktionspuffer für 10 Minuten bei Raumtemperatur lysiert und 7 Minuten bei 14.000 rpm und 4°C (Sigma Aldrich 1-15PR) zentrifugiert.

50 µl Zelllysate wurden in eine weiße 96-Well Flachbodenplatte pipettiert. Nach Zugabe von 150 µl Reaktionspuffer pro Well wurde die Stärke der Luziferase-Reaktion in einem Victor X4 Plattenreader bestimmt. Um die Werte auf die Transfektionseffizienz zu normalisieren, wurde die Anzahl der Zellen, die GFP exprimieren, im Durchflusszytometer gemessen. Zusätzlich wurde der Proteingehalt der Proben nach der Bradford Methode bestimmt. Die Werte wurden folgendermaßen verrechnet: Luziferase-Aktivität/ (Proteinkonzentration x Transfektionseffizienz).

4.2.1.16 Proliferationsassay

Scratch Assay

Um die Proliferation mikroskopisch und unabhängig von Schwankungen der Ausgangszellzahl zu bestimmen, wurde ein Scratch Assay durchgeführt. 6×10^5 HaCaT-pLXSN bzw HPV8 E6-exprimierende Zellen wurden in 4-cm Schalen ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium abgenommen und mit einer 10 µl Pipettenspitze drei parallele Kratzer in den Zellrasen eingefügt. Um Zellreste zu entfernen, wurde mit PBS gespült. Direkt danach, 24 h und 48 h später wurde das Zuwachsen am Mikroskop an acht Stellen dokumentiert. Anhand von Markierungen am Boden der Kulturschale wurde gewährleistet, dass jeweils die gleiche Stelle untersucht wurde. Um den Einfluss von p63siRNA und miR-203 Mimic auf die Proliferation zu untersuchen, wurden 5×10^5 Zellen in 4 cm Schalen ausgesät und, wie in Tabelle 4 und 5 angegeben, transfiziert. 24 h nach Transfektion wurde mit dem Scratch begonnen und ebenfalls nach 0 h/ 24 h/ 48 h dokumentiert.

BrdU ELISA (Roche Diagnostics)

Das Thymidinanalogon BrdU wird während der Replikation in die DNA eingebaut und kann über anti-BrdU Antikörper als Maß für die Proliferation nachgewiesen werden. $1,5 \times 10^4$ HaCaT-pLXSN HPV8 E6-exprimierende Zellen wurden in dreifach-Ansätzen in 96-Well Platten ausgesät. Nach 24 h wurde auf Medium ohne FKS gewechselt, um die Zellen in ihrem Wachstum zu synchronisieren. Weitere 24 h später wurde 10 µM BrdU in Medium mit FKS zu den Zellen gegeben. Nach 17 h wurden die Zellen wie im Herstellerprotokoll angegeben fixiert und 30 Minuten mit anti-BrdU-Peroxidase inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde Substrat dazugegeben. Die Reaktion wurde nach 30 Minuten mit 2N H_2SO_4 gestoppt und die 96-Well Platte bei 450 nm/ Ref. 620 nm im ELISA Reader Victor gemessen.

4.2.1.17 Organotypische Kulturen

Rattenskollagen wurde von Katrin Knerr-Rupp, AG Smola, aus Rattenschwänzen isoliert und mit einer Konzentration von 4 mg/ml in 0,1 % Essigsäure gelöst. An Tag 1 wurden

für neun 24-Well Ansätze à 1 ml, 7,9 ml Kollagen und 1,1 ml 10x DMEM mit ca. 1 ml 2 M NaOH auf Eis neutralisiert. Zügig wurden 3×10^6 VHF (Passage 3 bis 4) in 1 ml FKS dazugegeben und gemischt. Pro Loch einer 24-Well Platte wurde 1 ml Kollagen/Fibroblasten möglichst Luftblasen-frei auf die zurechtgeschnittene und mit DMEM Medium rehydrierte Kollagen-Elastin Matrix pipettiert. Nach ca. 20 Minuten im Brutschrank war das Kollagen fest und konnte mit 1 ml Fibroblastenmedium überschichtet werden. Am nächsten Tag wurde das Medium vorsichtig abgenommen und 6×10^5 HaCaT-pLXSN oder HPV8 E6-exprimierende HaCaT Zellen in RTS3b-Medium auf das Kollagen ausgesät. Nach 24 h wurden die Kulturen auf Gitter in 6-Well Platten gesetzt. Die Löcher wurden mit etwa 5 ml RTS3b Medium so befüllt, dass die Fibroblasten und Keratinozyten an die Luft-Medium Grenze gebracht wurden und nur durch die Trägerschwämmchen mit Nährstoffen versorgt wurden. Alle 2-3 Tage wurde das Medium gewechselt. Nach 14 Tagen wurden die organotypischen Kulturen 45 Minuten in 4 % Formaldehyd fixiert und anschließend durch Anne Kerber, Dermatologie, Uniklinik Homburg, in Paraffin eingebettet.

4.2.1.18 Einfrieren von Zellen

HaCaT Zellen wurde nach dem Trypsinieren zentrifugiert und das Pellet in 3 ml Einfriermedium resuspendiert. 1 ml Zellsuspension wurde in vorgekühlte Kryoröhrchen gegeben. Diese verblieben zunächst 15 Minuten auf Eis und wenige Tage bei -80°C , bis sie dann bei -150°C oder in Stickstoff eingefroren wurden. NFK wurden zu 6×10^5 , VHF zu 2×10^6 pro Kryoröhrchen eingefroren.

4.2.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.2.1 Nukleinsäure

2.2.1.1.1. Plasmidpräparation

Die Plasmidpräparation wurde mit dem Kit der Firma Macherey and Nagel, Düren, nach Herstellerangaben durchgeführt.

Das Pellet wurde in 200 μl autoklaviertem Wasser im Kühlschrank über Nacht gelöst.

2.2.1.1.2. DNA-Konzentrations Messung

Die Konzentration der Plasmid DNA wurde bei 260 nm mit dem NanoDrop gemessen. Dafür wurden 2 μl der Plasmidpräparation eingesetzt.

2.2.1.1.3. DNA-Sequenzierung

Sequenzierungsarbeiten wurden vom Institut für Immunologie und Genetik, Labor Thiele, Klinikum Kaiserslautern durchgeführt.

2.2.1.1.4. RNA-Isolation

a) Trizol®/Phenol-Chloroform Methode

Das Medium wurde von den Zellen abgenommen, diese mit PBS gewaschen und durch direkte Zugabe von 1 ml Trizol und mehrmaligem Pipettieren lysiert. Das Lysat wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß übertragen und 5 Minuten bei RT stehen gelassen. Anschließend wurden 200 µl Chloroform dazugegeben und kräftig für 15 Sekunden geschüttelt. Nach 2-3 Minuten wurde das Lysat bei 4°C 15 Minuten bei 12000 rpm mit der Tischzentrifuge zentrifugiert und die obere wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt. Die RNA wurde für 10 Minuten mit 500 µl Isopropanol gefällt und wie zuvor abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen, zentrifugiert, kurz getrocknet und in 51 µl EDTA 0,001M pH7, 6 µl DNase Puffer, 3 µl RNase freier DNase und 2 µl RNasin gelöst.

b) RNA Kit (Machery und Nagel)

Die Isolation der RNA wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die RNA wurde, je nach Ausgangsmenge der Zellen, mit 30-50 µl RNase freiem Wasser eluiert.

c) miRNA Kit (Machery und Nagel)

Dieses Kit eignet sich speziell zur Isolation von kleinen RNAs wie zum Beispiel microRNAs. Gleichzeitig wird auch mRNA isoliert. Es wurde nach Angaben des Herstellers gearbeitet. Durch RNase freies Wasser wurde die RNA, je nach Ausgangsmenge der Zellen, mit 30-50 µl Wasser eluiert.

2.2.1.1.5. RNA-Gel- Elektrophorese

Um die Qualität der RNA und die Menge zu überprüfen, wurde diese in einem RNA-Gel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht kontrolliert. Ist die RNA intakt, sind zwei distinkte Banden, die ribosomaler RNA entsprechen, zu sehen. Sieht man hingegen einen Schmier auf dem Gel, ist die RNA degradiert oder durch DNA verunreinigt.

Für ein 1 %iges Gel wurden 2 g Agarose mit 120 ml DEPC- behandeltem Wasser in der Mikrowelle aufgekocht und kurz abgekühlt. Vor dem Gießen wurden 40 ml Formaldehyd und 45 ml 5 x RNA-Laufpuffer dazugegeben.

0,3-1 µg RNA wurden auf 5 µl mit DEPC-Wasser aufgefüllt und mit weiteren 5 µl Ladepuffer 15 Minuten bei 65°C inkubiert. Der Ansatz wurde kurz auf Eis gekühlt, auf das Gel aufgetragen und ~1,5 h bei 80 V aufgetrennt. Da der Ladepuffer bereits Ethidiumbromid enthielt, konnte das Agarosegel anschließend unter UV-Licht dokumentiert werden.

2.2.1.1.6. cDNA Synthese

cDNA-Synthese von mRNA

Um RNA in der quantitativen Realtime PCR (qRT-PCR) messen zu können, muss diese erst in cDNA umgeschrieben werden. Spezielle Enzyme, Reverse Transkriptasen, können aus einem RNA-Template einen DNA-Strand synthetisieren. Für das Umschreiben von mRNA wurde das SuperScriptII System von Invitrogen verwendet. Durch den Einsatz von Random-Primern, also einer Mischung vieler unterschiedlicher synthetischer Oligonukleotide, werden alle mRNAs erkannt und gebunden.

Folgender Ansatz wurde pipettiert:

Komponente	Menge
Random Primer 500 μ M	1 μ l
RNA	0,5-1 μ g
dNTPs 10 mM	1 μ l
RNase freies Wasser	ad 12 μ l

Der Ansatz wurde für 5 Minuten bei 65°C inkubiert, kurz auf Eis gestellt und zentrifugiert. Dann wurde dazugegeben:

Komponente	Menge
5 x First Strand Puffer	4 μ l
0,1 M DTT	2 μ l

Nach 2 Minuten bei 42°C wurde 1 μ l Reverse Transkriptase Enzym hinzugefügt, 50 Minuten bei 42°C und 15 Minuten bei 70°C inkubiert. Eine 1:10 bzw. 1:50 Verdünnung mit RNase freiem Wasser wurde für die qRT-PCR eingesetzt.

cDNA-Synthese von miRNA

Um microRNAs in der qRT-PCR detektieren zu können, wurde das TaqMan miRNA System der Firma Thermo Scientific verwendet und das Protokoll modifiziert.

Folgender Ansatz wurde pipettiert:

Komponente	Menge
RNA	500 ng
Puffer	1,5 μ l
RNU6B Primer	1 μ l
miR-203 Primer	1 μ l
RNase Inhibitor	0,19 μ l
dNTPs	0,15 μ l
RNase freies Wasser	ad 15 μ l

Der Ansatz wurde zunächst 30 Minuten bei 16°C, 30 Minuten bei 42°C und anschließend 5 Minuten bei 85°C inkubiert. Die cDNA wurde mit einer 1:10 Verdünnung eingesetzt.

2.2.1.1.7. Quantitative Realtime PCR (qRT-PCR)

qRT-PCR für cDNA aus mRNA

Realtime PCR beschreibt ein PCR Verfahren, bei dem während der Amplifikation die Menge des Produktes über die Bindung spezifischer Sonden gemessen wird. Wird cDNA eingesetzt, spiegeln die Ergebnisse der RT-PCR die Expressionsstärke eines Gens wider. Für die Quantifizierung von cDNA aus mRNA wurde auf das 'Universal ProbeLibrary System' (UPL) der Firma Roche, Mannheim, zurückgegriffen. Bei den Sonden handelt es sich um 8-9 Nukleotid kurze Sequenzen. Das Set besteht aus 165 dieser Hydrolyse-Sonden, die aufgrund der kurzen Sequenz fast das ganze Genom abdecken können.

Am 5'-Ende sind die Sonden mit dem Fluorophor Fluorescein (F; FAM), am 3'-Ende mit einem Dark-Quencher (Q) gekoppelt. FAM gibt seine Energie nach Anregung durch Licht an den Quencher ab, da dieser in enger räumlicher Nähe liegt. Der Dark-Quencher gibt diese Energie als Wärme weiter. Das Prinzip nennt sich FRET (Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer), da der Quencher die Energie des Fluorophors aufnimmt und so kein Fluoreszenzsignal gemessen werden kann. Wenn die Sonde sich an die cDNA angelagert hat und nach Bindung der Primer die Polymerase den Strang amplifiziert, wird die Sonde durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase abgebaut. Jetzt kann die Emission des Fluorophors detektiert werden, da sich der Quencher nicht mehr in räumlicher Nähe befindet und die Energie des Fluorophors aufnehmen kann. Je stärker das Signal ist und je früher es sich detektieren lässt, desto mehr cDNA befindet sich in dem Ansatz. Die Benutzung dieser sequenzspezifischen Sonden reduziert den Hintergrund während der PCR, da nur die zu amplifizierende Sequenz gebunden wird. Wenn man ein bestimmtes Gen amplifizieren möchte, ist es nötig die passende Sonde zu ermitteln.

Der Ansatz für die PCR wurde nach diesem Schema zusammengesetzt:

Komponente	Menge
MgCl ₂	2,3,4 oder 5 µM
10 x Taq-Puffer	2 µl
TE-SS 40 ng/µl	1 µl
DMSO	1 µl
Tween 20, 10%	1 µl
BSA 20 ng/µl	0,5 µl
d’NTPs 10 mM	0,4 µl
Sonde 1 µM	0,8 µl
Sense Primer 10 µM	0,5 µl
Antisense Primer 10 µM	0,5 µl
Taq-Polymerase 5 U/µl	0,1 µl
PCR-Wasser	auf 15 µl

15 µl des Mixes wurden pro Loch einer 96-Well Platte pipettiert und je 5 µl der cDNA Verdünnung dazugegeben.

Die Schritte des PCR Programms:

Tabelle 8. PCR-Programm für den LightCycler für UPL Sonden

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

Um die Menge der cDNA quantifizieren zu können, wird ein so genannter Standard benötigt. Darunter versteht man die Verdünnungsreihe eines Plasmides, welches das jeweilige Gen trägt, das man detektieren möchte. Dieses Plasmid wird statt cDNA in der PCR eingesetzt. Durch Sequenzierung des Plasmids ist die Größe des Inserts bekannt und an Hand einer Berechnung kann die Menge der Amplifikate pro Verdünnung ermittelt werden. So kann der LightCycler über die gemessenen Ct-Werte eine Standardkurve erstellen, mit der die unbekannt Konzentrationen berechnet werden können. Unter dem Ct-Wert (cycle threshold) versteht man die Nummer des Amplifikationszyklus in dem der Anstieg des Fluoreszenzsignals gemessen wurde.

Im Folgenden ist eine Beispielrechnung für den Δ Np63 Standard dargestellt:

Größe Vektor pGex 4900 bp Konzentration: 810 ng/ μ l
 + Insert Δ Np63 1761 bp
 6661 bp

Gewicht/mol: 6661 bp x 650 g/mol = 4.329.650 g/mol

Kopienanzahl: $\frac{810 \text{ g/l} \times 10^{-9}}{4.329.650 \text{ g/mol}}$ x $6,023 \times 10^{23} = 1,13 \times 10^{11}$ Kopien/ μ l

→ 10^9 Kopien/ μ l = 0,008 μ l der Plasmid-DNA

Es wurden 8 μ l Plasmid-DNA in 1 ml TE-SS Puffer verdünnt. Davon wurde eine 1:5 Verdünnung hergestellt, um die Menge der DNA in den für die RT-PCR eingesetzten 5 μ l zu haben (10^9 Kopien/5 μ l). Die Verdünnungsreihe geht, je nach Stärke der Genexpression des Zielgens, von 10^7 Kopien/5 μ l bis 10 Kopien/5 μ l.

qRT-PCR für cDNA aus miRNA

Die Quantifizierung der microRNA wurde mit dem TaqMan® System von Life Technologies durchgeführt.

Für die RT-PCR wurde dieser Mix angesetzt:

Komponente	Menge
TaqMan Universal MasterMix	9 μ l
miR-203 bzw RNU6B Primer/Sonde	0,9 μ l
PCR-Wasser	6,3 μ l

Zu 15 μ l des Mixes wurden 5 μ l cDNA Verdünnung pipettiert.

Die Messung wurde mit dem LightCycler 480II durchgeführt. Dabei wurde das Programm des Herstellers befolgt:

Tabelle 9. PCR Programm für LightCycler für microRNAs

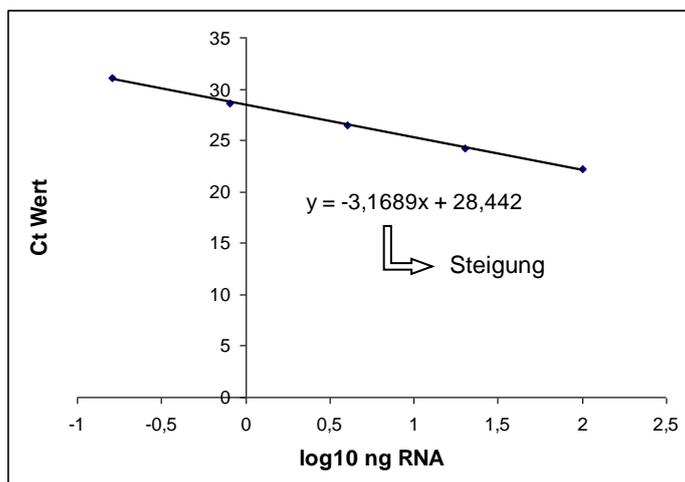
Programm	Temperatur	Zeit	Zyklen
Aktivierungsschritt	95°C	15 min	} 45 Zyklen
Denaturierung	94°C	15 sek	
Annealing	55°C	30 sek	
Amplifikation	70°C	30	

Da für die microRNA kein Standard vorhanden war, konnte nur eine relative Quantifizierung durchgeführt werden. Dafür wurde zunächst die Primereffizienz bestimmt, um zu ermitteln, ob wirklich eine Verdopplung der DNA pro PCR Zyklus stattfindet (Effizienz = 2). Von einer RNA-Probe, von der bekannt war, dass sie die miR-203 stark exprimiert, wurde cDNA und daraus eine Verdünnungsreihe hergestellt.

Auf diesen Verdünnungen wurde eine RT-PCR für miR-203 und das Referenzgen RNU6B durchgeführt. Da bekannt ist, wie viel RNA pro cDNA Verdünnung enthalten ist, können die Ct-Werte gegen die RNA Konzentration (logarithmisch) aufgetragen werden und so über die Steigung die Effizienz zu ermitteln. Ein Beispiel für miR-203 ist im Folgenden dargestellt.

Tabelle 10. In den cDNA Verdünnungen enthaltenen RNA Konzentrationen und die Ct-Werte der RT-PCR für miR-203

cDNA Verdünnung	ng RNA in Verdünnung	log10 ngRNA	Ct-Wert der miR-203 in RT-PCR
1:5	100	2	22,22
1:25	20	1,30103	24,26
1:125	4	0,60206	26,45
1:625	0,8	-0,09691	28,63
1:3125	0,16	-0,79588	31,11



$$\text{Effizienz} = 10^{(-1/\text{Steigung})}$$

$$= 2,068078$$

Wenn die Effizienz bekannt ist, kann aus den Ct-Werten der eigentlichen RT-PCR die relative Quantifizierung durchgeführt werden. Es wurde die Veränderung der Genexpression eines Genes im Verhältnis zu einem anderen Gen nach folgender Formel ermittelt:

$$E(\text{miR-203})^{(\text{Ct Wildtyp miR-203} - \text{Ct Mutante miR-203})} / E(\text{RNU6B})^{(\text{Ct Wildtyp RNU6B} - \text{Ct Mutante RNU6B})}$$

2.2.1.1.8. DNA Klonierung miR-203 Promotor

Der miR-203 Promotor wurde aus genomischer DNA amplifiziert. Folgender Ansatz wurde pipettiert:

5 µl Puffer
 0,5 µl dNTP [10µM]
 1,25 µl Primer Forward [10µM]
 1,25 µl Primer Reverse [10µM]
 0,25 µl Q5 High fidelity Polymerase [100U/µl]
 400 ng DNA
 Auf 25 µl mit Wasser

Tabelle 11. PCR Programm für Promotor Klonierung

Funktion	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	98°C	30 sek	} 35 Zyklen
Denaturierung	98°C	10 sek	
Annealing	62°C	30 sek	
Amplifikation	72°C	2,5 min	
Amplifikation	72°C	2 min	
Kühlung	4°C	unendlich	

Anschließend wurde das PCR Produkt auf einem 1,5 % Agarosegel aufgetrennt und die Bande bei 1170 bp ausgeschnitten. Die Aufreinigung erfolgte mit dem PCR-CleanUp Kit von Machery und Nagel nach Herstellerangaben. Das Produkt wurde in 15 µl Puffer eluiert. Der Promotor wurde zunächst in pGEM Vektor von der Firma Promega eingebracht. Da die Q5-Polymerase keine A-Überhänge während der PCR produziert, wurde dies über einen Zwischenschritt generiert.

PCR Produkt 6 µl
 Taq-Polymerase Puffer 2 µl
 Taq Polymerase 1 µl
 dATP [10µM] 1 µl

Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 70°C inkubiert und über PCR-CleanUp Kit aufgereinigt. Die Ligation in pGEM Vektor wurde wie folgt durchgeführt und für 3 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert:

pGEM-T® Vektor 1 µl
 2x Ligationspuffer 5 µl
 T4-Ligase (1U/µl) 1 µl
 Insert 3 µl

5 µl des Ligationsansatzes wurden mit 50 µl kompetenten Bakterien auf Eis 20 Minuten inkubiert. Über einen Hitzeschock bei 42°C für 90 Sekunden nahmen die Bakterien das Plasmid auf. Nach Abkühlen der Suspension auf Eis erfolgte nach Zugabe von 200 µl antibiotikafreiem LB-Medium eine halbstündige Inkubation bei 37 °C. Durch die Vorkultur in antibiotikafreiem LB-Medium wurde den durch den Hitzeschock gestressten Bakterien das Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase erleichtert und somit eine höhere Bakterienausbeute gewährleistet. Die Bakterien wurden anschließend auf einer LB-Agarplatte mit Ampicillin, die vorher mit IPTG und X-Gal behandelt wurde, ausgestrichen. Durch die Zugabe von IPTG und X-Gal kann eine Blau-Weiß Selektion durchgeführt werden. Das Prinzip beruht auf der Umsetzung des künstlichen Substrats X-Gal zu Galactose und einem blauen Farbstoff nach Induktion mit IPTG. Mit Hilfe dieser Methode kann der Erfolg einer Ligation bestimmt werden. Dazu muss allerdings der verwendete Bakterienstamm β -Galaktosidase-defizient sein (z.B. MOSBlue) und das Plasmid eine MCS (multiple cloning site) innerhalb des β -Galaktosidase-Gens (*lacZ*) tragen. War die Ligation des Inserts in die MCS des Plasmids erfolgreich, konnten die Bakterien das Enzym β -Galaktosidase nicht mehr produzieren und die betroffene Kolonie blieb weiß. Dementsprechend färbten sich Bakterien, die das Plasmid ohne Insert trugen, blau. Nach Inkubation der LB-Platte über Nacht bei 37°C wurden weiße Kolonien mit einem Zahnstocher in 2 ml LB-Medium mit Ampicillin gegeben und erneut über Nacht auf dem Schüttler zum Wachstum gebracht. Am folgenden Tag wurde über ein DNA-Plasmidkit von PeqLab DNA extrahiert und der Erfolg der Ligation zunächst über Restriktionsverdau überprüft:

<i>Mlu</i>	0,5 µl
<i>Xho</i>	0,5 µl
Puffer 3	2 µl
BSA	0,2 µl
DNA	5 µl
Wasser	11,8 µl

Der Ansatz wurde 3 h bei 37°C inkubiert und 5 µl auf einem Agarosegel aufgetrennt. Positive Klone wurden durch Sequenzierung auf Mutationen überprüft. Zur Umligation in pGL3-Basic Vektor wurde das Insert aus einem positiven pGEM-Klon mit *Mlu* und *Xho* ausgeschnitten. pGL3-Basic wurde mit den gleichen Enzymen verdaut und im Agarosegel aufgetrennt. Der Verdau wurde mit dem PeqLab Clean-Up Kit in 15 µl Puffer aus dem Gel isoliert. Das Insert wurde mit pGL3-Basic Vektor 1 Stunde bei Raumtemperatur ligiert.

10x T4 DNA Ligase Puffer	2 µl
pGL3-Basic Vektor	10 µl
miR-203 Promotor Insert	5 µl
T4 DNA Ligase	1 µl
Wasser	2 µl

Es erfolgte eine Transformation in kompetente Bakterien, wie zuvor beschrieben, welche auf LB-Ampicillin Platten ausplattiert wurde. Kolonien wurden in 2 ml LB-Ampicillin Medium kultiviert, DNA extrahiert und der Erfolg der Ligation über Sequenzierung mit GL-Primer2 und RV-Primer4 (Promega) überprüft.

2.2.1.1.9. Northern Blot

Northern Blot ist eine Methode, um RNA oder microRNAs nachzuweisen und basiert auf einem ähnlichen Prinzip wie der Western Blot. Die RNA wird in einem denaturierenden Gel aufgetrennt und auf eine Membran übertragen. Der Nachweis einer bestimmten Sequenz erfolgt durch die Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde. In dieser Arbeit sollte die MicroRNA-203 nachgewiesen werden

DNA-Sondenherstellung

Zunächst wurde ein spezifisches Oligonukleotid von der Firma Sigma-Aldrich bezogen, das der DNA Sequenz der microRNA entspricht. Zusätzlich musste eine kurze Sequenz angehängt werden, an die später die T7 RNA-Polymerase binden kann um einen komplementären RNA Strang zu erzeugen. Die T7 Promoter Primer binden an die Sequenz und die Klenow Polymerase amplifiziert eine doppelsträngige DNA Sequenz (Abbildung 8).

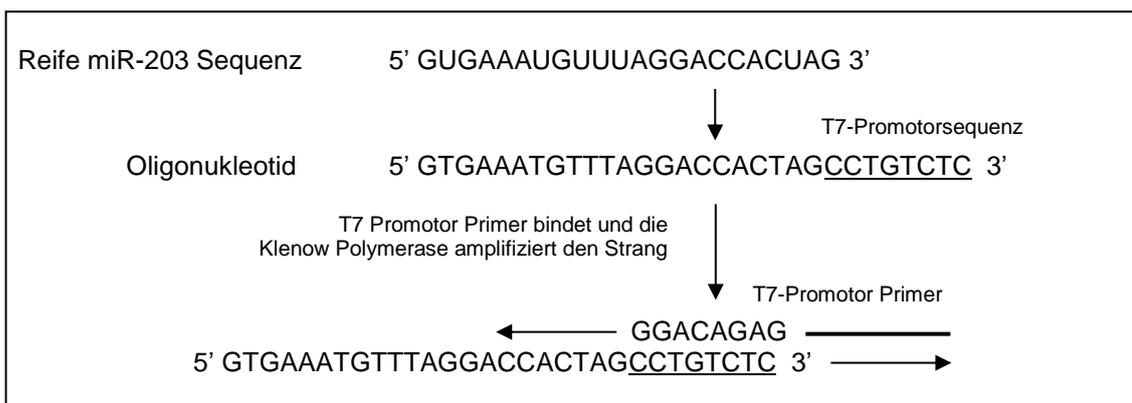


Abbildung 8. Schematische Darstellung der DNA Sondenherstellung

Folgender Ansatz wurde für die Sondenherstellung pipettiert:

Komponente	Menge
T7-Promotor Primer	2 μ l
Wasser	6 μ l
Oligonukleotid 100 μ M	2 μ l

Der Ansatz wurde für 5 Minuten auf 70°C erhitzt und dann auf Raumtemperatur gebracht, damit die Hybridisierung stattfinden konnte. Zu den Oligonukleotiden wurde gegeben:

Komponente	Menge
Klenow-Puffer 10 x	2 μ l
d’NTPs 10 mM	2 μ l
Wasser	4 μ l
Exo-Klenow	2 μ l

Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten wurden die Sonden-Oligonukleotide bei -20°C aufbewahrt.

Gel

Das denaturierende Gel, in dem die RNA aufgetrennt wurde, setzte sich wie folgt zusammen:

Komponente	Menge
Sequagel, konz.	24 ml
Sequagel, verd.	21 ml
Sequagel, Puffer	5 ml
APS 10 %	400 μ l
TEMED	20 μ l

Nach Zugabe von APS und TEMED wurde das Gel zwischen zwei gut gesäuberte Glasplatten gegossen und ein Plastikamm eingesetzt. Nach ca. 30 Minuten war es auspolymerisiert und konnte senkrecht in die Gelapparatur mit TBE Puffer eingesetzt werden. Nach einer Vorlaufzeit von 10 Minuten bei 15 W wurden die Taschen mit Puffer gespült und 15 μ g RNA in 5 μ l Probenpuffer aufgetragen. Nach 2-3 h war die RNA aufgetrennt und das Gel konnte 10 Minuten in Ethidiumbromid angefärbt werden, um die Ladekontrolle zu erfassen.

Transfer der RNA auf eine Membran

Ebenso wie die Proteine beim Western Blot wurde die RNA beim Northern Blot auf eine Membran (Hybond N von Amersham) übertragen. Dafür wurden 5 Filterpapiere auf den SemiDry Blotter aufgelegt, gut mit destilliertem Wasser getränkt und die Membran in Größe des Gels aufgelegt. Auf die Membran wurde das Gel aufgebracht und mit feuchten Filterpapieren bedeckt. Der Deckel der Apparatur wurde aufgelegt und bei 15 V 30 Minuten geblottet.

Chemisches Crosslinken

Es gibt die Möglichkeit die RNA mit UV-Licht auf die Membran zu fixieren oder mit Chemikalien. Letztere Methode wurde hier angewandt. Dafür wurden einmal 245 µl Methylimidazol in 9 ml Wasser und 0,75 g EDC-Hydrochlorid in 24 ml Wasser gelöst und vereint. Die Membran wurde auf einem Filterpapier mit der Lösung getränkt, in Folie eingeschlagen und 1-2 h bei 55°C fixiert.

Vorinkubation der Membran mit Hybridisierungspuffer

Der Hybridisierungspuffer wurde mindesten 30 Minuten bei 55°C gelöst.

Die Membran wurde anschließend mit dem Puffer 30 Minuten im Hybridisierungssofen bei 55°C vorinkubiert.

Markierung der Sonde und Hybridisierung

Die DNA-Sonde muss, bevor sie für den Nachweis von RNA eingesetzt werden kann, in RNA umgeschrieben und radioaktiv markiert werden. Diese beiden Bedingungen werden in einem Arbeitsschritt erfüllt. Die DNA abhängige RNA-Polymerase nutzt ein DNA Template und schreibt es in RNA um. Da nur radioaktiv markiertes Uracil im NTP Mix angeboten wurde, erhält die Sonde ihre Markierung in Form dieses radioaktiven Nukleotides. Binden kann die T7-Polymerase an den T7 Promotor, der an die DNA Sonde bereits angehängt wurde. Die folgenden Arbeitsschritte wurden im Radioaktiv-Labor unter Einhaltung der vorgeschriebenen Sicherheitsbedingungen durchgeführt. Der Ansatz zur Markierung der Sonde wurde zusammengesetzt aus:

Komponente	Menge
Wasser	7 µl
Sonde	1 µl
10x Puffer	2 µl
ATP/CTP/GTP 10 mM	3 µl
³² P-dUTP	5 µl
T7-RNA-Polymerase	2 µl

Nach 10 Minuten bei 37°C wurde 1 µl DNase dazugegeben und weitere 10 Minuten bei 37°C inkubiert, um etwaige DNA Reste abzubauen. Die markierte Sonde wurde zu dem Hybridisierungspuffer und der Membran gegeben und über Nacht bei 55°C inkubiert.

Entwicklung

Am nächsten Tag wurde durch 15 minütiges Waschen mit je zwei Mal Niedrigsalz- und Hochsalzpuffer überschüssige radioaktive Nukleotide entfernt. Die Membran wurde in Frischhaltefolie eingewickelt, über Nacht auf einem Phosphoscreen exponiert und am nächsten Tag mit dem Phosphoimager von Typhoon entwickelt.

2.2.1.1.10. miR-203 in situ Hybridisierung

Zum Nachweis endogener miR-203 Expression in Schnitten von EV-Läsionen und organotypischen Hautkulturen wurde in Kooperation mit Prof. Kim und Dr. Elke Ebert, Pathologie der Uniklinikum Homburg, *in situ* Hybridisierungen etabliert. Es wurde das System der Firma Exiqon verwendet. Die optimale miR-203 Sondenkonzentration lag bei 5nM.

4.2.2.2 Proteine

2.2.1.1.11. Protein Ganzzellextrakte und Konzentrationsbestimmung

Von bewachsenen Zellkulturschalen wurde das Medium abgenommen und mit PBS gespült. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen in PBS abgelöst und 10 Minuten bei 1200 rpm mit der Tischzentrifuge bei 4°C zentrifugiert. Das PBS wurde verworfen und die Zellen in 50-100 µl Probenpuffer resuspendiert. Auf Eis wurden die Zellen 2 x 15 Sekunden durch Ultraschall aufgeschlossen und 5 Minuten bei 100°C gekocht, um die Proteine zu denaturieren. Das Lysat wurde 10 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und eine 1:10 Verdünnung in 1 N NaOH bei 280 nm im Photometer gemessen.

Nach der Formel: $3,2 / \text{Absorption} = x \mu\text{l}$ wurde das Volumen für 15 µg Protein berechnet.

2.2.1.1.12. Proteinkernextrakte und Bradfordassay

Kernextrakte wurden nach dem Protokoll von Schreiber et al. (1989) isoliert und bei -80°C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung wurde mit einem Bradfordassay nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt.

2.2.1.1.13. Western Blot

SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese)

Die Methode der SDS-PAGE wurde nach Sambrook et al. durchgeführt.

15 µg Protein wurde aufgetragen. Das Gel wurde ca. 30 - 45 Minuten bei 15 V angeschlossen bis die Lauffront das Trenngel erreichte. Dann wurden die Proteine bei 30 mA aufgetrennt.

Transfer der Proteine auf Nitrocellulosemembran

Der Transfer der Proteine auf eine Membran erfolgte gekühlt bei 300 mA. Proteine bis 150 kDa wurden 1,5 h, Proteine bis 300 kDa 2 h geblottet.

Antikörperinkubation und Entwicklung

Um zu vermeiden, dass Antikörper unspezifisch binden, wurde die Membran 30 Minuten in 5 % Magermilch/PBS geblockt. Die Antikörper wurden je nach Angabe in 5 ml 5 % Magermilch/PBS verdünnt und mit der Membran in Folie eingeschweißt. Die Membran wurde über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper inkubiert und am nächsten Tag drei Mal 10 Minuten mit PBS gewaschen. Der sekundäre, Peroxidase markierte Antikörper wurde ebenfalls in 5 ml Blockinglösung verdünnt und mit der Membran eine Stunde inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde die Membran in der Dunkelkammer entwickelt. Mit dem SuperSignal West Dura Kit von Thermo Scientific wurden die Proteinbanden sichtbar gemacht. Dafür wurden 200 µl der H₂O₂- und 200 µl der ECL-Lösung gemischt und auf die Membran gegeben. Nach einer Minute wurde der Film aufgelegt. Je nach Stärke des Signals wurde der Film nach 15 Sekunden bis 15 Minuten für etwa 10 Sekunden in das Entwicklerbad gelegt, kurz mit Wasser gewaschen und dann in Fixierlösung fixiert. Zusätzlich wurden die Membranen in der Geldokumentation Chemidok XRS von BioRad dokumentiert.

2.2.1.1.14. EMSA

Dieser Assay dient dem Bindungsnachweis von Transkriptionsfaktoren an DNA-Sequenzen. Mögliche Bindestellen für AP-1-Faktoren in der vorhergesagten Promotorregion der miR-203 wurden mit dem Programm ALLGEN Promo analysiert. Je 20 µg der sense und antisense Oligonukleotide mit der Sequenz dieser Bindestellen wurden 5 Minuten mit 20 µl TEN50 Puffer bei 95°C hybridisiert, auf Raumtemperatur abgekühlt und auf eine Konzentration von 12,5 ng/µl eingestellt. 25 ng des doppelsträngigen Oligonukleotides wurden mit 5 U der T4 Polynukleotidkinase mit [γ ³²-P] ATP radioaktiv markiert. Dazu wurde der Reaktionsansatz für 1 h bei 37°C und anschließend bei 70°C für 10 min inkubiert. Nach der langsamen Abkühlung auf Raumtemperatur wurden die Proben 1:10 mit TE-Puffer verdünnt. Für den EMSA wurden 2,5 µg Kernextrakte mit 0,25 ng der markierten Oligonukleotide für 15 min bei Raumtemperatur in der Reaktionslösung inkubiert. Für Kompetitionsexperimente wurden die Kernextrakte im Reaktionspuffer zunächst mit den entsprechenden ungelabelten hybridisierten Oligonukleotiden (20 oder 200 ng) 15 Minuten auf Eis vorinkubiert. Für Supershift Analysen wurden die Kernextrakte mit 4 µg Antikörper 20 Minuten auf Eis vorinkubiert. DNA-gebundene Komplexe wurden auf einem Acrylamidgel für ca. 1,5 h bei einer Spannung von 160 V über eine Länge von ca. 10 cm aufgetrennt und anschließend 2 h auf einem Vakuumtrockner getrocknet. Die Bindung der Transkriptionsfaktoren an das markierte Oligonukleotid konnte aufgrund der

veränderten Laufstrecke im Vergleich zum ungebundenen Oligonukleotid auf dem Gel autoradiographisch nachgewiesen werden.

2.2.1.1.15. Immunhistochemie

Die immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten wurde mit dem Immpress Kit System der Firma Vector durchgeführt. Haut oder organotypische Kulturen wurden in 4 % Formaldehyd fixiert und durch Anne Kerber, Dermatologie, Uniklinikum Homburg, in Paraffin eingebettet. Schnitte von 7 µm Dicke wurden auf Objektträger aufgezogen, vor dem Färben deparaffiniert (Xylol, 3 mal 10 Minuten) und in einer absteigenden Ethanolreihe (99% / 90% / 80% / 70% / 50%) je 2 Minuten und 5 Minuten in Wasser rehydriert. Für die Antigendemaskierung wurden die Schitte 10 Minuten bei 95°C in Citratpuffer erhitzt. Die gewebeeigene Peroxidase wurde durch 10 Minuten Inkubation mit 3% H₂O₂/ 1xTBS zerstört. Es folgte ein Waschschrift in 1xTBS für 10 Minuten. Die Präparate wurden für 30 Minuten mit 2,5 % Pferdeserum geblockt. Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgte für eine Stunde (anti-Involucrin, anti p63) oder über Nacht bei 4°C (anti-p300) in einer feuchten Kammer. Nach einem Waschschrift in 1xTBS wurde für 30 Minuten der sekundäre Maus- bzw. Ziege-Peroxidase Antikörper (Impress Reagent Kit, Vector) dazugegeben. Nach zweimaligem Waschen in 1xTBS wurden die Schnitte mit DAB Substrat in einer dunklen Kammer 1-10 Minuten entwickelt. Mit Leitungswasser wurde die Reaktion abgestoppt und 20 Sekunden mit Hämatoxylin die Zellkerne gegengefärbt. Die Färbung wurde durch Spülen mit Leitungswasser stabilisiert. Anschließend wurden die Schnitte wieder in aufsteigender Ethanolreihe dehydriert (50%/ 70%/ 80%/ 99%), in Xylol getaucht und eingedeckelt (Vectamount, Vector).

4.2.3 In silico Analysen und Computerprogramme

Primer Design

- Oligonukleotide allgemein: NCBI
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>
- qRT-PCR Primer: UPL Roche
<http://lifescience.roche.com/shop/CategoryDisplay?catalogId=10001&tab=&identifier=Universal+Probe+Library>

Promotor Bindestelle Vorhersage

ALLGen Promo

http://algggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3

CpG Analyse von Promotorregionen

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/>

Literaturrecherche

Pubmed, Homepage des NCBI

www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed

microRNA Datenbank

miRBase

www.mirbase.org

<http://mirstart.mbc.nctu.edu.tw/>

Mikroskopaufnahmen

Leica Application Suite V3.06

4.2.4 Statistische Auswertung

Für Berechnungen wurde das Programm Excel, Office 2010 verwendet. Für die Erstellung der Balkendiagramme für die Ergebnisse der qRT-PCR wurde das Programm GraphPad 6 verwendet. Die Rohdaten der RT-PCR wurden auf das Haushaltsgen RPL13A normalisiert. Die Konzentration der gesuchten Genexpression wurde durch den Wert für RPL13A dividiert. Anschließend erfolgte die Relativierung auf die Kontrollzellen, indem deren Wert gleich 1 gesetzt wurde. Wenn nicht anders angegeben, wurden mindestens drei Experimente zusammengefasst. Der zweiseitige - Test wurde mit GraphPad 6 durchgeführt. Als signifikant werden p-Werte $< 0,05$ eingestuft.

5 Ergebnisse

5.1 HPV8 E6 stört die Differenzierung und Proliferation in Keratinozyten durch Unterdrückung der miR-203

5.1.1 HPV8 E6 induziert p63 und die Isoform Δ Np63 α in primären Keratinozyten

Um die Einflüsse der HPV8-Proteine E6 und E7 auf Signalwege und Prozesse in NFK zu untersuchen, wurden die Zellen durch retroviralen Gentransfer stabil mit dem Leervektor pLXSN oder pLXSN-8E6, pLXSN-8E7 und pLXSN-8E6/E7 infiziert. Ausgangspunkt der Arbeit bildete die Expressionsanalyse des Transkriptionsfaktors p63 in HPV8 E6- oder E7-exprimierenden NFK. Diese Zellen wurden zur Analyse der p63 Expression mittels Western Blot und der Δ Np63 α Expression mittels qRT-PCR eingesetzt. Δ Np63 α stellt die hauptsächlich exprimierte Isoform in proliferierenden Keratinozyten dar und wird durch die Verwendung eines p63 Antikörpers im Western Blot detektiert (Koster et al., 2004). In der qRT-PCR wurden Primer genutzt, die eine spezifische cDNA Sequenz der Δ Np63 α -Isoform erkennen. Abbildung 9 A und B zeigen, dass p63 in HPV8 E6-exprimierenden Zellen signifikant um das 2-fache induziert wurde. Dieser Effekt konnte durch die Expression von E7 nicht erzielt werden. In Zellen, die gleichzeitig E6 und E7 exprimierten, überwog der E6-Effekt und p63 wurde 2-fach induziert. Das gleiche Muster war auf mRNA-Ebene zu beobachten (Abbildung 9 C). In E6-exprimierenden Zellen wurde Δ Np63 α um das 2,5-fache signifikant induziert, während der Einfluss von E7 mit einer 1,2-fachen Induktion gering war. Ebenfalls lies sich feststellen, dass hier E6, zusammen mit E7 exprimiert, einen stärkeren Einfluss ausübte als E7 alleine und p63 2-fach induzierte. Die Ergebnisse aus dem RNA-Array konnten in zwei verschiedenen NFK-Spendern und vier verschiedenen retroviralen Infektionen bestätigt werden. Ebenso wurde die Expression der viralen Proteine HPV8 E6 und E7 für die Infektionen verifiziert (Abbildung 9 D, E).

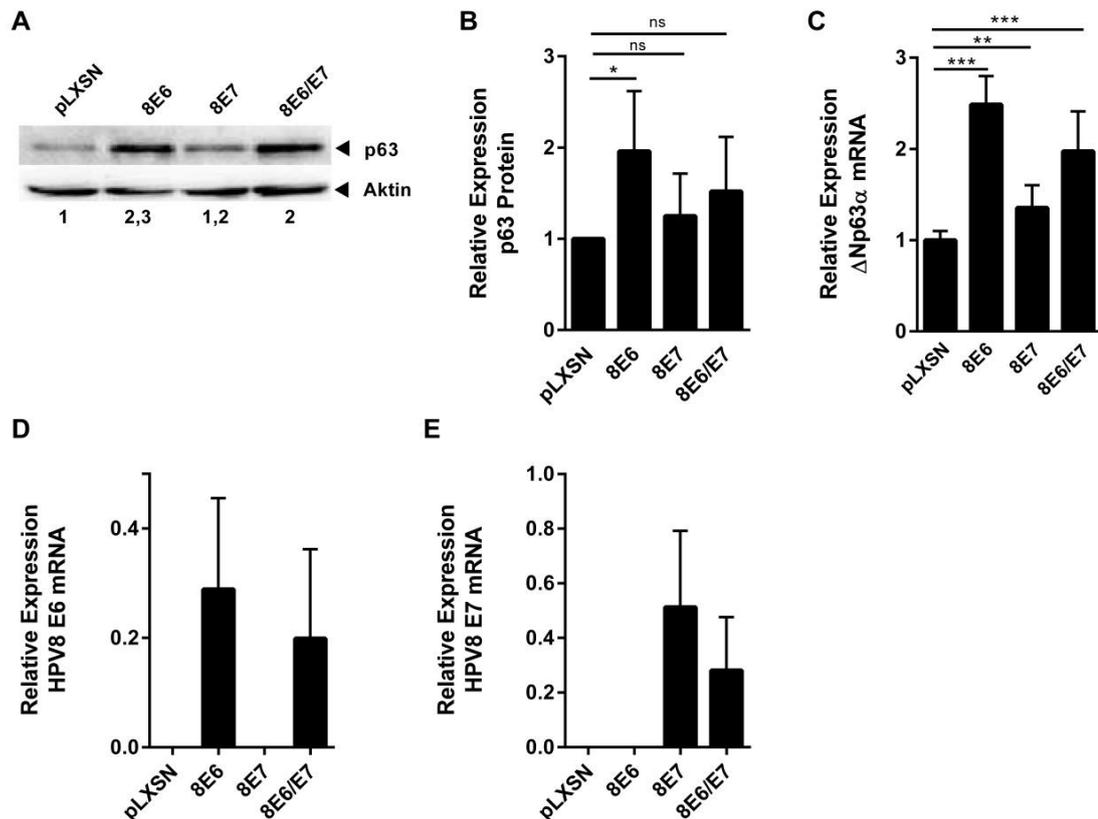


Abbildung 9. p63-Protein und Δ Np63 α mRNA Expression sind in NFK durch HPV8 E6 erhöht.

(A) Aus HPV8 E6-, E7- und E6/E7-exprimierenden NFK wurden Proteine isoliert und im Western Blot auf ihre p63 Expression analysiert. Zahlen geben die Quantifizierung von p63 im Verhältnis zur Ladekontrolle Aktin wieder. (B) Quantifizierung der Proteinexpression aus A von drei unabhängigen Experimenten. Aus den gleichen Zellen wurde mRNA isoliert und die (C) Δ Np63 α , (D) HPV8 E6 und (E) HPV8 E7 Expression mittels qRT-PCR analysiert. Normalisiert wurde auf die RPL13A Expression. ns= nicht signifikant, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

5.1.2 HPV8 E6 induziert p63 und die Isoform Δ Np63 α in der Keratinozyten Zelllinie HaCaT

Um zu überprüfen, ob die HPV8 E6 vermittelten induzierenden Effekte auf p63 auch in einer Keratinozyten Zelllinie auftreten, wurde die p63 Expression analog zu Abbildung 9 in HaCaT Zellen, die stabil E6 und E7 exprimierten, untersucht (Abbildung 10). HaCaT Zellen besitzen eine Mutation in Exon 5 und zwei Mutationen in Exon 8 von p53 (Lehman et al., 1993).

Die p63 Proteinexpression wurde durch E6 signifikant um das 2,3-fache induziert (Abbildung 10 A). E7 zeigte nur einen schwachen Einfluss und p63 wurde um das 1,5-fache induziert. Wurden beide viralen Proteine exprimiert, erhöhte sich das p63 Proteinlevel um das 2-fache. Eine im Vergleich zur Proteinmenge schwächere Induktion war auf mRNA Ebene zu erkennen (Abbildung 10 C). E6 induzierte Δ Np63 α signifikant um das 1,8-fache. E7 hatte wiederum keinen signifikanten Einfluss und E6

und E7 zusammen exprimiert erhöhten die Isoform ebenfalls nicht signifikant. Die Expression der viralen Gene E6 und E7 wurde mittels qPCR verifiziert (Abbildung 10 D, E)

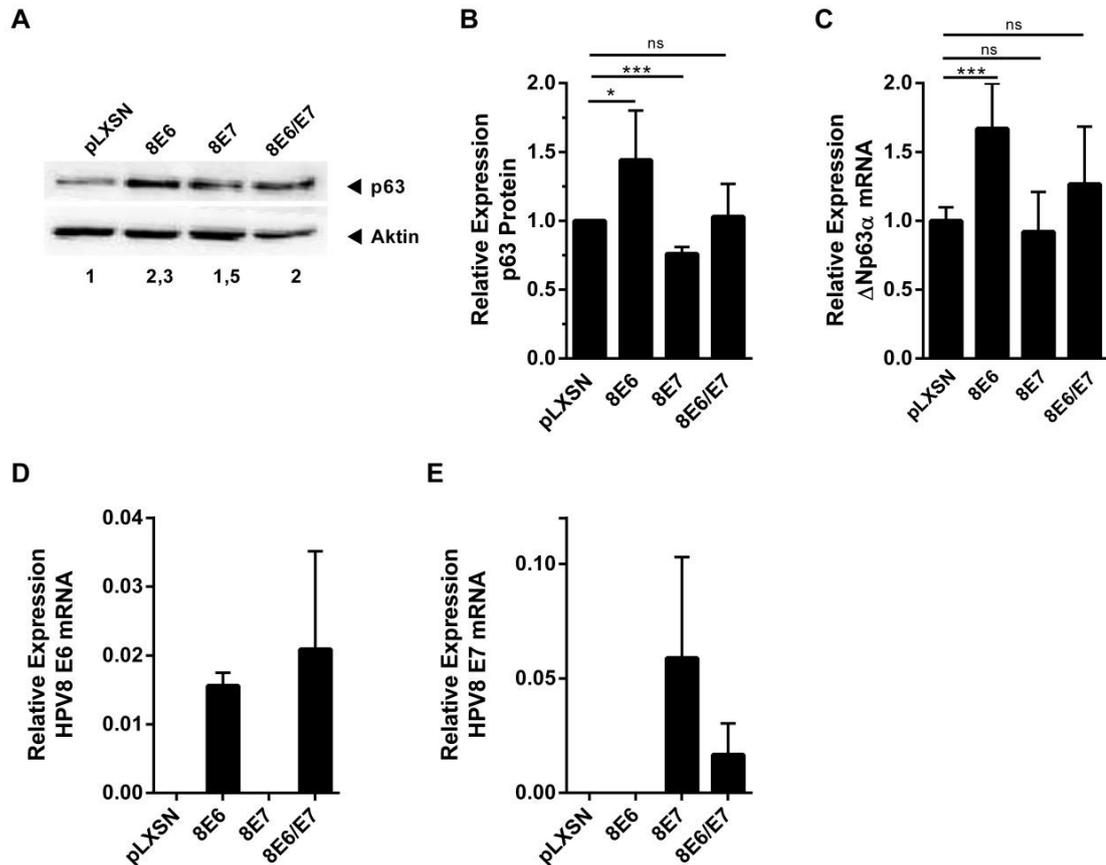


Abbildung 10. p63-Protein und Δ Np63 α mRNA Expression ist in HaCaT Zellen durch HPV8 E6 erhöht.

(A) Aus HPV8 E6-, E7- und E6/E7- exprimierenden HaCaT Zellen wurden Proteine isoliert und im Western Blot auf ihre p63 Expression analysiert. Zahlen geben die Quantifizierung von p63 im Verhältnis zur Ladekontrolle Aktin wieder. (B) Quantifizierung der Proteinexpression von drei unabhängigen Experimenten. Aus den gleichen Zellen wurde mRNA isoliert und die (C) Δ Np63 α , (D) HPV8 E6 und (E) HPV8 E7 Expression mittels qRT-PCR analysiert. Normalisiert wurde auf die RPL13A Expression. ns= nicht signifikant, * p < 0,05, *** p < 0,001.

Um den Einfluss von HPV8 E6 auf die p63 Expression in einem Modell zu untersuchen, welches der physiologischen Struktur der Haut gerechter wird, wurden organotypischen Hautkulturen generiert. HaCaT-pLXSN oder E6-exprimierende Keratinozyten wurden auf Kollagen und Fibroblasten an der Luft-Medium-Grenze kultiviert, wodurch sich innerhalb von 14 Tagen ein mehrschichtiges Epithel bildete. Von den Kulturen wurden Schnitte angefertigt und immunhistochemisch gefärbt. In der Kontrollkultur (Abbildung 11 A) wurde p63 vorwiegend in den Zellkernen der Basalzellen exprimiert (braun). In Bereichen, welche Differenzierung widerspiegeln und Hornperlen ausbilden, wurde der Transkriptionsfaktor nicht exprimiert und die Zellkerne

waren nur blau durch Hämatoxilin gegengefärbt. Im Gegensatz dazu, und äquivalent zu den Daten von Western Blot und qRT-PCR, war p63 in nahezu allen Zellkernen der E6-positiven organotypischen Kultur detektierbar (Abbildung 11B).

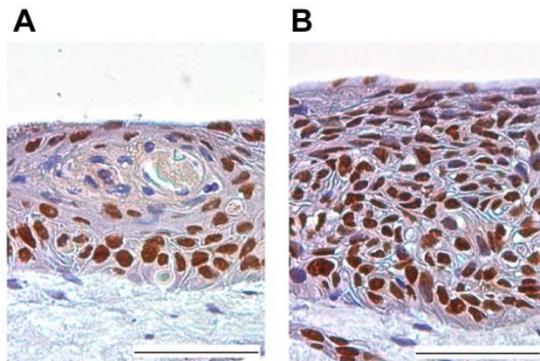


Abbildung 11. Organotypische Kulturen aus HPV8 E6-exprimierenden HaCaT Zellen zeigen erhöhte p63 Expression.

Organotypische Kulturen, generiert aus **(A)** HaCaT-pLXSN oder **(B)** HaCaT-8E6 Zellen, wurden nach 14 Tagen in Paraffin eingebettet und die Schnitte immunhistochemisch gegen p63 (braun) gefärbt. Zellkerne wurden mit Hämatoxilin (blau) gegengefärbt. Skalierung: 50 μm .

5.1.3 HPV8 E6 reduziert die miR-203 Expression in NFK und HaCaT Zellen

Die miR-203 wird während der Differenzierung der Haut induziert. Es ist bekannt, dass p63 durch die miR-203 negativ reguliert wird (Lena et al., 2008; Yi et al., 2008). Um herauszufinden, ob HPV8 E6 bereits die Expression der miR-203 stört und somit das p63-Expressionslevel erhöht, wurde die Expression der miR-203 durch qRT-PCR in retroviral infizierten NFK untersucht. In HPV8 E6-exprimierenden NFK wurde die miR-203 signifikant um die Hälfte reduziert (Abbildung 12 A). Auch E7 unterdrückte die miR-203, jedoch schwächer auf das 0,7-fache. E6 und E7 zusammen exprimiert reprimierten die miR-203 auf das 0,2-fache. In HaCaT Zellen war die miR-203 in E6-exprimierenden Zellen ebenfalls um die Hälfte reduziert. Es ist beschrieben, dass der Differenzierungs-Stimulus Calcium die miR-203 Expression induziert (Lena et al., 2008). Dies konnte ebenfalls bestätigt werden (Abbildung 12 B, C). In HaCaT-pLXSN Zellen induzierte Ca^{2+} nach 72 h die miR-203 um etwa das 2-fache, hier dargestellt im Northern Blot sowie in der qRT-PCR. Exprimierten die Zellen jedoch E6, wurde die miR-203 Expression verringert und der Calcium-vermittelte Effekt vollständig reprimiert.

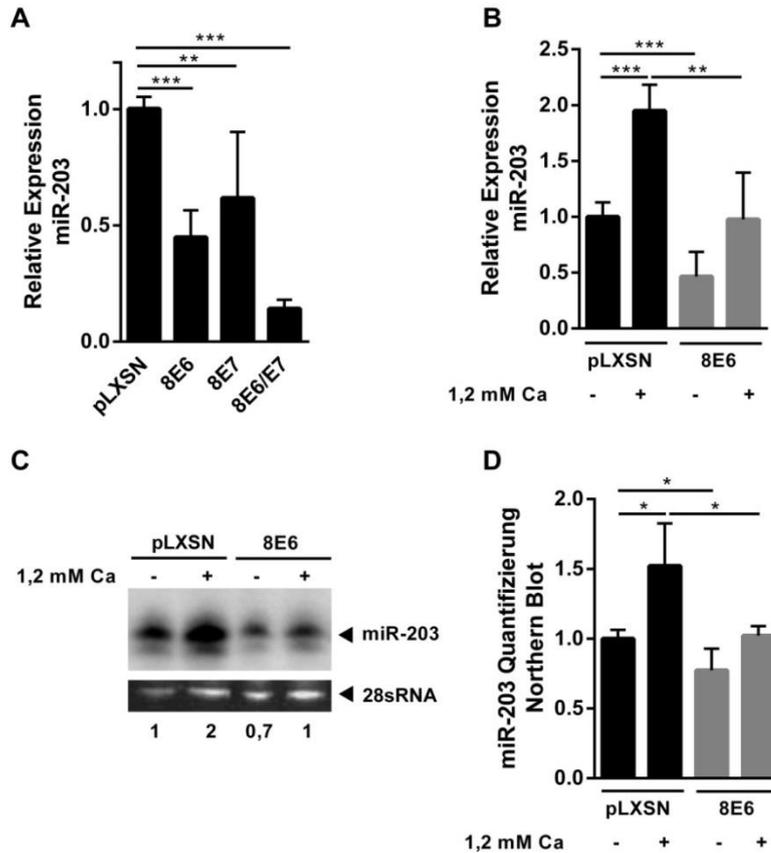


Abbildung 12. miR-203 Expression ist in HPV8 E6-exprimierenden NFK und HaCaT Zellen verringert.

(A) HPV8 E6-, E7- und E6/E7- exprimierende NFK wurden für gesamt-RNA geerntet und die miR-203 Expression über qRT-PCR bestimmt. Die relative miR-203 Expression wurde durch die $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode durch Normalisierung auf RNU6B bestimmt. (B) HaCaT-pLXSN und HaCaT-8E6 Zellen wurden 72 h mit 1,2 mM $CaCl_2$ stimuliert und die miR-203 Expression wie in A gemessen. (C) miR-203 Expression der wie in (B) behandelten HaCaT Zellen wurden im Northern Blot bestimmt. 28 sRNA dient als Ladekontrolle. (D) Quantifizierung der miR-203 Expression aus drei Northern Blot Experimenten. * $p < 0,01$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

5.1.4 p63 und miR-203 sind in HPV8-positiven EV-Läsionen gegenläufig exprimiert

Zur Überprüfung der p63 Expression *in vivo* wurden HPV8-positive EV-Läsionen immunhistochemisch gegen p63 (rot) gefärbt (Abbildung 13 A, B). Die miR-203 wurde über *in situ* Hybridisierung (blau) detektiert (Abbildung 13 C, D). Eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin wurde nur für p63 durchgeführt, da diese das miR-203 Signal überlagert hätte.

Nicht-läsionale Bereiche der Haut eines EV-Patienten sind auch mikroskopisch kaum von der Normalhaut Gesunder zu unterscheiden. Die Basallamina ist gleichmäßig und trennt die Dermis von der Epidermis. Eine frühe Läsion ist gekennzeichnet durch große, blasige Zellen mit viel Zytoplasma in denen eine hohe virale Replikation stattfindet (Sperling et al., 2012). In dysplastischen Regionen liegen sehr viele

Hautschichten vor. Zum Teil sind auch invasive Anteile zu erkennen, die auf Malignität hinweisen.

In nicht-läsionalen Bereichen wurde p63 nur in den Zellkernen der Basalzellen und Suprabasalzellen exprimiert und nicht in differenzierten Zellen des *Stratum granulosum* (Abbildung 13 A). Betrachtet man die Läsion, fällt eine massive Verbreitung der p63-positiven Keratinozyten-Schichten auf (Abbildung 13 B). Im Gegensatz dazu war die miR-203 hauptsächlich in nicht-läsionalen Bereichen im Zytoplasma der differenzierten, suprabasalen Schichten detektierbar (Abbildung 13 C). In der Läsion war die miR-203 stark unterdrückt (Abbildung 13 D).

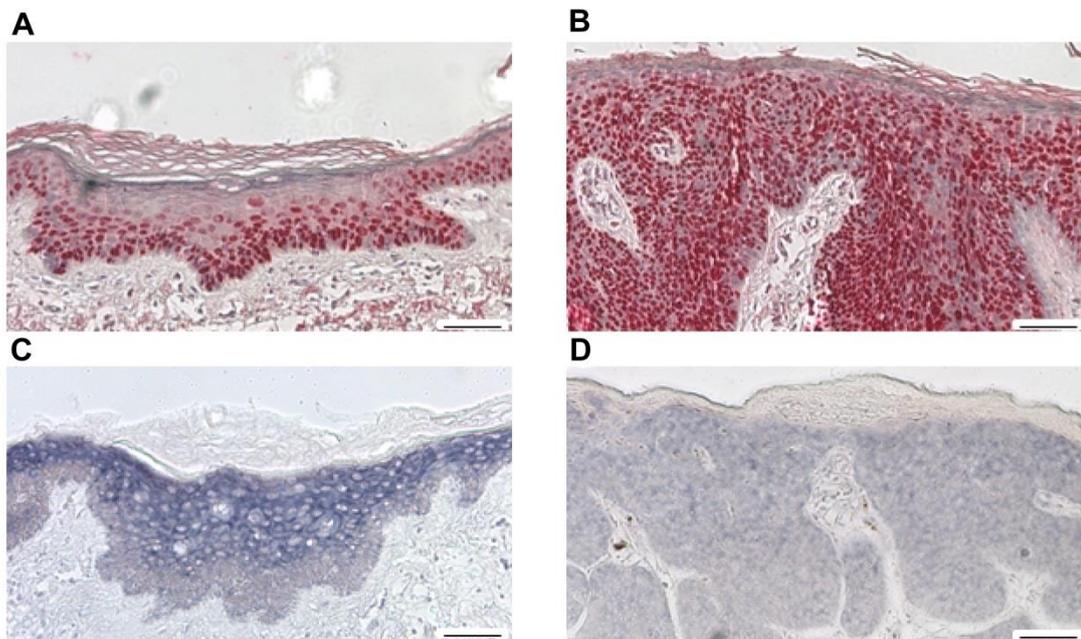


Abbildung 13. p63 und miR-203 Expression in Schnitten von HPV8-positiven EV-Patienten.

Immunhistochemische Färbung gegen p63 (rot) in (A) nicht läSIONALEM und (B) läSIONALEM Bereich von EV-Läsionen. In situ Hybridisierung gegen miR-203 (blau) in (C) nicht läSIONALEM und (D) läSIONALEM Bereich. Skalierung: 100 µm.

5.1.5 HPV8 E6 induziert Proliferation in Keratinozyten

Der Transkriptionsfaktor p63 ist ein Masterregulator für Proliferation in Basalzellen der Epidermis. Aufgrund der Erhöhung dieses Faktors durch HPV8 E6 war es naheliegend, die Auswirkungen dieser Deregulation auf die Proliferation hin zu untersuchen. Außerdem fiel auf, dass die E6-positiven organotypischen Kulturen dicker waren (Abbildung 11). Deshalb wurde zunächst die Anzahl der Zellkerne der organotypischen Kulturen bestimmt und zum Ausschluss von Unterschieden in der Schichtung diese auf die Fläche der Kultur normalisiert (Abbildung 14 A). Für die HPV8 E6-positive Kultur ergab sich eine Steigerung der Zellzahl um das 1,5-fache. In einem weiteren Experiment wurde die Inkorporation des Thymidinanalogons BrdU während der

Replikation der Zellen im Monolayer gemessen (Abbildung 14 B). Auch hier zeigte sich, dass HPV8 E6 die Zellteilung signifikant um das 1,5-fache positiv beeinflusst. In Abbildung 14 C wurde die Proliferation der Zellen über einen Scratch-Assay bestimmt. Der intakte Monolayer wurde durch einen gleichmäßigen Kratzer unter Zuhilfenahme einer Pipettenspitze verletzt und das Zuwachsen der freien Fläche in pLXSN und E6 infizierten HaCaT Zellen nach 0 h, 24 h und 48 h beobachtet. Bereits nach 24 h wurde deutlich, dass die E6-exprimierenden Zellen die Lücke signifikant schneller schlossen. Nach 48 h war nur noch in den pLXSN-Kontroll Zellen eine freie Fläche detektierbar.

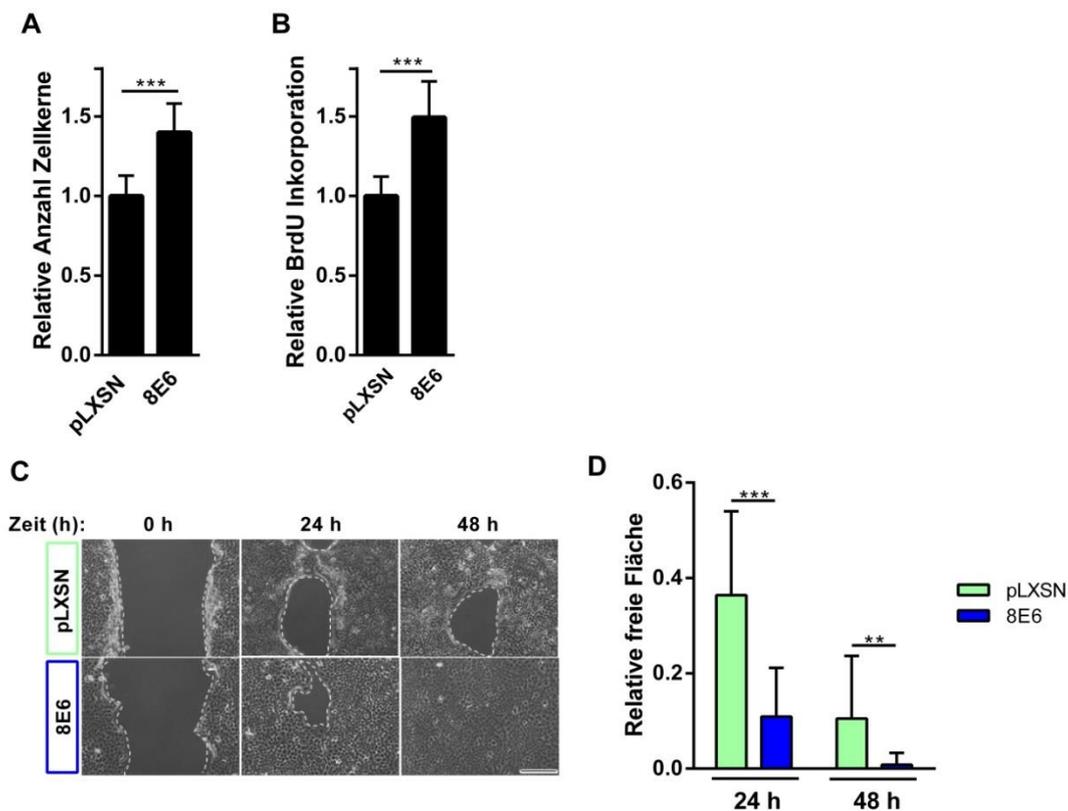


Abbildung 14. Proliferation ist in HPV8 E6-exprimierenden HaCaT Zellen erhöht.

(A) Die Anzahl der Zellkerne in HaCaT-pLXSN und HaCaT-8E6 organotypischen Kulturen wurde in drei Bildausschnitten an drei Kulturen gezählt und auf die Fläche verrechnet. (B) HaCaT-pLXSN und HaCaT-8E6 Zellen wurden für 17 h in 10 μ M BrdU kultiviert, fixiert und die Menge der BrdU Inkooperation mit einem sekundären Antikörper detektiert. (C) Der Zellrasen von konfluent gewachsenen HaCaT-pLXSN und HaCaT-8E6 Zellen wurde mit einer 10 μ l Pipettenspitze gekratzt und das Zuwachsen der Fläche nach 0 h, 24 h und 48 h mikroskopisch bestimmt. Der Rand des Scratches ist durch eine gestrichelte Linie markiert. Skalierung 200 μ m. (D) Drei Experimente wurden quantifiziert. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$

5.1.6 HPV8 E6 unterdrückt Gene der Keratinozytendifferenzierung in NFK

Nachdem der Einfluss von HPV8 E6 auf die Proliferation untersucht wurde, sollten nun in weiteren Experimenten die Effekte auf die Keratinozytendifferenzierung bestimmt werden. Die mRNA Expression von Markern der Keratinozytendifferenzierung in NFK wurden mittels qRT-PCR analysiert. Abbildung 15 zeigt, dass Corneodesmosin (CDSN), Cornifelin (CNFN), Late cornified envelope 2B (LCE2B) und Involucrin in E6-exprimierenden Zellen signifikant reprimiert wurden. Die Deregulation dieser Marker durch HPV8 E6 war zuvor in der Expressionanalyse des Affimetrix Gene Chip Human Gene 1.0 ST angezeigt worden und belief sich bei CDSN auf 0,2, bei CNFN auf 0,1, bei LCE2B auf 0,2 und bei Involucrin auf 0,3 gegenüber der Kontrolle pLXSN. Diese Ergebnisse wurden in vier verschiedenen retroviralen Infektionen an zwei NFK Spendern über qRT-PCR bestätigt (Abbildung 15).

In E7-exprimierenden Zellen war die Expressionshöhe der Differenzierungsgene CDSN, CNFN und Involucrin ebenfalls reduziert, allerdings geringer als durch E6. LCE2B wurde durch E7 nicht signifikant unterdrückt. In E6/E7-exprimierenden NFK lag die Expression von CNFN und LCE2B auf dem gleichen Niveau wie in Zellen, welche nur E6 exprimierten. Die Involucrin-Expression wurde durch E6/E7 sogar noch stärker unterdrückt als durch E6 alleine.

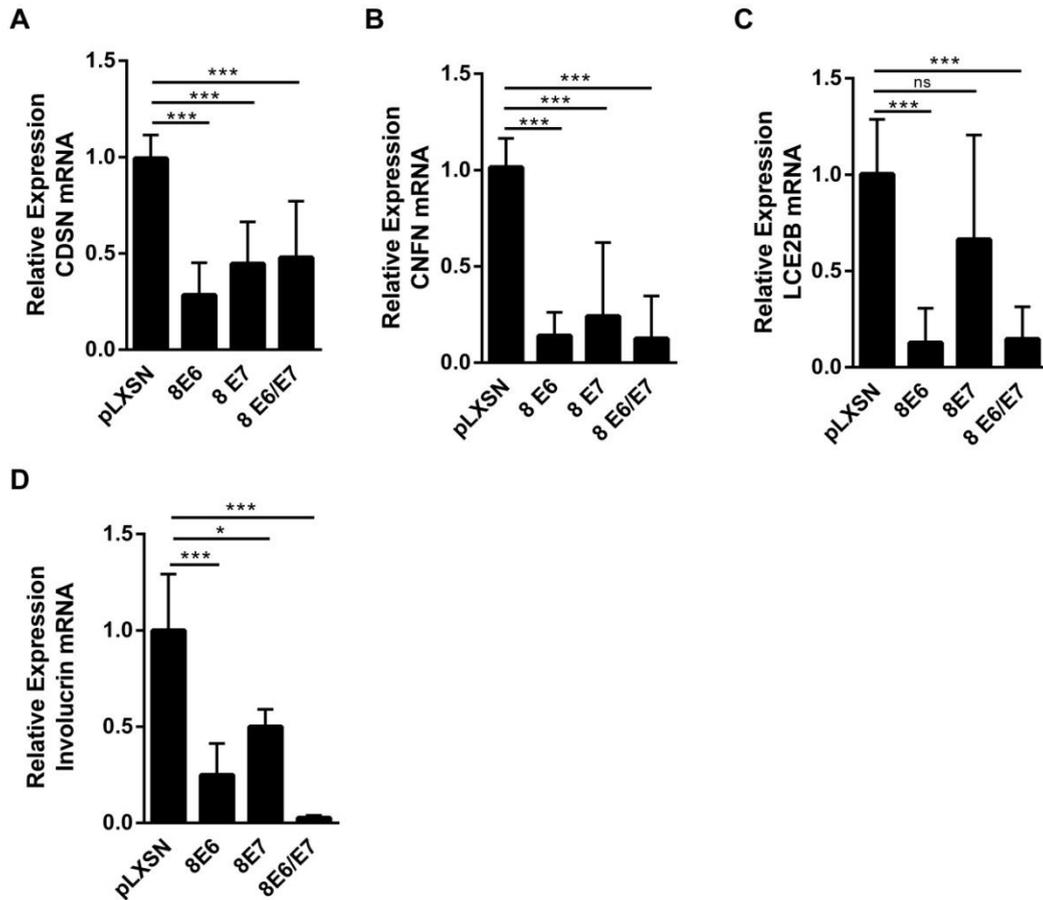


Abbildung 15. Gene der Keratinozytendifferenzierung sind durch HPV8 E6 in NFK unterdrückt.

Aus HPV8 E6-, E7- und E6/E7- exprimierenden NFK wurde RNA isoliert und die **(A)** CDSN, **(B)** CNFN, **(C)** LCE2B und **(D)** Involucrin Expression mittels qRT-PCR bestimmt. Normalisiert wurde auf die RPL13A Expression. ns= nicht signifikant, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

Um in weiteren Versuchen Effekte auf die Differenzierung zu betrachten, wurde der Marker Involucrin ausgewählt. In Abbildung 16 ist die Proteinexpression von Involucrin in NFK dargestellt. In E6-exprimierenden Zellen wurde Involucrin signifikant 0,4-fach reprimiert. Die Expression des E7-Proteins bewirkte einen deutlich schwächeren Effekt, dennoch war ebenfalls eine Reduktion von Involucrin auf 0,6-fach zu verzeichnen. Wurden E6 und E7 zusammen exprimiert, ergab sich der gleiche Phänotyp wie für E6 alleine: die Involucrin-Expression wurde signifikant 0,1-fach herunterreguliert. Die Suppression war sogar stärker als in Zellen, welche nur E6 exprimierten.

Nachdem eine Expression von E6 und E7 zusammen den gleichen oder stärker reprimierenden Effekt auf die Differenzierungsmarker ausübte wie E6 alleine, wurde in den folgenden Experimenten nur der Einfluss von E6 untersucht.

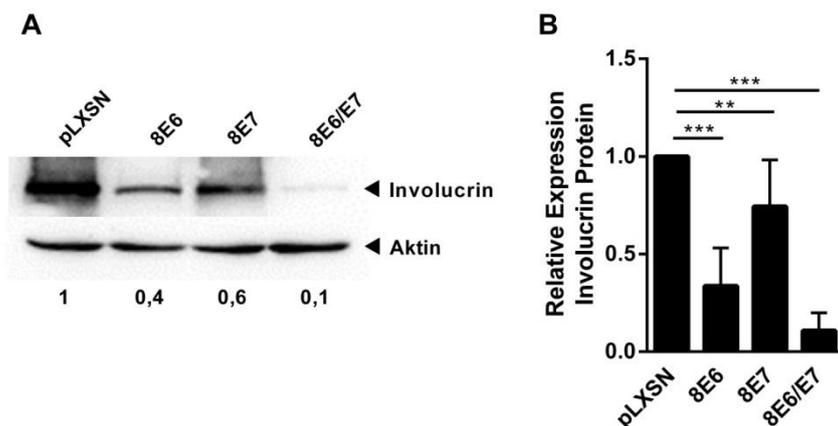


Abbildung 16. Involucrin Expression ist durch HPV8 E6 in NFK unterdrückt.

(A) Aus HPV8 E6-, E7- und E6/E7- exprimierenden NFK wurden Proteine isoliert und die Involucrin Expression im Western Blot bestimmt. Zahlen geben die Quantifizierung im Verhältnis zur Ladekontrolle Aktin wieder. (B) Quantifizierung der Proteinexpression aus (A) von drei unabhängigen Experimenten. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

5.1.7 HPV8 E6 unterdrückt die Involucrin-Expression in HaCaT Zellen

Es sollte nun überprüft werden, ob in der Zelllinie HaCaT die gleichen Effekte auf die Differenzierung zu beobachten waren wie in NFK (Abbildung 17). Es zeigte sich, dass in HPV8 E6-exprimierenden HaCaT Zellen die Involucrin Proteinmenge auf das 0,5-fache vermindert wurde. Wurden die pLXSN-Zellen mit 1,2 mM Calcium stimuliert, konnte die Differenzierung induziert werden, was sich in einer mehr als 4-fachen Erhöhung der Involucrin-Expression widerspiegelte. Die Induktion wurde in E6-exprimierenden Zellen komplett unterdrückt. Diese Beobachtungen ließen sich auch für die mRNA Expression reproduzieren (Abbildung 17 B). Calcium-Stimulation induzierte Involucrin in den pLXSN-Zellen um mehr als das 2-fache. In E6-exprimierenden Zellen wurde der Differenzierungsmarker signifikant auf das 0,2-fache herunterreguliert. Die Stimulation der E6-exprimierenden Zellen wurde zu 100 % unterdrückt.

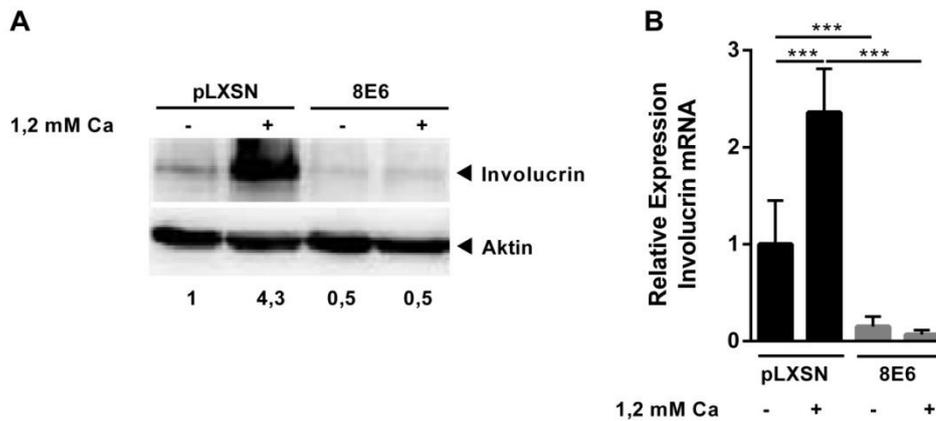


Abbildung 17. Involucrin Expression ist durch HPV8 E6 in HaCaT Zellen unterdrückt.

(A) HPV8 E6-exprimierende HaCaT Zellen wurden 3 Tage mit 1,2 mM Ca^{2+} behandelt, Proteine isoliert und die Involucrin Expression im Western Blot bestimmt. Zahlen geben die Quantifizierung im Verhältnis zur Ladekontrolle Aktin wieder. (B) Die gleichen Zellen wie in A wurden für RNA-Extraktion und qRT-PCR Analyse von Involucrin verwendet. Normalisiert wurde auf die RPL13A Expression. *** $p < 0,001$.

Aus pLXSN und E6-exprimierenden HaCaT Zellen wurden organotypische Kulturen generiert und immunhistochemisch gegen Involucrin angefärbt. In der Kontroll-Kultur wurde Involucrin nur in den suprabasalen Schichten im Zytoplasma detektiert (braun), Basalzellen zeigten keine Expression (Abbildung 18 A). Vor allem in den Bereichen der Hornperlbildung zeigte sich verstärkte Expression. Dies waren Bereiche, welche negativ für p63 gefärbt wurden (Abbildung 11 A). Im Gegensatz dazu konnte in E6-Kulturen kaum eine Involucrin Expression detektiert werden.

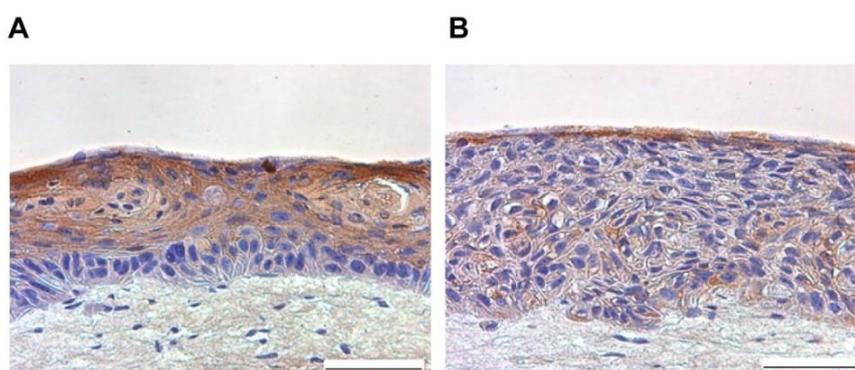


Abbildung 18. Organotypische Kulturen aus HPV8 E6-exprimierenden HaCaT Zellen zeigen verringerte Involucrin Expression.

Organotypische Kulturen, generiert aus (A) HaCaT-pLXSN oder (B) HPV8 E6-exprimierende Zellen, wurden nach 14 Tagen in Paraffin eingebettet und die Schnitte immunhistochemisch gegen Involucrin (braun) gefärbt. Zellkerne wurden mit Hämatoxylin (blau) gegengefärbt. Skalierung: 50 μm .

5.1.8 Involucrin-Expression ist in EV-Läsionen stark reduziert

Um den physiologischen Verlauf der Involucrin Expression im Zusammenhang mit HPV8 zu untersuchen, wurden Hautläsionen von HPV8-positiven EV-Patienten immunhistochemisch gegen Involucrin gefärbt. In Abbildung 19 A ist ein nicht-läsionaler Bereich dargestellt, welcher der Haut gesunder Personen gleicht. Involucrin ist nur in den suprabasalen, differenzierten Hautschichten im Cytoplasma exprimiert. In extrem proliferativen Bereichen der Läsion war die Involucrinexpression massiv unterdrückt (Abbildung 19 B). Nur in den obersten Schichten konnte Involucrin detektiert werden.

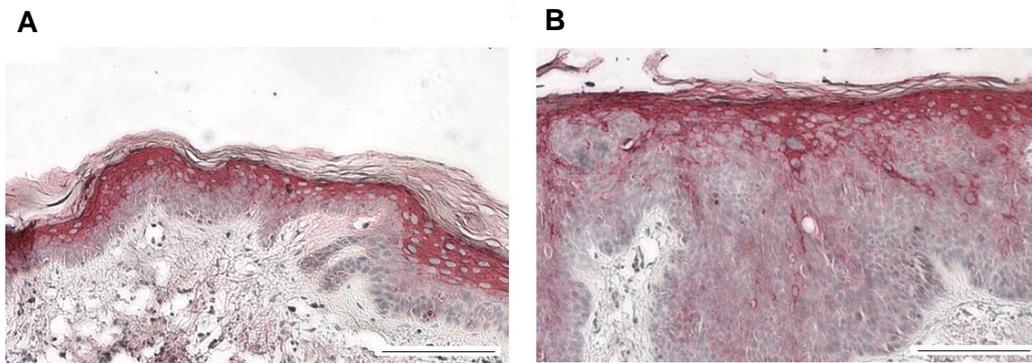


Abbildung 19. Involucrin Expression in Schnitten von HPV8-positiven EV-Patienten. Immunhistochemische Färbung gegen Involucrin (rot) in **(A)** nicht läSIONalem und **(B)** läSIONalem Bereich von EV-Läsionen. Skalierung: 200 μ m.

5.1.9 HPV8 E6 induzierte p63 Expression ist für reduzierte Involucrin Expression und verstärkte Proliferation verantwortlich

Nachdem gezeigt wurde, dass HPV8 E6 Marker der Keratinozytendifferenzierung auf der einen Seite massiv unterdrückte und auf der anderen Seite Proliferation induzierte, sollte untersucht werden, ob dies aufgrund der E6 vermittelten p63-Induktion geschah. Zunächst wurde in HaCaT Zellen die p63 Expression über siRNA Transfektion reduziert. Abbildung 20 A-C stellt die Ergebnisse des Western Blots dar. Erneut wurde p63 durch E6 signifikant induziert (2,4-fach). In pLXSN sowie in E6-exprimierenden HaCaT Zellen war der *Knockdown* von p63 erfolgreich. In den Kontroll-Zellen induzierte die siRNA-vermittelte p63-Reduktion die Involucrin Expression signifikant um das 1,5-fache. Vor allem in den E6-exprimierenden Zellen konnte durch p63-siRNA Transfektion der supprimierende Einfluss auf Involucrin revertiert werden. Das Expressionslevel wurde mit einer 4-fachen Induktion fast auf ein normales Niveau angehoben (0,8-fach). Die gleichen Ergebnisse konnten in der qRT-PCR beobachtet werden (Abbildung 20 D/E). Der *Knockdown* von p63 induzierte auch hier in den pLXSN- und in den E6-positiven Zellen signifikant die Involucrin Expression.

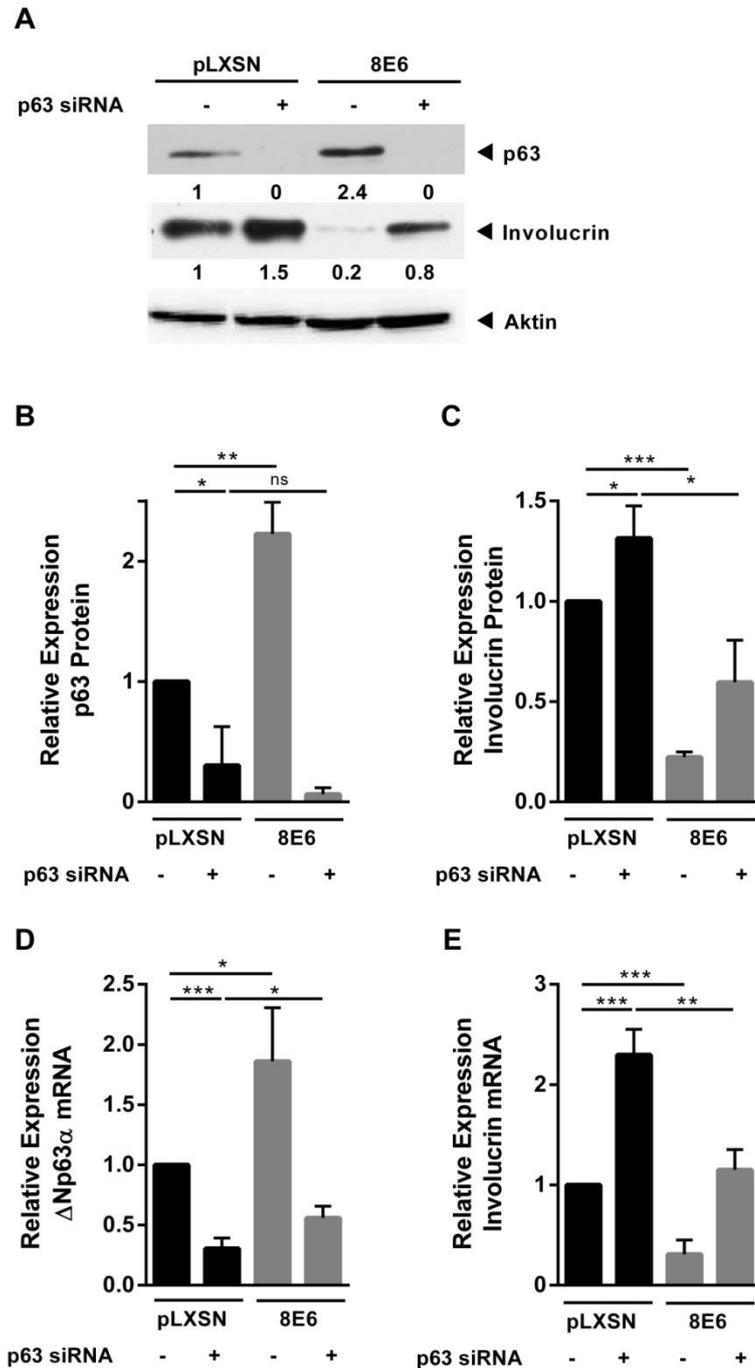


Abbildung 20. p63 siRNA Transfektion in pLXSN und HPV8 E6-exprimierenden HaCaT Zellen beeinflusst die Involucrin Expression.

pLXSN-Kontroll und HPV8 E6-exprimierende HaCaT Zellen wurden mit 10 nM non-coding oder p63 siRNA transfiziert und nach 48 h Proteine und RNA isoliert. **(A)** Die p63 und Involucrin Expression wurde im Western Blot analysiert. Zahlen geben die Quantifizierung im Verhältnis zur Ladekontrolle Aktin wieder. **(B, C)** Quantifizierung der Proteinexpression von drei unabhängigen Experimenten. Die **(D)** Δ p63 α und **(E)** Involucrin Expression wurde mittels qRT-PCR bestimmt. Normalisiert wurde auf die RPL13A Expression. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Über einen Scratch Assay sollte nun der Einfluss von p63 auf die Proliferation untersucht werden (Abbildung 21). Wie im vorherigen Experiment wurde p63 über siRNA Transfektion in pLXSN und E6-exprimierenden HaCaT Zellen herunter reguliert. Anschließend wurde wie in Abbildung 14 C das Schließen der Lücke im Monolayer verfolgt (Abbildung 21 A). Wie bereits publiziert, unterdrückte die Reduktion von p63 das Zellwachstum (dunkelgrün) (Craig et al., 2010; Viticchie et al., 2012). Der Kratzer war nach 24 und 48 h signifikant weniger bewachsen als die Kontroll-infizierten pLXSN Zellen. Wie bereits in Abbildung 14 C gezeigt, schlossen E6-exprimierende Zellen die Lücke des Kratzers schneller, als die korrespondierende pLXSN-Kontrolle (hellblau). Wurden nun aber die E6-exprimierenden HaCaT Zellen mit p63 siRNA transfiziert, war nach 48 h, wie in der Kontrolle, der Kratzer noch nicht zugewachsen (dunkelblau). Die Quantifizierung der Scratch-Fläche sowie deren statistische Auswertung sind in Abbildung 21 B dargestellt. Der Erfolg des p63-Knockdowns wurde nach Abschluss des Experiments mittels qRT-PCR verifiziert (Daten nicht gezeigt).

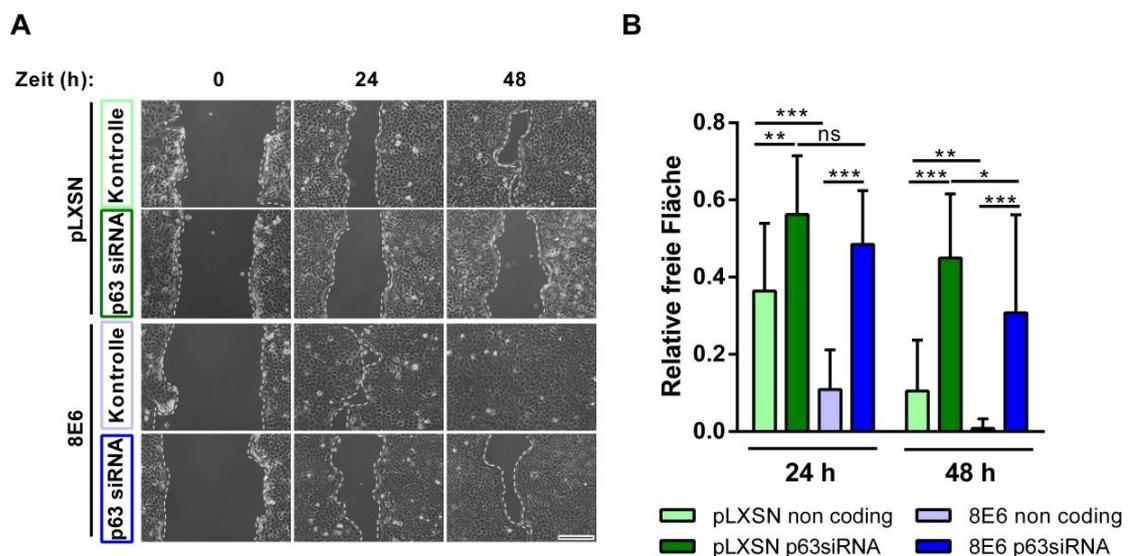


Abbildung 21. p63 siRNA Transfektion in HaCaT-pLXSN und HPV8 E6-exprimierenden Zellen beeinflusst die Proliferation.

(A) pLXSN-Kontroll und HPV8 E6-exprimierende HaCaT Zellen wurden mit 10 nM non-coding oder p63siRNA transfiziert. Der Zellrasen wurde 24 h nach Transfektion mit einer 10 μ l Pipettenspitze gekratzt und das Zuwachsen der Fläche nach 0 h, 24 h und 48 h mikroskopisch bestimmt. Der Rand des Scratches ist durch eine gestrichelte Linie markiert. Skalierung 200 μ m. (B) Drei Experimente wurden zusammengefasst. ns=nicht signifikant, **p<0,01, ***p<0,001.

5.1.11 HPV8 E6 vermittelte miR-203 Suppression ist für reduzierte Involucrin Expression und verstärkte Proliferation verantwortlich

Nachdem gezeigt wurde, dass die erhöhte p63 Expression für die Deregulation der Involucrin-Expression und der Proliferation verantwortlich war, galt es im nächsten Schritt zu analysieren, inwiefern bereits die Reduktion der miR-203 Expression durch HPV8 E6 für diese Effekte verantwortlich ist. Die miR-203 wurde in HaCaT-pLXSN und E6-exprimierenden Zellen überexprimiert und die Effekte auf die Involucrin und p63 Expression im Western Blot und in der qRT-PCR untersucht (Abbildung 22). Durch die miR-203 Mimic Transfektion wurde das Target p63 in den pLXSN-Zellen auf das 0,6-fache (Protein, mRNA), in den E6-exprimierenden Zellen von 1,4 auf 1 (Protein) bzw. von 1,2 auf 0,9 (mRNA) signifikant reduziert. In diesem Experiment wurden ähnliche Bedingungen geschaffen wie durch die p63 siRNA Transfektion, da durch die miR-203 Mimic die p63 Expression reduziert wurde. Auch die Involucrin Expression konnte in den pLXSN-Zellen, wie beschrieben, auf das 1,3-fache (Protein) bzw. auf das 1,7-fache (RNA) signifikant angehoben werden (Sunkoly et al., 2010). Der E6 vermittelte suppressive Effekt wurde aufgehoben, die Involucrin Expression wurde 7-fach (Protein) bzw. 2-fach (RNA) induziert und damit zu mehr als 70 % wiederhergestellt.

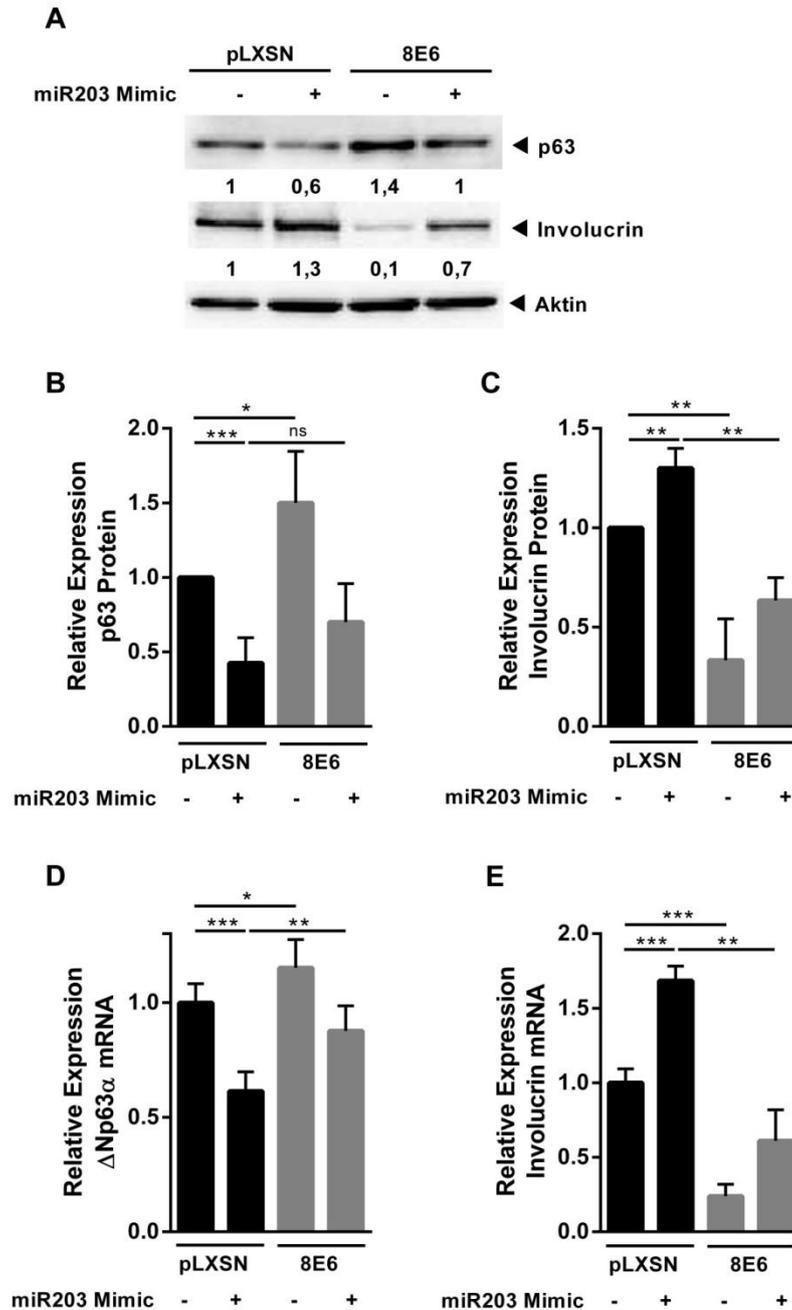


Abbildung 22. miR-203 Mimic Transfektion in pLXSN und HPV8 E6-exprimierenden HaCaT Zellen beeinflusst die p63 und Involucrin Expression.

pLXSN-Kontroll und HPV8 E6-exprimierende HaCaT Zellen wurden mit 20 nM non-coding oder miR-203 Mimic transfiziert und nach 72 h Proteine und RNA isoliert. **(A)** Die p63 und Involucrin Expression wurde im Western Blot analysiert. Zahlen geben die Quantifizierung im Verhältnis zur Ladekontrolle Aktin wieder. **(B, C)** Quantifizierung der Proteinexpression von drei unabhängigen Experimenten. Die **(D)** Δ p63 α und **(E)** Involucrin Expression wurde mittels qRT-PCR bestimmt. Normalisiert wurde auf die RPL13A Expression. ns=nicht signifikant, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Auch die Effekte auf die Proliferation im Scratch Assay (Abbildung 23) waren vergleichbar mit den p63-siRNA Experimenten. Wie zuvor durch Viticchie und Kollegen (2012) berichtet, unterdrückte die Überexpression der miR-203 das Wachstum. In den pLXSN Kontroll-Mimic transfizierten Zellen konnte dieser Effekt beobachtet werden (dunkelgrün). Nach 48 h war die Lücke im Zellrasen noch nicht ganz bewachsen. E6-exprimierende Zellen schlossen die Lücke des Kratzers schneller als die korrespondierende pLXSN-Kontrolle (hellblau). In HPV8 E6-exprimierenden HaCaT Zellen unterdrückte die Überexpression der miR-203 das Wachstum (dunkelblau). Nach 24 h war die Lücke des Kratzers noch deutlich sichtbar. Auch nach 48 h war der Kratzer noch nicht bewachsen. Hier war das Wachstum sogar etwas stärker gehemmt als in der Kontrolle. Die Quantifizierung der Scratch-Fläche sowie deren statistische Auswertung sind in Abbildung 21 B dargestellt. Der Erfolg der miR-203 Überexpression wurde nach Abschluss des Experiments mittels qRT-PCR verifiziert (Daten nicht gezeigt).

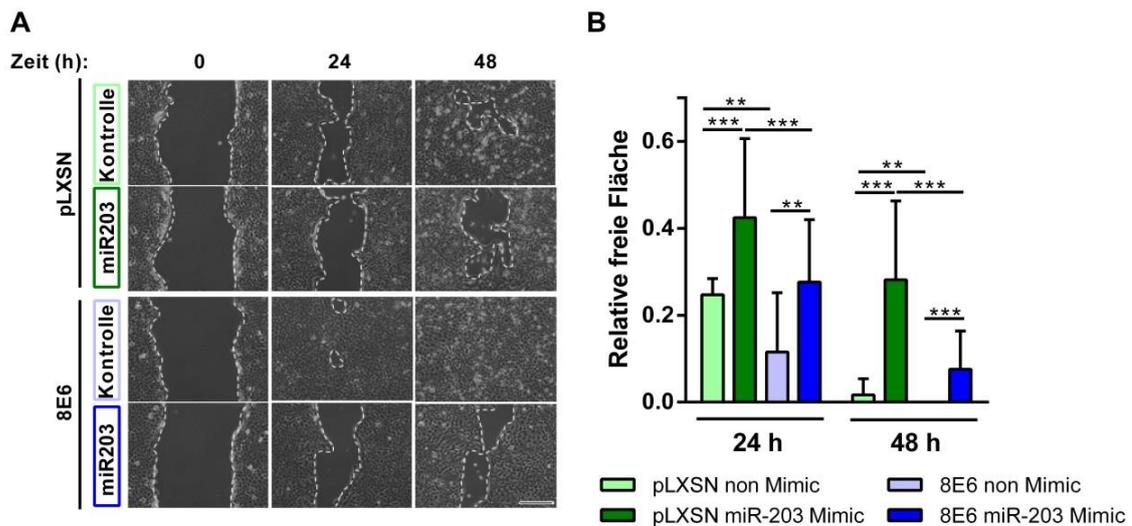


Abbildung 23. miR-203 Mimic Transfektion in pLXSN und HPV8 E6-exprimierenden HaCaT Zellen beeinflusst die Proliferation.

(A) pLXSN-Kontroll und HPV8 E6-exprimierende HaCaT Zellen wurden mit 20 nM *non Mimic*- oder miR-203 Mimic transfiziert. Der Zellrasen wurde 24 h nach Transfektion mit einer 10 μ l Pipettenspitze gekratzt und das Zuwachsen der Fläche nach 0 h, 24 h und 48 h mikroskopisch bestimmt. Der Rand des Scratches ist durch eine gestrichelte Linie markiert. Skalierung 200 μ m. (B) Drei Experimente wurden zusammengefasst. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

5.1.12 WNT-Inhibitor Dickkopf 1 (DKK1) ist über miR-203 durch HPV8 E6 reguliert

Ein weiteres interessantes Gen wurde im RNA-Array in HPV8 E6-exprimierenden NFK auf das 0,1-fache unterdrückt. Es handelt sich um den WNT-Inhibitor DKK1, der eine wichtige Rolle in der epidermalen-mesenchymalen Transition (EMT) der Haut spielt und somit auch Migration und Proliferation beeinflusst. qRT-PCR Analysen bestätigten die Array-Daten. DKK1 wurde in E6-exprimierenden NFK signifikant auf das 0,4-fache (Abbildung 24 A), in E6-exprimierenden HaCaT Zellen signifikant auf das 0,7-fache unterdrückt (Abbildung 24 B). Die Suppression von DKK1 war in HaCaT Zellen schwächer. Interessanterweise viel auf, dass durch miR-203-Mimic Überexpression die DKK1 Expression in HaCaT Zellen 1,8-fach induziert wurde (Abbildung 24 B). Außerdem konnte die DKK1 Expression in HPV8 E6-exprimierenden HaCaT Zellen durch die miR-203-Mimic 1,7-fach induziert werden. Dies entsprach der Induktion in den pLXSN-Kontrollzellen. Das gleiche Experiment wurde in NFK durchgeführt und erbrachte ähnliche Resultate (Abbildung 24 C). In den Kontrollzellen induzierte die miR-203 Mimic die DKK1 Expression 1,3-fach. Allerdings sind die Ergebnisse auf Grund der geringen Probenzahl noch nicht signifikant, da das Experiment nur einmal in Triplikaten durchgeführt wurde. Der Einfluss von HPV8 E6 auf die DKK1 Expression konnte durch die miR-203 Expression in NFK ebenso wie in HaCaT Zellen aufgehoben werden.

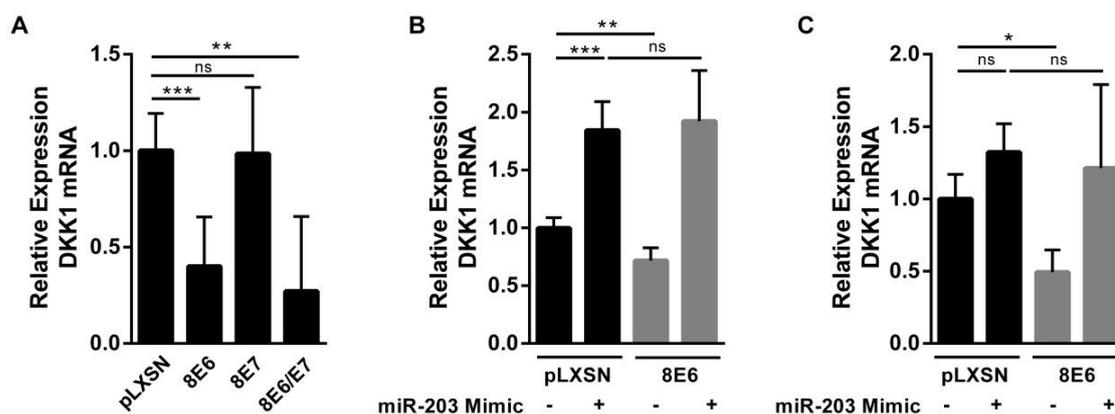


Abbildung 24. DKK1 Expression in E6-exprimierenden NFK und HaCaT Zellen und nach miR-203 Mimic Transfektion.

(A) Aus HPV8 E6-, E7- und E6/E7- exprimierenden NFK wurde mRNA isoliert und die DKK1 Expression mittels qRT-PCR analysiert. (B) pLXSN-Kontroll und HPV8 E6-exprimierende HaCaT Zellen und (C) NFK wurden mit 20 nM non-coding oder miR-203 Mimic transfiziert und nach 72 h RNA isoliert. Die DKK1 Expression wurde mittels qRT-PCR bestimmt. Normalisiert wurde auf die RPL13A Expression. Experiment (C) wurde einmal in Triplikaten durchgeführt. ns= nicht signifikant, **p<0,01, ***p<0,001.

5.2 Regulation der miR-203 in Keratinozyten

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die HPV8 E6 vermittelte Suppression der miR-203 und die damit einhergehende Induktion des Transkriptionsfaktors p63 bzw. Δ Np63 α für die verminderte Expression des Differenzierungsmarkers Involucrin und die erhöhte Proliferation der Keratinozyten verantwortlich war, sollte nun weiter bestimmt werden, wie es zur Deregulation der miR-203 Expression kam. Zur Klärung dieser Fragestellung wurde der Mechanismus der miR-203 Regulation untersucht.

In Abbildung 25 ist die Region auf Chromosom 14 dargestellt, welche die miR-203 Sequenz beinhaltet. Die miR-203 befindet sich nicht in Intron- oder Exonbereichen eines anderen Gens. Das nächste definierte Gen ASPG endet mehr als 4600 bp stromaufwärts. Es wurde deshalb davon ausgegangen, dass die miR-203 nicht über Coexpression reguliert wird, sondern vielmehr einen eigenen Promotor besitzt. Transkriptionsstart- und Promotoraktivitäts-Analysen unterstützen diese Hypothese (Jackson et al., 2013; Wellner et al., 2009). Eine Analyse des Maus-Promotors zeigte zahlreiche Transkriptionsfaktor-Bindestellen an (Jackson et al., 2013).

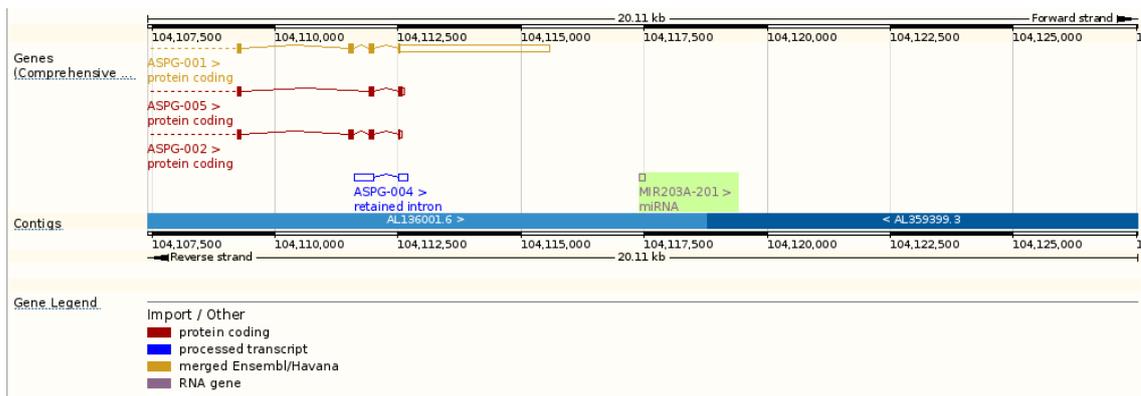


Abbildung 25. Genomische Lokalisation der miR-203 (hellgrün) auf Chromosom 14 (www.ensembl.org)

5.2.1 miR-203 ist in HPV8 E6 positiven Keratinozyten nicht über epigenetische Mechanismen reguliert

Es ist bekannt, dass Hypermethylierung von Promotor-assoziierten CpG-Bereichen die miR-203 Expression in u.a. CIN-Läsionen, Zervixkarzinomen und Brustkrebs vermindert (Wilting et al., 2013b; Zhang et al., 2011). Eine *in silico* Analyse der miR-203 Region auf CpG-reiche Bereiche zeigte eine hohe Dichte in dem Bereich von -750 bp bis +250 bp an, weshalb diese Region als vermutlicher Promotor beschrieben wurde (Abbildung 26). Aus diesem Grund sollte der Einfluss von DNA-Hypermethylierung auf die miR-203 Expression in HPV8 E6-exprimierenden Zellen untersucht werden.

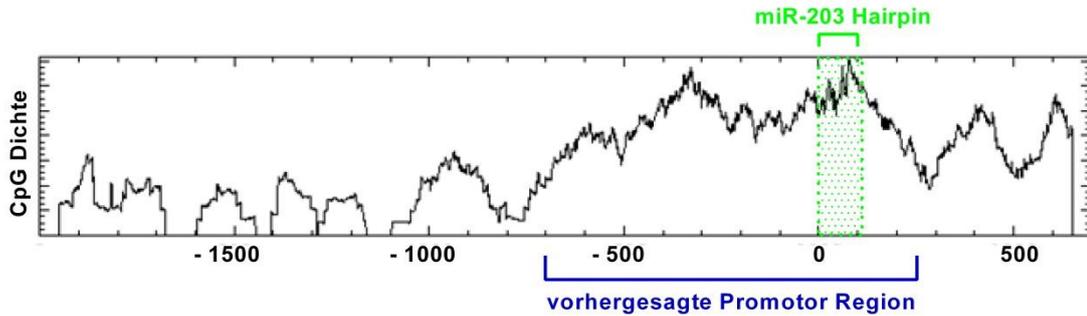


Abbildung 26. Relative Dichte der CpG Wiederholungen im Bereich der vorhergesagten miR-203 Promotor Sequenz.

Die CpG Dichte ist im Bereich -750 bis +250 bp der miR-203 Hairpin am größten. Auf Grund dieser Daten wurde eine Promotorregion vorhergesagt (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/>)

Erste Hinweise auf einen Einfluss von Methylierung ergaben Experimente mit DNA-Methyltransferase Inhibitoren. HaCaT-pLXSN und E6-exprimierende Zellen wurden mit 5-Aza-2'-deoxycytidin (DAC) behandelt. DAC ist ein synthetisches Nucleosid, das während der Replikation in die DNA eingebaut wird, DNA-Methyltransferasen bindet und diese inhibiert. Somit wird die *de novo* Methylierung der DNA verhindert. Abbildung 27 zeigt die Ergebnisse der qRT-PCR für die miR-203 Expression nach DAC Behandlung. In der Kontrolle wurde die miR-203 Expression durch Blockierung der Methyltransferasen mehr als 2-fach signifikant induziert. Die HPV8 E6 vermittelte Suppression der miR-203 wurde durch DAC Behandlung aufgehoben und diese 1,7-fach induziert.

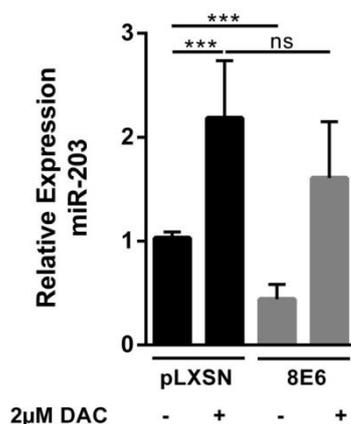


Abbildung 27. miR-203 Expression wird durch den DNA-Methyltransferase Inhibitor DAC induziert.

pLXSN-Kontroll und HPV8 E6-exprimierende HaCaT Zellen wurden mit 2 µM 5-Aza-2'-deoxycytidin (DAC) bzw. DMSO behandelt, nach 72 h für RNA geerntet und die miR-203 Expression mittels qRT-PCR gemessen. Die relative miR-203 Expression wurde durch die $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode durch Verrechnung mit RNU6B bestimmt. ns= nicht signifikant, *** $p < 0,001$.

Um den tatsächlichen Status der Methylierung zu ermitteln, wurde in Kooperation mit dem Institut für Epigenetik der Universität des Saarlandes (Sascha Tierling, AG Prof. Jörn Walter) eine Bisulphitsequenzierung des miR-203 Promotors vorgenommen. Genomische DNA der mit DAC behandelten Zellen wurde mit Bisulphit behandelt. Dadurch wurden unmethylierte Cytosine in Uracile gewandelt. In der anschließenden Sequenzierung wurden diese als Thymidine amplifiziert. Nach Abgleich der Sequenzen konnte der Status der Methylierung ermittelt werden. Aus den behandelten Zellen wurde parallel RNA isoliert, um den miR-203 Expressionsstatus wie in Abbildung 28 zu überprüfen (Daten nicht gezeigt).

Es wurden vier verschiedene Regionen im Bereich der miR-203 Hairpin untersucht. Die bioinformatische Auswertung der Analyse ergab, dass in Region 1 (-619 nt bis -147 nt) und Region 2 (-172 nt bis + 64 nt) keine Methylierung vorlag (Daten nicht gezeigt). In Region 3 (+19 nt bis +553 nt) begann eine schwache Methylierung (Abbildung 28 A). Erst in Region 4 (+554 nt bis +1072 nt) lagen vermehrt methylierte CpG-Bereiche vor (Abbildung 26 B). In den HaCaT-pLXSN und E6-exprimierenden Zellen konnte nach Behandlung mit DAC, was die endogene miR-203 Expression induzierte (Abbildung 27), eine Abnahme der Methylierung festgestellt werden. Die CpGs 17-22 waren hier am stärksten methyliert. Jedoch zeigten E6-exprimierende Zellen ohne DAC Behandlung im Vergleich zu pLXSN-HaCaT nicht, wie angenommen, eine verstärkte Methylierung des miR-203 Promotors. Nur bei vereinzelt CpGs war dies schwach der Fall, wie z.B. bei CpG 4 oder 22 (Site 4 und Site 22, siehe Abbildung 28 B).

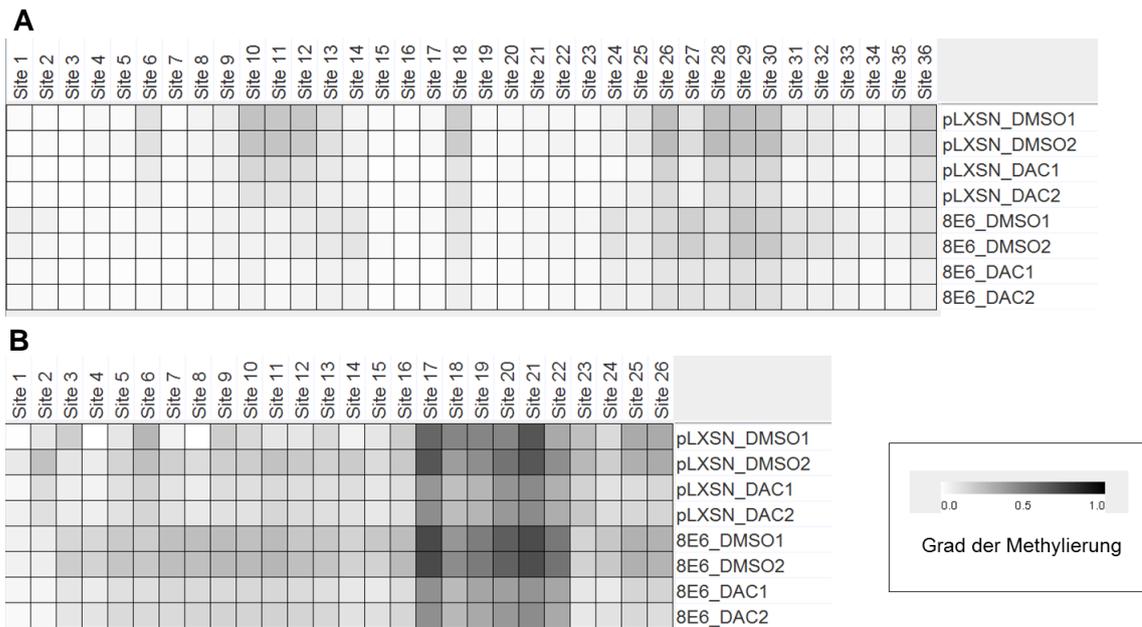


Abbildung 28. Methylierungsstatus miR-203 in HaCaT-pLXSN und 8E6.

HaCaT pLXSN und HPV8 E6-exprimierende Zellen wurden 72 h mit DMSO oder 2 μ M 5-Deoxy-2'-azacytidin (DAC) behandelt und DNA sowie RNA geerntet. Die DNA wurde der Bisulphitbehandlung unterzogen und der Grad der Methylierung über Abgleich der Sequenzierung ermittelt. „Site“ bezeichnet ein CpG. Legende: weiße Kästchen bedeuten keine Methylierung; je dunkler, desto mehr Methylierung liegt vor. **(A)** Region 3: +19 nt bis +553 nt im Vergleich zur miR-203 Hairpin. **(B)** Region 4: +554 nt bis +1072 nt im Vergleich zur miR-203 Hairpin.

In einem weiteren Versuch wurde über siRNA Transfektion die Expression einer der wichtigsten DNA-Methyltransferase (DNMT1) reduziert und die Expression der miR-203 über qRT-PCR gemessen. Dieser Versuch sollte Aufschluss darüber geben, ob die Abwesenheit von DNMT1, also verringerte Methylierung, die miR-203 Expression erhöhen kann. Jedoch wurde die miR-203 Expression durch DNMT1-siRNA Transfektion nicht induziert (Abbildung 29 A). Auch war die mRNA Expression von DNMT1 in E6-exprimierenden NFK nicht erhöht, sondern im Gegenteil auf etwa 0,5-fach reduziert (Abbildung 29 B). Es blieb also weiterhin unklar, ob DNA-Hypermethylierung der miR-203 Promotor-Region generell eine Rolle in der Regulation einnimmt. Auch der Einfluss von E6 auf Hypermethylierung in dieser Region schien unwahrscheinlich, weshalb nach weiteren Mechanismen gesucht wurde.

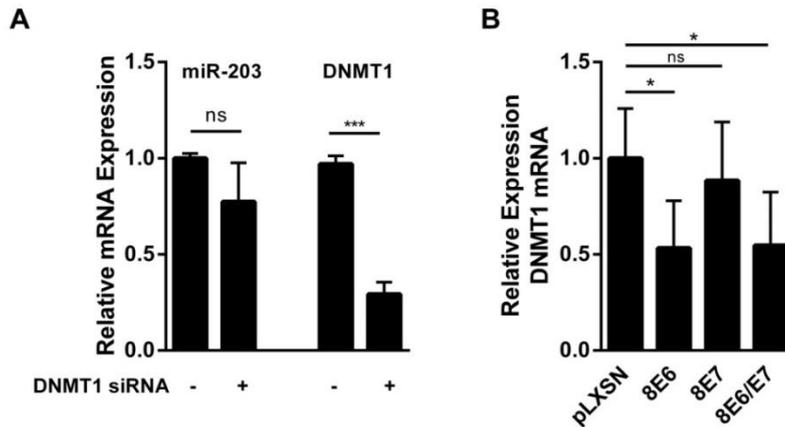


Abbildung 29. Die Rolle von DNMT1 auf die miR-203 Expression in NFK.

(A) NFK wurden mit 10 nM DNMT1-siRNA oder non-coding siRNA transfiziert, nach 48 h RNA geerntet und die miR-203 sowie die DNMT1 Expression über qRT-PCR gemessen. Die relative miR-203 Expression wurde durch die $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode durch Verrechnung mit RNU6B, die relative DNMT1 Expression durch Verrechnung mit RPL13A bestimmt. (B) Aus HPV8 E6-, E7- und E6/E7-exprimierende NFK wurde mRNA isoliert und die DNMT1 Expression mittels qRT-PCR analysiert. Normalisiert wurde auf die RPL13A Expression. ns=nicht signifikant, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

Zur Abklärung des Einflusses von Histonmodifikationen wurden pLXSN und E6-exprimierende HaCaT und NFK mit Trichostatin A (TSA), einem Histondeacetylase (HDAC) Inhibitor, behandelt. Histonacetylierung öffnet das Chromatin und ist ein Indikator für verstärkte Transkription. Eine verringerte Histonacetylierung im Bereich der miR-203 Sequenz könnte also eine Ursache für die verringerte Expression darstellen. Die Behandlung mit TSA führte allerdings nicht zu einer erhöhten miR-203 Expression (Daten nicht gezeigt). Auch die mRNA-Expression von Histondemethylasen wie JMJD1C und JMJD3 war in E6-exprimierenden Zellen nicht verändert (Daten nicht gezeigt). Histon-bezogene epigenetische Mechanismen wurden deshalb als unwahrscheinliche Ursache der miR-203 Deregulation betrachtet.

5.2.2 siRNA Transfektion von MAML, JunB und p300 reduziert miR-203

Da epigenetische Mechanismen direkt am miR-203 Promotor nicht gezeigt werden konnten, sollten siRNA-Experimente Aufschluss darüber geben, ob der miR-203 Promotor direkt über die Aktivität von Transkriptionsfaktoren beeinflusst wird.

Ausgewählt wurden Faktoren, die während der Keratinozytendifferenzierung eine wichtige Rolle spielen und zum Teil bereits als Zielstrukturen für HPV8 E6 beschrieben sind (Brimer et al., 2012; Howie et al., 2011; Tan et al., 2012). MAML, p300 und JunB wurden in NFK über siRNA-Transfektion herunterreguliert und der Erfolg des *Knockdowns* über qRT-PCR kontrolliert und bestätigt (Abbildung 30). Die miR-203 Expression wurde in allen siRNA-Transfektionen reduziert. MAML, ein Regulator des

Notch-Signalwegs, und die Acetyltransferase p300 stellten sich als interessante Faktoren heraus, da beide über E6 inhibiert bzw. degradiert werden (Brimer et al., 2012; Howie et al., 2011).

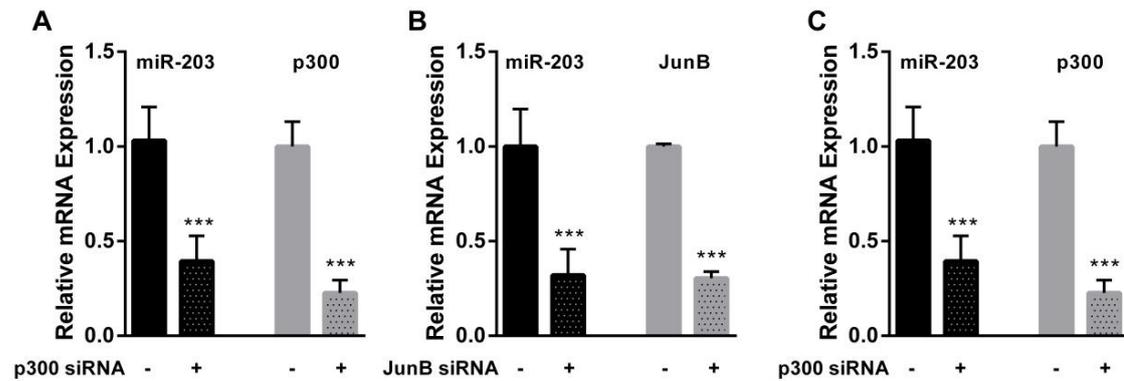


Abbildung 30. p300-/ JunB-/ MAML-siRNA Transfektion in NFK.

NFK wurden mit 10 nM non-coding oder siRNA transfiziert, nach 48 h RNA isoliert und die miR-203 Expression sowie der jeweilige Knockdown mittels qRT-PCR bestimmt **(A)** miR-203 und MAML Expression nach MAML-siRNA Transfektion. **(B)** miR-203 und JunB Expression nach JunB-siRNA Transfektion **(C)** miR-203 und p300 Expression nach p300-siRNA Transfektion. Die relative miR-203 Expression wurde durch die $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode durch Verrechnung mit RNU6B bestimmt. MAML, JunB und p300 wurden auf die RPL13A Expression normalisiert. ***p<0,001.

5.2.3 Einfluss des Notch-Signalwegs auf die miR-203 Expression

Zunächst wurde der Notch-Signalweg weiter untersucht. Notch ist ein Transmembranprotein, welches als Rezeptor fungiert. Binden Liganden wie Jagged1 wird die intrazelluläre Domäne (ICN) durch eine Gamma-Sekretase geschnitten und gelangt in den Zellkern. Dort bindet ICN mit dem Coaktivator MAML an den Repressor RBPJk und induziert die Expression von Zielgenen.

Über einen Gamma Sekretase Inhibitor (GSI) sollte dieser Signalweg in HaCaT Zellen und NFK geblockt werden. Anschließend wurde die Expression der miR-203 und Involucrin über qRT-PCR bestimmt. In HaCaT Zellen wurde weder die miR-203 noch die Involucrin Expression durch GSI gestört (Abbildung 31 A, B). In NFK jedoch reduzierte sich die Expression der miR-203 signifikant auf 0,3-fach, von Involucrin signifikant auf 0,1-fach (Abbildung 31 C, D). Ca^{2+} -Stimulation induzierte die miR-203 sowie die Involucrin Expression um etwa das 3-fache. Dieser Effekt wurde durch GSI unterdrückt. In einem weiteren Experiment sollte der Notch-Signalweg aktiviert werden. Dies erfolgte zum einen über Stimulation der Zellen mit einem löslichen Liganden (Jagged1), zum anderen durch Überexpression der intrazellulären Notch1 Domäne (ICN-1). In beiden Experimenten konnte die Expression der miR-203 nicht angehoben

werden (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurden weitere Mechanismen der miR-203 Regulation untersucht.

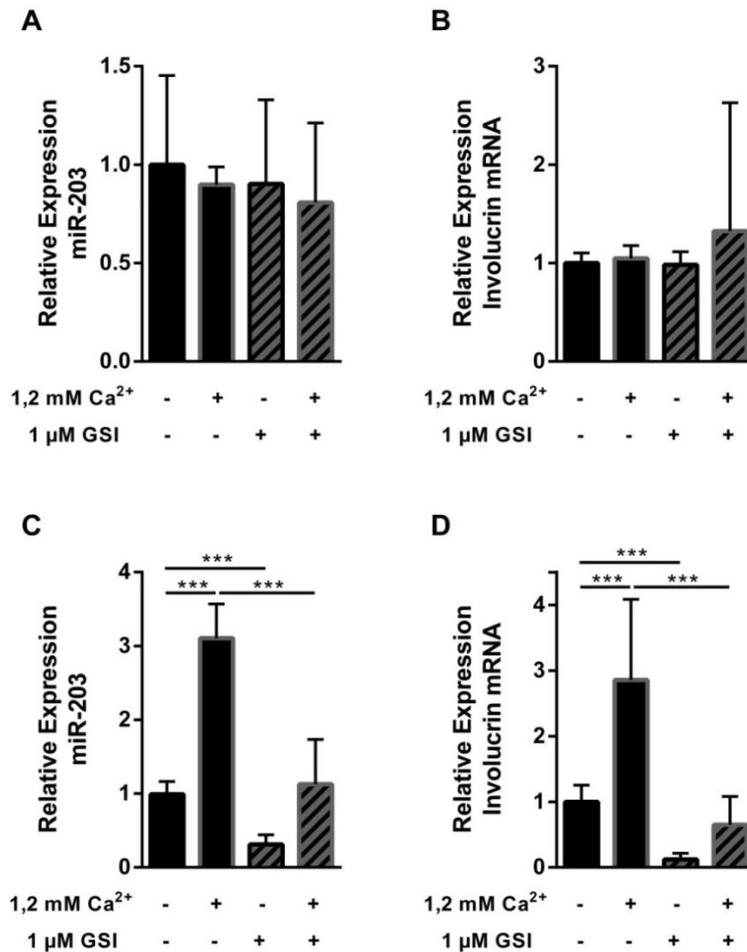


Abbildung 31. miR-203 und Involucrin Expression nach Ca²⁺ und GSI Behandlung in HaCaT Zellen und NFK.

HaCaT Zellen (**A, B**) und NFK (**C, D**) wurden mit 1,2 mM Ca²⁺ und/ oder 1 μM Gamma-Sekretase-Inhibitor (GSI) behandelt, nach 72 h für RNA geerntet und die miR-203 (**A, C**) und Involucrin (**B, D**) Expression mittels qRT-PCR gemessen. Die relative miR-203 Expression wurde durch die 2^{-ΔΔCT} Methode durch Normalisierung auf RNU6B bestimmt, Involucrin wurde auf die RPL13A Expression normalisiert. ***p<0,001.

5.2.4 JunB beeinflusst die miR-203 Expression

5.2.4.1 HPV8 E6 unterdrückt JunB und die PMA- vermittelte miR-203 Induktion

Als weiterer möglicher Kandidat der miR-203 Regulation wurde JunB, ein Faktor der AP-1 Familie der Transkriptionsfaktoren, untersucht. AP-1 Faktoren bilden Heterodimere, die DNA Sequenzen binden. Sie haben eine wichtige Rolle in der Differenzierung und Proliferation der Haut (Florin et al., 2006; Zenz et al., 2006). JunB wurde im RNA-Array durch HPV8 E6 auf das 0,5-fache reprimiert. Diese Ergebnisse

wurden in E6-exprimierenden NFK verschiedener Spender verifiziert. Die JunB Expression wurde durch E6 auf Protein- sowie auf mRNA-Ebene signifikant im Durchschnitt auf etwa 0,6-fach herunterreguliert (Abbildung 32 A-C). Auch die Stimulation mit PMA, einem PKC-Aktivator, welcher die JunB-Expression in den Kontrollzellen erhöhte, wurde in E6-exprimierenden Zellen signifikant unterdrückt (Abbildung 32 A-C). Gleichzeitig wurde die Δ Np63 α Expression durch PMA-Stimulation in den Kontrollzellen signifikant auf das 0,2-fache reduziert (Abbildung 32 D). In HPV8 E6-exprimierenden Zellen reduzierte die PMA-Stimulation die Δ Np63 α Expression signifikant 4-fach schwächer als in den Kontrollzellen (Abbildung 32 D). Durch Stimulation mit PMA wurde auch die miR-203 Expression in den Kontrollzellen 4-fach erhöht (Abbildung 32 E). Exprimierten die Zellen jedoch E6, kam es zu keiner gesteigerten Expression. Wie in Abbildung 30 B bereits gezeigt, reduzierte sich die miR-203 Expression nach JunB-siRNA Transfektion.

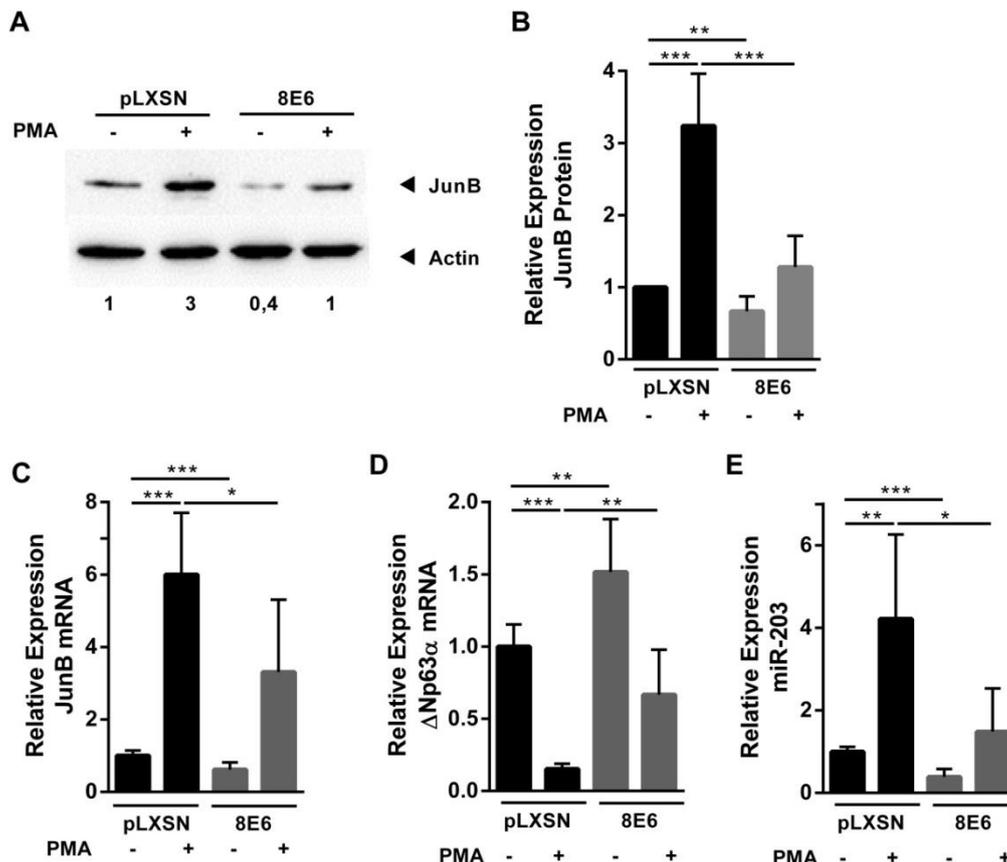


Abbildung 32. JunB, miR-203 und Δ Np63 α Expression nach PMA-Stimulation.

HPV8 E6-exprimierende NFK wurden 24 h mit 50 ng/ml PMA stimuliert und Kernextrakte sowie mRNA isoliert. **(A)** JunB Proteinexpression im Western Blot, Zahlen geben die Quantifizierung im Verhältnis zur Ladekontrolle Aktin wieder. **(B)** Quantifizierung der Proteinexpression aus A von drei unabhängigen Experimenten. **(C)** JunB **(D)** Δ Np63 α **(E)** miR-203 mRNA Expression mittels qRT-PCR analysiert. Normalisiert wurde auf die RPL13A bzw. RNU6B Expression. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

5.2.4.2 AP-1 Bindestellen im miR-203 Promotor

Die durch Wellner und Kollegen (2009) beschriebene humane miR-203 Promotor Region von 1170 bp wurde mittels AllGen Promo Software einer *in silico* Analyse zur Vorhersage von Transkriptionsfaktorbindestellen unterzogen. Dieser Bereich ist großzügiger gefasst als der nur durch CpG-Häufigkeiten vorhergesagte (siehe Abbildung 26). Die Auswertung zeigte eine AP-1 Bindestelle (TGAGTCA) von -473 nt bis -466 nt an (Bindestelle II: BS-II). Eine weitere Bindestelle (TGACTAA) wurde an Hand der Publikation von Thierry und Kollegen im Bereich -1010 nt bis -1017 nt identifiziert (BS-I) (Thierry et al., 1992).

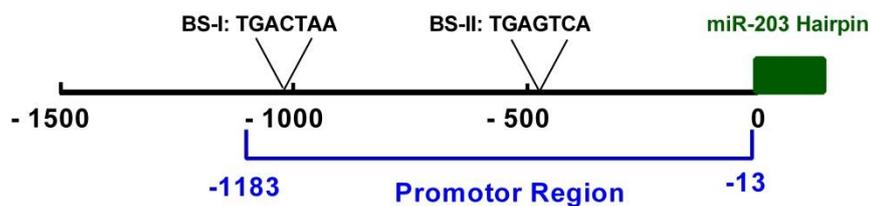


Abbildung 33. miR-203 Promotor Region mit AP-1 Bindestellen

Die vorhergesagte Promotor-Region der miR-203 Hairpin (-13 bis -1183). Angegeben sind die AP-1 Bindestellen (BS) I und II. BS-I (TGACTAA) von -1010 nt bis -1017 und BS-II (TGAGTCA) von -473 bis -466.

Die vorhergesagten Bindestellen I und II wurden durch EMSA charakterisiert. Zunächst wurde ein Konkurrenzexperiment durchgeführt (Abbildung 34). NFK-Kernextrakte wurden mit einem AP-1-Konsensussequenz- oder dem jeweiligen BS-I oder II Oligonukleotid präinkubiert, welches AP-1-Transkriptionsfaktoren abfängt. Wenn es sich bei BS-I und II um AP-1-Bindestellen handelt, würde sich dies in diesem experimentellen Aufbau durch eine geringere Bindung an BS-I oder II zeigen. In Abbildung 34 ist beispielhaft ein Wettbewerbs-EMSA mit NFK Kernextrakten dargestellt. Zunächst wurden die Kernextrakte mit 20 ng oder 200 ng BS-I oder AP-1-Konsensus Oligonukleotiden (genannt „AP-1“ in Abbildung 34) inkubiert, bevor die radioaktiv markierte BS-I Sequenz dazu kam. Im Vergleich zur Kontrolle verringerte sich die Bindung an BS-I nach Konkurrenz mit BS-I oder der Konsensussequenz sehr stark. Eine mutierte Sequenz zeigte diese Reduktion nicht. Die gleichen Resultate ergaben sich für BS-II. Zusätzlich konnte durch dieses Experiment die Spezifität der AP-1-Bande auf dem Gel bestimmt werden, welche durch einen Pfeil markiert wurde. Ein Wettbewerbs-EMSA für HaCaT Zellen ergab die gleichen Resultate (Daten nicht gezeigt).

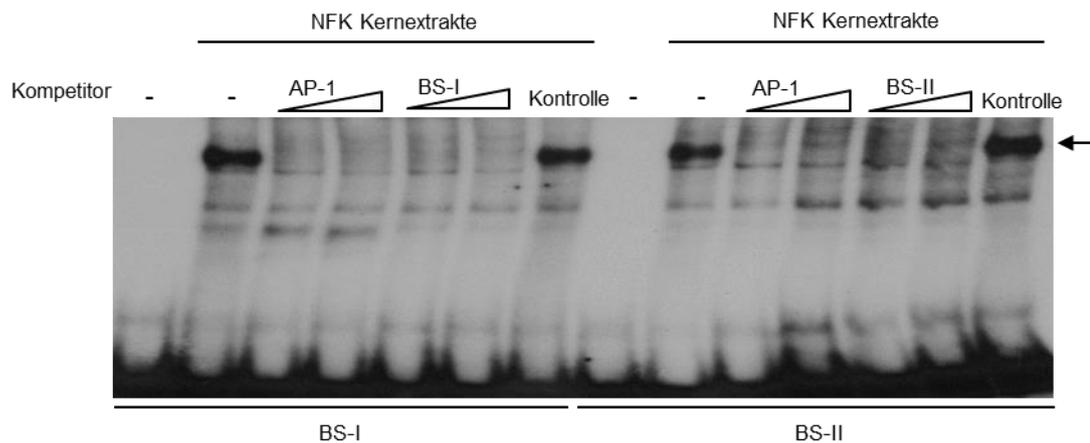


Abbildung 34. AP-1 EMSA mit Konkurrenz in NFK.

NFK Kernextrakte wurden mit der 20 ng oder 200 ng nicht-radioaktiv markierter AP-1 Konsensus BS (AP-1), BS-I, mutierten Kontrollbindestelle (Kontrolle) oder BS-II vorinkubiert und mit γ -³²P-ATP markierter BS-I oder II inkubiert. Extrakte wurden auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und autoradiographisch detektiert. Pfeil= AP-1 BS

Die Klasse der AP-1-Transkriptionsfaktoren besteht aus zahlreichen Komponenten. Diese treten als Homo- oder Heterodimere auf. Zur genaueren Charakterisierung, welche Faktoren an BS-I und II binden, wurde ein *Supershift*-EMSA mit den wichtigsten Vertretern c-Jun, c-Fos, JunB, JunD, Fra-1 und Fra-2 durchgeführt. Hierfür wurden die Kernextrakte mit Antikörpern gegen die jeweiligen AP-1 Komponenten vorinkubiert. Bindet ein AP-1-Faktor mit gebundenem Antikörper an das jeweilige Oligonukleotid BS-I oder II, ergibt sich aufgrund der Größe eine Verschiebung im Gel (*Shift*). Abbildung 35 zeigt, dass in den HaCaT Kernextrakten JunB, JunD und Fra-2 geshiftet wurden, also diese Komponenten an BS-I und II gebunden haben. Ein Supershift EMSA für BS-I ergab keine konstanten und auswertbaren Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

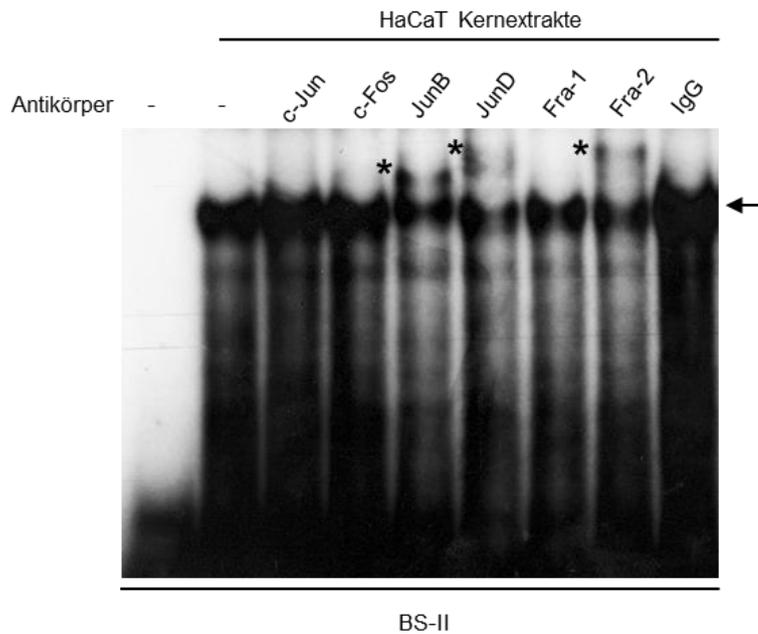


Abbildung 35. AP-1 EMSA mit Supershift in HaCaT Zellen.

HaCaT Kernextrakte wurden mit 2 µg AP-1 Antikörper oder einer Isotypkontrolle vorinkubiert und mit γ -³²P-dATP markierter BS-II inkubiert. Extrakte wurden auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und autoradiographisch detektiert. Sterne indizieren den Supershift. Pfeil= AP-1 BS

Ob p300 und JunB in den Proteinkomplexen, welche an BS-I und II binden, vorhanden sind, wurde durch ein siRNA-Experiment untersucht. Nach Herunterregulation von JunB war die Bindung an BS-I und II in NFK leicht reduziert, in HaCaT Zellen fast komplett verschwunden (Abbildung 36 A, B). Eine Herunterregulation von p300 veränderte die Bindeaktivität in NFK nicht. Nur in HaCaT Zellen war die Bindung an BS-II leicht unterdrückt.

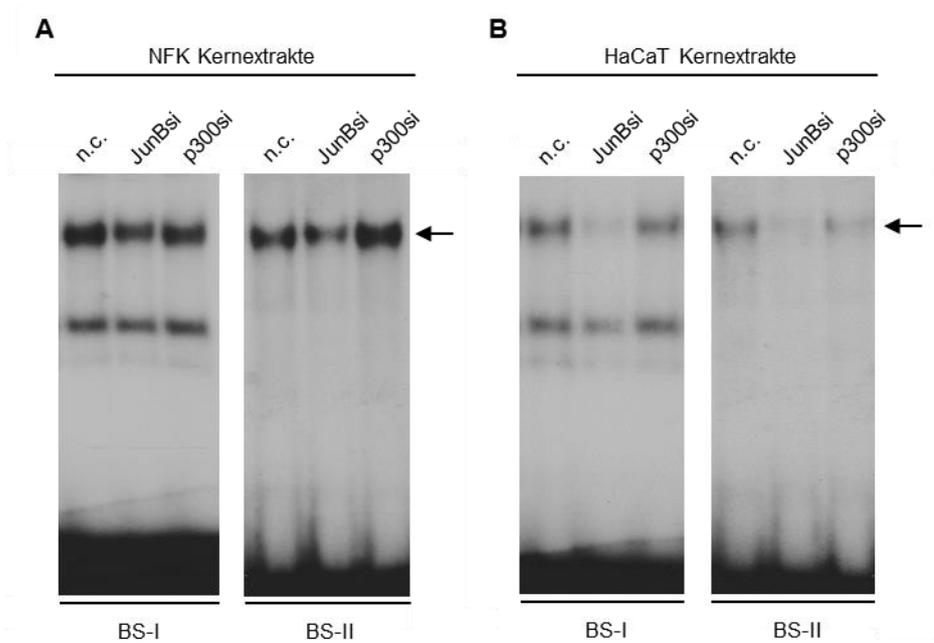


Abbildung 36. AP-1 EMSA in NFK und HaCaT Zellen nach siRNA-Transfektion.

(A) NFK und (B) HaCaT Zellen wurden mit 10 nM *noncoding* (n.c.), JunB- oder p300-siRNA (si) transfiziert und nach 48 h Kernextrakte geerntet. Proteine wurden mit γ -³²P-ATP markierter BS-I oder II inkubiert, auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und autoradiographisch detektiert. Pfeil= AP-1 BS

Nach Stimulation der Zellen mit dem PKC-Aktivator PMA, welcher JunB hochreguliert hatte (Abbildung 32 A), erhöhte sich die Bindung an BS-I und II (Abbildung 37). Allerdings zeigte sich keine Veränderung in HPV8 E6-exprimierenden NFK. Bei der Wiederholung des Versuches war die Bindung in manchen Kernextrakten schwächer, in manchen stärker. Auch bei der Analyse der Zusammensetzung der AP-1 Komponenten über Supershift-Analyse ergab sich keine Veränderung in E6 positiven Zellen (Daten nicht gezeigt). Allerdings wurde in E6-exprimierenden Zellen die Induktion durch PMA verhindert. Generell konnten die vorhergesagten AP-1-Bindestellen I und II im miR-203 Promotor als solche charakterisiert werden.

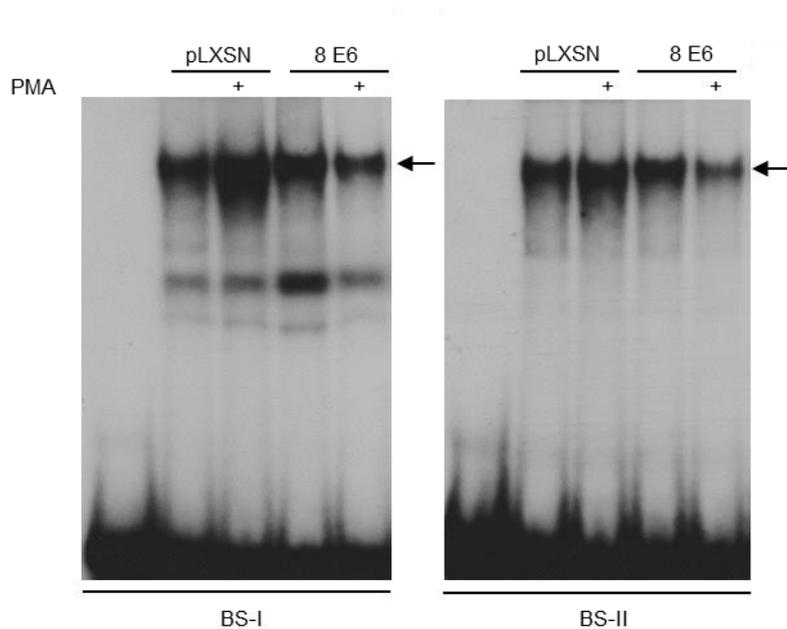


Abbildung 37. AP-1 EMSA in NFK nach PMA Stimulation.

8E6-exprimierende NFK wurden mit 50 ng/ml PMA stimuliert und nach 48 h Kernextrakte geerntet. Proteine wurden mit γ -³²P-ATP markierter BS-I oder II inkubiert, auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und autoradiographisch detektiert. Pfeil= AP-1 BS

5.2.5 p300 beeinflusst die miR-203 Expression

5.2.5.1 HPV8 E6-vermittelte Degradation von p300 ist für die Involucrin Suppression verantwortlich

Die Acetyltransferase p300, welche als Coaktivator in vielen Signalwegen der Differenzierung involviert ist, war der nächste denkbare Kandidat in der miR-203 Regulation. Howie und Kollegen (2012) haben beschrieben, dass HPV8 E6 über Bindung an p300 dessen Phosphorylierung durch die AKT Kinase verhindert. Daraus resultierte eine Destabilisierung von p300, was zur Degradation führte. Eine HPV8 E6 Mutante (Δ 8E6), die p300 nicht mehr binden konnte, zeigte diese Effekte nicht. Auch Involucrin wurde nicht mehr unterdrückt.

Diese Ergebnisse konnten bestätigt werden. Die p300 Proteinexpression war in E6, aber nicht in den Δ 8E6-exprimierenden NFK um die Hälfte reduziert (Abbildung 38 A, B). Es wurde ein Antikörper verwendet, der p300-spezifisch war und keine Kreuzreaktion mit CBP, dem p300 Homolog, zeigte (Howie et al., 2011). Diese Herstellerangabe wurde über Abgleich der Aminosäuresequenzen von CBP und p300 überprüft und verifiziert. In einer p300-spezifischen qRT-PCR wurde gezeigt, dass die mRNA Expression durch E6 nicht beeinflusst wurde (Abbildung 38 C).

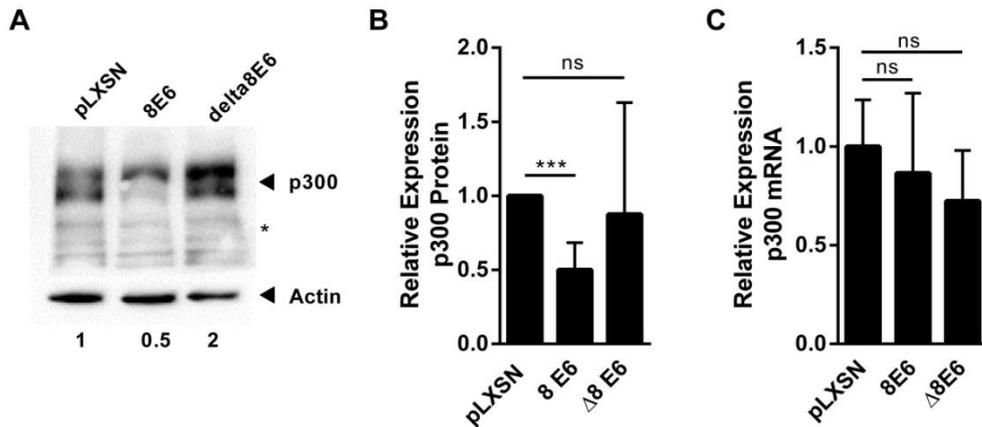


Abbildung 38. p300-Protein und mRNA Expression in Δ 8E6-exprimierenden NFK.

(A) Aus HPV8 E6- und Δ 8E6-exprimierenden NFK wurden Kernextrakte hergestellt und im Western Blot auf ihre p300 Expression analysiert. Zahlen geben die Quantifizierung von p300 im Verhältnis zur Ladekontrolle Aktin wieder.* unspezifische Bindung (B) Quantifizierung der Proteinexpression aus A von drei unabhängigen Experimenten. (C) Aus den gleichen Zellen wurde mRNA isoliert und die p300 Expression mittels qRT-PCR analysiert. Normalisiert wurde auf die RPL13A Expression. ns= nicht signifikant, *** $p < 0,001$

Ebenso konnte die Beobachtung von Howie und Kollegen bestätigt werden, dass die Involucrin Expression in NFK, welche die E6 Mutante Δ 8E6 exprimierten, nicht mehr reduziert wurde (Abbildung 39). Sowohl auf Protein- als auch auf mRNA Ebene lag das Expressionsniveau von Involucrin in Δ 8E6 Zellen nahe dem Normallevel.

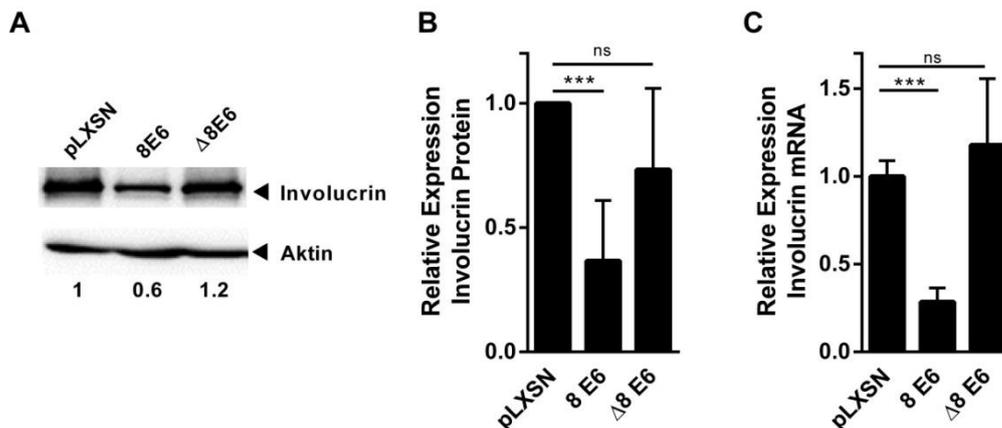


Abbildung 39. Involucrin Expression in Δ 8E6-exprimierenden NFK.

(A) Aus HPV8 E6- und Δ 8E6-exprimierenden NFK wurden Proteine isoliert und im Western Blot die Involucrin Expression analysiert. Zahlen geben die Quantifizierung im Verhältnis zur Ladekontrolle Aktin wieder. (B) Quantifizierung der Proteinexpression aus A von drei unabhängigen Experimenten. (C) Aus den gleichen Zellen wurde mRNA isoliert und die Involucrin Expression gemessen. Normalisiert wurde auf die RPL13A Expression. ns= nicht signifikant, *** $p < 0,001$

5.2.5.2 miR-203 Promotor Aktivität ist p300- und JunB-abhängig

Vorherige Studien haben gezeigt, dass die miR-203 auf transkriptioneller Ebene reguliert wird (Jackson et al., 2013; Wellner et al., 2009). Bioinformatische Analysen der vermutlichen Promotorregion (siehe Abbildung 33) und eine Publikation gaben an, dass der Bereich 1170 bp stromaufwärts der miR-203 Hairpin Struktur regulatorische Bereiche beinhaltet (Wellner et al., 2009). Ebenso habens RACE-PCRs (*rapid amplification of cDNA-ends with polymerase chain reaction*) der murinen miR-203 Sequenz gezeigt, dass es sich um eine Promotor Region handelt (Jackson et al., 2013).

Um den Zusammenhang zwischen JunB, p300 und der Aktivierung des miR-203 Promotors besser verstehen zu können, wurden in den folgenden Experimenten Reportergeren Analysen durchgeführt. Der Bereich -13 bp bis -1183 bp stromaufwärts der miR-203 Hairpin-Sequenz wurde in einen *Firefly*-Luziferase Reportervektor kloniert (siehe Abbildung 33).

Die Aktivität des Promotors wurde nach Cotransfektion mit einem p300-Expressionsplasmid gering, aber signifikant auf das 1,4-fache induziert (Abbildung 40 A). JunB konnte den Promotor signifikant 2,3-fach aktivieren. Wurden JunB und p300 zusammen exprimiert, zeigte sich ein synergistischer Effekt und die Promotoraktivität lag bei Faktor 4. Die Stimulation mit PMA induzierte nicht nur die endogene JunB und miR-203 Expression (Abbildung 32), sondern aktivierte ebenso den Promotor signifikant um das 3-fache (Abbildung 40 B). Um mehr Einblicke in die Abhängigkeit der Promotoraktivität von JunB und p300 zu erlangen, wurden beide Proteine über siRNA Transfektion herunterreguliert und der Promotor anschließend mit PMA stimuliert (Abbildung 40 B). Die Herunterregulation von JunB reduzierte die Promotoraktivität auf das 0,7-fache, die von p300 auf das 0,2-fache. Beide Faktoren waren für die basale miR-203 Promotoraktivität nötig. Eine Induktion der Promotoraktivität durch PMA wurde nach JunB- oder p300-*Knockdown* signifikant inhibiert. Der Erfolg der siRNA Transfektion ist in Abbildung 40 C im Western Blot dargestellt. Auch in einem zweiten Experiment wurde die Abhängigkeit der Promotoraktivität von JunB und p300 dargestellt: die Dosis-abhängige Aktivierung durch JunB-Überexpression wurde nach dem *Knockdown* von p300 geblockt (Abbildung 40 D).

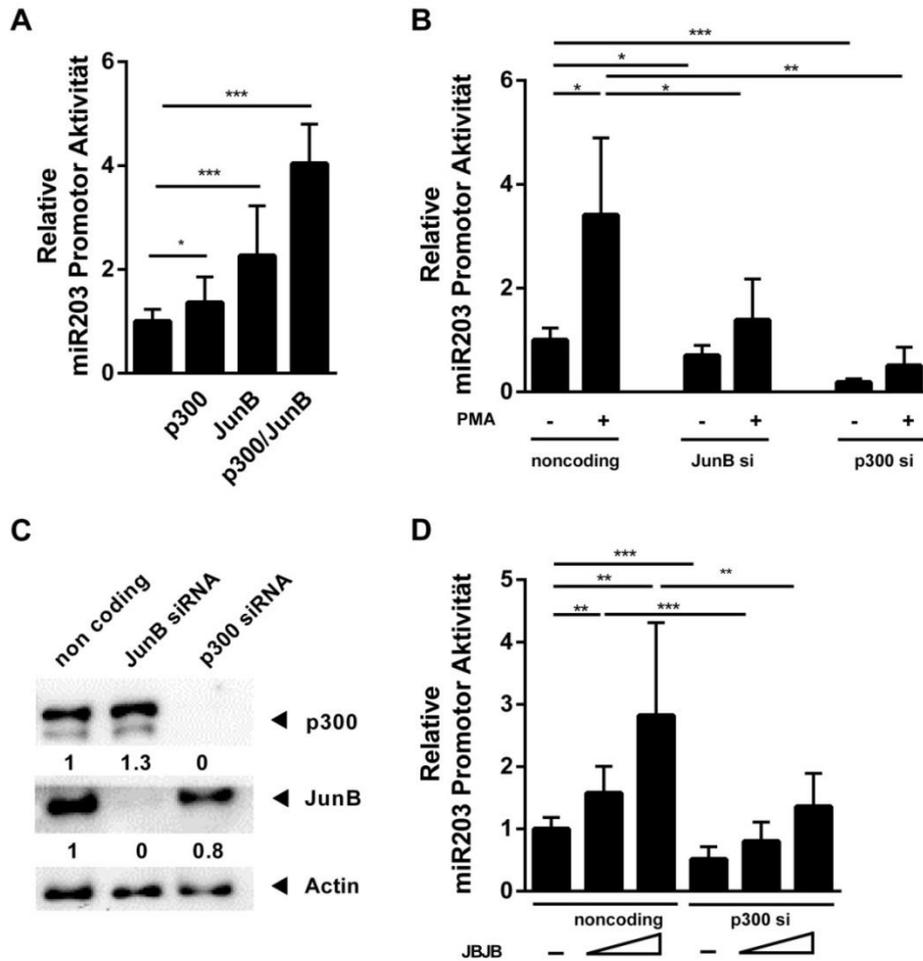


Abbildung 40. miR-203 Promotor Aktivität in HaCaT Zellen und NFK.

(A) HaCaT Zellen wurden mit 100 ng pGL3Basic-miR-203-Promotor, 100 ng pEGFP-C1 und je 300 ng pCMV-p300 oder pCG-JunB/JunB kotransfiziert und nach 48 h für Luziferase-Assay geerntet. (B) NFK wurden mit 10 nM siRNA transfiziert, nach 24 h mit 100 ng pGL3Basic-miR-203-Promotor und 100 ng pEGFP-C1 transfiziert, 24 h später mit 50 ng/ml PMA stimuliert und nach 24 h für Luziferase-Assay geerntet. (C) NFK wurden, wie in B, mit siRNA transfiziert, nach 48 h Proteinextrakte geerntet und im Western Blot die p300, JunB und Aktin Expression analysiert. Zahlen geben die Quantifizierung im Verhältnis zur Ladekontrolle Aktin wieder. (D) HaCaT Zellen wurden mit 10 nM siRNA transfiziert, nach 24 h mit 100 ng pGL3Basic-miR-203-Promotor, 100 ng pEGFP-C1 und 100 bzw. 300 ng pCG-JunB/JunB kotransfiziert und nach 48 h für Luziferase-Assay geerntet. Alle Luziferase-Extrakte wurden auf die Proteinkonzentration und die Transfektionseffizienz normalisiert.

5.2.7 JunB und p300 beeinflussen die Involucrin Expression

Der *Knockdown* von JunB und p300 durch siRNA-Transfektion verändert nicht nur die endogene miR-203 Expression (Abbildung 30) und die miR-203 Promotoraktivität (Abbildung 40 B), sondern auch die Expression des Differenzierungsmarkers Involucrin auf das 0,3-fache (Abbildung 41 A und B). Abbildung 41 A zeigt, dass die p300-mRNA Expression nach JunB siRNA-Transfektion signifikant auf das 0,7-fache reduziert wurde. Diese Daten lassen sich auf Proteinebene nicht bestätigen (Abbildung 40 C). Hier lag die p300 Expression bei 1,1-fach. Im Gegensatz dazu wurde JunB durch p300 siRNA-Transfektion nicht auf mRNA-Ebene (Abbildung 41 B), jedoch auf Proteinebene (Abbildung 40 C) auf das 0,8-fache reduziert.

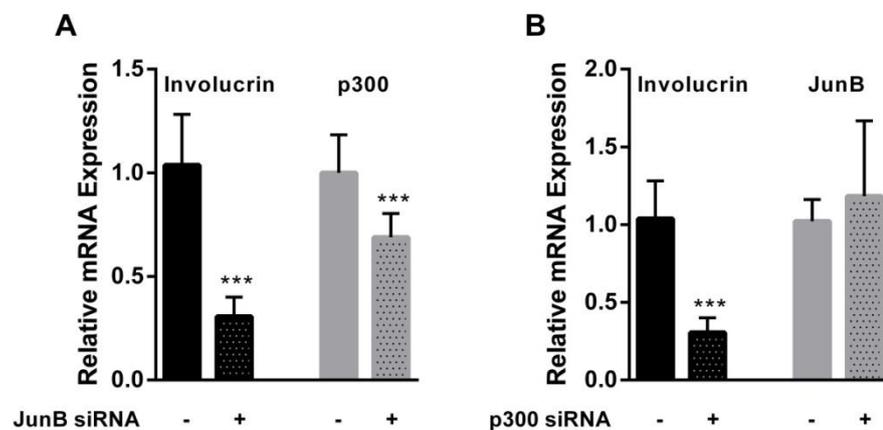


Abbildung 41. JunB siRNA- und p300 siRNA-Transfektion in NFK beeinflusst die Involucrin Expression

NFK wurden mit 10 nM non-coding oder JunB bzw. p300 siRNA transfiziert und nach 48 h RNA isoliert. **(A)** Involucrin und p300 Expression gemessen in der qRT-PCR nach JunB siRNA-Transfektion. **(B)** Involucrin und JunB Expression gemessen in der qRT-PCR nach p300 siRNA-Transfektion. Die mRNA Expression wurde auf die RPL13A Expression normalisiert. *** $p < 0,001$.

5.2.9 p300 und miR-203 Expression werden in EV-Läsionen unterdrückt

Um die p300 Expression *in vivo* im Zusammenhang mit HPV8 zu untersuchen, wurden Hautläsionen von HPV8-positiven EV-Patienten immunhistochemisch gegen p300 gefärbt (Abbildung 42 A, B).

p300 wurde in nicht-läsionalen Bereichen nur in den Suprabasalzellen exprimiert. Undifferenzierte Basalzellen exprimierten kein p300. Im Gegensatz dazu wurde p300 in den Läsionen massiv herunter reguliert (Abbildung 42 B). Um die Expressionmuster der miR-203 mit der von p300 vergleichen zu können, wurde der gleiche Bereich der Läsion in einem Schnitt derselben Läsion über *in situ* Hybridisierung für miR-203 gefärbt. Die miR-203 wurde ebenfalls in nicht-läsionalen Bereichen nur suprabasal exprimiert (Abbildung 42 C), in den Läsionen jedoch wie p300 massiv unterdrückt (Abbildung 42 D).

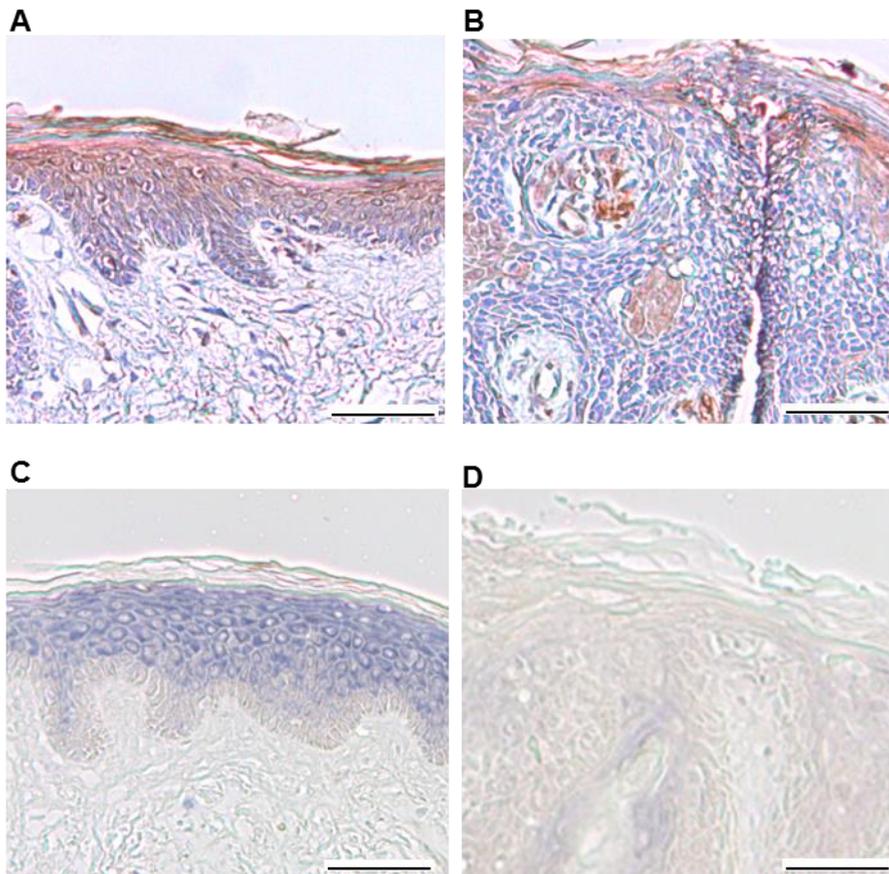


Abbildung 42. p300 und miR-203 Expression in Schnitten von HPV8-positiven EV-Patienten.

Immunhistochemische Färbung gegen p300 (braun) in (A) nicht läsionalem und (B) läsionalem Bereich von EV-Läsionen. *In situ* Hybridisierung gegen miR-203 (blau) in (C) nicht läsionalem und (D) läsionalem Bereich. Skalierung: 100 µm.

5.2.11 miR-203 Reduktion in HPV8 E6 ist p300 abhängig

In einem weiteren Experiment sollte untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen der HPV8 E6 vermittelten Degradation von p300 und der reduzierten miR-203 Expression bzw. der Induktion von Δ Np63 α besteht. Dafür wurde die p63 bzw. Δ Np63 α Expression sowie die miR-203 Expression in Δ 8E6-exprimierenden Zellen bestimmt. Die p63 bzw. Δ Np63 α Expression in NFK, welche die p300-Bindemutante Δ 8E6 exprimierten, lag fast auf Normalniveau (Abbildung 43 A-C). Darüber hinaus wurde deutlich, dass in Δ 8E6-exprimierenden Zellen die miR-203 Expression im Gegensatz zu E6-exprimierenden Zellen nicht unterdrückt wurde, sondern auf Kontrollniveau lag (Abbildung 43 D).

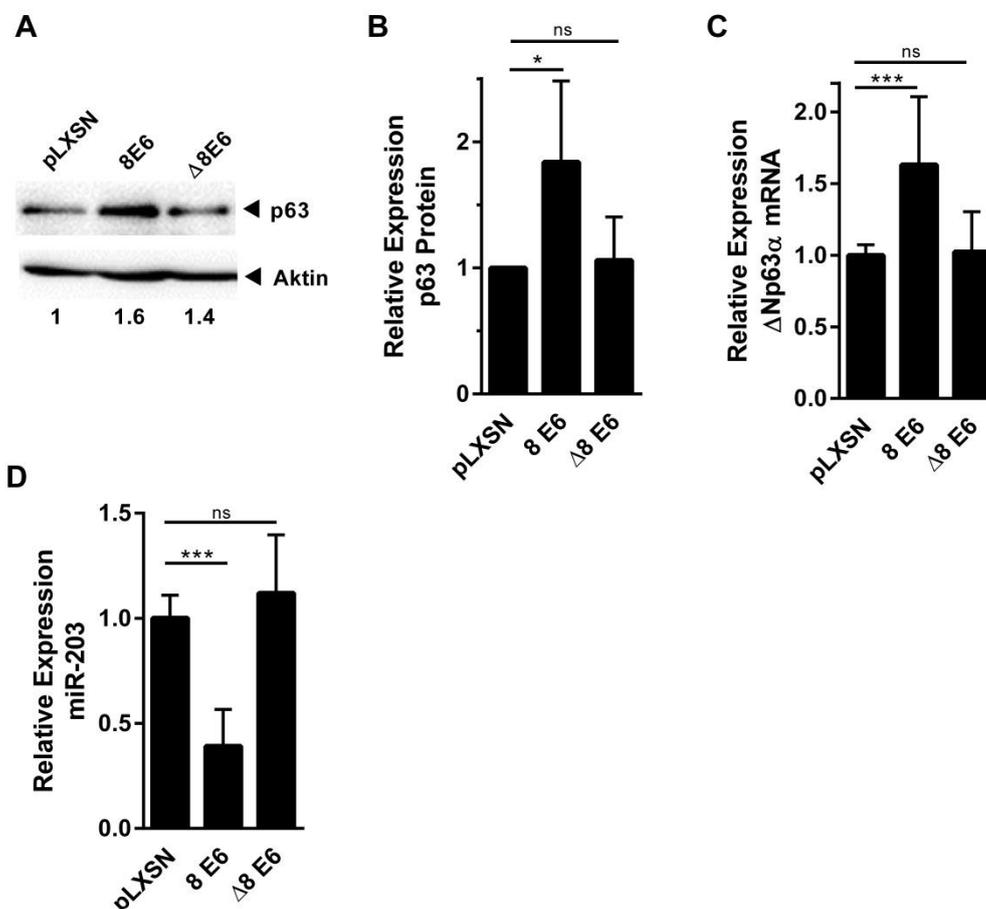


Abbildung 43. Δ Np63 α und miR-203 Expression in Δ 8E6-exprimierenden NFK.

(A) Aus HPV8 E6- und Δ 8E6-exprimierenden NFK wurden Proteine isoliert und im Western Blot die p63 Expression analysiert. Zahlen geben die Quantifizierung im Verhältnis zur Ladekontrolle Aktin wieder. (B) Quantifizierung der Proteinexpression aus A von drei unabhängigen Experimenten. (C) Aus den gleichen Zellen wurde mRNA isoliert und die Δ Np63 α und (D) miR-203 Expression mittels qRT-PCR gemessen. Normalisiert wurde auf die RPL13A bzw. die RNU6B Expression. ns= nicht signifikant, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

6 Diskussion

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das kutane beta-Papillomvirus Typ 8 den Transkriptionsfaktor $\Delta Np63\alpha$ induziert, indem es die Expression der miR-203 unterdrückt. Der Coaktivator p300 sowie der AP-1 Faktor JunB konnten als neue Induktoren der miR-203 identifiziert werden.

HPV8 E6 führte zur Reduktion des p300-Proteins, wodurch die endogene miR-203 Expression unterdrückt wurde. Als Konsequenz dieser Deregulation traten in HPV8 E6 positiven Zellen sowie in Biopsien von HPV8 positiven *Epidermodysplasia verruciformis* Patienten gestörte Differenzierungsprozesse und eine verstärkte Proliferation auf.

6.1 HPV8 E6 stört den miR-203/p63 Signalweg und dadurch Differenzierung und Proliferation in Keratinozyten

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Expression des Transkriptionsfaktors $\Delta Np63\alpha$, die Expression der miR-203 sowie Marker der Keratinozytendifferenzierung in primären Keratinozyten, welche HPV8 E6 und E7 exprimieren, untersucht. Die Ergebnisse konnten in Biopsien HPV8-positiver EV-Patienten verifiziert werden. Es konnte *in vitro* ein Zusammenhang zwischen der Herunterregulation der miR-203, der damit einhergehenden Hochregulation von p63 und folglich der gestörten Differenzierung und Proliferation durch HPV8 E6 hergestellt werden.

6.1.1 HPV8 stört den p63/miR-203 Signalweg in NFK und HaCaT Zellen

Unter Verwendung verschiedener retroviral infizierter NFK-Spender konnte gezeigt werden, dass HPV8 E6 den Transkriptionsfaktor $\Delta Np63\alpha$ induziert. Dies wurde zwischenzeitlich auch von Meyers et al. (2013) bestätigt. Zusätzlich zu den Daten aus der Diplomarbeit (Schneider, 2010), wurden weitere retroviral infizierte NFK Spender in die Auswertung mit einbezogen. Dabei fiel auf, dass HPV8 E7 $\Delta Np63\alpha$ weniger induzierte, bei einer gleichzeitigen Expression von E6 und E7 jedoch der Einfluss von E6 dominiert hat. Dies könnte der natürlichen Expression der viralen Proteine während einer Infektion der Haut entsprechen. In der Keratinozytenzelllinie HaCaT waren die gleichen Effekte auf die $\Delta Np63\alpha$ Expression zu beobachten. Auch in organotypischen Hautkulturen, generiert aus HPV8 E6-positiven HaCaT Zellen, war die $\Delta Np63\alpha$ Expression in nahezu allen Zellkernen aller Schichten detektierbar. In den Kontrollkulturen wurde bestätigt, dass $\Delta Np63\alpha$ hauptsächlich in den basalen Schichten detektiert werden kann (Parsa et al., 1999). Die Ergebnisse konnten in EV-Läsionen verifiziert werden. Die Zelllinie HaCaT wurde ausgesucht, da sie im Vergleich zu

primären Keratinozyten auf Grund von p53-Mutationen immortalisiert ist (Craig et al., 2010; Lehman et al., 1993).

Nun stellte sich die Frage nach dem Mechanismus, wie HPV8 E6 p63 reguliert. Es ist bekannt, dass p63 eine Zielstruktur der miR-203 ist und durch diese negativ reguliert wird (Lena et al., 2008; Yi et al., 2008). Dabei wird angenommen, dass nicht die Translation der p63 mRNA inhibiert, sondern bereits die mRNA degradiert wird (Yi et al., 2008). Die miR-203 ist als Stammzell-inhibierende miRNA charakterisiert worden. Sie wird nur in den differenzierten Schichten der Haut exprimiert und induziert den Austritt aus dem Zellzyklus (Jackson et al., 2013). *In vitro* kann die Expression der miR-203 über Stimulation mit dem PKC-Aktivator PMA und Ca^{2+} erreicht werden (Lena et al., 2008; Sonkoly et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass HPV8 E6 sowohl in NFK als auch in HaCaT Zellen die miR-203 Expression inhibiert. Auch nach Induktion der Differenzierung durch Ca^{2+} , was zu Induktion der miR-203 in den Kontrollzellen führte, blockierte HPV8 E6 die Hochregulation. Dieses Phänomen ist für kutane beta-HPV-Typen hier zum ersten Mal beschrieben. Es wurde bisher gezeigt, dass E5 und E7 von mukosalen Hochrisiko-Typ 16 und 31 sowie HPV18 E6 die miR-203 Expression negativ beeinflusst (Greco et al., 2011; McKenna et al., 2010; Melar-New et al., 2010; Yablonska et al., 2013). HPV18 E6 verhindert die miR-203 Expression, indem die proteasomale Degradation von p53 induziert wird (McKenna et al., 2010). Hier wird p53 als Regulator der miR-203 beschrieben. Der genaue Mechanismus wurde allerdings nicht entschlüsselt, zum Beispiel die direkte Bindung von p53 an den miR-203 Promotor oder eine Aktivierung dessen. Es wurde nur gezeigt, dass durch p53siRNA Transfektion die miR-203 Expression reprimiert wird, sowie dass eine p53-induzierende Doxorubicin Behandlung die miR-203 induziert. HPV18 E6 unterdrückt die Doxorubicin-vermittelte miR-203 Induktion. Im Gegensatz dazu regulieren HPV16 und HPV31 E7 die miR-203 über Inhibition des PKC Signalwegs, welcher als neuer Regulator beschrieben wurde (Melar-New et al., 2010). Über den PKC-Aktivator PMA konnte die miR-203 Expression induziert, beziehungsweise durch HPV16 E7 unterdrückt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass auch HPV8 E6 den PMA-induzierenden Effekt der miR-203 Induktion unterdrückt.

6.1.2 p63 und miR-203 in EV-Läsionen und anderen Tumoren

Die Ergebnisse konnten in EV-Läsionen bestätigt werden. *In vivo* Daten zur miR-203 und p63 Expression zeigten ein inverses Muster in Hautbiopsien von HPV8-positiven EV Patienten. Die miR-203 wird im Zytoplasma der suprabasalen Epidermisschichten in nicht-läsionaler Haut exprimiert. Dies entspricht dem Expressionsmuster in gesunder Haut (Sonkoly et al., 2007). p63 hingegen ist nur in den Zellkernen basaler Schichten

exprimiert (Parsa et al., 1999). Im Gegensatz dazu wird p63 in läsionaler Haut massiv induziert, während die miR-203 kaum noch detektiert werden kann. Immunhistochemische Färbungen von Basalzell-Karzinomen (*basal cell carcinoma: BCC*) zeigten den gleichen Phänotyp (Sonkoly et al., 2012). Die miR-203, exprimiert in suprabasalen Zellen, wurde in BCC bei gleichzeitiger Hochregulation von p63 supprimiert. Auch in einigen Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen (*head and neck squamous cell carcinoma: HNSCC*) wurde eine Hochregulation von p63 beobachtet, was zum Teil mit der Genomamplifikation des *p63*-Gens zusammenhängt, jedoch auch mit einer Herunterregulation der miR-203 assoziiert wurde (Bockmuhl et al., 1996; Kozaki et al., 2008; Mathe et al., 2009). Die Überexpression von p63 in HNSCC wird mit einer schlechten Prognose und einem aggressiven Krankheitsverlauf in Zusammenhang gebracht (Lo Muzio et al., 2005; Suarez-Carmona et al., 2014). Die Deregulation der miR-203 und damit einhergehend die Hochregulation von p63 ist im Vergleich zur Suppression von p53 ein selteneres Phänomen in Tumoren (Candi et al., 2014). In Zervixkarzinomen konnte ebenfalls beobachtet werden, dass die miR-203 herunterreguliert wird (Wilting et al., 2013a). Bei der Untersuchung unterschiedlicher Grade von zervikalen intraepithelialen Neoplasien zeigte sich, dass die miR-203 bereits früh in der Tumorentwicklung supprimiert wird (Wilting et al., 2013a; Wilting et al., 2013b). Die Deregulation der miR-203 scheint ein häufig auftretendes Phänomen in Tumoren zu sein und macht sie gewebeabhängig zu einer Tumorsuppressor-miRNA.

6.1.3 HPV8 und Notch

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in HPV8 E6-exprimierenden Keratinozyten das erhöhte p63-Level durch miR-203 Überexpression wieder auf Normal-Niveau reguliert wird, weshalb die Überexpression von p63 in erster Linie auf die Deregulation der miR-203 zurückzuführen ist.

Die Induktion von p63 in HPV8 E6-exprimierenden Zellen wurde ebenfalls von Meyers et al. beobachtet (Meyers et al., 2013). In der Arbeit wurde die Deregulation von MAML, einem Faktor des Notch Signalwegs beschrieben. Da p63 auch negativ über den Notch Signalweg reguliert werden kann, wurde die Deregulation von p63 in diesen Zusammenhang gestellt (Nguyen et al., 2006). Nguyen et al. haben gezeigt, dass Notch und p63 in einer Kreuzregulation stehen und sich gegenseitig negativ beeinflussen. Notch induziert den Zellzyklus-Inhibitor p21 und Involucrin auf Promotor- sowie auf Proteinebene. Bei gleichzeitiger Expression von $\Delta Np63\alpha$ wurden diese Effekte blockiert. Andererseits wird p63 durch Notch induziertes NF- κ B inhibiert. Drei Publikationen haben gezeigt, dass HPV8 E6 mit MAML interagiert, wodurch der Notch Signalweg blockiert wird (Brimer et al., 2012; Meyers et al., 2013; Tan et al., 2012). Anzumerken ist allerdings, dass Meyers et al. die p63 Induktion nicht alleine auf die

gestörte Notch Funktion zurückführen, da nach Inhibition des Notch-Signalweges durch den Gamma-Sekretase-Inhibitor (GSI) eine Stimulation mit Ca^{2+} das p63-Niveau immer noch unterdrückt.

In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls gezeigt, dass durch Blockierung des Signalwegs über GSI die Involucrin Expression zurückging. Gleichzeitig wurde auch die miR-203 unterdrückt. Dieser Effekt trat in den HaCaT Zellen nicht auf und ist eventuell auf einen Zelllinien-Artefakt zurückzuführen. Eine Überexpression mit der intrazellulären Notch1 Domäne oder eine Stimulation mit dem Notch Liganden Jagged1 konnte die miR-203 weder in NFK noch in HaCaT Zellen induzieren. Es scheint sich demnach bei der miR-203 Regulation nicht um einen direkten Effekt von Notch1 zu handeln.

6.1.4 Effekte von HPV8 E6 auf Differenzierung und Proliferation

Effekte der Deregulation des p63/miR-203 Netzwerkes durch HPV8 E6 spiegelten sich im Hinblick auf gestörte Differenzierungsprozesse und erhöhte Proliferation wider. Es konnte gezeigt werden, dass HPV8 E6 Differenzierungsfaktoren wie Involucrin in Keratinozyten und organotypischen Kulturen unterdrückt. Auch in HPV8-positiven EV-Läsionen war die Involucrin-Expression reduziert. Im Gegensatz dazu wurde die Proliferation induziert. Gestörte Differenzierung durch humane Papillomviren wurde auch für andere Typen beschrieben. Organotypische Kulturen, generiert aus HPV5 oder HPV38 E6/E7 (Boxman et al., 2001) sowie aus HPV8 E6/E7-exprimierenden humanen Keratinozyten (Kazem et al., 2012), bildeten keine kornifizierte Schichten aus. Sowohl die Expression des frühen Differenzierungsmarkers Keratin 10 (Boxman et al., 2001) als auch des späten Markers SPRR2 (Lazic et al., 2011) war in HPV8 vermindert, was bei Lazic et al. auf das E6 Protein zurückgeführt wurde. Über die Inhibition der Differenzierung schafft das Virus ein ideales Milieu, indem es die Transkriptionsfaktoren und Coaktivatoren der Zelle für die eigene Replikation und Transkription nutzen kann. Inwiefern das E7 Protein von HPV8 einen Einfluss auf die Differenzierung hat, ist noch unklar. In einer retroviralen Infektion an NFK-Spender 8, welcher auch im RNA-Array eingesetzt wurde, ergaben qRT-PCR Ergebnisse eindeutig eine Induktion zahlreicher früher und später Differenzierungsfaktoren durch HPV8 E7 (Schneider, 2010). Diese Infektion wurde in früheren Arbeiten der AG Smola durchgeführt. Bei späteren, auch an anderen Keratinozyten-Spendern durchgeführten retroviralen Infektionen induzierte HPV8 E7 diese Differenzierungsmarker nicht, sondern unterdrückte sie. Aus diesem Grund ergibt sich für den Einfluss von HPV8 E7 auf die Differenzierung eine große Divergenz. Lazic et al. beschrieben ebenfalls eine Induktion der Differenzierung durch HPV8 E7 in transgenen Mäusen sowie in HPV8 E7-exprimierenden humanen Keratinozyten, wobei hier E7 dominant über E6 wirkte

(Lazic et al., 2011). Im Gegensatz dazu steht die Arbeit von Westphal et al., in welcher gezeigt wurde, dass HPV8 E7-positive organotypische Kulturen den Differenzierungsmarker Keratin 10 normal exprimierten (Westphal et al., 2009). Die widersprüchlichen Ergebnisse könnten auf den Einsatz unterschiedlicher primärer Keratinozyten und Zellkulturmedien zurückzuführen sein. Außerdem könnte sich der unterschiedliche experimentelle Aufbau der organotypischen Kulturen auf die Ergebnisse auswirken.

Die HPV8 E6-vermittelte Deregulation der Differenzierung konnte auf die Suppression der miR-203 und der damit einhergehenden Induktion von p63 zurückgeführt werden. Durch p63 siRNA Experimente wurde die Expression des Differenzierungsmarkers Involucrin in pLXSN-HaCaT Zellen induziert. Dies bestätigt Versuche von Yugawa et al. (2010). Nach p63 *Knockdown* in HPV8 E6-exprimierenden Zellen wurde Involucrin ähnlich wie in den Kontroll-Zellen normal exprimiert. Die gleichen Ergebnisse erzielten miR-203 Überexpressionsversuche, wodurch die Expression des Zielgens p63 auf mRNA- als auch auf Proteinebene unterdrückt wurde. Es erfolgt demnach vermutlich bereits die Degradation der p63-mRNA durch die miR-203 und nicht nur eine Inhibition der Translation (Lena et al., 2008; Yi et al., 2008). Durch die Überexpression der miR-203 und der Herunterregulation von p63 wurde Involucrin in den Kontrollzellen induziert. Die Induktion in den Kontrollzellen ist nicht sehr stark, was dafür spricht, dass die miR-203 nicht das einzige Molekül in der Haut ist, welches für die Induktion von Differenzierung verantwortlich ist. So wird Involucrin beispielsweise auch direkt über Differenzierungsspezifisch-exprimierte Transkriptionsfaktoren wie C/EBP, AP-1 oder p300 induziert (Crish et al., 2006; Howie et al., 2011). Auch andere Signalwege spielen eine wichtige Rolle, wie der eben beschriebene Notch-Signalweg.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass HPV8 E6 die Proliferation in HaCaT Zellen verstärkt. Auch organotypische Kulturen, generiert aus E6-exprimierenden HaCaT Zellen waren dicker und wiesen mehr Zellschichten auf als Kontrollkulturen. Auf die Fläche der Keratinozyten-Schichten normiert waren mehr Zellkerne in E6 positiven Kulturen vorhanden. Dies verdeutlicht, dass die Dicke der E6-positiven Kulturen nicht auf größere Zellen zurückzuführen ist, sondern tatsächlich auf eine vermehrte Zellzahl. HPV8 E6/E7-positive organotypische Kulturen, generiert in der Arbeit von Lazic et al. (2012), waren ebenfalls dicker als die Kontroll-Kulturen. Ein Scratch-Assay untermauerte diese Ergebnisse. Die freie Fläche war in E6-positive Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen nach 48 Stunden vollständig bewachsen. Um einen Zusammenhang zu der Deregulation des p63/miR-203 Netzwerkes herzustellen, wurde der Scratch-Assay für HaCaT-pLXSN und HPV8 E6-exprimierende Zellen nach p63siRNA- oder miR-203 Mimic-Transfektion durchgeführt. Die p63siRNA-Transfektion führte zu einer

deutlichen Inhibierung des Wachstums in HaCaT-pLXSN Zellen. Dies bestätigt Ergebnisse früherer Gruppen (Truong et al., 2006; Yugawa et al., 2010). Der Zellzyklusinhibitor p21 wird durch Δ Np63 α supprimiert, weshalb die Herunterregulation von Δ Np63 α den Abbruch der Proliferation durch Induktion von p21 bewirkt (Truong et al., 2006). In HPV8 E6-positiven Zellen verlangsamte die p63 siRNA Transfektion ebenfalls die Proliferation und generierte einen Phänotyp vergleichbar mit den HaCaT-pLXSN Zellen.

Nach der Überexpression der miR-203 wurde p63 herunterreguliert. Im Scratch-Assay induzierte die miR-203 Transfektion in den HaCaT-pLXSN Zellen ebenso wie die Transfektion der p63 siRNA die Proliferation. Dies bestätigte die Versuche, durchgeführt an Prostatazellen und Keratinozyten (McKenna et al., 2010; Saini et al., 2011; Viticchie et al., 2011). Auch hier unterdrückte die miR-203 das Wachstum. Darüber hinaus konnte in den E6-positiven Zellen die erhöhte Proliferation gesenkt werden. Diese beiden Versuche zeigen, dass die HPV8 E6-vermittelte Suppression der miR-203 und die daraus resultierende Induktion von p63 für die erhöhte Proliferation in Keratinozyten verantwortlich war. Die Effekte, welche im Scratch-Assay beobachtet wurden, können neben Proliferation auch Migration beinhalten. Die Bedeutung der miR-203 Expression für den Zellzyklus wurde in einer Arbeit von Jackson und Kollegen gezeigt (Jackson et al., 2013). Nach asymmetrischer Zellteilung der basalen Keratinozyten-Stammzelle in eine Basalzelle und eine Suprabasalzelle wurde nur in Letzterer die Expression der miR-203 induziert. Die Expression der miR-203 stoppte innerhalb von 6 Stunden den Zellzyklus. Auch Langzeiteffekte auf den Zellzyklus wurden hier postuliert. Nach einer dreitägigen Behandlung der Zellen mit miR-203 konnte die Zellteilung nicht wiederhergestellt werden. Allerdings wurde in dieser Publikation kein genauer Zeitpunkt definiert, wie lange die Effekte anhalten.

Die Deregulation des p63/miR-203 Signalweges in zahlreichen Tumoren brachte erste Versuche hervor, dieser durch p63-Herunterregulation oder miR-203 Überexpression entgegen zu wirken. Erste Arbeiten zeigten bereits einen vorklinischen Ansatzpunkt der Behandlung durch p63-Herunterregulation (Thurfjell et al., 2005). In dieser Publikation konnte dargestellt werden, dass Tumorzellen durch die p63-Reduktion besser auf Chemotherapien ansprechen. Eine ektope Expression der miR-203 in der HPV16 positiven Zelllinie SiHa unterdrückte die Proliferation (Wilting et al., 2013b). Welche Rolle die verminderte Expression der miR-203 in der Karzinogenese haben kann, zeigen Arbeiten an Brustkrebszellen (Zhang et al., 2011). Zhang et al. zeigten, dass die miR-203 vor allem in metastasierenden Brustkrebszellen herunterreguliert wird. Durch ektope Expression in diesen Zellen konnte Apoptose und Zell-Zyklus Arrest induziert werden. Außerdem reduzierten sich Zellinvasion und Metastasierungsprozesse. Taube

et al. konnten außerdem zeigen, dass durch die miR-203 Suppression Prozesse der Epidermalen-Mesenchymalen Transition (EMT), welche auch Metastasierung und Migration beeinhaltend, verstärkt werden (Lamouille et al., 2014; Taube et al., 2013). Diese Arbeiten geben erste Einblicke auf einen möglichen Ansatz in der Tumorthherapie.

Die Deregulation des miR-203/p63-Netzwerks könnte auch in EV-Patienten die Tumorgenese vorantreiben. Weitere Zielgene der miR-203 wie beispielsweise Snai2, SOCS-3, ZEB1, Interleukin-8, c-Jun, Msi2 und Skp2 beeinflussen Proliferation, Metastasierung, Apoptose und Immunantworten (Jackson et al., 2013; Sonkoly et al., 2012; Wei et al., 2010; Wei et al., 2013; Zhang et al., 2011). Eine Untersuchung der Expression dieser und weiterer miR-203 Zielgene in HPV8-positiven Keratinozyten und Biopsien von EV-Patienten wäre interessant, um die Konsequenzen der miR-203 Deregulation auch unabhängig von p63 zu erfassen. Hier wäre vor allem der Einfluss auf die EMT interessant, da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass DKK1, ein Inhibitor des Wnt-Signalweges, welcher die EMT induziert, durch HPV8 E6 unterdrückt wurde. Taube und Kollegen haben beschrieben, dass die miR-203 indirekt die Expression von DKK1 induziert (Taube et al., 2013). Dies konnte in den miR-203 Mimic Versuchen bestätigt werden.

6.2 miR-203 Regulation

Im zweiten Teil der Arbeit wurde zunächst der HPV-unabhängige Mechanismus der miR-203 Regulation in Keratinozyten untersucht, um anschließend verstehen zu können, wie HPV8 E6 diesen stören kann. Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Acetyltransferase p300 zusammen mit dem AP-1 Transkriptionsfaktor JunB den miR-203 Promotor aktiviert. *Knockdown* von p300 und JunB unterdrückte die miR-203 Expression. Nachdem publiziert wurde, dass HPV8 E6 p300 destabilisiert (Howie et al., 2011), konnte gezeigt werden, dass in Keratinozyten, welche die p300-Bindemutante $\Delta 8E6$ exprimierten, die miR-203 nicht unterdrückt wurde. Außerdem wurde das Target der miR-203, $\Delta Np63\alpha$, nicht induziert.

McKenna und Kollegen haben beschrieben, dass HPV18 E6 über p53-Degradation die miR-203 deregulieren (McKenna et al., 2010). Im Gegensatz zu mukosalen Hochrisiko-HPV Typen induziert HPV8 nicht die p53 Degradation (Elbel et al., 1997; Scheffner et al., 1990; Steger et al., 1992). Ganz ausgeschlossen werden kann diese Regulation durch HPV8 E6 allerdings nicht, da p53 zwar nicht durch HPV8 E6 degradiert wird, aber vielleicht in seiner Aktivität verändert ist. Arbeiten aus dem Galloway Labor deuten in die Richtung, dass HPV5 und HPV8 über veränderte Phosphorylierung und Acetylierung die Aktivität von p53 stören (Wallace et al., 2012). So konnten Wallace et

al. zeigen, dass die HPV5 und HPV8 E6-Proteine unter UV-Stress die Phosphorylierung an Serin 15 und 37 von p53 verringern. Diese Phosphorylierungen stabilisieren normalerweise p53 und verhindern eine MDM2 induzierte Degradation (Shieh et al., 1997). Verhindert E6 diese Phosphorylierung, wird p53 abgebaut. Außerdem wird die p300-vermittelte Acetylierung von p53 an Lysin 382, ebenfalls unter UV-Stress, reduziert. Diese Modifikation trägt zu DNA-Interaktionen bei (Gu et al., 1997). Im Gegensatz dazu steht die Arbeit von White et al., welche beschreibt, dass HPV8 E6 die Acetylierung von p53 an Lysin 382 sowie die Phosphorylierung an Serin 15 unter Mitomycin C Behandlung nicht verhindert (White et al., 2014). Sie diskutieren die Unterschiede zu der Arbeit von Wallace et al. mit verschiedenen experimentellen Aufbauten. Allerdings fällt auch in dieser Arbeit eine leicht verringerte Induktion der p53-Acetylierung auf, welche von den Autoren nicht als solche beschrieben wird. Ursächlich für die Differenzen könnte auch die Verwendung unterschiedlicher Zellen sein. So nutzen White et al. im Gegensatz zu Wallace et al. keine primären Keratinozyten, sondern N/Tert-immortalisierte Keratinozyten. Es bleibt also nach wie vor unklar, ob HPV8 E6 einen Einfluss auf die p53 Aktivität hat. Aus diesem Grund wurden weitere mögliche Mechanismen der miR-203 Regulation untersucht.

6.2.1 Epigenetik

Zahlreiche Publikationen der letzten Jahre berichten über eine epigenetische Regulation von miRNAs in Tumoren. So ist die miR-203 beispielsweise in Brustkrebszellen, Multiplen Myelomen, Mundkrebs und Zervixkarzinomen über DNA-Hypermethylierung supprimiert (Kozaki et al., 2008; Taube et al., 2013; Wilting et al., 2013b; Wong et al., 2012). Diese Arbeiten gaben Anlass, die epigenetische Regulation der miR-203 in HPV8 E6-exprimierenden HaCaT Zellen zu analysieren. DNA-Methyltransferasen (DNMT) übertragen während der Replikation der DNA eine Methylgruppe an Cytosine (Baylin, 2005). Es werden Cytosine, welche als CpG Dinukleotide vorliegen, methyliert. Vor allem Promotorregionen sind sehr CpG reich und eine Hypermethylierung bewirkt eine Kondensation des Chromatins, was die Transkription verhindert. Der Methyltransferase-Inhibitor DAC inhibiert die Methylierung während der Replikation durch Blockierung der DNMTs (Patra et al., 2009). In HaCaT-pLXSN Zellen induzierte diese Behandlung die Expression der miR-203 und des Differenzierungsmarkers Involucrin. Auch in den HPV8 E6-positiven Zellen konnte die miR-203 sowie die Involucrin Expression induziert werden. Dieser Versuch war ein deutliches Indiz, dass die miR-203 über DNA-Hypermethylierung in HPV8 E6-exprimierenden HaCaT Zellen unterdrückt wurde, wodurch auch die Differenzierung beeinträchtigt war. Diese Modifikation konnte durch die Behandlung mit dem DNMT-Inhibitor DAC aufgehoben werden. Zur Klärung des tatsächlichen

Methylierungsstatus des miR-203 Promotors wurde in Kooperation mit Dr. Sascha Tierling von der Arbeitsgruppe Walter, Genetik, in Saarbrücken eine Bisulphitsequenzierung der Zellen vorgenommen. HaCaT-pLXSN sowie HPV8 E6-positive Zellen waren stromaufwärts der miR-203 Hairpin nicht methyliert. Demnach konnte durch DAC Behandlung auch eine Methylierung nicht aufgehoben werden. Erst in Bereichen stromabwärts wurde an einigen CpGs eine leichte Methylierung festgestellt, welche bis +1072 bp leicht zunahm. Durch DAC-Behandlung reduzierte sich diese. Allerdings waren die CpGs im Durchschnitt in E6-exprimierenden Zellen nicht stärker methyliert. Die anfängliche Vermutung, dass die vorhergesagte miR-203 Promotorregion in HPV8 E6-exprimierenden Zellen in CpG-reichen Regionen DNA-Hypermethylierungen aufweist, hatte sich nicht bestätigt. Eventuell resultierte die Hochregulation der miR-203 nach DAC Behandlung durch einen epigenetisch regulierten Aktivator. Auch wäre denkbar, dass DNA-Bereiche, welche weiter distal oder proximal des vorhergesagten Promotors liegen, hypermethyliert sind. Darüberhinaus müsste überprüft werden, ob es sich hierbei noch um miR-203-assoziierte Enhancer- oder Promotorelemente handelt.

DNMT1 ist als *Maintain*-Methyltransferase an der Aufrechterhaltung der Methylierung während der Replikation verantwortlich, während DNMT3a und DNMT3b *de novo* methylieren (Robertson, 2001). Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass auch die siRNA-vermittelte Herunterregulation der DNA-Methyltransferase DNMT1 die miR-203 Expression nicht verändern konnte. Bei der in dieser Zeit stattgefundenen Replikation hätte sich die fehlende Methylierung durch DNMT1 bemerkbar machen müssen und es war nicht notwendig, die *de novo* Methyltransferasen 3a und 3b zu inhibieren. In den letzten Jahren haben zahlreichen Studien gezeigt, dass eine erhöhte DNMT1-Aktivität oder ein erhöhtes mRNA-Level eine Hauptrolle bei der Hypermethylierung von Tumorzellen und in der Karzinogenese spielt (Subramaniam et al., 2014). Tumoviren wie HBV, HCV und EBV induzieren die Aktivität oder die Expression von DNMT1 (Hino et al., 2009; Jung et al., 2007; Zeng et al., 2012). Die Inhibition von DNMT1 hingegen reduzierte die Tumorigenese, während eine Überexpression die Transformation förderte (Laird et al., 1995; Wu et al., 1993).

Eine Analyse der mRNA Expression in E6 und E7 infizierten NFK zeigte, dass DNMT1 auch nicht verstärkt exprimiert wurde. Yeung et al. beschrieben, dass DNMT1 negativ über p53 reguliert wird, und so in HPV16 positiven Zelllinien über die p53-Degradation hochreguliert wird (YeungYeung et al., 2010). Eine Hochregulation von DNMT1 in HPV8 E6-exprimierenden Zellen konnte nicht beobachtet werden. Eine Möglichkeit wäre, dass durch HPV8 E6 die Expression der DNMT1 nicht erhöht wird, sondern

deren Aktivität verändert ist. Beispielsweise induziert HPV16 E7 die DNMT1 Aktivität über direkte Bindung und verstärkt so die DNA-Methylierung (Burgers et al., 2007). Eine weitere epigenetische Modifikation erfolgt über Acetylierung und Methylierung an Histonen (Farria et al., 2015; McGrath et al., 2015). Der Einfluss von Histonacetylierung auf die miR-203 Expression wurde über Inhibition der Histondeacetylasen (HDAC) untersucht. Trichostatin-A (TSA) inhibiert HDACs, wodurch Histone verstärkt acetyliert vorliegen und eine erhöhte Transkription stattfindet (Farria et al., 2015). Nach Behandlung der HaCaT-pLXSN und HaCaT-E6 Zellen mit TSA wurde das miR-203 Niveau nicht verändert und diese Modifikation wurde als miR-203 Regulator ausgeschlossen. Weitere Möglichkeiten, diese Modifikationen zu untersuchen, wären Western Blots mit Antikörpern gegen unterschiedliche Histonmodifikationen oder Chromatin-Immunpräzipitationen. Methylierung des Histons H3 an den Lysinresten 9 und 27 ist mit transkriptioneller Repression verbunden (Le et al., 2014). Im RNA Array unterdrückte HPV8 E6 die H3-Lys9 Demethylase JMJD1C sowie die H3-Lys27 Demethylase JMJD3. Diese Ergebnisse konnten in den retroviral infizierten NFK für HPV8 E6 nicht bestätigt werden, weshalb auch diese Modifikationen als Regulator der miR-203 ausgeschlossen wurden.

6.2.2 JunB und p300 regulieren miR-203 in Keratinozyten

Wichtige Regulatoren der Differenzierung und Proliferation in der Haut sind AP-1 Transkriptionsfaktoren. Zahlreiche Studien haben die Funktionen der unterschiedlichen AP-1 Komponenten in Keratinozyten im Hinblick darauf analysiert. JunB wird in allen Schichten der Epidermis exprimiert (Jin et al., 2011; Zenz et al., 2005), wobei auch eine neuere Publikation über immunhistochemische Färbungen die Expression nur in den suprabasalen Schichten zeigt (Ponticos et al., 2015). JunB inhibiert den Cyclin D1 Promotor und inhibiert die Proliferation von Keratinozyten (Bakiri et al., 2000; Jin et al., 2011). In Psoriasis und Plattenepithelkarzinomen ist JunB unterdrückt (Jin et al., 2011; Zenz et al., 2005). JunB kann die Differenzierung über Aktivierung von Involucrin induzieren (Welter et al., 1995). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, dass die Involucrin Expression nach JunB *Knockdown* reduziert wurde. Die Bedeutung von AP-1 Faktoren in der miR-203 Regulation wurde in Ansätzen schon beschrieben. Sonkoly et al. haben gezeigt, dass c-Jun die miR-203 inhibiert (Sonkoly et al., 2012; Sonkoly et al., 2010). Die Transfektion einer dominant-negativen JunB Mutante inhibierte die Expression und deutet an, dass JunB die miR-203 aktivieren kann. Außerdem konnte durch PMA die miR-203 Expression induziert (Melar-New et al., 2010). Diese Tatsachen machten JunB zu einem interessanten Kandidaten als miR-203 Regulator. Außerdem war JunB im RNA Array durch HPV8 E6 reduziert. Der JunB *Knockdown* supprimierte die endogene miR-203 Expression. In HPV8 E6-

exprimierenden NFK war die JunB Expression verringert und konnte auch durch PMA-Stimulation nur zum Teil induziert werden. PMA induzierte neben JunB auch die miR-203, wobei $\Delta Np63\alpha$ reduziert wurde. Die *in silico* Analyse des miR-203 Promotors und der Abgleich mit Literaturdaten zeigten zwei AP-1 Bindestellen an (Thierry et al., 1992). Kompetitionsversuche in EMSA Experimenten mit einer Konsensusbindestelle konnten beide Bindestellen verifizieren. Eine genaue Charakterisierung der AP-1 Faktoren ergab, dass neben JunB auch JunD und Fra-2 in den HaCaT Kernextrakten vorhanden waren, welche an die Promotor-proximale BS-II gebunden haben. Die Expression von JunD und Fra-2 wurden im Gegensatz zu JunB durch HPV8 E6 nicht unterdrückt (Daten nicht gezeigt). Ein *Knockdown* von JunB reduzierte die Bindung an beide Bindestellen in HaCaT Zellen, in NFK allerdings nur schwach. In NFK spielen eventuell noch andere AP-1 Faktoren wie JunD und Fra-2 eine Rolle bei der Bindung. Die PMA-Stimulation verstärkte die Bindung, wobei in E6 positiven Zellen keine verminderte Bindung an BS-I oder II festgestellt werden konnte. Ob eine Verschiebung der Faktoren vorlag, weshalb eine Reduktion des JunB Levels nicht deutlich wurde, ist noch zu zeigen. Die Verstärkung der Bindung nach PMA-Stimulation wurde in E6-exprimierenden Zellen reduziert. JunB bindet im Vergleich zu c-Jun nur schwach an die DNA, wenn der Promotor einzelne AP-1 Bindestellen und keine Cluster vorweist (Deng et al., 1993). Die Bedeutung von JunB in der miR-203 Regulation wurde durch das siRNA-Experiment und die PMA-Stimulation deutlich. Auch konnten die Bindestellen im Promotor verifiziert werden. Die Versuche mit E6-infizierten Zellen zeigten im EMSA allerdings keine klaren Ergebnisse, was eventuell damit zusammenhängt, dass E6 nicht die Bindungsstärke, sondern die Transaktivierung verändert.

Um den direkten Einfluss von JunB und p300 auf den miR-203 Promotor zu messen, wurde dieser analog zu Wellner et al. in einen Reportervektor kloniert (Wellner et al., 2009). Es wurde der Bereich 1170 bp stromaufwärts der miR-203 Hairpin-Struktur als Promotor definiert, da dies auch in dem *in silico* Programm vorhergesagt wurde (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/>). Jackson et al. haben über RACE-Analyse die Transkriptionsstartstelle (TSS) in Maus etwa 100 bp stromaufwärts definiert, wobei sich die meisten Transkriptionsfaktorbindestellen im Bereich bis -500 bp befinden (Jackson et al., 2013). Ebenso wie bei Jackson et al. konnte der Promotor über Calcium-Stimulation induziert werden (Daten nicht gezeigt). Auch PMA induzierte diesen und induzierte somit deutlich die Abhängigkeit von Differenzierungsspezifisch-induzierten Transkriptionsfaktoren. Interessant war nun der Einfluss von JunB und p300 auf die miR-203 Promotoraktivität. p300 konnte den Promotor nur schwach, JunB stärker aktivieren. Zusammen exprimiert ergab sich ein synergistischer Effekt. Die Abhängigkeit der Promotoraktivität von JunB und p300 zeigten siRNA Experimente,

denn nach *Knockdown* der Faktoren reduzierte sich die Promotoraktivität und war auch durch PMA nicht wie in der Kontrolle stimulierbar. Durch PMA wurde JunB induziert, d. h., dass die PMA vermittelte Induktion auf JunB zurückzuführen war (Schlingemann et al., 2003). Allerdings ist nicht auszuschließen, dass auch weitere PMA-induzierbare Faktoren, wie C/EBP (Sperling et al., 2012), den Promotor und die miR-203 induzieren. Nach p300-*Knockdown* und anschließender JunB Transfektion konnte die Promotoraktivität nicht mehr ganz wiederhergestellt werden. Diese Experimente zeigten deutlich, dass der miR-203 Promotor von dem AP-1 Transkriptionsfaktor JunB abhängig ist, aber auch von p300, welcher selbst ein schwacher Aktivator ist. Der Synergismus zwischen p300 und AP-1 Faktoren wurde bereits an Hand des Involucrin Promotors gezeigt (Crish et al., 2008). Wie auch in den vorliegenden Experimenten verhinderte in dieser Publikation die p300-Inhibition die PMA-induzierte Involucrin-Promotor Aktivierung. Fra-1 und p300 zusammen exprimiert aktivieren den Promotor stärker als alleine. p300 bindet Fra-1 und verstärkt so als Brückenprotein die Transaktivierung, vermutlich auch zusammen mit JunB. Wang et al. haben gezeigt, dass die Acetyltransferase p300 JunB und andere AP-1 Faktoren acetyliert und dadurch die DNA Bindung und Transaktivierung verbessert (Wang et al., 2011). Dieser Mechanismus könnte am miR-203 Promotor vorliegen. Dies würde auch erklären, warum die Bindungsaffinität an die AP-1 BS-I und II durch HPV8 E6 nicht verändert ist. Vielleicht wird hier das transaktivierende Potential verändert, was in einem Bindungsassay nicht deutlich wird. Eine Analyse der JunB Acetylierungsmuster in normalen Zellen, aber auch in E6-exprimierenden Zellen könnte diese Frage klären. Außerdem könnten Interaktionsstudien Aufschluss darüber geben, ob JunB und p300 direkt interagieren. Chromatinimmunpräzipitationen könnten aufzeigen, an welche Sequenz der eventuelle Komplex bindet.

Über welchen Weg JunB dereguliert wird, ist unklar. Eine Hypothese war, dass p300 ein Coaktivator von JunB ist und somit durch die p300 Degradation auch das JunB Level beeinflusst wird. Allerdings war die JunB Expression in Δ 8E6 Zellen immer noch reduziert (Daten nicht gezeigt). In p300 siRNA Experimenten reduzierte sich das JunB Proteinlevel aber nicht das mRNA-Level. Es blieb deshalb noch unklar, ob p300 die JunB Expression beeinflusst oder vielleicht über indirekte Effekte die Proteinstabilität fördert. Lee et al. zeigten, dass das Ad-E1A Protein p300 inhibiert und dadurch JunB nicht mehr über p300 transaktiviert wird (Lee et al., 1996). Allerdings wurde für diese Versuche hauptsächlich die Adenokarzinom-Zelllinie HeLa verwendet, welche HPV18 positiv ist und somit die Ergebnisse beeinträchtigen kann. Ob JunB auch in einer Form über HPV8 E6 degradiert oder destabiliert wird, und inwiefern JunB durch p300 reguliert wird, bleibt zu klären.

6.2.3 p300 und miR-203 in HPV8 Δ E6-exprimierenden Zellen und in EV-Läsionen

Howie et al. haben die HPV8 E6-vermittelte p300-Degradation gezeigt (Howie et al., 2011). Deshalb wurde die Hypothese aufgestellt, dass über diesen Mechanismus die Co-Aktivierung der miR-203 verhindert wird. Um dieser Idee nachzugehen, wurde zunächst die p300 Expression in HPV8 E6 sowie in HPV8 Δ E6-positiven Zellen verifiziert. E6 reduzierte p300 Protein- aber nicht mRNA-Level, was die Regulation auf Proteinebene verdeutlichte. Die p300-Bindungsmutante Δ 8E6 zeigte ein normales, sogar leicht erhöhtes p300-Level. Die Normalisierung der Involucrin Expression wurde bereits von Howie et al. (2011) demonstriert. Sie führten sie auf einen direkten Einfluss von p300 auf den Involucrin Promotor zurück. Da in der vorliegenden Arbeit allerdings gezeigt werden konnte, dass die miR-203 Überexpression das Involucrin Level in E6 positiven Zellen wieder normalisierte, wurde davon ausgegangen, dass die Reduktion der miR-203 durch E6 hauptsächlich für den Involucrin-Effekt verantwortlich ist.

Einen Beweis für einen Zusammenhang zwischen der Herunterregulation der miR-203 durch HPV8 E6 und p300 erbrachten Messungen der miR-203 und p63 Expression in HPV8 Δ E6-exprimierenden Zellen. In diesen Zellen, in welchen die p300 Degradation durch eine Mutation in HPV8 E6 nicht induziert werden konnte, befand sich das miR-203 Level auf Normalniveau. Außerdem wurde Δ Np63 α in HPV8 Δ E6-exprimierenden Zellen nicht mehr induziert. Das Expressionsniveau von Δ Np63 α konnte sich wieder normalisieren, da die negativ-regulierende miR-203 normal exprimiert wurde. Einen endgültigen Beweis, dass die HPV8 E6-vermittelte Degradation von p300 für die Suppression der miR-203 verantwortlich ist, könnten transiente Transfektionsexperimente mit p300-Mutanten erbringen, welche nicht durch AKT phosphoryliert werden können. Howie et al. (2011) haben bereits gezeigt, dass diese Mutanten in HPV8 E6-exprimierenden Zellen weniger degradiert werden.

Die *in vivo* Daten der miR-203 und p300 Expression in HPV8-positiven Läsionen von EV Patienten validierten die Ergebnisse der *in vitro* Versuche. p300 wurde in den nicht-läsionalen Bereichen in einem differenzierungsspezifischen Muster exprimiert. In den basalen, proliferierenden und undifferenzierten Keratinozyten konnte p300 nicht detektiert werden. Mit beginnender Differenzierung wurde p300 in den suprabasalen Zellen exprimiert. Dies konnten auch Müller et al. (2002) zeigen. Im Gegensatz dazu wurde p300 in läsionalen und präkanzerösen Bereichen der EV-Läsion stark unterdrückt. Die miR-203 und p300 Expressionsmuster deckten sich: in den Keratinozytenschichten, in welchen p300 exprimiert wurde, wurde auch die miR-203 exprimiert. Wurde p300 herunterreguliert, war auch die miR-203 nicht detektierbar. Diese Korrelation verhielt sich schlüssig zu den Untersuchungen der endogenen miR-203 Expression nach p300siRNA Transfektion.

Welche Bedeutung haben nun diese Ergebnisse für den HPV8-Lebenszyklus? Es lässt sich feststellen, dass HPV8 E6 den Masterregulator p300 inhibiert. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass p300 nicht nur, wie in der Literatur beschrieben, einzelne Gene und Proteine reguliert, sondern für die Expression einer entscheidenden miRNA verantwortlich ist. HPV8 E6 interferiert durch die Inhibition von p300 und JunB in weitreichende Kaskaden der Keratinozytenentwicklung. Indem p300 zusammen mit JunB die miR-203 reguliert, werden zahlreiche Signalwege beeinflusst. Zielgene der miR-203 verändern Proliferation, Differenzierung und die EMT (Jackson et al., 2013). Im Bezug auf den Replikationszyklus der Papillomviren bedeutet eine hohe miR-203 Expression eine verringerte episomale Genomamplifikation, was bereits für den mukosalen Hochrisiko-Typ 31 dargestellt ist (Melar-New et al., 2010). In dieser Publikation wurde gezeigt, dass während der Keratinozytendifferenzierung die Überexpression der miR-203 die virale Genomamplifikation inhibiert. Nach mehreren Passagen verloren die Zellen die episomale DNA. Auch kutane Hochrisikotypen könnten diesem Mechanismus durch die Unterdrückung der miR-203 entgegenwirken. Generell wird durch die Inhibition von p300 und JunB, und somit durch die Inhibition der miR-203, die Differenzierung gestört und Proliferation verstärkt, wodurch das Virus ein Milieu schafft, das der eigenen Replikation und Transkription zu Gute kommt. Nebeneffekte können, wie bei jedem Tumovirus, die Entstehung von hyperproliferativen Läsionen und Tumoren sein. Auch andere Viren wie EBV können die miR-203 deregulieren (Yu et al., 2012). Dies spricht dafür, dass es sich bei der miR-203 um einen entscheidenden Regulator bei der Entwicklung von Zellen handelt, welcher neben HPV auch von anderen Tumoviren wie HPV und EBV dereguliert wird.

7 Verzeichnisse

7.1 Abkürzungsverzeichnis

3'	DNA Ende mit freier OH Gruppe, ‚ <i>downstream</i> ‘ hinter der Sequenz
3'UTR	3' untranslatierte Region
8E6	HPV8 E6
8E7	HPV8 E7
8E6/E7	HPV8 E6/E7
A	Adenin
Ad-E1A	Adenovirus E1A Protein
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP-1	Aktivator-Protein-1
APS	Ammoniumpersulfat
ATM	Proteinkinase <i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	Proteinkinase <i>Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein</i>
BCC	<i>basal cell carcinoma</i> (Basalzellkarzinom)
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
CaCl ₂	Calciumchlorid
C	Cytosin
cDNA	<i>complementary</i> Desoxyribonukleinsäure
CDSN	Corneodesmosin
CDK	Cyclin dependant kinase
CER	<i>complete early region</i> (frühe Region von HPV Genom)
DAC	5-Aza-2'-deoxycytidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
CNFN	Cornifelin
DNMT	DNA-Methyltransferase
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	2'-Desoxy-nukleosid-5'-Triphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
E 2/4/5/6/7	früh exprimierte HPV-Gene (<i>early</i>)
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EV	<i>Epidermodysplasia verruciformis</i>
EVER	<i>Epidermodysplasia verruciformis</i> -Gene 1 und 2
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FKS	fötale Kälberserum
G	Guanin
G-418	Geneticin
h	<i>hour</i> (Stunde)
HaCaT	<i>human adult low calcium high temperature</i> , Zelllinie
HBS	HEPES gepufferte Salzlösung
HBSS	Hanks gepufferte Salzlösung
HDAC	Histondeacetylase
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure

HNSCC	<i>head and neck squamous cell carcinoma</i> (Hals und Kopf Plattenepithelkarzinom)
HPV	Humanes Papillomvirus
HPV8	HPV Typ 8, kutan
kb	Kilobasen
kbp	Kilobasenpaare
kDa	KiloDalton
L 1, L2	spät exprimierte HPV-Gene (<i>late</i>)
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LCE2B	<i>late cornified envelope 2B</i>
LCR	<i>long control region</i>
LTR	<i>long terminal repeat</i>
m	Milli
M	Molar
miR	micro RNA
miRNA	micro RNA
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCR	<i>non coding region</i>
NFK	<i>normal foreskin Keratinocytes</i>
NF-κB	<i>nuclear factor κB</i>
NMSC	<i>non melanoma skin cancer</i> (Nicht melanozytärer Hautkrebs)
ORF	<i>open reading frame</i> (offenes Leseraster)
ori	Replikationsursprung
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	<i>potentia hydrogenii</i> (Wasserstoffexponent)
PMA	<i>phorbol 12-myristate 13 acetate</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pRb	Retinoblastomprotein
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
qRT-PCR	quantitative <i>Realtime</i> -PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RPL13A	<i>ribosomal protein large 13A</i> , Haushaltsgen
RT	Raumtemperatur
SCC	<i>squamous cell carcinoma</i> (Plattenepithelkarzinom)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPRR2A	<i>Small proline-rich protein 2A</i>
ssDNA	<i>salmon-sperm</i> DNA
SV40	Simian Virus 40
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-Ethylendiamintetraacetat
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
TBE	Tris- Borat-EDTA Puffer
TBP	<i>TATA-binding protein</i>
TE	Tris-EDTA
TE-SS	TE- <i>salmon sperm</i> DNA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat
Tris	Tris (-hydroxymethyl-) aminomethan
TSA	Trichostatin A
TSS	Transkriptionsstart
U	Unit
wt	Wildtyp
XRCC1	<i>X-ray cross complementing group 1 protein</i>

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.	Aufbau der Epidermis.	3
Abbildung 2.	Ausschnitt aus dem phylogenetischen Stammbaum der Papillomviren.....	6
Abbildung 3.	Genomische Organisation von HPV8.....	7
Abbildung 4.	Der Replikationszyklus von HPV in der Epidermis.....	9
Abbildung 5.	Gen- und Proteinstruktur von p63.....	17
Abbildung 6.	Schnitte humaner Vorhaut.....	17
Abbildung 7.	Dynamisches Modell der Notch-p63 Regulation.....	19
Abbildung 8.	Schematische Darstellung der DNA Sondenherstellung.....	57
Abbildung 9.	p63-Protein und Δ Np63 α mRNA Expression sind in NFK durch HPV8 E6 erhöht.....	65
Abbildung 10.	p63-Protein und Δ Np63 α mRNA Expression ist in HaCaT Zellen durch HPV8 E6 erhöht.....	66
Abbildung 11.	Organotypische Kulturen aus HPV8 E6-exprimierenden HaCaT Zellen zeigen erhöhte p63 Expression.....	67
Abbildung 12.	miR-203 Expression ist in HPV8 E6-exprimierenden NFK und HaCaT Zellen verringert.....	68
Abbildung 13.	p63 und miR-203 Expression in Schnitten von HPV8-positiven EV-Patienten.....	69
Abbildung 14.	Proliferation ist in HPV8 E6-exprimierenden HaCaT Zellen erhöht.....	70
Abbildung 15.	Gene der Keratinozytendifferenzierung sind durch HPV8 E6 in NFK unterdrückt.....	72
Abbildung 16.	Involucrin Expression ist durch HPV8 E6 in NFK unterdrückt.....	73
Abbildung 17.	Involucrin Expression ist durch HPV8 E6 in HaCaT Zellen unterdrückt.....	74
Abbildung 18.	Organotypische Kulturen aus HPV8 E6-exprimierenden HaCaT Zellen zeigen verringerte Involucrin Expression.....	74
Abbildung 19.	Involucrin Expression in Schnitten von HPV8-positiven EV-Patienten.....	75
Abbildung 20.	p63 siRNA Transfektion in pLXSN und HPV8 E6-exprimierenden HaCaT Zellen beeinflusst die Involucrin Expression.....	76
Abbildung 21.	p63 siRNA Transfektion in HaCaT-pLXSN und HPV8 E6-exprimierenden Zellen beeinflusst die Proliferation.....	77
Abbildung 22.	miR-203 Mimic Transfektion in pLXSN und HPV8 E6-exprimierenden HaCaT Zellen beeinflusst die p63 und Involucrin Expression.....	79
Abbildung 23.	miR-203 Mimic Transfektion in pLXSN und HPV8 E6-exprimierenden HaCaT Zellen beeinflusst die Proliferation.....	80
Abbildung 24.	DKK1 Expression in E6-exprimierenden NFK und HaCaT Zellen und nach miR-203 Mimic Transfektion.....	81
Abbildung 25.	Genomische Lokalisation der miR-203 (hellgrün) auf Chromosom 14.....	82
Abbildung 26.	Relative Dichte der CpG Wiederholungen im Bereich der vorhergesagten miR-203 Promotor Sequenz.....	83
Abbildung 27.	miR-203 Expression wird durch den DNA-Methyltransferase Inhibitor DAC induziert.....	83
Abbildung 28.	Methylierungsstatus miR-203 in HaCaT-pLXSN und 8E6.....	85
Abbildung 29.	Die Rolle von DNMT1 auf die miR-203 Expression in NFK.....	86
Abbildung 30.	p300-/ JunB-/ MAML-siRNA Transfektion in NFK.....	87
Abbildung 31.	miR-203 und Involucrin Expression nach Ca ²⁺ und GSI Behandlung in HaCaT Zellen und NFK.....	88
Abbildung 32.	JunB, miR-203 und Δ Np63 α Expression nach PMA-Stimulation.....	89
Abbildung 33.	miR-203 Promotor Region mit AP-1 Bindestellen.....	90
Abbildung 34.	AP-1 EMSA mit Kompetition in NFK.....	91
Abbildung 35.	AP-1 EMSA mit Supershift in HaCaT Zellen.....	92
Abbildung 36.	AP-1 EMSA in NFK und HaCaT Zellen nach siRNA-Transfektion.....	93
Abbildung 37.	AP-1 EMSA in NFK nach PMA Stimulation.....	94
Abbildung 38.	p300-Protein und mRNA Expression in Δ 8E6-exprimierenden NFK.....	95
Abbildung 39.	Involucrin Expression in Δ 8E6-exprimierenden NFK.....	95
Abbildung 40.	miR-203 Promotor Aktivität in HaCaT Zellen und NFK.....	97
Abbildung 41.	JunB siRNA- und p300 siRNA-Transfektion in NFK beeinflusst die Involucrin Expression.....	98
Abbildung 42.	p300 und miR-203 Expression in Schnitten von HPV8-positiven EV-Patienten.....	99

Abbildung 43. Δ Np63 α und miR-203 Expression in Δ 8E6-exprimierenden NFK. 100

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.	Verteilung der Lokalisation humaner miRNAs.....	21
Tabelle 2.	Primer für die RT-PCR und für die PCR benötigte MgCl ₂ Konzentration und Sondennummern	30
Tabelle 3.	Antikörper und eingesetzte Verdünnungen	34
Tabelle 4.	Pipettierschema miR-203 Mimic Transfektion in HaCaT Zellen.....	45
Tabelle 5.	Pipettierschema siRNA Transfektion mit Lipofectamine RNAiMax in HaCaT Zellen und NFK.....	45
Tabelle 6.	Pipettierschema transiente Transfektion mit Lipofectamine 2000 in HaCaT Zellen	46
Tabelle 7.	Pipettierschema transiente Transfektion mit Transfast in NFK	46
Tabelle 8.	PCR-Programm für den LightCycler für UPL Sonden	52
Tabelle 9.	PCR Programm für LightCycler für microRNAs	53
Tabelle 10.	In den cDNA Verdünnungen enthaltenen RNA Konzentrationen und die Ct- Werte der RT-PCR für miR-203	54
Tabelle 11.	PCR Programm für Promotor Klonierung	55

7.4 Literaturverzeichnis

- Akgul, B., Cooke, J. C., & Storey, A. (2006). HPV-associated skin disease. *J Pathol*, *208*(2), 165-175. doi: 10.1002/path.1893
- Akgul, B., Garcia-Escudero, R., Ghali, L., Pfister, H. J., Fuchs, P. G., Navsaria, H., & Storey, A. (2005). The E7 protein of cutaneous human papillomavirus type 8 causes invasion of human keratinocytes into the dermis in organotypic cultures of skin. *Cancer Res*, *65*(6), 2216-2223. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1952
- Akgul, B., Ghali, L., Davies, D., Pfister, H., Leigh, I. M., & Storey, A. (2007). HPV8 early genes modulate differentiation and cell cycle of primary human adult keratinocytes. *Exp Dermatol*, *16*(7), 590-599. doi: 10.1111/j.1600-0625.2007.00569.x
- Alfandari, J., Shnitman Magal, S., Jackman, A., Schlegel, R., Gonen, P., & Sherman, L. (1999). HPV16 E6 oncoprotein inhibits apoptosis induced during serum-calcium differentiation of foreskin human keratinocytes. *Virology*, *257*(2), 383-396. doi: 10.1006/viro.1999.9675
- Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R. J., Rahmsdorf, H. J., . . . Karin, M. (1987). Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell*, *49*(6), 729-739.
- Angel, P., & Karin, M. (1991). The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta*, *1072*(2-3), 129-157.
- Angel, P., Szabowski, A., & Schorpp-Kistner, M. (2001). Function and regulation of AP-1 subunits in skin physiology and pathology. *Oncogene*, *20*(19), 2413-2423. doi: 10.1038/sj.onc.1204380
- Astori, G., Lavergne, D., Benton, C., Hockmayr, B., Egawa, K., Garbe, C., & de Villiers, E. M. (1998). Human papillomaviruses are commonly found in normal skin of immunocompetent hosts. *J Invest Dermatol*, *110*(5), 752-755. doi: 10.1046/j.1523-1747.1998.00191.x
- Augustin, M., Bamberger, C., Paul, D., & Schmale, H. (1998). Cloning and chromosomal mapping of the human p53-related KET gene to chromosome 3q27 and its murine homolog Ket to mouse chromosome 16. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society*, *9*(11), 899-902.
- Baker, S. J., Markowitz, S., Fearon, E. R., Willson, J. K., & Vogelstein, B. (1990). Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science*, *249*(4971), 912-915.
- Bakiri, L., Lallemand, D., Bossy-Wetzel, E., & Yaniv, M. (2000). Cell cycle-dependent variations in c-Jun and JunB phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression. *EMBO J*, *19*(9), 2056-2068. doi: 10.1093/emboj/19.9.2056
- Bakiri, L., Matsuo, K., Wisniewska, M., Wagner, E. F., & Yaniv, M. (2002). Promoter specificity and biological activity of tethered AP-1 dimers. *Mol Cell Biol*, *22*(13), 4952-4964.
- Barcelos, A. C., & Sotto, M. N. (2009). Comparative analysis of the expression of cytokeratins (1, 10, 14, 16, 4), involucrin, filaggrin and e-cadherin in plane warts and epidermodysplasia verruciformis plane wart-type lesions. *J Cutan Pathol*, *36*(6), 647-654. doi: 10.1111/j.1600-0560.2008.01127.x
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, *116*(2), 281-297.
- Baylin, S. B. (2005). DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat Clin Pract Oncol*, *2* Suppl 1, S4-11. doi: 10.1038/ncponc0354
- Bedard, K. M., Underbrink, M. P., Howie, H. L., & Galloway, D. A. (2008). The E6 oncoproteins from human betapapillomaviruses differentially activate telomerase through an E6AP-dependent mechanism and prolong the lifespan of primary keratinocytes. *J Virol*, *82*(8), 3894-3902. doi: 10.1128/JVI.01818-07

- Bernard, H. U., Burk, R. D., Chen, Z., van Doorslaer, K., Hausen, H., & de Villiers, E. M. (2010). Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*, *401*(1), 70-79. doi: 10.1016/j.virol.2010.02.002
- Bienkowska-Haba, M., & Sapp, M. (2011). The cytoskeleton in papillomavirus infection. *Viruses*, *3*(3), 260-271. doi: 10.3390/v3030260
- Blanpain, C., & Fuchs, E. (2009). Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *10*(3), 207-217. doi: 10.1038/nrm2636
- Bockmuhl, U., Schwendel, A., Dietel, M., & Petersen, I. (1996). Distinct patterns of chromosomal alterations in high- and low-grade head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Res*, *56*(23), 5325-5329.
- Borchert, G. M., Lanier, W., & Davidson, B. L. (2006). RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nature structural & molecular biology*, *13*(12), 1097-1101. doi: 10.1038/nsmb1167
- Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., & Fusenig, N. E. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol*, *106*(3), 761-771.
- Bouvard, V., Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Secretan, B., El Ghissassi, F., . . . Wo, W. I. A. R. C. M. (2009). A review of human carcinogens-Part B: biological agents. *Lancet Oncology*, *10*(4), 321-322.
- Boxman, I. L., Mulder, L. H., Noya, F., de Waard, V., Gibbs, S., Broker, T. R., . . . ter Schegget, J. (2001). Transduction of the E6 and E7 genes of epidermodysplasia- verruciformis-associated human papillomaviruses alters human keratinocyte growth and differentiation in organotypic cultures. *J Invest Dermatol*, *117*(6), 1397-1404. doi: 10.1046/j.0022-202x.2001.01602.x
- Bray, S. J. (2006). Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nature reviews.Molecular cell biology*, *7*(9), 678-689. doi: 10.1038/nrm2009
- Brimer, N., Lyons, C., Wallberg, A. E., & Vande Pol, S. B. (2012). Cutaneous papillomavirus E6 oncoproteins associate with MAML1 to repress transactivation and NOTCH signaling. *Oncogene*, *31*(43), 4639-4646. doi: 10.1038/onc.2011.589
- Burgers, W. A., Blanchon, L., Pradhan, S., de Launoit, Y., Kouzarides, T., & Fuks, F. (2007). Viral oncoproteins target the DNA methyltransferases. *Oncogene*, *26*(11), 1650-1655. doi: 10.1038/sj.onc.1209950
- Cai, X., Li, G., Laimins, L. A., & Cullen, B. R. (2006). Human papillomavirus genotype 31 does not express detectable microRNA levels during latent or productive virus replication. *J Virol*, *80*(21), 10890-10893. doi: 10.1128/JVI.01175-06
- Calin, G. A., Sevignani, C., Dumitru, C. D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., . . . Croce, C. M. (2004). Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(9), 2999-3004. doi: 10.1073/pnas.0307323101
- Candi, E., Agostini, M., Melino, G., & Bernassola, F. (2014). How the TP53 family proteins TP63 and TP73 contribute to tumorigenesis: regulators and effectors. *Hum Mutat*, *35*(6), 702-714. doi: 10.1002/humu.22523
- Candi, E., Cipollone, R., Rivetti di Val Cervo, P., Gonfloni, S., Melino, G., & Knight, R. (2008). P63 in Epithelial Development. *Cell Mol Life Sci*, *65*(20), 3126-3133. doi: 10.1007/s00018-008-8119-x
- Candi, E., Schmidt, R., & Melino, G. (2005). The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *6*(4), 328-340. doi: 10.1038/nrm1619
- Castro, F. A., Ivansson, E. L., Schmitt, M., Juko-Pecirep, I., Kjellberg, L., Hildesheim, A., . . . Pawlita, M. (2012). Contribution of TMC6 and TMC8 (EVER1 and EVER2) variants to cervical cancer susceptibility. *Int J Cancer*, *130*(2), 349-355. doi: 10.1002/ijc.26016
- Celli, J., Duijf, P., Hamel, B. C., Bamshad, M., Kramer, B., Smits, A. P., . . . van Bokhoven, H. (1999). Heterozygous germline mutations in the p53 homolog p63 are the cause of EEC syndrome. *Cell*, *99*(2), 143-153.

- Chen, J., Halappanavar, S. S., St-Germain, J. R., Tsang, B. K., & Li, Q. (2004). Role of Akt/protein kinase B in the activity of transcriptional coactivator p300. *Cell Mol Life Sci*, *61*(13), 1675-1683. doi: 10.1007/s00018-004-4103-9
- Chendrimada, T. P., Gregory, R. I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., & Shiekhattar, R. (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*, *436*(7051), 740-744. doi: 10.1038/nature03868
- Cheung, T. H., Man, K. N., Yu, M. Y., Yim, S. F., Siu, N. S., Lo, K. W., . . . Wong, Y. F. (2012). Dysregulated microRNAs in the pathogenesis and progression of cervical neoplasm. *Cell Cycle*, *11*(15), 2876-2884. doi: 10.4161/cc.21278
- Chi Lam Au YeungYeung, C. L. A., Tsang, W. P., Tsang, T. Y., Co, N. N., Yau, P. L., & Kwok, T. T. (2010). HPV-16 E6 upregulation of DNMT1 through repression of tumor suppressor p53. *Oncol Rep*, *24*(6), 1599-1604. doi: Doi 10.3892/or_00001023
- Chi, S. W., Ayed, A., & Arrowsmith, C. H. (1999). Solution structure of a conserved C-terminal domain of p73 with structural homology to the SAM domain. *EMBO J*, *18*(16), 4438-4445. doi: 10.1093/emboj/18.16.4438
- Conway, M. J., & Meyers, C. (2009). Replication and assembly of human papillomaviruses. *J Dent Res*, *88*(4), 307-317. doi: 10.1177/0022034509333446
- Craig, A. L., Holcakova, J., Finlan, L. E., Nekulova, M., Hrstka, R., Gueven, N., . . . Vojtesek, B. (2010). DeltaNp63 transcriptionally regulates ATM to control p53 Serine-15 phosphorylation. *Mol Cancer*, *9*, 195. doi: 10.1186/1476-4598-9-195
- Crish, J. F., & Eckert, R. L. (2008). Synergistic activation of human involucrin gene expression by Fra-1 and p300--evidence for the presence of a multiprotein complex. *J Invest Dermatol*, *128*(3), 530-541. doi: 10.1038/sj.jid.5701049
- Crish, J. F., Gopalakrishnan, R., Bone, F., Gilliam, A. C., & Eckert, R. L. (2006). The distal and proximal regulatory regions of the involucrin gene promoter have distinct functions and are required for in vivo involucrin expression. *Journal of Investigative Dermatology*, *126*(2), 305-314. doi: DOI 10.1038/sj.jid.5700019
- Croce, C. M. (2009). Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet*, *10*(10), 704-714. doi: 10.1038/nrg2634
- Davis, B. N., & Hata, A. (2009). Regulation of MicroRNA Biogenesis: A miRiad of mechanisms. *Cell Commun Signal*, *7*, 18. doi: 10.1186/1478-811X-7-18
- De Laurenzi, V., Rossi, A., Terrinoni, A., Barcaroli, D., Levrero, M., Costanzo, A., . . . Melino, G. (2000). P63 and P73 Transactivate Differentiation Gene Promoters in Human Keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, *273*(1), 342-346. doi: 10.1006/bbrc.2000.2932
- Deng, T., & Karin, M. (1993). JunB differs from c-Jun in its DNA-binding and dimerization domains, and represses c-Jun by formation of inactive heterodimers. *Genes Dev*, *7*(3), 479-490.
- Dohn, M., Zhang, S., & Chen, X. (2001). p63alpha and DeltaNp63alpha can induce cell cycle arrest and apoptosis and differentially regulate p53 target genes. *Oncogene*, *20*(25), 3193-3205. doi: 10.1038/sj.onc.1204427
- Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, I. G., Stoler, M., Broker, T. R., & Stanley, M. A. (2012). The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*, *30 Suppl 5*, F55-70. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.06.083
- Dueck, A., & Meister, G. (2014). Assembly and function of small RNA - argonaute protein complexes. *Biol Chem*, *395*(6), 611-629. doi: 10.1515/hsz-2014-0116
- Duffy, C. L., Phillips, S. L., & Klingelhutz, A. J. (2003). Microarray analysis identifies differentiation-associated genes regulated by human papillomavirus type 16 E6. *Virology*, *314*(1), 196-205.
- Dyson, N., Howley, P. M., Munger, K., & Harlow, E. (1989). The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*, *243*(4893), 934-937.
- Eckert, R. L., & Welter, J. F. (1996). Epidermal keratinocytes - genes and their regulation. *Cell Death Differ*, *3*(4), 373-383.

- Eckner, R., Arany, Z., Ewen, M., Sellers, W., & Livingston, D. M. (1994a). The adenovirus E1A-associated 300-kD protein exhibits properties of a transcriptional coactivator and belongs to an evolutionarily conserved family. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, *59*, 85-95.
- Eckner, R., Ewen, M. E., Newsome, D., Gerdes, M., DeCaprio, J. A., Lawrence, J. B., & Livingston, D. M. (1994b). Molecular cloning and functional analysis of the adenovirus E1A-associated 300-kD protein (p300) reveals a protein with properties of a transcriptional adaptor. *Genes Dev*, *8*(8), 869-884.
- Elbel, M., Carl, S., Spaderna, S., & Iftner, T. (1997). A comparative analysis of the interactions of the E6 proteins from cutaneous and genital papillomaviruses with p53 and E6AP in correlation to their transforming potential. *Virology*, *239*(1), 132-149. doi: 10.1006/viro.1997.8860
- Enzenauer, C., Mengus, G., Lavigne, A., Davidson, I., Pfister, H., & May, M. (1998). Interaction of human papillomavirus 8 regulatory proteins E2, E6 and E7 with components of the TFIID complex. *Intervirology*, *41*(2-3), 80-90.
- Farria, A., Li, W., & Dent, S. Y. (2015). KATs in cancer: functions and therapies. *Oncogene*. doi: 10.1038/onc.2014.453
- Feltkamp, M. C., de Koning, M. N., Bavinck, J. N., & Ter Schegget, J. (2008). Betapapillomaviruses: innocent bystanders or causes of skin cancer. *J Clin Virol*, *43*(4), 353-360. doi: 10.1016/j.jcv.2008.09.009
- Florin, L., Knebel, J., Zigrino, P., Vonderstrass, B., Mauch, C., Schorpp-Kistner, M., . . . Angel, P. (2006). Delayed wound healing and epidermal hyperproliferation in mice lacking JunB in the skin. *J Invest Dermatol*, *126*(4), 902-911. doi: 10.1038/sj.jid.5700123
- Fuchs, E., & Green, H. (1980). Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell*, *19*(4), 1033-1042.
- Ghioni, P., Bolognese, F., Duijf, P. H., 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*(24), 8659-8668.
- Goethe, R., Basler, T., & Phi-van, L. (2007). Regulation of C/EBPbeta mRNA expression and C/EBPbeta promoter activity by protein kinases A and C in a myelomonocytic cell line (HD11). *Inflamm Res*, *56*(7), 274-281. doi: 10.1007/s00011-007-6170-y
- Goldman, P. S., Tran, V. K., & Goodman, R. H. (1997). The multifunctional role of the co-activator CBP in transcriptional regulation. *Recent Prog Horm Res*, *52*, 103-119; discussion 119-120.
- Goodman, R. H., & Smolik, S. (2000). CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev*, *14*(13), 1553-1577.
- Greco, D., Kivi, N., Qian, K., Leivonen, S. K., Auvinen, P., & Auvinen, E. (2011). Human papillomavirus 16 E5 modulates the expression of host microRNAs. *PLoS One*, *6*(7), e21646. doi: 10.1371/journal.pone.0021646
- Grishok, A., Pasquinelli, A. E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., . . . Mello, C. C. (2001). Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell*, *106*(1), 23-34.
- Gu, W., An, J., Ye, P., Zhao, K. N., & Antonsson, A. (2011). Prediction of conserved microRNAs from skin and mucosal human papillomaviruses. *Arch Virol*, *156*(7), 1161-1171. doi: 10.1007/s00705-011-0974-3
- Gu, W., & Roeder, R. G. (1997). Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell*, *90*(4), 595-606.
- Habig, M., Smola, H., Dole, V. S., Derynck, R., Pfister, H., & Smola-Hess, S. (2006). E7 proteins from high- and low-risk human papillomaviruses bind to TGF-beta-regulated Smad proteins and inhibit their transcriptional activity. *Arch Virol*, *151*(10), 1961-1972. doi: 10.1007/s00705-006-0768-1

- Han, J., Lee, Y., Yeom, K. H., Kim, Y. K., Jin, H., & Kim, V. N. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev*, *18*(24), 3016-3027. doi: 10.1101/gad.1262504
- He, L., He, X., Lim, L. P., de Stanchina, E., Xuan, Z., Liang, Y., . . . Hannon, G. J. (2007). A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature*, *447*(7148), 1130-1134. doi: 10.1038/nature05939
- Hino, R., Uozaki, H., Murakami, N., Ushiku, T., Shinozaki, A., Ishikawa, S., . . . Fukayama, M. (2009). Activation of DNA methyltransferase 1 by EBV latent membrane protein 2A leads to promoter hypermethylation of PTEN gene in gastric carcinoma. *Cancer Res*, *69*(7), 2766-2774. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3070
- Houben, E., De Paepe, K., & Rogiers, V. (2007). A keratinocyte's course of life. *Skin pharmacology and physiology*, *20*(3), 122-132. doi: 10.1159/000098163
- Howie, H. L., Katzenellenbogen, R. A., & Galloway, D. A. (2009). Papillomavirus E6 proteins. *Virology*, *384*(2), 324-334. doi: 10.1016/j.virol.2008.11.017
- Howie, H. L., Koop, J. I., Weese, J., Robinson, K., Wipf, G., Kim, L., & Galloway, D. A. (2011). Beta-HPV 5 and 8 E6 promote p300 degradation by blocking AKT/p300 association. *PLoS Pathog*, *7*(8), e1002211. doi: 10.1371/journal.ppat.1002211
- Hsu, Y. C., Li, L., & Fuchs, E. (2014). Emerging interactions between skin stem cells and their niches. *Nat Med*, *20*(8), 847-856. doi: 10.1038/nm.3643
- Hufbauer, M., Lazic, D., Akgul, B., Brandsma, J. L., Pfister, H., & Weissenborn, S. J. (2010). Enhanced human papillomavirus type 8 oncogene expression levels are crucial for skin tumorigenesis in transgenic mice. *Virology*, *403*(2), 128-136. doi: 10.1016/j.virol.2010.04.013
- Huibregtse, J. M., Scheffner, M., & Howley, P. M. (1991). A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *EMBO J*, *10*(13), 4129-4135.
- IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Volume 100B, (2012). ISBN-13: 9789283213192
- Iftner, T., Elbel, M., Schopp, B., Hiller, T., Loizou, J. I., Caldecott, K. W., & Stubenrauch, F. (2002). Interference of papillomavirus E6 protein with single-strand break repair by interaction with XRCC1. *EMBO J*, *21*(17), 4741-4748.
- Jackson, S., Harwood, C., Thomas, M., Banks, L., & Storey, A. (2000). Role of Bak in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins. *Genes Dev*, *14*(23), 3065-3073.
- Jackson, S. J., Zhang, Z., Feng, D., Flagg, M., O'Loughlin, E., Wang, D., . . . Yi, R. (2013). Rapid and widespread suppression of self-renewal by microRNA-203 during epidermal differentiation. *Development*, *140*(9), 1882-1891. doi: 10.1242/dev.089649
- Jin, J. Y., Ke, H., Hall, R. P., & Zhang, J. Y. (2011). c-Jun promotes whereas JunB inhibits epidermal neoplasia. *J Invest Dermatol*, *131*(5), 1149-1158. doi: 10.1038/jid.2011.1
- Jung, J. K., Arora, P., Pagano, J. S., & Jang, K. L. (2007). Expression of DNA methyltransferase 1 is activated by hepatitis B virus X protein via a regulatory circuit involving the p16INK4a-cyclin D1-CDK 4/6-pRb-E2F1 pathway. *Cancer Res*, *67*(12), 5771-5778. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0529
- Kalinin, A. E., Idler, W. W., Marekov, L. N., McPhie, P., Bowers, B., Steinert, P. M., & Steven, A. C. (2004). Co-assembly of envoplakin and perioplakin into oligomers and Ca(2+)-dependent vesicle binding: implications for cornified cell envelope formation in stratified squamous epithelia. *J Biol Chem*, *279*(21), 22773-22780. doi: 10.1074/jbc.M313660200
- Kalinin, A. E., Kajava, A. V., & Steinert, P. M. (2002). Epithelial barrier function: assembly and structural features of the cornified cell envelope. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, *24*(9), 789-800. doi: 10.1002/bies.10144

- Kalkhoven, E. (2004). CBP and p300: HATs for different occasions. *Biochem Pharmacol*, 68(6), 1145-1155. doi: 10.1016/j.bcp.2004.03.045
- Kappelmann, M., Bosserhoff, A., & Kuphal, S. (2014). AP-1/c-Jun transcription factors: regulation and function in malignant melanoma. *Eur J Cell Biol*, 93(1-2), 76-81. doi: 10.1016/j.ejcb.2013.10.003
- Kazem, S., van der Meijden, E., Struijk, L., de Gruijl, F. R., & Feltkamp, M. C. (2012). Human papillomavirus 8 E6 disrupts terminal skin differentiation and prevents pro-Caspase-14 cleavage. *Virus Res*, 163(2), 609-616. doi: 10.1016/j.virusres.2011.12.015
- Ketting, R. F., Fischer, S. E., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G. J., & Plasterk, R. H. (2001). Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev*, 15(20), 2654-2659. doi: 10.1101/gad.927801
- Kiyono, T., Hiraiwa, A., Ishii, S., Takahashi, T., & Ishibashi, M. (1994). Inhibition of p53-mediated transactivation by E6 of type 1, but not type 5, 8, or 47, human papillomavirus of cutaneous origin. *J Virol*, 68(7), 4656-4661.
- Klingelhutz, A. J., Foster, S. A., & McDougall, J. K. (1996). Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature*, 380(6569), 79-82. doi: 10.1038/380079a0
- Klingelhutz, A. J., & Roman, A. (2012). Cellular transformation by human papillomaviruses: lessons learned by comparing high- and low-risk viruses. *Virology*, 424(2), 77-98. doi: 10.1016/j.virol.2011.12.018
- Koster, M. I., Kim, S., Mills, A. A., DeMayo, F. J., & Roop, D. R. (2004). P63 is the Molecular Switch for Initiation of an Epithelial Stratification Program. *Genes Dev*, 18(2), 126-131. doi: 10.1101/gad.1165104
- Kozaki, K., Imoto, I., Mogi, S., Omura, K., & Inazawa, J. (2008). Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer. *Cancer Res*, 68(7), 2094-2105. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5194
- Laird, P. W., Jackson-Grusby, L., Fazel, A., Dickinson, S. L., Jung, W. E., Li, E., . . . Jaenisch, R. (1995). Suppression of intestinal neoplasia by DNA hypomethylation. *Cell*, 81(2), 197-205.
- Lamouille, S., Xu, J., & Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(3), 178-196. doi: 10.1038/nrm3758
- Laurikkala, J., Mikkola, M. L., James, M., Tummers, M., Mills, A. A., & Thesleff, I. (2006). P63 Regulates Multiple Signalling Pathways Required for Ectodermal Organogenesis and Differentiation. *Development (Cambridge, England)*, 133(8), 1553-1563. doi: 10.1242/dev.02325
- 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. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 73(2), 348-370. doi: 10.1128/MMBR.00033-08
- Lazarczyk, M., Pons, C., Mendoza, J. A., 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. *The Journal of experimental medicine*, 205(1), 35-42. doi: 10.1084/jem.20071311
- Lazic, D., Alborzi, F., Marcuzzi, G. P., Angel, P., Hess, J., Pfister, H., & Akgul, B. (2011). Enhanced StefinA and Sprr2 expression during papilloma formation in HPV8 transgenic mice. *J Dermatol Sci*, 62(2), 84-90. doi: 10.1016/j.jdermsci.2011.02.006
- Le, J. M., Squarize, C. H., & Castilho, R. M. (2014). Histone modifications: Targeting head and neck cancer stem cells. *World J Stem Cells*, 6(5), 511-525. doi: 10.4252/wjsc.v6.i5.511
- Lee, D. K., Kim, B. C., Kim, I. Y., Cho, E. A., Satterwhite, D. J., & Kim, S. J. (2002). The human papilloma virus E7 oncoprotein inhibits transforming growth factor-beta

- signaling by blocking binding of the Smad complex to its target sequence. *J Biol Chem*, 277(41), 38557-38564. doi: 10.1074/jbc.M206786200
- Lee, J. S., See, R. H., Deng, T., & Shi, Y. (1996). Adenovirus E1A downregulates cJun- and JunB-mediated transcription by targeting their coactivator p300. *Mol Cell Biol*, 16(8), 4312-4326.
- Lee, J. W., Choi, C. H., Choi, J. J., Park, Y. A., Kim, S. J., Hwang, S. Y., . . . Bae, D. S. (2008). Altered MicroRNA expression in cervical carcinomas. *Clin Cancer Res*, 14(9), 2535-2542. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1231
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), 843-854.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K. H., Lee, S., Baek, S. H., & Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*, 23(20), 4051-4060. doi: 10.1038/sj.emboj.7600385
- Lehman, T. A., Modali, R., Boukamp, P., Stanek, J., Bennett, W. P., Welsh, J. A., . . . Rogan, E. M. (1993). P53 Mutations in Human Immortalized Epithelial Cell Lines. *Carcinogenesis*, 14(5), 833-839.
- Lena, A. M., Shalom-Feuerstein, R., Rivetti di Val Cervo, P., Aberdam, D., Knight, R. A., Melino, G., & Candi, E. (2008). miR-203 represses 'stemness' by repressing DeltaNp63. *Cell Death Differ*, 15(7), 1187-1195. doi: 10.1038/cdd.2008.69
- Leverrier, S., Bergamaschi, D., Ghali, L., Ola, A., Warnes, G., Akgul, B., . . . Storey, A. (2007). Role of HPV E6 proteins in preventing UVB-induced release of pro-apoptotic factors from the mitochondria. *Apoptosis*, 12(3), 549-560. doi: 10.1007/s10495-006-0004-1
- Lippens, S., Denecker, G., Ovaere, P., Vandenabeele, P., & Declercq, W. (2005). Death penalty for keratinocytes: apoptosis versus cornification. *Cell Death Differ*, 12 Suppl 2, 1497-1508. doi: 10.1038/sj.cdd.4401722
- Lo Muzio, L., Santarelli, A., Caltabiano, R., Rubini, C., Pieramici, T., Trevisiol, L., . . . Piattelli, A. (2005). p63 overexpression associates with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma. *Hum Pathol*, 36(2), 187-194. doi: 10.1016/j.humpath.2004.12.003
- London, R. E. (2015). The structural basis of XRCC1-mediated DNA repair. *DNA Repair (Amst)*. doi: 10.1016/j.dnarep.2015.02.005
- Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E., & Kutay, U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science (New York, N. Y.)*, 303(5654), 95-98. doi: 10.1126/science.1090599
- Lutzner, M. A. (1978). Epidermodysplasia verruciformis. An autosomal recessive disease characterized by viral warts and skin cancer. A model for viral oncogenesis. *Bull Cancer*, 65(2), 169-182.
- Marcuzzi, G. P., Hufbauer, M., Kasper, H. U., Weissenborn, S. J., 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), 2855-2864. doi: 10.1099/vir.0.012872-0
- Martinez, I., Gardiner, A. S., Board, K. F., Monzon, F. A., Edwards, R. P., & Khan, S. A. (2008). Human papillomavirus type 16 reduces the expression of microRNA-218 in cervical carcinoma cells. *Oncogene*, 27(18), 2575-2582. doi: 10.1038/sj.onc.1210919
- Mathe, E. A., Nguyen, G. H., Bowman, E. D., Zhao, Y., Budhu, A., Schetter, A. J., . . . Harris, C. C. (2009). MicroRNA expression in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the esophagus: associations with survival. *Clin Cancer Res*, 15(19), 6192-6200. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1467
- McGrath, J., & Trojer, P. (2015). Targeting histone lysine methylation in cancer. *Pharmacol Ther*. doi: 10.1016/j.pharmthera.2015.01.002
- McKenna, D. J., McDade, S. S., Patel, D., & McCance, D. J. (2010). MicroRNA 203 Expression in Keratinocytes Is Dependent on Regulation of p53 Levels by E6. *J Virol*, 84(20), 10644-10652. doi: 10.1128/JVI.00703-10

- McLaughlin-Drubin, M. E., & Munger, K. (2009). Oncogenic activities of human papillomaviruses. *Virus Res*, *143*(2), 195-208. doi: 10.1016/j.virusres.2009.06.008
- Melar-New, M., & Laimins, L. A. (2010). Human papillomaviruses modulate expression of microRNA 203 upon epithelial differentiation to control levels of p63 proteins. *J Virol*, *84*(10), 5212-5221. doi: 10.1128/JVI.00078-10
- Meyers, J. M., & Munger, K. (2014). The viral etiology of skin cancer. *J Invest Dermatol*, *134*(e1), E29-32. doi: 10.1038/skinbio.2014.6
- Meyers, J. M., Spangle, J. M., & Munger, K. (2013). The human papillomavirus type 8 E6 protein interferes with NOTCH activation during keratinocyte differentiation. *J Virol*, *87*(8), 4762-4767. doi: 10.1128/JVI.02527-12
- Mills, A. A., Zheng, B., Wang, X. J., Vogel, H., Roop, D. R., & Bradley, A. (1999). P63 is a P53 Homologue Required for Limb and Epidermal Morphogenesis. *Nature*, *398*(6729), 708-713. doi: 10.1038/19531
- Muench, P., Probst, S., Schuetz, J., Leiprecht, N., Busch, M., Wesselborg, S., . . . Iftner, T. (2010). Cutaneous papillomavirus E6 proteins must interact with p300 and block p53-mediated apoptosis for cellular immortalization and tumorigenesis. *Cancer Res*, *70*(17), 6913-6924. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1307
- Muller-Schiffmann, A., Beckmann, J., & Steger, G. (2006). The E6 protein of the cutaneous human papillomavirus type 8 can stimulate the viral early and late promoters by distinct mechanisms. *J Virol*, *80*(17), 8718-8728. doi: 10.1128/JVI.00250-06
- Muller, A., Ritzkowsky, A., & Steger, G. (2002). Cooperative activation of human papillomavirus type 8 gene expression by the E2 protein and the cellular coactivator p300. *J Virol*, *76*(21), 11042-11053.
- Muller, H., & Helin, K. (2000). The E2F transcription factors: key regulators of cell proliferation. *Biochim Biophys Acta*, *1470*(1), M1-12.
- Munger, K., & Howley, P. M. (2002). Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res*, *89*(2), 213-228.
- Munger, K., Werness, B. A., Dyson, N., Phelps, W. C., Harlow, E., & Howley, P. M. (1989). Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J*, *8*(13), 4099-4105.
- Nakabeppu, Y., Ryder, K., & Nathans, D. (1988). DNA binding activities of three murine Jun proteins: stimulation by Fos. *Cell*, *55*(5), 907-915.
- Nguyen, B. C., Lefort, K., Mandinova, A., Antonini, D., Devgan, V., Della Gatta, G., . . . Dotto, G. P. (2006). Cross-regulation between Notch and p63 in keratinocyte commitment to differentiation. *Genes Dev*, *20*(8), 1028-1042. doi: 10.1101/gad.1406006
- Nickoloff, B. J., Qin, J. Z., Chaturvedi, V., Denning, M. F., Bonish, B., & Miele, L. (2002). Jagged-1 mediated activation of notch signaling induces complete maturation of human keratinocytes through NF-kappaB and PPARgamma. *Cell Death Differ*, *9*(8), 842-855. doi: 10.1038/sj.cdd.4401036
- Nylander, K., Vojtesek, B., Nenutil, R., Lindgren, B., Roos, G., Zhanxiang, W., . . . Coates, P. J. (2002). Differential expression of p63 isoforms in normal tissues and neoplastic cells. *J Pathol*, *198*(4), 417-427. doi: 10.1002/path.1231
- O'Donnell, K. A., Wentzel, E. A., Zeller, K. I., Dang, C. V., & Mendell, J. T. (2005). c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*, *435*(7043), 839-843. doi: 10.1038/nature03677
- Oldak, M., Maksym, R. B., Sperling, T., Yaniv, M., Smola, H., Pfister, H. J., . . . Smola, S. (2010). Human papillomavirus type 8 E2 protein unravels JunB/Fra-1 as an activator of the beta4-integrin gene in human keratinocytes. *J Virol*, *84*(3), 1376-1386. doi: 10.1128/JVI.01220-09
- Oldak, M., Tolzmann, L., Wnorowski, A., Podgorska, M. J., Silling, S., Lin, R., . . . Smola, S. (2011). Differential regulation of human papillomavirus type 8 by

- interferon regulatory factors 3 and 7. *J Virol*, 85(1), 178-188. doi: 10.1128/JVI.00998-10
- Orth, G. (2006). Genetics of epidermodysplasia verruciformis: Insights into host defense against papillomaviruses. *Semin Immunol*, 18(6), 362-374. doi: 10.1016/j.smim.2006.07.008
- Osada, M., Ohba, M., Kawahara, C., Ishioka, C., Kanamaru, R., Katoh, I., . . . Ikawa, S. (1998). Cloning and functional analysis of human p51, which structurally and functionally resembles p53. *Nat Med*, 4(7), 839-843.
- Parsa, R., Yang, A., McKeon, F., & Green, H. (1999). Association of p63 with proliferative potential in normal and neoplastic human keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 113(6), 1099-1105. doi: 10.1046/j.1523-1747.1999.00780.x
- Pass, F., Reissig, M., Shah, K. V., Eisinger, M., & Orth, G. (1977). Identification of an immunologically distinct papillomavirus from lesions of epidermodysplasia verruciformis. *J Natl Cancer Inst*, 59(4), 1107-1112.
- Patel, A. S., Karagas, M. R., Pawlita, M., Waterboer, T., & Nelson, H. H. (2008). Cutaneous human papillomavirus infection, the EVER2 gene and incidence of squamous cell carcinoma: a case-control study. *Int J Cancer*, 122(10), 2377-2379. doi: 10.1002/ijc.23377
- Patel, D., Huang, S. M., Baglia, L. A., & McCance, D. J. (1999). The E6 protein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300. *EMBO J*, 18(18), 5061-5072. doi: 10.1093/emboj/18.18.5061
- Patra, S. K., & Bettuzzi, S. (2009). Epigenetic DNA-(cytosine-5-carbon) modifications: 5-aza-2'-deoxycytidine and DNA-demethylation. *Biochemistry (Mosc)*, 74(6), 613-619.
- Pfeffer, S., Sewer, A., Lagos-Quintana, M., Sheridan, R., Sander, C., Grasser, F. A., . . . Tuschl, T. (2005). Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat Methods*, 2(4), 269-276. doi: 10.1038/nmeth746
- Pfefferle, R., Marcuzzi, G. P., Akgul, B., Kasper, H. U., Schulze, F., Haase, I., . . . Pfister, H. (2008). The human papillomavirus type 8 E2 protein induces skin tumors in transgenic mice. *J Invest Dermatol*, 128(9), 2310-2315. doi: 10.1038/jid.2008.73
- Ponticos, M., Papaioannou, I., Xu, S., Holmes, A. M., Khan, K., Denton, C. P., . . . Abraham, D. J. (2015). Failed Degradation of JunB Contributes to Overproduction of Type I Collagen and Development of Dermal Fibrosis in Patients With Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheumatol*, 67(1), 243-253. doi: 10.1002/art.38897
- Ponting, C. P. (1995). SAM: a novel motif in yeast sterile and Drosophila polyhomeotic proteins. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 4(9), 1928-1930. doi: 10.1002/pro.5560040927
- Proweller, A., Tu, L., Lepore, J. J., Cheng, L., Lu, M. M., Seykora, J., . . . Parmacek, M. S. (2006). Impaired notch signaling promotes de novo squamous cell carcinoma formation. *Cancer Res*, 66(15), 7438-7444. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0793
- Qian, K., Pietila, T., Ronty, M., Michon, F., Frilander, M. J., Ritari, J., . . . Auvinen, E. (2013). Identification and validation of human papillomavirus encoded microRNAs. *PLoS One*, 8(7), e70202. doi: 10.1371/journal.pone.0070202
- Quint, K. D., Genders, R. E., de Koning, M. N., Borgogna, C., Gariglio, M., Bouwes Bavinck, J. N., . . . Feltkamp, M. C. (2014). Human Beta-Papillomavirus Infection and Keratinocyte Carcinomas. *J Pathol*. doi: 10.1002/path.4425
- Ramoz, N., Rueda, L. A., Bouadjar, B., Montoya, L. S., Orth, G., & Favre, M. (2002). Mutations in two adjacent novel genes are associated with epidermodysplasia verruciformis. *Nat Genet*, 32(4), 579-581. doi: 10.1038/ng1044
- Rangarajan, A., Talora, C., Okuyama, R., Nicolas, M., Mammucari, C., Oh, H., . . . Dotto, G. P. (2001). Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. *EMBO J*, 20(13), 3427-3436. doi: 10.1093/emboj/20.13.3427

- Restivo, G., Nguyen, B. C., Dziunycz, P., Ristorcelli, E., Ryan, R. J., Ozuysal, O. Y., . . . Dotto, G. P. (2011). IRF6 is a mediator of Notch pro-differentiation and tumour suppressive function in keratinocytes. *EMBO J*, *30*(22), 4571-4585. doi: 10.1038/emboj.2011.325
- Ribeiro, J., & Sousa, H. (2014). MicroRNAs as biomarkers of cervical cancer development: a literature review on miR-125b and miR-34a. *Mol Biol Rep*, *41*(3), 1525-1531. doi: 10.1007/s11033-013-2998-0
- Robertson, K. D. (2001). DNA methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene*, *20*(24), 3139-3155. doi: 10.1038/sj.onc.1204341
- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J. L., & Bradley, A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res*, *14*(10A), 1902-1910. doi: 10.1101/gr.2722704
- Roman, A., & Munger, K. (2013). The papillomavirus E7 proteins. *Virology*, *445*(1-2), 138-168. doi: 10.1016/j.virol.2013.04.013
- Ruiter, M., & van Mullem, P. J. (1966). Demonstration by electronmicroscopy of an intranuclear virus in epidermodysplasia verruciformis. *J Invest Dermatol*, *47*(3), 247-252.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Saini, H. K., Griffiths-Jones, S., & Enright, A. J. (2007). Genomic analysis of human microRNA transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(45), 17719-17724. doi: 10.1073/pnas.0703890104
- Saini, S., Majid, S., Yamamura, S., Tabatabai, L., Suh, S. O., Shahryari, V., . . . Dahiya, R. (2011). Regulatory Role of mir-203 in Prostate Cancer Progression and Metastasis. *Clinical Cancer Research*, *17*(16), 5287-5298. doi: Doi 10.1158/1078-0432.Ccr-10-2619
- Saint Just Ribeiro, M., Hansson, M. L., & Wallberg, A. E. (2007). A proline repeat domain in the Notch co-activator MAML1 is important for the p300-mediated acetylation of MAML1. *Biochem J*, *404*(2), 289-298. doi: 10.1042/BJ20061900
- Schaper, I. D., Marcuzzi, G. P., Weissenborn, S. J., Kasper, H. U., Dries, V., Smyth, N., . . . Pfister, H. (2005). Development of skin tumors in mice transgenic for early genes of human papillomavirus type 8. *Cancer Res*, *65*(4), 1394-1400. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3263
- Scheffner, M., Huibregtse, J. M., Vierstra, R. D., & Howley, P. M. (1993). The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell*, *75*(3), 495-505.
- Scheffner, M., Werness, B. A., Huibregtse, J. M., Levine, A. J., & Howley, P. M. (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*, *63*(6), 1129-1136.
- Schlingemann, J., Hess, J., Wrobel, G., Breitenbach, U., Gebhardt, C., Steinlein, P., . . . Lichter, P. (2003). Profile of gene expression induced by the tumour promotor TPA in murine epithelial cells. *Int J Cancer*, *104*(6), 699-708. doi: 10.1002/ijc.11008
- Schmitt, A., Harry, J. B., Rapp, B., Wettstein, F. O., & 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. (2010). Regulation der Keratinozytendifferenzierung durch die frühen Proteine E6 und E7 des humanen Papillomvirus Typ 8. Diplomarbeit
- Schreiber, E., Matthias, P., Muller, M. M., & Schaffner, W. (1989). Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res*, *17*(15), 6419.
- Schultz, J., Ponting, C. P., Hofmann, K., & Bork, P. (1997). SAM as a protein interaction domain involved in developmental regulation. *Protein science : a publication of the Protein Society*, *6*(1), 249-253. doi: 10.1002/pro.5560060128

- Shaulian, E., & Karin, M. (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol*, 4(5), E131-136. doi: 10.1038/ncb0502-e131
- Shieh, S. Y., Ikeda, M., Taya, Y., & Prives, C. (1997). DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell*, 91(3), 325-334.
- Smola-Hess, S., Pahne, J., Mauch, C., Zigrino, P., Smola, H., & Pfister, H. J. (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. doi: 10.1099/vir.0.80551-0
- Sonkoly, E., Loven, J., Xu, N., Meisgen, F., Wei, T., Brodin, P., . . . Pivarcsi, A. (2012). MicroRNA-203 functions as a tumor suppressor in basal cell carcinoma. *Oncogenesis*, 1, e3. doi: 10.1038/oncsis.2012.3
- Sonkoly, E., Wei, T., Janson, P. C., Saaf, A., Lundeberg, L., Tengvall-Linder, M., . . . Pivarcsi, A. (2007). MicroRNAs: novel regulators involved in the pathogenesis of psoriasis? *PLoS One*, 2(7), e610. doi: 10.1371/journal.pone.0000610
- Sonkoly, E., Wei, T., Pavez Lorie, E., Suzuki, H., Kato, M., Torma, H., . . . Pivarcsi, A. (2010). Protein kinase C-dependent upregulation of miR-203 induces the differentiation of human keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 130(1), 124-134. doi: 10.1038/jid.2009.294
- Sperling, T., Oldak, M., Walch-Ruckheim, B., Wickenhauser, C., Doorbar, J., Pfister, H., . . . Smola, S. (2012). Human papillomavirus type 8 interferes with a novel C/EBPbeta-mediated mechanism of keratinocyte CCL20 chemokine expression and Langerhans cell migration. *PLoS Pathog*, 8(7), e1002833. doi: 10.1371/journal.ppat.1002833
- Steger, G., & Pfister, H. (1992). In vitro expressed HPV 8 E6 protein does not bind p53. *Arch Virol*, 125(1-4), 355-360.
- Suarez-Carmona, M., Hubert, P., Gonzalez, A., Duray, A., Roncarati, P., Ercicum, C., . . . Herfs, M. (2014). DeltaNp63 isoform-mediated beta-defensin family up-regulation is associated with (lymph)angiogenesis and poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma. *Oncotarget*, 5(7), 1856-1868.
- Subramaniam, D., Thombre, R., Dhar, A., & Anant, S. (2014). DNA methyltransferases: a novel target for prevention and therapy. *Front Oncol*, 4, 80. doi: 10.3389/fonc.2014.00080
- Takahashi, H., Aoki, N., Nakamura, S., Asano, K., Ishida-Yamamoto, A., & Iizuka, H. (2000). Cornified cell envelope formation is distinct from apoptosis in epidermal keratinocytes. *J Dermatol Sci*, 23(3), 161-169.
- Tan, M. J., White, E. A., Sowa, M. E., Harper, J. W., Aster, J. C., & Howley, P. M. (2012). Cutaneous beta-human papillomavirus E6 proteins bind Mastermind-like coactivators and repress Notch signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(23), E1473-1480. doi: 10.1073/pnas.1205991109
- Taube, J. H., Malouf, G. G., Lu, E., Sphyris, N., Vijay, V., Ramachandran, P. P., . . . Mani, S. A. (2013). Epigenetic silencing of microRNA-203 is required for EMT and cancer stem cell properties. *Sci Rep*, 3, 2687. doi: 10.1038/srep02687
- Thanos, C. D., & Bowie, J. U. (1999). p53 Family members p63 and p73 are SAM domain-containing proteins. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 8(8), 1708-1710. doi: 10.1110/ps.8.8.1708
- Thierry, F., Spyrou, G., Yaniv, M., & Howley, P. (1992). Two AP1 sites binding JunB are essential for human papillomavirus type 18 transcription in keratinocytes. *J Virol*, 66(6), 3740-3748.
- Thomas, M., & Banks, L. (1998). Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6. *Oncogene*, 17(23), 2943-2954. doi: 10.1038/sj.onc.1202223
- Thomas, M., & Banks, L. (1999). Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types. *J Gen Virol*, 80 (Pt 6), 1513-1517.
- Thurfjell, N., Coates, P. J., Vojtesek, B., Benham-Motlagh, P., Eisold, M., & Nylander, K. (2005). Endogenous p63 acts as a survival factor for tumour cells of SCCHN origin. *Int J Mol Med*, 16(6), 1065-1070.

- Trink, B., Okami, K., Wu, L., Sriuranpong, V., Jen, J., & Sidransky, D. (1998). A new human p53 homologue. *Nat Med*, *4*(7), 747-748.
- Truong, A. B., Kretz, M., Ridky, T. W., Kimmel, R., & Khavari, P. A. (2006). p63 regulates proliferation and differentiation of developmentally mature keratinocytes. *Genes Dev*, *20*(22), 3185-3197. doi: 10.1101/gad.1463206
- Tschachler, E. (2005). Apoptotic pathways in the epidermis. *Exp Dermatol*, *14*(10), 790-791. doi: 10.1111/j.1600-0625.2005.0355h.x
- Underbrink, M. P., Howie, H. L., Bedard, K. M., Koop, J. I., & Galloway, D. A. (2008). E6 proteins from multiple human betapapillomavirus types degrade Bak and protect keratinocytes from apoptosis after UVB irradiation. *J Virol*, *82*(21), 10408-10417. doi: 10.1128/JVI.00902-08
- Uphoff, C. C., & Drexler, H. G. (2013). Detection of mycoplasma contaminations. *Methods Mol Biol*, *946*, 1-13. doi: 10.1007/978-1-62703-128-8_1
- Uphoff, C. C., & Drexler, H. G. (2014). Detection of Mycoplasma contamination in cell cultures. *Curr Protoc Mol Biol*, *106*, 28 24 21-28 24 14. doi: 10.1002/0471142727.mb2804s106
- van Bokhoven, H., & McKeon, F. (2002). Mutations in the p53 homolog p63: allele-specific developmental syndromes in humans. *Trends Mol Med*, *8*(3), 133-139.
- Viticchie, G., Lena, A. M., Cianfarani, F., Odorisio, T., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Melino, G., & Candi, E. (2012). MicroRNA-203 contributes to skin re-epithelialization. *Cell Death Dis*, *3*, e435. doi: 10.1038/cddis.2012.174
- Viticchie, G., Lena, A. M., Latina, A., Formosa, A., Gregersen, L. H., Lund, A. H., . . . Melino, G. (2011). MiR-203 controls proliferation, migration and invasive potential of prostate cancer cell lines. *Cell Cycle*, *10*(7), 1121-1131.
- Wallace, N. A., Gasior, S. L., Faber, Z. J., Howie, H. L., Deininger, P. L., & Galloway, D. A. (2013). HPV 5 and 8 E6 expression reduces ATM protein levels and attenuates LINE-1 retrotransposition. *Virology*, *443*(1), 69-79. doi: 10.1016/j.virol.2013.04.022
- Wallace, N. A., Robinson, K., Howie, H. L., & Galloway, D. A. (2012). HPV 5 and 8 E6 abrogate ATR activity resulting in increased persistence of UVB induced DNA damage. *PLoS Pathog*, *8*(7), e1002807. doi: 10.1371/journal.ppat.1002807
- Wang, W. M., Wu, S. Y., Lee, A. Y., & Chiang, C. M. (2011). Binding site specificity and factor redundancy in activator protein-1-driven human papillomavirus chromatin-dependent transcription. *J Biol Chem*, *286*(47), 40974-40986. doi: 10.1074/jbc.M111.290874
- Wang, X., Wang, H. K., McCoy, J. P., Banerjee, N. S., Rader, J. S., Broker, T. R., . . . Zheng, Z. M. (2009). Oncogenic HPV infection interrupts the expression of tumor-suppressive miR-34a through viral oncoprotein E6. *RNA (New York, N.Y.)*, *15*(4), 637-647. doi: 10.1261/rna.1442309
- Waseem, A., Dogan, B., Tidman, N., Alam, Y., Purkis, P., Jackson, S., . . . Leigh, I. M. (1999). Keratin 15 expression in stratified epithelia: downregulation in activated keratinocytes. *J Invest Dermatol*, *112*(3), 362-369. doi: 10.1046/j.1523-1747.1999.00535.x
- Watt, F. M., Estrach, S., & Ambler, C. A. (2008). Epidermal Notch signalling: differentiation, cancer and adhesion. *Curr Opin Cell Biol*, *20*(2), 171-179. doi: 10.1016/j.ceb.2008.01.010
- Watt, F. M., & Hogan, B. L. (2000). Out of Eden: stem cells and their niches. *Science (New York, N.Y.)*, *287*(5457), 1427-1430.
- Weerheim, A., & Ponc, M. (2001). Determination of stratum corneum lipid profile by tape stripping in combination with high-performance thin-layer chromatography. *Archives of Dermatological Research*, *293*(4), 191-199.
- Wei, T., Orfanidis, K., Xu, N., Janson, P., Stahle, M., Pivarcsi, A., & Sonkoly, E. (2010). The expression of microRNA-203 during human skin morphogenesis. *Exp Dermatol*, *19*(9), 854-856. doi: 10.1111/j.1600-0625.2010.01118.x
- Wei, T. L., Xu, N., Meisgen, F., Stahle, M., Sonkoly, E., & Pivarcsi, A. (2013). Interleukin-8 is regulated by miR-203 at the posttranscriptional level in primary

- human keratinocytes. *European Journal of Dermatology*, 23, 66-71. doi: DOI 10.1684/ejd.2013.1997
- Wellner, U., Schubert, J., Burk, U. C., Schmalhofer, O., Zhu, F., Sonntag, A., . . . Brabletz, T. (2009). The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nat Cell Biol*, 11(12), 1487-1495. doi: 10.1038/ncb1998
- Welter, J. F., Crish, J. F., Agarwal, C., & Eckert, R. L. (1995). Fos-related antigen (Fra-1), junB, and junD activate human involucrin promoter transcription by binding to proximal and distal AP1 sites to mediate phorbol ester effects on promoter activity. *J Biol Chem*, 270(21), 12614-12622.
- Westfall, M. D., Mays, D. J., Sniezek, J. C., & Pietenpol, J. A. (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.
- Westphal, K., Akgul, B., Storey, A., & Nindl, I. (2009). Cutaneous human papillomavirus E7 type-specific effects on differentiation and proliferation of organotypic skin cultures. *Cell Oncol*, 31(3), 213-226. doi: 10.3233/CLO-2009-0476
- White, E. A., Walther, J., Javanbakht, H., & Howley, P. M. (2014). Genus beta human papillomavirus E6 proteins vary in their effects on the transactivation of p53 target genes. *J Virol*, 88(15), 8201-8212. doi: 10.1128/JVI.01197-14
- Williams, V. M., Filippova, M., Soto, U., & Duerksen-Hughes, P. J. (2011). HPV-DNA integration and carcinogenesis: putative roles for inflammation and oxidative stress. *Future Virol*, 6(1), 45-57. doi: 10.2217/fvl.10.73
- Wilting, S. M., Snijders, P. J., Verlaat, W., Jaspers, A., van de Wiel, M. A., van Wieringen, W. N., . . . Steenbergen, R. D. (2013a). Altered microRNA expression associated with chromosomal changes contributes to cervical carcinogenesis. *Oncogene*, 32(1), 106-116. doi: 10.1038/onc.2012.20
- Wilting, S. M., Verlaat, W., Jaspers, A., Makazaji, N. A., Agami, R., Meijer, C. J., . . . Steenbergen, R. D. (2013b). Methylation-mediated transcriptional repression of microRNAs during cervical carcinogenesis. *Epigenetics*, 8(2), 220-228. doi: 10.4161/epi.23605
- Wong, K. Y., Huang, X., & Chim, C. S. (2012). DNA methylation of microRNA genes in multiple myeloma. *Carcinogenesis*, 33(9), 1629-1638. doi: 10.1093/carcin/bgs212
- Wong, P. P., Pickard, A., & McCance, D. J. (2010). p300 alters keratinocyte cell growth and differentiation through regulation of p21(Waf1/CIP1). *PLoS One*, 5(1), e8369. doi: 10.1371/journal.pone.0008369
- Wu, J., Issa, J. P., Herman, J., Bassett, D. E., Jr., Nelkin, B. D., & Baylin, S. B. (1993). Expression of an exogenous eukaryotic DNA methyltransferase gene induces transformation of NIH 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(19), 8891-8895.
- Yablonska, S., Hoskins, E. E., Wells, S. I., & Khan, S. A. (2013). Identification of miRNAs dysregulated in human foreskin keratinocytes (HFKs) expressing the human papillomavirus (HPV) Type 16 E6 and E7 oncoproteins. *Microna*, 2(1), 2-13.
- Yamashita, T., Segawa, K., Fujinaga, Y., Nishikawa, T., & Fujinaga, K. (1993). Biological and biochemical activity of E7 genes of the cutaneous human papillomavirus type 5 and 8. *Oncogene*, 8(9), 2433-2441.
- Yang, A., Kaghad, M., Wang, Y., Gillett, E., Fleming, M. D., Dotsch, V., . . . 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), 305-316.
- Yang, A., Schweitzer, R., Sun, D., Kaghad, M., Walker, N., Bronson, R. T., . . . McKeon, F. (1999). P63 is Essential for Regenerative Proliferation in Limb, Craniofacial and Epithelial Development. *Nature*, 398(6729), 714-718. doi: 10.1038/19539

- YeungYeung, C. L. A., Tsang, W. P., Tsang, T. Y., Co, N. N., Yau, P. L., Kwok, T. T. (2010). HPV-16 E6 upregulation of DNMT1 through repression of tumor suppressor p53. *Oncol Rep*, 24, 1599-1604, Doi 10.3892/or_00001023
- Yi, R., Poy, M. N., Stoffel, M., & Fuchs, E. (2008). A skin microRNA promotes differentiation by repressing 'stemness'. *Nature*, 452(7184), 225-229. doi: 10.1038/nature06642
- Yu, H., Lu, J., Zuo, L., Yan, Q., Yu, Z., Li, X., . . . Li, G. (2012). Epstein-Barr virus downregulates microRNA 203 through the oncoprotein latent membrane protein 1: a contribution to increased tumor incidence in epithelial cells. *J Virol*, 86(6), 3088-3099. doi: 10.1128/JVI.05901-11
- Yugawa, T., Handa, K., Narisawa-Saito, M., Ohno, S., Fujita, M., & Kiyono, T. (2007). Regulation of Notch1 gene expression by p53 in epithelial cells. *Mol Cell Biol*, 27(10), 3732-3742. doi: 10.1128/MCB.02119-06
- Yugawa, T., Narisawa-Saito, M., Yoshimatsu, Y., Haga, K., Ohno, S., Egawa, N., . . . Kiyono, T. (2010). DeltaNp63alpha repression of the Notch1 gene supports the proliferative capacity of normal human keratinocytes and cervical cancer cells. *Cancer Res*, 70(10), 4034-4044. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4063
- Zeng, B., Li, Z., Chen, R., Guo, N., Zhou, J., Zhou, Q., . . . Gong, Y. (2012). Epigenetic regulation of miR-124 by hepatitis C virus core protein promotes migration and invasion of intrahepatic cholangiocarcinoma cells by targeting SMYD3. *FEBS Lett*, 586(19), 3271-3278. doi: 10.1016/j.febslet.2012.06.049
- Zenz, R., Eferl, R., Kenner, L., Florin, L., Hummerich, L., Mehic, D., . . . Wagner, E. F. (2005). Psoriasis-like skin disease and arthritis caused by inducible epidermal deletion of Jun proteins. *Nature*, 437(7057), 369-375. doi: 10.1038/nature03963
- Zenz, R., & Wagner, E. F. (2006). Jun signalling in the epidermis: From developmental defects to psoriasis and skin tumors. *Int J Biochem Cell Biol*, 38(7), 1043-1049. doi: 10.1016/j.biocel.2005.11.011
- Zhang, Z., Zhang, B., Li, W., Fu, L., Fu, L., Zhu, Z., & Dong, J. T. (2011). Epigenetic Silencing of miR-203 Upregulates SNAI2 and Contributes to the Invasiveness of Malignant Breast Cancer Cells. *Genes Cancer*, 2(8), 782-791. doi: 10.1177/1947601911429743
- Zhao, B., & Chen, Y. G. (2014). Regulation of TGF-beta Signal Transduction. *Scientifica (Cairo)*, 2014, 874065. doi: 10.1155/2014/874065
- Zimmermann, H., Degenkolbe, R., Bernard, H. U., & O'Connor, M. J. (1999). The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300. *J Virol*, 73(8), 6209-6219.
- zur Hausen, H. (1996). Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta*, 1288(2), F55-78.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Homburg, den 17. April 2015

(Anna Schneider)