

Aus dem Department für Diagnostische Labormedizin der
Universität Tübingen
Institut für Medizinische Virologie und Epidemiologie der
Viruskrankheiten

**Die Rolle von Interferon-kappa und Sp100 Proteinen bei
der Infektion mit dem Cottontail Rabbit Papillomvirus
in vivo**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Wurdak, Marcel André

2019

Dekan: Professor Dr. I. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Stubenrauch

2. Berichterstatter: Professor Dr. U. Lauer

3. Berichterstatter: Professor Dr. T. Stamminger

Tag der Disputation: 02.08.2018

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	7
1 Einleitung	10
1.1 Humane Papillomviren	10
1.1.1 Klassifizierung und klinische Bedeutung humaner Papillomviren	10
1.1.2 Lebenszyklus humaner Papillomviren	11
1.1.3 Das virale Genom	13
1.1.4 Die viralen Proteine.....	14
1.2 Das Cottontail Rabbit Papillomavirus Modell	16
1.3 Papillomvirusinfektionen und Typ I Interferone	18
1.4 Papillomvirusinfektionen und ND10 bodies.....	21
1.5 Papillomvirusinfektionen und Sp100 Proteine.....	23
1.6 Ziele dieser Arbeit	24
2 Material und Methoden	26
2.1 Zellkulturmethoden.....	26
2.1.1 Kultivierung von HEK293T.....	26
2.1.2 Kultivierung von Kaninchen-Keratinocyten.....	26
2.1.3 Passagieren von Zellen	27
2.1.4 Auftauen und Einfrieren von Zellen	27
2.1.5 DNA-Transfektion in Zellen mit einem Komplexbildner	28
2.2 Mikrobiologische Methoden	29
2.2.1 Herstellung kompetenter Bakterienstämme.....	29
2.2.2 Transformation von DNA in kompetente Bakterien	29

Inhaltsverzeichnis

2.2.3 Bakterienkulturen zur Amplifizierung von DNA.....	30
2.2.4 Langzeitlagerung von Bakterienkulturen	30
2.3 DNA-Methoden	31
2.3.1 Präparative Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	31
2.3.2 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren (Agarosegele).....	31
2.3.3 DNA-Fragmentextraktion aus Agarosegelen	32
2.3.4 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen.....	32
2.3.5 Dephosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten.....	32
2.3.6 Ligation von DNA-Fragmenten	32
2.3.7 Hybridisierung von Oligonukleotiden zu doppelsträngiger DNA.....	33
2.3.8 Amplifikation von DNA mittels PCR	33
2.3.9 Sequenzierung von DNA	34
2.4 RNA-Methoden	35
2.4.1 Isolation von RNA aus eukaryotischen Zellen	35
2.4.2 Synthese von cDNA.....	35
2.4.3 Quantitative Real-Time PCR (qPCR)	35
2.5 Spezielle Methoden und Versuchsaufbau der Zellkultur-Experimente .	39
2.5.1 Behandlung von Kaninchen-Keratinocyten mit Interferon- β	39
2.5.2 Behandlung von Kaninchen-Keratinocyten mit Interferon- κ aus Zellkultur-Überstand.....	39
2.5.3 Luziferase-Reporteranalysen zur Bestimmung der HPV und CRPV Promotor Aktivität bei Sp100 Überexpression.....	40
2.5.4 Herstellung lentiviraler shIFN- κ und shSp100 Expressionsplasmide	43
2.5.5 Herstellung von stabilen Interferon- κ und Sp100 Knock-down Zelllinien	48
2.5.6 Untersuchung der Zellproliferation der Sp100 Knock-down Keratinocyten.....	49
2.6 Spezielle Methoden und Versuchsaufbau der Tierexperimente	50
2.6.1 Herstellung von rekombinanten CRPV-shIFN- κ und CRPV-shSp100 Genomen	50
2.6.2 Präzipitation der CRPV-DNA an Gold und Beladen der Tefzel-Schläuche.....	52
2.6.3 Qualitätskontrolle der Gene Gun Patronen.....	53

Inhaltsverzeichnis

2.6.4 Infektionsschemata der Tierexperimente.....	54
2.6.5 Injektion der CRPV-DNA in Kaninchenhaut.....	56
2.6.6 Bestimmung der Papillomprogression und Biopsientnahme	56
2.6.7 Isolation von RNA aus den Papillombiopsien	56
2.6.8 Isolation von DNA aus den Papillombiopsien	57
3 Ergebnisse	58
3.1 Vergleich von Interferon- κ und Sp100 Isoformen zwischen Mensch und Kaninchen	58
3.1.1 Interferon- κ mRNA Alignment – Mensch/Kaninchen	59
3.1.2 Interferon- κ Protein Alignment – Mensch/Kaninchen	59
3.1.3 Die Sp100 Isoformen des Kaninchens	60
3.1.4 Sp100 mRNA Alignment – Mensch/Kaninchen	61
3.1.5 Sp100 Protein Alignment – Mensch/Kaninchen	62
3.2 Wirkung von Typ I Interferonen und Sp100-Proteinen in Kaninchen-Keratinocyten	64
3.2.1 Charakterisierung der Interferon- κ und Sp100 Expression in Kaninchen-Keratinocyten Zelllinien	64
3.2.2 Effekte von Interferon- β auf die Expression von Sp100 in RK1-16E7/Ras Zellen	65
3.2.3 Effekte von Interferon- β auf die Expression von Sp100 und virale Transkription in AVS Zellen	66
3.2.4 Die Wirkung von Interferon- κ auf Sp100 und virale Transkription in AVS Zellen.....	68
3.2.5 Effekte der Überexpression von humanen Sp100-Proteinen in AVS-Zellen auf die Promotoraktivität von HPV31 und CRPV.....	70
3.3 Herstellung und Analyse verschiedener stabiler Interferon- κ und Sp100 Knock-down Zelllinien	72
3.3.1 Vergleich der shRNA Knock-down Effizienzen.....	72
3.3.2 Sp100 Knock-down Effekt auf die virale Transkription in AVS-Zellen.....	76
3.3.3 Untersuchung der Zellproliferation der Sp100 Knock-down Keratinocyten.....	77
3.4 In vivo Versuche mit rekombinanten CRPV Interferon- κ und Sp100 Knock-down Genomen am Kaninchenmodell	78

Inhaltsverzeichnis

3.4.1 Qualitätskontrolle der Gene Gun Patronen.....	79
3.4.2 Papillom-Induktionsrate der rekombinanten CRPV Genome	80
3.4.3 Progression der Sp100-Knock-down Papillome	83
3.4.1 Crossing-Point Werte für ausgewählte Transkripte in Papillomen	84
3.4.4 Knock-down Effizienzen der rekombinanten CRPV Genome in vivo	85
3.4.5 Effekte des Sp100 Knock-downs auf die virale Transkription	87
3.4.6 Effekte des Sp100 Knock-downs auf die CRPV Kopienanzahl	89
3.4.7 Korrelation der CRPV-Kopienanzahl mit dem Transkript SD7810-SA3714	91
3.4.8 CRPV Kopienanzahl in infizierter Haut ohne Papillombildung	92
3.4.9 Weitere exprimierte Interferontypen	93
4 Diskussion	94
4.1 Analyse der Effekte der Typ I Interferone.....	94
4.1.1 Effekte von Interferon- β und Interferon- κ in den Zellkultur-Experimenten.....	94
4.1.2 Effekte von Interferon- κ in den Tierexperimenten	97
4.2 Analyse der Effekte der Sp100 Proteine	100
4.2.1 Effekte der Sp100 Proteine in den Zellkultur-Experimenten.....	100
4.2.2 Effekte der Sp100 Proteine in den Tierexperimenten.....	103
4.3 Sonstige Schlussfolgerungen aus den Experimenten	106
5 Zusammenfassung.....	107
6 Literaturverzeichnis	109
Erklärung zum Eigenanteil	117
Veröffentlichungen.....	118
Danksagung.....	119

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
Bromo	bromodomain
cDNA	copy desoxyribonucleid acid
CIN	cervikale intraepitheliale Neoplasie
CP	crossing point
CRPV	cottontail rabbit papilloma virus
CS	calf serum
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleid acid
E	early (frühe HPV Gene oder Genprodukte)
EBV	Epstein-Barr virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Eff	Effizienz
ETFE	Ethylen-Tetrafluorethylen-Copolymer
FKS	fötales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase
HCMV	human cytomegalovirus
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMG	high-mobility-group domain
HP1	heterochromatin protein 1 interaction region
HPV	Humane Papillomviren
HSR	homogenously stained region
HSV	herpes simplex virus
HVS	herpesvirus saimiri
IFIT1	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1

Abkürzungsverzeichnis

IFN	interferon
IFNAR	interferon-alpha/beta receptor
IFR	interferon regulatory factors
ISG	interferon-stimulated gene
JAK1	Janus kinase 1
KSHV	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus
L	late (späte HPV Gene oder Genprodukte)
LB	lysogeny broth
LCR	long control region
LE6	long early 6 (langes Genprodukt von CRPV E6)
Luc	Luciferase
MHV68	Murid herpesvirus 68
mRNA	messenger ribonucleic acid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCR	non-coding region
ND10	Nuclear domain 10
P1	promotor 1
PAE	polyadenylation site early
PAL	polyadenylation site late
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PHD	plant homeodomain
PL	promotor late
PML	Promyelocytic Leukemia
polyA	polyadenylation site
PPRs	pattern recognition receptors
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
RLU	relative light units
RNA	ribonucleic acid
RNase	Ribonuklease
rpm	revolutions per minute
SA	splice acceptor

Abkürzungsverzeichnis

SAND	<u>S</u> p100, <u>A</u> IRE-1, <u>N</u> ucP41/45, <u>D</u> EAF-1
SD	standard deviation
SD	splice donator
SE6	short early 6 (kurzes Genprodukt von CRPV E6)
SEM	standard error of the mean
SFM	serum free medium
shRNA	small hairpin ribonucleic acid
siRNA	small interfering ribonucleic acid
Su	Sumo conjugation motif
SV40	Simian virus 40
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TYK2	Tyrosin kinase 2
URR	upstream regulatory region
UV	Ultraviolett
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtprozent
WHO	World Health Organization

1 Einleitung

1.1 Humane Papillomviren

1.1.1 Klassifizierung und klinische Bedeutung humaner Papillomviren

Humane Papillomviren (HPV) sind unbehüllte doppelsträngige DNA Viren die zur Familie der Papillomaviridae gehören und je nach Virustyp Zellen des verhornten oder unverhornten Plattenepithels befallen. Die Viren bestehen aus einem ikosaedrischen Kapsid, in dem sich das zirkuläre, etwa 8000 Basenpaare große Genom befindet. Derzeit sind über 200 verschiedene HPV Typen bekannt, die in verschiedene Gattungen eingeteilt werden (Alpha, Beta, Gamma, Mu, Nu). Die Alphapapillomviren haben aus medizinischer Sicht die größte Relevanz, da sie je nach Virustyp mit verschiedenen intraepithelialen Neoplasien und invasiven Karzinomen assoziiert sind (Harden & Munger 2017). Sie werden in der Regel sexuell übertragen (Christensen 2016). Infektionen mit humanen Papillomviren anderer Gattungen führen meist nur zu Warzen oder gutartigen Hautläsionen (Harden & Munger 2017).

Bei den Alphapapillomviren wird zwischen HPV-Hochrisikotypen (z.B. HPV16 und HPV18) und HPV-Niedrigrisikotypen (z.B. HPV6 und HPV11) unterschieden. Im Gegensatz zu den HPV-Hochrisikotypen immortalisieren Niedrigrisikotypen die Keratinozyten nicht und führen daher oft nur zu niedriggradigen intraepithelialen Neoplasien und Genitalwarzen (de Villiers et al. 2004). Die Internationale Agentur für Krebsforschung als Teil der Weltgesundheitsorganisation (WHO) klassifiziert die HPV-Typen 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 und 66 als Typ I Karzinogene (Cogliano et al. 2005).

Humane Papillomviren können in 99,7 % aller Zervixkarzinome nachgewiesen werden (Murray et al. 2009). In 70 % der Fälle handelt es sich um die HPV Typen 16 oder 18 (Harden & Munger 2017). Mit weltweit über 500.000 Neuerkrankungen pro Jahr ist Gebärmutterhalskrebs die vierthäufigste Krebserkrankung bei Frauen. Die Letalität beträgt derzeit etwa 50 % (HPV Information Centre 2017). Neben den Zervixkarzinomen sind auch Analkarzinome mit 88 % HPV-positiven Tumoren sehr stark mit der Virusinfektion assoziiert (de Martel et al. 2012).

Hochrisiko-Papillomviren sind darüber hinaus in 70 % der oropharyngealen Karzinome, in 60 % der Vaginalkarzinome, in 50 % der Vulvakarzinome und 35 % der Peniskarzinome nachweisbar. Insgesamt können weltweit etwa 5,2 % aller Krebserkrankungen auf Infektionen mit Papillomviren zurückgeführt werden (Harden & Munger 2017).

In Deutschland sind derzeit drei HPV Impfstoffe zugelassen. Der Impfstoff Cervarix® vom Hersteller GlaxoSmithKline GmbH & Co. KG schützt vor Infektionen mit den HPV-Hochrisikotypen 16 und 18. Der nonavalente Impfstoff Gardasil®9 von Merck & Co. ist seit April 2016 als Nachfolger des quadrivalenten Impfstoffes Gardasil® erhältlich. Neben den HPV-Niedrigrisikotypen 6 und 11, die für die Entstehung von 90 % aller Genitalwarzen verantwortlich sind, bietet dieser Impfstoff Schutz vor den Hochrisikotypen 16, 18, 31, 33, 45, 52 und 58. Gardasil® 9 hat somit das Potential etwa 90 % aller Zervixkarzinome zu verhindern. Gegen schon bestehende Infektionen sind die Impfstoffe nicht wirksam. Die Ständige Impfkommission des Robert-Koch-Institutes empfiehlt zwei Impfungen für alle Mädchen zwischen 9 und 14 Jahren. Für ältere Frauen werden drei Impfungen empfohlen (Robert-Koch-Institut 2016; Harden & Munger 2017; Harper & DeMars 2017).

1.1.2 Lebenszyklus humaner Papillomviren

In der basalen Epithelschicht der Haut beziehungsweise der Schleimhaut befinden sich die teilungsfähigen Stammzellen der Keratinozyten. Durch Mikroverletzungen können Papillomviren die Zellen der Basalschicht infizieren.

Initial binden die Papillomviren über das L1 Kapsid Protein an Heparansulfat-Proteoglykane der basalen Zellen. Dadurch wird eine Änderung der Struktur des viralen Kapsids induziert, sodass die Bindung an den primären Rezeptor wieder verloren geht. Nach Bindung an einen zweiten derzeit noch unbekanntem Rezeptor schließt sich die Endozytose des Virus an. Die Aufnahme des Virus scheint im Gegensatz zu früheren Annahmen Clathrin, Caveolin, Cholesterol und Dynamin unabhängig zu funktionieren. Papillomviren nutzen einen Mechanismus, der am ehesten einer Makropinozytose ähnelt (Horvath et al. 2010; Schelhaas et al. 2012; Harden & Munger 2017).

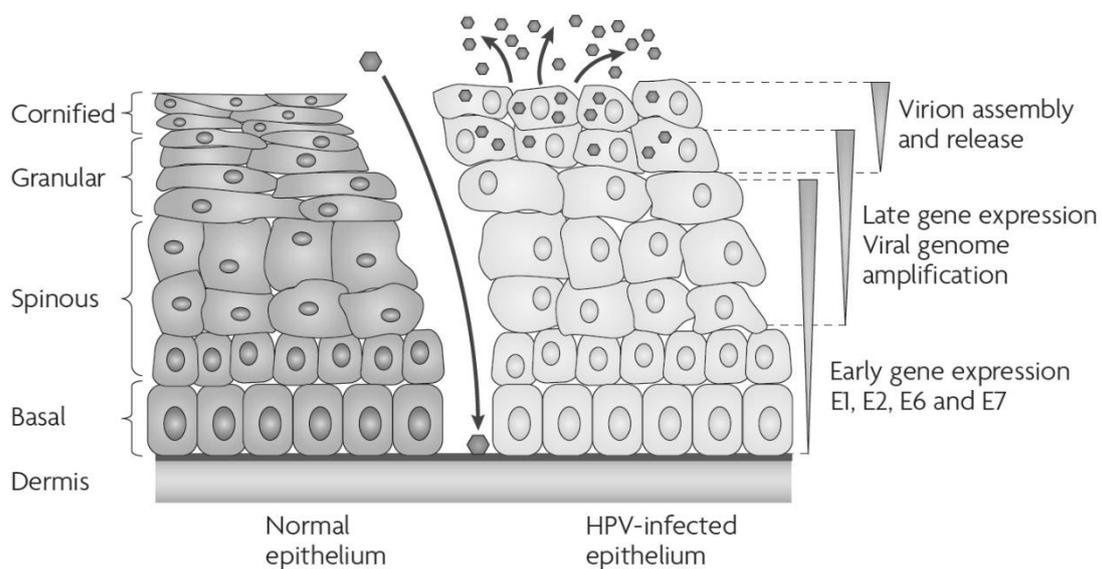


Abbildung 1: Lebenszyklus humaner Papillomviren (Moody & Laimins, 2010). Über Mikroverletzungen kann es zur Infektion der basalen Epithelschicht kommen. In den unteren Epithelschichten liegt das virale Genom in niedriger Kopienzahl vor. Es werden nur die frühen viralen Gene exprimiert. Mit zunehmender Differenzierung der Keratinozyten werden die viralen Gene verstärkt exprimiert und das Virusgenom amplifiziert. Erst spät werden die viralen Strukturproteine L1 und L2 transkribiert und translatiert. In den oberen Zellschichten werden die Virusgenome verpackt und anschließend freigesetzt.

Nach der Penetration beginnt das Uncoating der Viren, wobei die L1 Kapsid-Proteine von den L2 Kapsid-Proteinen getrennt werden. Das virale Genom verbleibt an L2, welches unter anderem den Transport zum trans-Golgi Netzwerk und die Aufnahme in den Nukleus vermittelt. Das Virusgenom positioniert sich anschließend zusammen mit L2 im Zellkern an den ND10 nuclear bodies (Harden & Munger 2017). Die ND10 nuclear bodies werden für die effektive Etablierung

und Transkription in einem frühen Stadium des viralen Lebenszyklus benötigt (Day et al. 2004).

Der Lebenszyklus der Papillomviren ist an den Differenzierungsstand der Keratinozyten gekoppelt. In den basalen Stammzellen des Epithels befinden sich nur 50 bis 100 episomale Kopien des viralen Genoms, die bei Zellteilung aufgeteilt werden. Die Replikation findet dort nur während der S-Phase des Zellzyklus statt. Mit zunehmender Differenzierung der Keratinozyten beziehungsweise in den höher gelegenen Zellschichten werden die viralen Gene verstärkt exprimiert. In den oberen Zellschichten beginnt auch die Amplifikation des Virusgenoms. Die Strukturproteine L1 und L2 werden ebenfalls verhältnismäßig spät exprimiert, sodass die Verpackung des viralen Genoms erst in den obersten Epithelschichten möglich ist. Dort erfolgt auch die Freisetzung der infektiösen Viren (Stubenrauch & Laimins 1999; Harden & Munger 2017).

Infektionen mit HPV-Hochrisikotypen werden vom Immunsystem bekämpft und heilen meist nach 15 bis 20 Monaten aus (Richardson et al. 2003). In über 90 % der Fälle sind nach zwei Jahren keine Viren mehr nachweisbar. Gelegentlich kommt es jedoch zu einer Langzeitpersistenz der Infektion. Je länger eine Infektion mit HPV persistiert, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit eine hochgradige intraepitheliale Neoplasie zu entwickeln, welche wiederum zu einem invasiven Karzinom fortschreiten kann (Moscicki et al. 2012).

1.1.3 Das virale Genom

Die genetische Information von humanen Papillomviren ist auf nur einem DNA-Strang des doppelsträngigen Virusgenoms codiert. Das virale Genom kann grob in drei Bereiche eingeteilt werden. In der frühen Region (E, early) sind die regulatorischen Proteine codiert, während in der späten Region (L, late) die zwei Viruskapsid-Proteine codiert sind. Der dritte Bereich wird als lange nicht-codierende Region (LCR, long control region) bezeichnet. Neben LCR sind hierfür auch die Bezeichnungen non-coding region (NCR) oder upstream regulatory region (URR) geläufig. Hier wird über Bindungsstellen für verschiedene zelluläre Proteine und Bindungsstellen für die viralen Proteine E1

und E2 die Transkription und Replikation geregelt. In der LCR befindet sich darüber hinaus auch der Replikationsursprung des Virus (Harden & Munger 2017; Sen et al. 2002; Frattini & Laimins 1994; Graham 2010).

E2 reguliert sowohl positiv als auch negativ die Aktivität des frühen Promotors, der vor allem für die Expression von E6, E7, E1 sowie E2 selbst ausschlaggebend ist (McBride 2013). Die Aktivierung des späten Promotors hängt vom Differenzierungsstand der Keratinozyten ab und führt in den oberen Epithelschichten zu einer deutlich verstärkten Expression der viralen Proteine E1, E2 und E1^{E4}, was wiederum eine verstärkte Genomamplifikation zu Folge hat (Bodily & Laimins 2011).

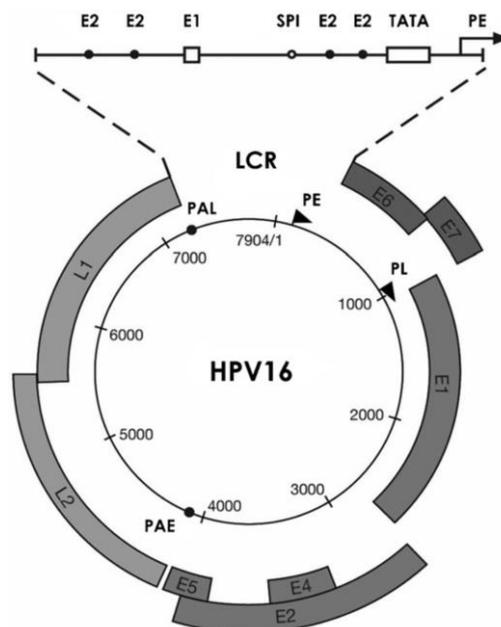


Abbildung 2: HPV16 Genomorganisation. Das Genom wird eingeteilt in frühe (E) und späte Gene (L) sowie einen nicht kodierenden Bereich (LCR). Darüber hinaus ist die Lage des frühen (PE) und des späten (PL) Promotors, als auch die Lage der Polyadenylierungssignale (PAL / PAE) eingezeichnet. (Doorbar et al. 2012)

1.1.4 Die viralen Proteine

Die regulatorischen Proteine E1 und E2 werden für die virale Replikation und Transkription benötigt. Das E1 Protein ist eine ATP-abhängige virale DNA Helikase. Sie kann am Replikationsursprung des viralen Genoms binden und ist somit essentiell für die virale Amplifikation. Die Transkription von E1 wird durch

posttranslationale Modifikation streng reguliert um eine Akkumulation von E1 im Zellkern zu vermeiden. Eine zu starke Akkumulation von E1 führt zu einem Zellzyklusarrest (Bergvall et al. 2012).

E2 ist für die Regulation der viralen Transkripte zuständig, wobei das E2 Protein in voller Länge die virale Transkription verstärkt. Das E8^{E2} Fusionsprotein hingegen inhibiert die virale Transkription und Replikation. Darüber hinaus vermittelt E2 in Interaktion mit dem E1 Protein die virale Replikation. E2 rekrutiert hierbei neben E1 verschiedene zelluläre Replikationsproteine an den Replikationsursprung. In einer weiteren Funktion ist E2 für die nukleäre Retention der viralen Genome nach der Mitose verantwortlich (McBride 2013).

Das E4 Gen liegt vollständig im E2 Gen und wird hauptsächlich als E1^{E4} Fusionsprotein in den späten Stadien des viralen Lebenszyklus exprimiert. Das Fusionsprotein destabilisiert das Cytokeratin-Netzwerk der Keratinozyten und ist in der Virusfreisetzung involviert. E5 ist ein kleines Transmembranprotein, das unter anderem mit dem Epidermal Growth Factor (EGF) Rezeptor agiert. Wahrscheinlich spielt dieses Protein auch eine Rolle in der Regulierung der Apoptose sowie der Immunevasion (Harden & Munger 2017).

Die Expression der Onkoproteine E6 und E7 ist entscheidend verantwortlich bei der malignen Transformation infizierter Keratinozyten. Papillomviren sind bei der Amplifikation des viralen Genoms auf das Replikationssystem ihrer Wirtszelle angewiesen. Die virale Replikation erfolgt aber hauptsächlich in Keratinozyten der oberen Hautschichten, in denen normalerweise keine zelluläre DNA-Replikation mehr stattfinden würde. Die Onkoproteine manipulieren die Wirtszelle und erzwingen den Eintritt in den Zellzyklus in den oberen Zellschichten der Haut. Die Genprodukte von E6 und E7 haben keine enzymatische Funktion, besitzen aber die Fähigkeit an eine Vielzahl von zellulären Proteinen zu binden, um deren Funktionen zu modifizieren oder zu unterdrücken. Die wichtigste Funktion von E6 ist der Abbau des Tumorsuppressors p53 und die Aktivierung des Telomeraseenzym. E7 bindet an Tumorsuppressorproteine der Retinoblastom Familie und induziert ebenfalls deren Abbau, wobei ein unkontrollierter Eintritt der

Zelle in die S-Phase des Zellzyklus ermöglicht wird (Bodily & Laimins 2011; Harden & Munger 2017; Viarisio et al. 2017).

In der späten Region der Papillomviren sind die viralen Kapsidproteine L1 und L2 codiert. L1 ist der Hauptbestandteil des ikosaedrischen Kapsids. Alle bisher entwickelten Impfstoffe nutzen das L1-Antigen um eine spezifische Immunantwort zu provozieren. Das L2 Kapsidprotein ist neben seiner Funktion als Strukturprotein in der Einschleusung des Virus und dem anschließenden Transport des viralen Genoms innerhalb der Zelle beteiligt (Harden & Munger 2017).

1.2 Das Cottontail Rabbit Papillomavirus Modell

Die Erzeugung von Läsionen mit anschließender Wundheilung, die Etablierung des Virus in den basalen Stammzellen der Haut in niedriger Kopienanzahl sowie die Interaktion mit dem Immunsystem sind einige Beispiele, die in den Zellkultur-Experimenten nicht simuliert werden können. Zur Beantwortung komplexerer Fragestellungen zur Virusbiologie von Papillomviren wird deshalb auf verschiedene Tiermodelle zurückgegriffen. Ein geeignetes Tiermodell für Untersuchungen von Papillomvirus Infektionen und Papillomvirus induzierten Hauttumoren ist das Cottontail Rabbit Papillomavirus (CRPV) Modell (Doorbar 2016). In seinem natürlichen Wirt, dem Baumwollschwanzkaninchen (*Sylvilagus floridanus*), kommt es nach 4 bis 8 Wochen zur Bildung gutartiger epithelialer Papillome, die meist spontan regredieren. Bei 25 % der Infektionen kommt es jedoch zur malignen Progression der Papillome zu Karzinomen. Für die Tierexperimente werden nicht Baumwollschwanzkaninchen, sondern domestizierte Wildkaninchen (*Oryctolagus cuniculus*) der Rasse New Zealand White Rabbit mit CRPV infiziert. Die entstandenen Papillome in den domestizierten Wildkaninchen persistieren in der Regel lebenslang und

progredieren in über 80 % der Fälle nach 8 bis 14 Monaten zu invasiven Karzinomen (Syverton 1952). Obwohl in den CRPV-induzierten Papillomen keine bedeutenden Mengen an infektiösen Partikeln produziert werden, konnte beobachtet werden, dass in den oberen Zellschichten späte Transkripte wie E4 und L1 exprimiert werden und dort ebenfalls die Amplifikation des Virusgenoms beginnt (Hu et al. 2007; Peh et al. 2004; Zeltner et al. 1994). Dies zeigt, dass auch im New Zealand White Rabbit ein produktiver Replikationszyklus stattfindet, der aber deutlich abgeschwächt ist. Aufgrund der beinahe abortiven Virusproduktion und der erhöhten Karzinogenität als Folge der wirtsfremden Infektion ist die Infektion von New Zealand White Rabbits mit CRPV für verschiedene Fragestellungen als in vivo Modell gut geeignet. Darüber hinaus ähnelt die Aufhebung des geregelten Zellzyklus im CRPV Modell der Funktionsweise von humanen Hochrisiko-Papillomviren. Eine kleine Einschränkung der Vergleichbarkeit hingegen resultiert daraus, dass CRPV Tumore auf verhornter Haut verursacht, während humane Hochrisiko-Alpha Papillomviren unverhornte Schleimhäute infizieren (Doorbar 2016).

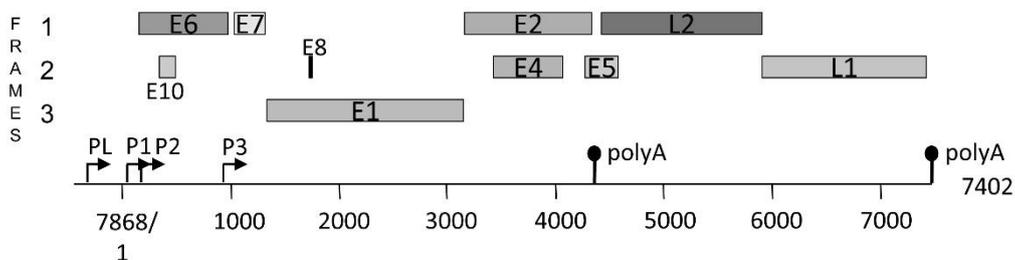


Abbildung 3: CRPV Genomorganisation. Insgesamt zehn Gene stehen unter Kontrolle von vier Promotoren (P). Analog zu humanen Papillomviren kann das Genom in frühe (E) und späte Gene (L) sowie einen nicht kodierenden Bereich (LCR) eingeteilt werden. Nach (Papillomavirus Episteme 2017 a)

Das CRPV Genom besteht aus 7868 Basenpaaren und ist dem Genom von humanpathogenen Papillomviren ähnlich. Im Gegensatz zu humanen Papillomviren initiieren insgesamt vier Promotoren (P1, P2, P3, PL) die Transkription der Virus DNA. P2 und P3 haben die höchste Aktivität, während P1 eine etwa 10-fach geringere Aktivität aufweist. PL hat die schwächste Aktivität.

In qPCR Analysen von Papillomen und Karzinomen zeigten sich bis zu 400-fach weniger PL induzierte Transkripte verglichen mit P3 regulierten Transkripten (Probst-Hunczek et al. 2015; Papillomavirus Episteme 2017 b).

Ein weiterer Unterschied zwischen HPV und CRPV zeigt sich bei der Expression von E6. CRPV exprimiert zwei unterschiedliche E6 Proteine mit Hilfe von zwei verschiedenen Promotoren (P1, P2). Das Long E6 Protein (LE6) ist insgesamt 273 Aminosäuren lang, während Short E6 (SE6) dem C-Terminus von LE6 entspricht, aber nur 176 Aminosäuren lang ist (Barbosa & Wettstein 1987; Probst-Hunczek et al. 2015; Papillomavirus Episteme 2017 b).

Vergleichende RNA Sequenzierungen zwischen CRPV induzierten Papillomen und Karzinomen haben keine quantitativen oder qualitativen Veränderungen der viralen Transkripte aufzeigen können. Darüber hinaus wurden vor kurzem zwei neue CRPV Transkripte identifiziert: SD7810-SA3714 sowie SD1751-SD3065 (SD = Spleissdonor, SA = Spleissakzeptor). Beide Transkripte wurden zuvor schon bei Transkriptanalysen anderer Papillomviren beschrieben. Das gespleißte Transkript SD7810-SA3714 geht aus der CRPV URR Region (Basenpaar 7810) in das E2/E4 Exon (Basenpaar 3714) über. Es wird vom späten Promotor PL transkribiert und ist wahrscheinlich in der Expression der Kapsidproteine L1 und L2 involviert (Probst-Hunczek et al. 2015). Auch im Rahmen dieser Arbeit wurde neben anderen Transkripten SD7810-SA3714 in den Papillomen quantifiziert.

1.3 Papillomvirusinfektionen und Typ I Interferone

Immunreaktionen können in zwei Gruppen eingeteilt werden: angeborene Immunantworten und adaptive Immunantworten. Angeborene Immunreaktionen reagieren schneller auf unterschiedliche Krankheitserreger wie Bakterien, Pilze oder Viren. Nach Eindringen eines Krankheitserregers werden über sogenannte

pattern recognition receptors (PPRs) Pathogen-assoziierte molekulare Muster wie beispielsweise Lipopolysaccharide, Endotoxine oder typische Muster viraler Nukleinsäuren erkannt. Über die PPRs werden bei Virusinfektionen eine Vielzahl von Signalkaskaden aktiviert, die wiederum verschiedene Restriktionsfaktoren aktivieren. Interferone bilden hierbei eine wichtige Gruppe dieser antiviralen Signalmoleküle (Hong & Laimins 2017).

Interferone (IFN) können abhängig von ihrem Zielrezeptor in drei verschiedene Gruppen (Typ I, Typ II, Typ III) eingeteilt werden (Borden et al. 2007). Zu den Typ I Interferonen gehören beispielsweise IFN- α , IFN- β oder IFN- κ . Interferone dieser Gruppe binden an den Typ I Interferon Rezeptor, der aus den beiden Untereinheiten Interferon- α/β Rezeptor 1 (IFNAR1) und IFNAR2 besteht. Nach Bindung eines Interferons an den Rezeptor werden im Zytoplasma die Proteinkinasen Janus Kinase 1 (JAK1) und Tyrosin Kinase 2 (TYK2) aktiviert, die wiederum verschiedene Signalkaskaden aktivieren. Am Ende werden Interferon regulatorische Faktoren (IFRs) aktiviert, die an bestimmte Sequenzen in Promotoren, den interferon stimulated response element (ISRE), binden und dadurch die Expression von verschiedenen Interferon-stimulierten Genen (ISGs) aktivieren (Hong & Laimins 2017; LaFleur et al. 2001; Hardy et al. 2004).

Einen starken Effekt von Typ I Interferone auf Papillomvirusinfektionen konnte in Keratinozyten-Zelllinien mit replizierenden episomalen HPV16 und HPV31 Genomen gezeigt werden. Die Behandlung der Zellen mit 1000 U/ml IFN- β über mehrere Tage führte bei den meisten Zellen zu einem Wachstumsarrest oder zur Apoptose. Bei Untersuchungen der HPV16 positiven Zellen wurde gezeigt, dass vor der Reduktion der viralen Transkription die episodale Virus Kopienanzahl abnimmt. Die längere Behandlung mit IFN- β führte jedoch zur Integration der Virusgenome und zur Ausbildung einer Resistenz gegenüber IFN- β (Chang et al. 2002; Herdman et al. 2006).

Die Behandlung mit geringen Mengen IFN- β erhöhte hingegen die Kopienanzahl in Keratinozyten, die transient mit HPV11 oder HPV16 transfiziert wurden oder die HPV16 und HPV31 stabil replizierten. Darüber hinaus wurde die Aktivität des frühen HPV Promotors erhöht. Als Grund hierfür wird die Aktivierung von IRF1

genannt, der auch an ein ISRE im HPV Promotor bindet und diesen somit aktiviert (Lace et al. 2009).

IFN- κ wird zelltypspezifisch von Keratinozyten, von dendritischen Zellen und von Monozyten exprimiert. IFN- κ bindet wie auch IFN- β an Heparin und wird so sehr nahe am Produktionsort gehalten (Buontempo et al. 2006; LaFleur et al. 2001). In kultivierten menschlichen Keratinozyten konnte gezeigt werden, dass die Expression von IFN- κ im Gegensatz zu IFN- β keinen Stimulus wie beispielsweise eine virale Infektion benötigt. IFN- κ wurde in den untersuchten Keratinozyten in hohen Mengen konstitutiv exprimiert. Die Menge an IFN- κ übersteigt hierbei die Menge an IFN- β um das bis zu 500-fache (Reiser et al. 2011; LaFleur et al. 2001).

In Zellkulturversuchen wurde nachgewiesen, dass die IFN- κ Expression in Keratinozyten von HPV16, HPV18 und HPV31 inhibiert wird (Rincon-Orozco et al. 2009; DeCarlo et al. 2010; Reiser et al. 2011). Die ebenfalls nachgewiesene Abnahme der Expression von ISGs deutet darauf hin, dass IFN- κ für die Expression von ISGs in Keratinozyten wichtig ist. Darüber hinaus konnte in Biopsien von Zervix Karzinomen ebenfalls kein IFN- κ nachgewiesen werden (Rincon-Orozco et al. 2009; DeCarlo et al. 2010). Als Grund für die Inhibierung der IFN- κ Expression wird die Methylierung des IFN- κ Promotors durch HPV E6 und E7 angesehen. Der Einfluss von E6 wird hierbei als Wichtiger erachtet. Die Behandlung von HPV-positiven Zellen durch DNA-Methyltransferase-Inhibitor reaktiviert die Expression von IFN- κ (Reiser et al. 2011; Rincon-Orozco et al. 2009).

Die Überexpression von IFN- κ in Keratinozyten-Zelllinien mit replizierenden episomalen HPV31 Genomen verringerte die virale Transkription und Replikation und inhibierte das Wachstum der Zellen. Derselbe Effekt konnte auch durch die Behandlung mit IFN- β erreicht werden, was auf einen gemeinsamen Interferon-Mechanismus hindeutet. Erste Effekte der Interferonbehandlungen konnten schon nach 4 bis 6 Stunden beobachtet werden (Habiger et al. 2015).

Interferone induzieren zahlreiche ISGs. Viele ISGs wirken direkt oder indirekt antiviral. Das ISG IFIT1 ist beispielsweise ein Protein, dass die Replikation von HPV11 und HPV18 durch die Bindung an E1 direkt inhibiert (Terenzi et al. 2008).

Als weitere wichtige ISGs mit anti-PV Wirkung werden Sp100 Proteine als Bestandteile der nuclear domain 10 (ND10) bodies angesehen (Habiger et al. 2015; Stepp et al. 2013).

1.4 Papillomvirusinfektionen und ND10 bodies

ND10 Strukturen (auch bekannt als PML nuclear bodies) sind punktförmige Strukturen im Zellkern, die wahrscheinlich an vielen unterschiedlichen Zellfunktionen beteiligt sind. Sie werden aus verschiedenen konstitutiv exprimierten Proteinen zusammengesetzt, können aber auch durch Typ I und Typ II Interferone induziert werden. Das PML Protein formt das Gerüst der ND10 Strukturen. Sp100 Proteine und hDaxx Proteine lagern sich an PML an (Porter et al. 2016; Everett & Chelbi-Alix 2007; Chelbi-Alix et al. 1995).

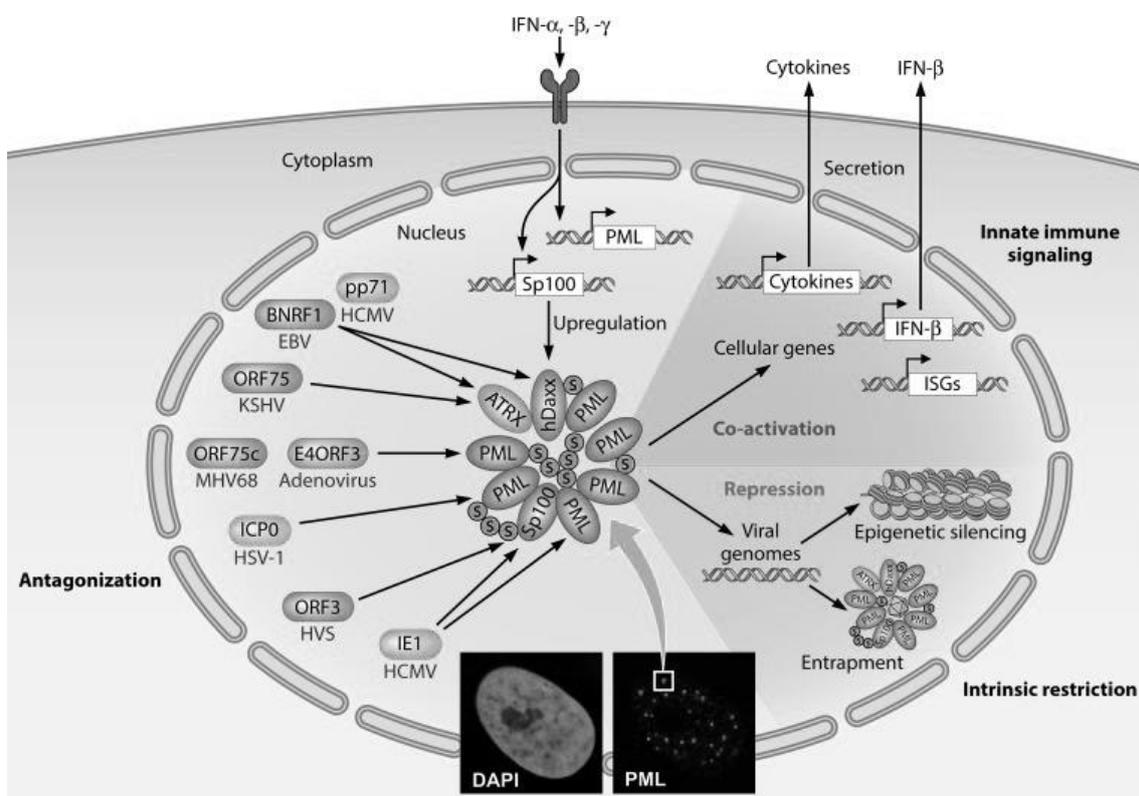


Abbildung 4: Die Rolle von ND10 Strukturen in intrinsischen Immunabwehrreaktionen und ihre Antagonisierung durch verschiedene virale Effektorproteine. (Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis) (Scherer & Stamminger 2016).

Den ND10 Strukturen wird eine wichtige Rolle bei der intrinsischen Abwehr von Virusinfektionen zugeschrieben. Die Genexpression von vielen DNA Viren wird zumindest teilweise durch ND10 Strukturen verringert. ND10 Strukturen wirken außerdem als Koaktivatoren für verschiedene Interferone und Zytokine. Trotzdem initiieren viele Viren ihre Transkription und Replikation an den ND10 Strukturen. Einige Viren umgehen den antiviralen Effekten von ND10 Strukturen, indem sie deren Funktion stören oder diese darüber hinaus strukturell und funktionell verändern und zu ihrem Vorteil nutzen (Everett & Chelbi-Alix 2007; Scherer & Stamminger 2016; Maul 1998).

Das virale HPV Kapsidprotein L2 positioniert sich kurz nach Infektion zusammen mit dem viralen Genom an den ND10 Strukturen. Das Vorhandensein von ausreichend PML Proteinen ist für Papillomviren bei der initialen Infektion wichtig. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich, dass PML selbst keine anti-HPV Wirkung besitzt, sich aber viele zelluläre Transkriptionsfaktoren, Replikationsfaktoren und DNA-Reparaturproteine an und oder in der Nähe von PML anlagern. Diese Proteine werden zum Teil auch von HPV für die Transkription und Replikation missbraucht (Stepp et al. 2013; Day et al. 2004; Porter et al. 2016).

hDaxx wirkt bei verschiedenen DNA Viren wie beispielsweise HCMV oder Adenoviren als Repressor der viralen Transkription. Bei HPV Infektionen hingegen verstärkt die Anwesenheit von hDaxx die virale Transkription und Replikation. Das L2 Kapsidprotein rekrutiert zusätzlich hDaxx zu den ND10 Strukturen, während es Sp100 Proteine verdrängt (Scherer & Stamminger 2016; Stepp et al. 2013; Kivipold et al. 2015; Florin et al. 2002).

1.5 Papillomvirusinfektionen und Sp100 Proteine

Durch unterschiedliches Spleißen können verschiedene Sp100 Isoformen entstehen. Im Menschen sind vier Sp100 Isoformen bekannt – Sp100A, Sp100B, Sp100C und Sp100HMG. Alle Isoformen können posttranslational in der heterochromatin protein 1 interaction region (HP1) SUMOyliert werden. Über die homogenously stained region (HSR) können die Proteine dimerisieren. Über die HSR wird auch die Lokalisation an die ND10 bodies ermöglicht (Berscheminski et al. 2014; Sternsdorf et al. 1997, Sternsdorf et al. 1999). Sp100B, Sp100C und Sp100HMG haben darüber hinaus eine SAND-Domäne (Sp100, AIRE-1, NucP41/45, DEAF-1), die die direkte Bindung an unmethylierte CpG DNA Sequenzen ermöglicht. (Bottomley et al. 2001; Isaac et al. 2006) Sp100C und Sp100HMG besitzen zusätzlich jeweils Bereiche, die mit Chromatin interagieren können. Sp100C nutzt hierfür sowohl eine bromodomain (Bromo), als auch eine plant homeodomain (PHD), während Sp100HMG zu diesem Zweck eine HMG-box nutzt (Berscheminski et al. 2014; Porter et al. 2016).

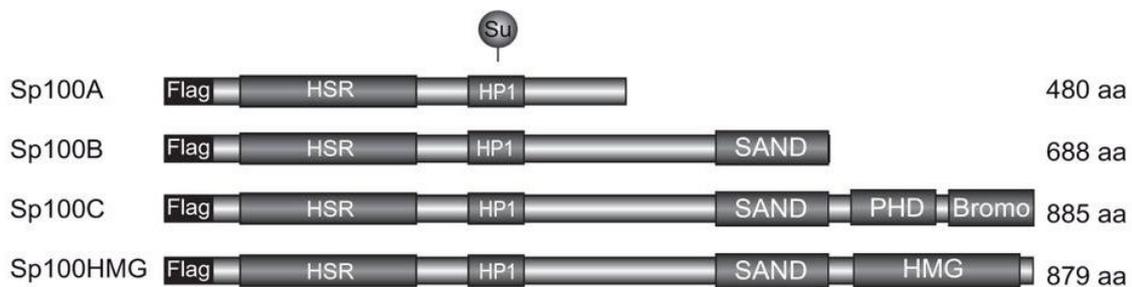


Abbildung 5: Humane Sp100 Isoformen. Die vier Isoformen entstehen durch unterschiedliches Spleißen und unterscheiden sich in ihrer Länge. aa: amino acid HSR: homogenously stained region; HP1: heterochromatin protein 1 interaction region; SAND: Sp100, AIRE-1, NucP41/45 and DEAF-1 domain; Bromo: bromodomain; PHD: plant homeodomain; HMG: high-mobility-group domain; Su: Sumo conjugation motif (Berscheminski et al. 2014).

Sp100 Proteine werden als Repressoren verschiedener viraler Infektionen beschrieben. Aktuelle Experimente weisen jedoch darauf hin, dass zwischen Sp100A und den anderen Isoformen unterschieden werden muss. Während die längeren Isoformen die virale Transkription unterdrücken, scheint Sp100A die Transkription eher zu verstärken (Berscheminski et al. 2014; Negorev et al. 2006; Newhart et al. 2013; Wilcox et al. 2005; Porter et al. 2016).

Sp100 Proteinen werden ebenfalls inhibierende Effekte gegenüber HPV zugeschrieben. Durch einen siRNA vermittelten Knock-down von Sp100 konnte gezeigt werden, dass während der Virusetablierung von HPV18 die Transkription um das 3- bis 6-fache ansteigt. Eine Steigerung der Replikation konnte ebenfalls beobachtet werden. Der Knock-down von Sp100 hatte in Keratinozyten mit stabil replizierenden HPV18 Genomen hingegen nur eine sehr schwache Erhöhung der Transkription zu Folge (Stepp et al. 2013). In einer weiteren Arbeit konnte neben HPV18 auch für HPV31 eine Erhöhung der viralen Transkription und Replikation durch den Knock-down von Sp100 belegt werden. Als Hauptmechanismus wird hierbei die Inhibierung der regulatorischen Regionen von HPV angesehen. Bei Überexpression der einzelnen Sp100 Isoformen in humanen Keratinozyten konnte für die Isoformen Sp100B, Sp100C und Sp100HMG eine starke Abnahme der Promotoraktivität von HPV18 und HPV31 nachgewiesen werden (Habiger et al. 2015).

1.6 Ziele dieser Arbeit

In vorangegangenen Experimenten unserer Arbeitsgruppe konnte nachgewiesen werden, dass die Reexpression von IFN- κ in humanen Keratinozyten mit stabil replizierenden HPV31 Genomen sowohl die virale Transkription und Replikation, als auch das Wachstum der Zellen inhibierte. Unter anderem mittels Transkriptionsanalyse konnte Sp100 als wichtiges durch IFN- κ induzierbares Gen mit anti-HPV Wirkung identifiziert werden (Habiger et al. 2015). Gleichzeitig scheint HPV die Expression von IFN- κ sowohl in vitro als auch in vivo zu unterdrücken (Rincon-Orozco et al. 2009; DeCarlo et al. 2010; Karstensen et al. 2006; Nees et al. 2001; Reiser et al. 2011). Auch die Expression von Sp100A und Sp100C ist in humanen Keratinozyten mit stabil replizierenden HPV Genomen reduziert (Habiger et al. 2015).

Ziel dieser Arbeit war es die in Zellkulturversuchen belegte anti-PV Wirkung von IFN- κ und Sp100 Proteinen in vivo zu untersuchen. Für die Tierexperimente wurde das Cottontail Rabbit Papillomavirus Modell genutzt. Im ersten Teil der Arbeit wurde Kaninchen IFN- κ und Sp100 charakterisiert und deren Wirkung auf CRPV in der Zellkultur überprüft. Im zweiten Teil der Arbeit wurden effektive IFN- κ und Sp100 shRNA Knock-down Sequenzen konstruiert und getestet. Mittels rekombinanten CRPV-shIFN- κ beziehungsweise CRPV-shSp100 Genomen konnte schließlich der Einfluss der antiviralen Proteine in vivo am Kaninchen untersucht werden.

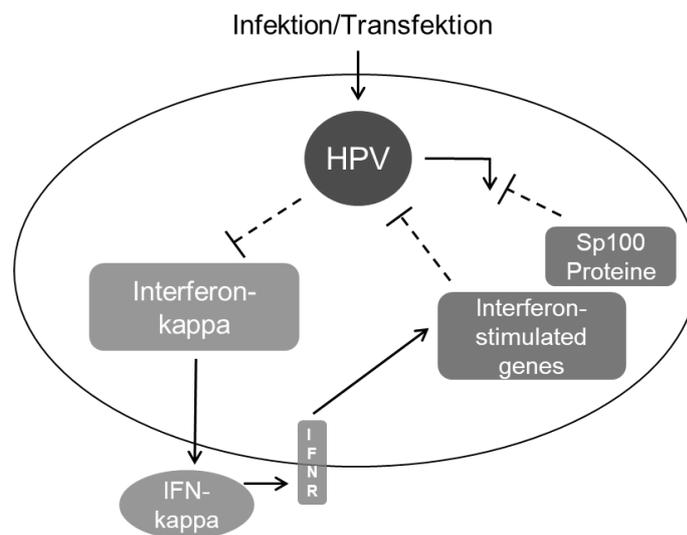


Abbildung 6: Vereinfachte schematische Darstellung des untersuchten Modells. HPV inhibiert über E6 die konstitutive Expression von IFN- κ . Gleichzeitig ist auch die Menge des ISGs Sp100 in Keratinozyten mit stabil replizierenden HPV Genomen reduziert. Sowohl IFN- κ als auch Sp100 haben in Zellkulturversuchen direkte oder indirekte anti-HPV Wirkung.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkulturmethoden

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen an einer Werkbank mit laminar-air-flow-System durchgeführt. Die Zellkulturen wurden als Adhäsionskulturen unter Standardbedingungen bei 37°C und befeuchteter 5 %-iger CO₂-Atmosphäre inkubiert.

2.1.1 Kultivierung von HEK293T

Bei der Zelllinie **HEK293T** handelt es sich um humane embryonale Nierenzellen, die mit Adenovirus E1A und SV40 Large-T-Antigen immortalisiert wurden (Graham et al. 1977). Diese Zelllinie wurde zur Herstellung von lentiviralen Partikel benötigt. Als Medium wurde DMEM-FKS (Dulbecco's Modified Eagle Medium und fötales Kälberserum) (*Gibco, Invitrogen, Carlsbad, USA*) in einem Verhältnis von 10:1 verwendet. Durch Zugabe von 1 µl Penicillin/Streptomycin (*Thermo Fisher, Waltham, USA*) pro ml Zellkulturmedium wurden die Zellkulturen vor biologischen Kontaminationen geschützt. Die Zellen wurden in Standard-Zellkulturschalen (*Nunc, Roskilde, Dänemark*) kultiviert und alle zwei bis drei Tage passagiert.

2.1.2 Kultivierung von Kaninchen-Keratinocyten

Bei der Zelllinie **AVS** (Asia Virus Stock) handelt es sich um primäre Kaninchen-Keratinocyten, die durch das CRPV-Genom immortalisiert wurden. Das CRPV-Genom liegt in episomaler Form vor (Huber et al. 2004).

Die Zelllinie **RK1-16E7/Ras** besteht aus immortalisierten Kaninchen-Keratinocyten, die das HPV16-E7-Gen, sowie das Protoonkogen Ras enthalten. Darüber hinaus besitzen die Zellen eine Neomycinresistenz (Jeckel et al. 2003).

Alle Kaninchen-Keratinocyten wurden in speziellen Microtest™ Primaria™ Zellkulturschalen (*Becton Dickson and Company, Franklin Lakes, USA*) kultiviert, die mit einer Mischung aus anionischen und kationischen Funktionsgruppen beschichtet sind. Als Zellkulturmedium wurde Keratinocyte-SFM (*Gibco, Invitrogen, Carlsbad, USA*) ohne Antibiotikum verwendet.

2.1.3 Passagieren von Zellen

Beim Passagieren einer 100 mm Zellkultur-Schale wurde zuerst das Medium abgesaugt und die Zellen mit 10 ml sterilem DPBS (*Gibco, Invitrogen, Carlsbad, USA*) gewaschen. Nach Zugabe von 2 ml Trypsin-EDTA (*Gibco, Invitrogen, Carlsbad, USA*) wurde die Zellkultur-Schale kurze Zeit im Brutschrank inkubiert. Nach Ablösen der Zellen wurde das Trypsin mit 8 ml serumhaltigem DMEM FKS (*Gibco, Invitrogen, Carlsbad, USA*) deaktiviert. Das Verhältnis von DMEM zu FKS betrug 10:1. Die sich nun im Medium befindlichen Zellen konnten anschließend im benötigten Verhältnis geteilt werden. Kaninchen-Keratinocyten wurden nach Inaktivierung durch DMEM FKS nochmals abzentrifugiert und im geeigneten Medium aufgenommen und geteilt. Für die Bestimmung der Zellanzahl pro Milliliter wurde eine Neubauer Zählkammer (*0,1 mm Tiefe, 0,0025 mm², Assistent - Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim v. d. Rhön*) verwendet.

2.1.4 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren von Zellen wurden diese wie beim Passagieren zuerst mit sterilem DPBS (*Gibco, Invitrogen, Carlsbad, USA*) gewaschen und anschließend mit 2 ml Trypsin-EDTA (*Gibco, Invitrogen, Carlsbad, USA*) von den annähernd vollen 100 mm Schalen gelöst. Nach Inaktivierung des Trypsins durch DMEM FKS (*Gibco, Invitrogen, Carlsbad, USA*) wurden die Zellen für 5 min bei 250 g zentrifugiert und das Pellet in 2 ml Einfriermedium resuspendiert und auf zwei Einfriereröhrchen

verteilt. Die Zellen wurden mit Hilfe einer Einfrierbox (*Mr. Frosty, Nalgene/Thermo Fisher, Waltham, USA*) langsam (1°C/min) auf -80°C eingefroren. Das verwendete Einfriermedium wurde aus dem jeweiligen Kultivierungsmedium mit entsprechendem Serum (FKS bei HEK293T; CS bei Kaninchen-Keratinocyten) (*Gibco, Invitrogen, Carlsbad, USA*) und 10 % DMSO hergestellt.

Zum Auftauen der Zellen wurde das Einfrier Röchen angewärmt und die Zellsuspension anschließend bei 250 g für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 2 ml Zellkulturmedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurden ein weiteres Mal abzentrifugiert und anschließend in 10 ml des passenden Mediums auf eine 100 mm Zellschale überführt. DMSO-Reste konnten durch das zweimalige Zentrifugieren zuverlässig entfernt werden, was vor allem beim Kultivieren von Kaninchen-Keratinocyten notwendig war.

2.1.5 DNA-Transfektion in Zellen mit einem Komplexbildner

Zur DNA-Transfektion in Zellen wurde der liposomenbasierte Komplexbildner FuGENE® HD (*Roche, Rotkreuz, Schweiz*) verwendet. Die zu transfizierenden Zellen wurden 24 Stunden zuvor in Kulturschalen ausgesät. Das Transfektionsgemisch bestehend aus OptiMEM (*Gibco, Invitrogen, Carlsbad, USA*), DNA und FuGENE® Reagenz wurde in einem nach Herstellerangaben optimalen Verhältnis in einem sterilen Polystyrol-Röhrchen gemischt (5 µl FuGENE® auf 2 µg DNA) und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde das Medium der Zellkulturen gewechselt. Abschließend wurde das Transfektionsgemisch tropfenweise in die Zellkulturschalen gegeben.

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Herstellung kompetenter Bakterienstämme

Zur Amplifikation von Plasmiden in Bakterien wurde der Bakterienstamm *Escherichia coli* DH5 α (*Clontech, Kyoto, Japan*) verwendet. Durch Behandlung mit CaCl₂, RbCl₂ und MnCl₂ erhielten die Bakterien die Fähigkeit zur Aufnahme von Plasmid-DNA (Ausubel et al. 1990).

2.2.2 Transformation von DNA in kompetente Bakterien

Zur Transformation von DNA in kompetente Bakterien wurde die Hitzeschockmethode nach Ausubel et al. 1990 durchgeführt. 100 μ l kompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und mit etwa 200 ng Plasmid-DNA versetzt. Nach mindestens 10-minütiger Inkubationszeit auf Eis wurde der Ansatz für eine Minute bei 42°C inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz wieder auf Eis abgekühlt und 900 μ l SOC-Medium hinzugegeben. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37°C im Schüttelinkubator wurden 150 μ l des Mediums auf ampicillinhaltigem Agar ausplattiert. Durch die auf den Plasmiden kodierte Ampicillinresistenz wuchsen auf der Agarplatte über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank nur Kolonien, die die Plasmid-DNA enthielten.

Herstellung von LB-Agar (Luria-Bertani-Agar): 25 g LB-Medium (Luria-Bertani-Medium) (*Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe*) und 12 g Select Agar (*Invitrogen, Carlsbad, USA*) wurden in 1 l H₂O gelöst. Der LB-Agar-Ansatz wurde autoklaviert, anschließend mit Ampicillin (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe) in der Konzentration 100 μ g/ml versetzt und noch warm in Portionen zu etwa 30 ml in Petrischalen gegossen.

SOC-Medium: 2 % (w/v) Bacto-Trypton (*Bacto Laboratories Pty Ltd, Mt Pritchard, Australia*); 0,5 % (w/v) Bacto-Yeast Extract; 10 mmol/l NaCl; 2,5 mmol/l KCl; 10 mmol/l MgCl₂; 10 mmol/l MgSO₄; 20 mmol/l Glucose; pH-Wert 7,0.

2.2.3 Bakterienkulturen zur Amplifizierung von DNA

Die Anzucht von Bakterien erfolgte je nach benötigter DNA-Menge entweder in 3 ml beziehungsweise 50 ml LB-Medium (Luria-Bertani-Medium) (*Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe*). Für die Herstellung von 1 l Bakterienkulturmedium wurden 25 g LB Medium Pulver in 1 l Wasser gelöst und autoklaviert. In das Nährmedium wurde darüber hinaus Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml gegeben. Je nach benötigter DNA Menge wurden entweder 3 ml LB-Medium für ein QIAprep® Spin Miniprep Kit oder 50 ml für ein QIAgen® Plasmid Plus Midi Kit (*Qiagen, Venlo, Niederlande*) mit einem Tropfen Bakterienlösung (beispielsweise aus einem Einfrierröhrchen) beimpft. Bei Klonierungen wurde das Medium hingegen mit einer möglichst isoliert liegenden Kolonie von der Agarplatte beimpft. Die Bakterienkulturen wurden bei 37°C im Schüttelinkubator über Nacht inkubiert. Aufgrund der enthaltenen Ampicillin-Resistenz der Plasmide konnte eine Selektion zugunsten der plasmidhaltigen Bakterien erreicht werden.

2.2.4 Langzeitlagerung von Bakterienkulturen

Zur Langzeitlagerung von Bakterien wurde 1 ml Bakteriensuspension im LB-Medium zum gleichen Teil mit einem zuvor hergestellten Bakterien-Einfriermedium (65% Glycerol (v/v), 0,1 mmol/l MgSO₄, 0,0025 mmol/l Tris bei einem pH-Wert von 8,0) vermischt und bei -80°C eingefroren und gelagert.

2.3 DNA-Methoden

Die Standard DNA-Methoden basieren auf Protokollen nach (Ausubel et al. 1990) und (Sambrook & Russell 2001) oder den Anleitungen der Kit-Hersteller.

2.3.1 Präparative Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Je nach benötigter DNA-Menge erfolgte die Isolierung von Plasmiden aus Bakterien entweder durch ein QIAprep® Spin Miniprep Kit oder ein QIAgen® Plasmid Plus Midi Kit (*Qiagen, Venlo, Niederlande*) nach dem Protokoll des Herstellers. Konzentration und Reinheit der DNA wurden mittels eines Spektralphotometers (*Nanodrop® ND-1000, Nalgene/Thermo Fisher, Waltham, USA*) gemessen.

2.3.2 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren (Agarosegele)

Abhängig von der Länge der zu trennenden DNA-Fragmente wurden für die Experimente Agarose-Gele mit einem Agaroseanteil zwischen 0,5 % und 2 % (w/v) hergestellt. Es wurde TAE-Puffer mit der entsprechend benötigten Menge an Agarpulver (*Invitrogen, Carlsbad, USA*) erhitzt und anschließend mit zwei Tropfen Ethidiumbromid pro 50 ml Gel vermischt. Als Spannungsquelle diente der PowerPack 200 (*Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA*), der an die Gelelektrophorese-Kammern (*Sub Cell GT, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA*) bei 100 Volt über ca. 60 Minuten angeschlossen wurde. Im Gel wurde der DNA-Längenmarker 1 kb DNA Ladder (*Invitrogen, Carlsbad, USA*) mitgeführt. Mit dem Kamerasystem Gel Doc 2000 (*Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA*) konnten die DNA-Banden unter UV-Licht dokumentiert werden.

50x TAE Puffer: 2 mmol/l Tris; 1 mmol/l CH₃COOH; 50 mmol/l EDTA; pH 8,5

2.3.3 DNA-Fragmentextraktion aus Agarosegelen

Nach dem Ausschneiden der DNA-Banden unter UV-Licht wurde für die DNA-Extraktion aus dem Agarosegel und anschließender Aufreinigung das QIAquick® Gel Extraction Kit (*Qiagen, Venlo, Niederlande*) nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.3.4 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Bei der Konstruktion neuer rekombinanter DNA-Plasmide war es notwendig DNA an bestimmten Positionen mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen zu spalten. Es wurden hierfür sowohl Enzyme der Firma New England Biolabs (*Ipswich, USA*) sowie von Thermo Fisher (*Waltham, USA*) nach Angaben der Hersteller verwendet. Zur Trennung der Fragmente wurde anschließend eine Gelelektrophorese durchgeführt.

2.3.5 Dephosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten

Vor der Ligation von DNA-Fragmenten ist es notwendig, eines der beiden Fragmente zu dephosphorylieren. Für diesen Zweck wurde Alkalische Phosphatase (*New England Biolabs, Ipswich, USA*) nach dem Protokoll des Herstellers verwendet.

2.3.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von linearen DNA-Fragmenten wurde mittels Rapid DNA Ligation Kit (*Thermo Fisher, Waltham, USA*) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die daraus entstandenen DNA-Plasmide wurden anschließend in kompetente Bakterien transformiert. Hierzu wurden 5 µl des Ligationsansatzes verwendet.

2.3.7 Hybridisierung von Oligonukleotiden zu doppelsträngiger DNA

Die Oligonukleotid DNA-Sequenzen für die shRNAs wurden als einzelsträngige DNA vom Hersteller (*Biomers, Ulm*) synthetisiert. Die Sequenzen wurden deshalb im ersten Schritt mit der jeweils komplementären DNA hybridisiert. Nach Lösen der Oligonukleotide in H₂O mit einer Endkonzentration von 1 µg/µl wurden jeweils 12,5 µl der forward und reverse Oligonukleotide mit 25 µl 2-fach Hybridisierungspuffer gemischt. Der Ansatz wurde mit folgendem Programm in einem Thermal Cycler (*PTC 200 Peltier, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA*) inkubiert:

- 5 min 95°C
- 10 min 70°C
- 10 min 60°C
- 10 min 50°C
- 10 min 40°C
- 10 min 25°C
- ∞ 4°C

Die Temperatur wurde zwischen jedem Schritt mit einer Geschwindigkeit von 0,1°C/s verändert.

2-fach Hybridisierungspuffer: 200 mmol/l Kaliumacetat; 4 mmol/l Magnesiumacetat; 60 mmol/l HEPES-KOH; pH 7,4

2.3.8 Amplifikation von DNA mittels PCR

Zur Amplifizierung von DNA wurde eine Polymerase Kettenreaktion mit spezifischen Primern und dem Pyrobest DNA-Polymerase Kit (*Takara Bio, Mountain View, USA*) durchgeführt.

Der PCR-Ansatz mit Puffer, Nukleotiden, Primern, DNA-Polymerase und DNA-Template wurde nach dem Kit-Protokoll von Takara Bio hergestellt und im Thermal Cycler (*PTC 200 Peltier, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA*) inkubiert:

➤ Initiale Denaturierung	5 min	95°C	} 30 Zyklen
➤ Denaturierung	10 s	95°C	
➤ Primerbindung	30 s	55°C	
➤ Elongation	60 s	72°C	
➤ Finale Elongation	10 min	72°C	
➤ Ende	∞	4°C	

Abschließend war bei dieser Technik ein Restriktionsverdau, sowie die Auftrennung und Aufreinigung der DNA-Sequenzen mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese und DNA-Gelextraktion notwendig, bevor das Amplifikat beispielsweise zur weiteren Klonierung verwendet werden konnte.

Um spezifische Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen zu Beginn oder am Ende eines Amplifikationsproduktes zu erzeugen wurde bei Bedarf eine PCR Mutagenese durchgeführt. Hierbei wurden längere Primer verwendet, die vor ihrem zum Amplifikat komplementären Teil bestimmte Schnittstellen codierende Sequenzen enthielten.

2.3.9 Sequenzierung von DNA

Sequenzierungen wurden extern von der Firma GATC Biotech AG (*Konstanz*) durchgeführt.

2.4 RNA-Methoden

2.4.1 Isolation von RNA aus eukaryotischen Zellen

Zur Isolation von Gesamt-RNA wurden die Zellen direkt in den Zellkulturschalen durch RLT-Puffer lysiert und das Lysat anschließend mit dem QIAshredder® Kit (*Qiagen, Venlo, Niederlande*) homogenisiert. Danach wurde mit dem RNeasy® Mini Kit (*Qiagen, Venlo, Niederlande*) die RNA nach dem Protokoll des Herstellers aus dem Lysat isoliert. Nach Elution in 40 µl RNase-freiem Wasser wurde die Konzentration und Reinheit der RNA mittels eines Spektralphotometers (*Nanodrop® ND-1000, Nalgene/Thermo Fisher, Waltham, USA*) bestimmt.

2.4.2 Synthese von cDNA

Für die cDNA Synthese aus isolierter Gesamt-RNA wurde das QuantiTect® Reverse Transcription Kit (*Qiagen, Venlo, Niederlande*) nach dem Protokoll des Herstellers verwendet. Nach der Synthese wurde die cDNA mit 100 µl H₂O versetzt und stand anschließend für eine quantitative Real-Time PCR bereit.

2.4.3 Quantitative Real-Time PCR (qPCR)

Mit der quantitativen Real-Time PCR ist es möglich eine Bestimmung der absoluten oder relativen Kopienanzahl von cDNA oder DNA durchzuführen. Als qPCR-Gerät wurde der LightCycler 480® (*Roche, Rotkreuz, Schweiz*) genutzt. Der verwendete MasterMix LightCycler® SYBR Green Master I lagert sich unspezifisch in doppelsträngige DNA ein und führt somit parallel zur Amplifikation der DNA auch zu einer Verstärkung der emittierten Floreszenz. Abhängig von den gewählten Primerpaaren werden somit spezifische Transkripte quantifiziert.

Pro Reaktionsansatz in einer LightCycler® 480 Multiwell Platte 96 wurden 14 µl MasterMix vorgelegt. In einer Reaktionskammer befanden sich somit:

- 10 µl SYBR Green Master I

- 2 µl Primer Forward (3 pmol)
- 2 µl Primer Reverse (3 pmol)

Anschließend wurden jeweils 6 µl der zu analysierenden cDNA-Proben in zwei Wells gegeben. Durch die Duplikate konnten Messungenauigkeiten reduziert werden. Bei der aus Kaninchenhaut und Papillomen isolierten DNA wurden die Proben zuvor in einem Verhältnis von 1:60 mit H₂O verdünnt. Im Anschluss wurde die Platte mit einer transparenten Abdeckfolie versiegelt und in einer Zentrifuge für 5 min bei 4000 rpm abzentrifugiert.

Die Polymerase Kettenreaktion und Analyse der Proben erfolgte im LightCycler 480 mit folgendem Programm:

- | | | | |
|--------------------------|--------|------|-------------|
| ➤ Initiale Denaturierung | 10 min | 95°C | } 45 Zyklen |
| ➤ Denaturierung | 10 s | 95°C | |
| ➤ Primerbindung | 15 s | 55°C | |
| ➤ Elongation | 15 s | 72°C | |
| ➤ Schmelzkurve | | | |

Der LightCycler ermittelte die CP-Werte (Crossing Point) der einzelnen Wells und gab somit als Wert den Zyklus aus, an dem die emittierte Fluoreszenz eines Reaktionsansatzes einen kritischen Wert überstieg. Bei der relativen Auswertung der Genexpression wurde die Expression des zu untersuchenden Zielgens auf ein konstant exprimiertes Referenzgen bezogen. Auf diese konstitutiv exprimierten Gene wie beispielsweise GAPDH oder α-Tubulin hatten die zu untersuchenden Versuchsvariablen keinen Einfluss. Mit Hilfe folgender Formel konnten so Aussagen über das Verhalten der mRNA-Expression im Vergleich zu einer Kontrollprobe getätigt werden (Pfaffl 2001):

$$rel. mRNA - Expr. = \frac{Primereffizienz_{Zielgen}^{CP\Delta_{Probe} (Kontrollgen-Zielgen)}}{Primereffizienz_{Kontrollgen}^{CP\Delta_{Kontrollprobe} (Kontrollgen-Zielgen)}}$$

Die Effizienz der Primer wurde entweder zusammen mit einer Standardkurve berechnet oder es wurde vereinfacht eine Effizienz von 2 angenommen.

Standardkurven dienten darüber hinaus zur absoluten Quantifizierung der mRNA beziehungsweise der DNA-Kopien Anzahl in einer Probe. Bei der Erstellung einer

Standardkurve wurde im ersten Schritt eine Verdünnungsreihe eines Referenzplasmides mit bekannter Kopienanzahl erstellt und im LightCycler mit den passenden Primern analysiert. Aus den gemessenen CP-Werten erstellte die Software des LightCyclers die Standardkurve, die nun für die Anwendung auf weitere Experimente zur Verfügung stand. Zur Kalibrierung der Kurve musste bei folgenden Experimenten ein Wert aus der Verdünnungsreihe neben den zu untersuchenden Proben mitgeführt werden.

qPCR-Primer

Folgende Primer wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific / Invitrogen (*Waltham, USA*) für die quantitative Real-Time PCR synthetisiert:

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	
ocGAPDH F	TGCACCACCAACTGCTTAGC	
ocGAPDH R	GGCGTGCACCGTGGTCATGAG	
oc α -Tubulin F	GCTTCTTGGTTTTCCACAGC	
oc α -Tubulin R	GGTGGTGAGGATGGAGTTGT	
ocSp100 F	GTCCCTGTGCAAAAAGTGGT	
ocSp100 R	CTCTCTCTCCTCCACCATCG	
ocSp100 B/C/HMG F	ACGGACCAAAAAGTGACCAAG	
ocSp100 B/C/HMG R	GAGGCACCTTTCAGCAACTC	
ocIFIT1 F	GAAGGCCGAAGGAAGAGAGT	
ocIFIT1 R	GGCCTATCTGGTGGTGAAGA	
ocIFN- κ F	CCAGATGGAGAAAAGGGACA	(Eff: 1,903)
ocIFN- κ R	TTCCTCAGCTCCAGGTTGTT	(Eff: 1,903)
ocIFN- β F	AATCGCTCTCCTGTTGTGCT	
ocIFN- β R	CTGGAGCTGTTGTGGTTCCT	
ocIFN- ϵ F	TGGGGAGAAAATGACTTGG	
ocIFN- ϵ R	CTGGGCTTCCAGGTAGTCAC	
ocIFN- λ F	GGATGCCTTGAAGAGTCAC	
ocIFN- λ R	CAGAACCTTCAGCGACATGA	
ocGAPDH-DNA F	TGCACCACCAACTGCTTAGC	(Eff: 1,993)
ocGAPDH-DNA R	GGCGTGCACCGTGGTCATGAG	(Eff: 1,993)

Material und Methoden

CRPV E1 2093 F	ATGCTTCATCTCTGCTGCTG	
CRPV E1 2179 R	ACAATGCAACAGCGACACTC	
CRPV E2 1306 F	AATCGACTGCTATCCGCATC	
CRPV E2 3085 R	AGTTCTAAGGTGGACCAGAACC	
CRPV LE6 106 F	AACGCATTGCCAGGAATTT	
CRPV LE6 306 R	ATACGGCCACCCTTTATGC	
CRPV SE6/LE6 330 F	CTGCAGAGACTGCACTGTATTG	(Eff: 1,992)
CRPV SE6/LE6 467 R	CTTCCGCAAACACTGTACAACG	(Eff: 1,992)
CRPV E1^E4 1338 F	GTGCCCGGAGTGTTGTAA	
CRPV E1^E4 3751 R	GGTGTCTTCAGGGGCACT	
CRPV SD7810-SA3714 F	GCCAGGTGTGCATGACTCT	
CRPV SD7810-SA3714 R	CTGGTGACCTTGACCTTCGT	

2.5 Spezielle Methoden und Versuchsaufbau der Zellkultur-Experimente

2.5.1 Behandlung von Kaninchen-Keratinocyten mit Interferon- β

Im ersten Versuch wurden Kaninchen-Keratinocyten der RK1 16E7/ras Zelllinie in 6-well Platten ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Zellkulturmedium gewechselt und mit 100 U/ml oder 1000 U/ml humanem rekombinantem IFN- β (*PeproTech Inc., Rocky Hill, USA*) versetzt. Weitere 6 Stunden später wurde die Expression von IFIT1 und der Sp100 Isoformen mittels Real-Time PCR bestimmt.

Für den zweiten Versuch wurden AVS-Zellen verwendet. Die Zellen wurden wie im ersten Versuch mit unterschiedlichen Konzentrationen von IFN- β behandelt. Die Expression von GAPDH, IFIT1, Sp100 und die viralen E2 und E6 Transkripte wurden durch Real-Time PCR Analysen nach 6 Stunden sowie nach 24 Stunden bestimmt.

2.5.2 Behandlung von Kaninchen-Keratinocyten mit Interferon- κ aus Zellkultur-Überstand

Im Gegensatz zu humanem IFN- β ist Kaninchen IFN- κ nicht kommerziell erhältlich. Da IFN- κ nach der Proteinbiosynthese in den Zellkulturüberstand abgegeben wird (Habiger et al. 2015), wurde stattdessen der IFN- κ haltige Überstand genutzt.

Es wurden AVS-Zellen in 100 mm Platten ausgesät und 24 Stunden später mit dem Plasmid pSG5-ocIFN- κ transfiziert. Das Expressionsplasmid für Kaninchen IFN- κ wurde von Christina Habiger am virologischen Institut Tübingen aus dem eukaryontischen Expressionsplasmid pSG5 (Stratagene, San Diego, USA) hergestellt. Die Expression des inserierten IFN- κ Gens steht hierbei unter der Kontrolle des frühen SV40 Promotors. 24 Stunden nach der Transfektion wurde das Zellkulturmedium gewechselt und nach weiteren 24 Stunden wurde der Überstand entnommen und mit Hilfe von 0,22 μ m Filtern (Millipore, Merck KGaA,

Darmstadt) sterilfiltriert. Als Kontrolle wurden AVS-Zellen mit einem unveränderten pSG5 Vektor transfiziert. Mit dem Überstand wurde in der gleicher Weise verfahren.

Die sterilfiltrierten Überstände wurden unverdünnt beziehungsweise in einer 1:10 Verdünnung auf untransfizierte AVS-Zellen gegeben. Die AVS-Zellen wurden 24 Stunden zuvor in 6-Well Platten ausgesät. Nach einer Inkubationszeit von 6 Stunden wurden die behandelten Zellen geerntet, RNA isoliert und cDNA synthetisiert. In der anschließenden qPCR wurde die Expression von Sp100 und die viralen Transkripte E2 und E6 gemessen.

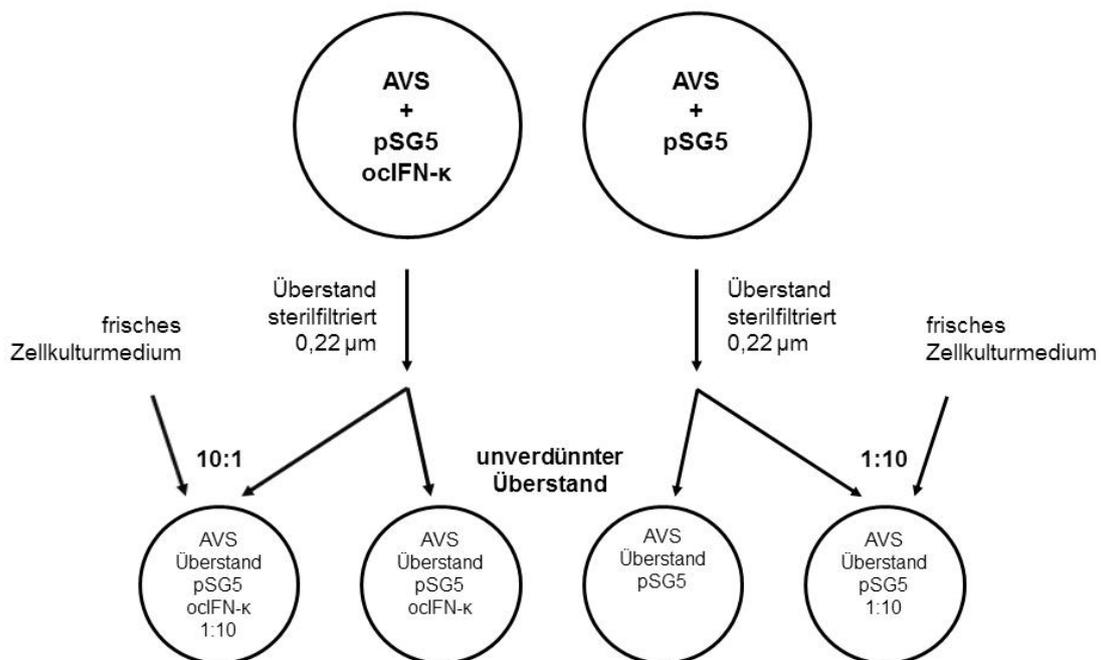


Abbildung 7: Versuchsaufbau - Behandlung von Kaninchen-Keratinocyten mit IFN-κ aus Zellkultur-Überstand. Überstand von zuvor mit pSG5 oder pSG5-oclIFN-κ transfizierten AVS-Zellen wurde entweder unverdünnt oder in einer 1:10 Verdünnung auf untransfizierte AVS Zellen überführt. Nach einer Inkubationszeit von 6 Stunden wurden die Zellen geerntet und RNA isoliert.

2.5.3 Luziferase-Reporteranalysen zur Bestimmung der HPV und CRPV Promotor Aktivität bei Sp100 Überexpression

Um die Aktivität regulatorischer DNA-Abschnitte bestimmter Gene zu untersuchen, können Luziferase-Reporteranalysen durchgeführt werden. Für die Analyse wurde das Firefly-Luziferasegen hinter den oder die zu untersuchenden

Promotor(en) kloniert und das rekombinante Konstrukt in Zellen transfiziert. Durch die Quantifizierung des emittierten Lichtes, das bei der Oxidation des Luziferasesubstrats D-Luziferin entsteht und mit Hilfe eines Luminometers (*Lumat LB 9507, Berthold Technologies GmbH & Co.KG, Bad Wildbad*) bestimmt wurde, konnte Rückschluss auf die die Promotoraktivität gezogen werden. Um Schwankungen bei der Transfektionseffizienz auszuschließen beziehungsweise rechnerisch korrigieren zu können, wurden die Zellen neben dem zu untersuchenden Promotorkonstrukt zusätzlich mit einem Gaussia-Luziferase-Plasmid pCMV-Gluc (*New England Biolabs, Ipswich, USA*) cotransfiziert. Die Gaussia-Luziferase wird von den Zellen synthetisiert und anschließend in den Überstand sekretiert, wo die Aktivität des Enzymes getrennt von der Firefly-Luziferase, die sich in den Zellen befindet, bestimmt werden konnte.

Ziel des Versuches war es den Einfluss von den verschiedenen humanen Sp100 Isoformen auf die URR-Aktivität von HPV31 und CRPV in Kaninchen-Keratinocyten zu untersuchen. Ein ähnlicher Versuch wurde zuvor mit der URR von HPV31 und der URR von HPV16 in CIN612-9E Zellen durchgeführt (Habiger et al. 2015). Im verwendeten CRPV URR Reporterkonstrukt befanden sich die CRPV Promotoren P1 und P2 sowie PL, sodass mit diesem Reporterkonstrukt die Aktivität aller drei Promotoren erfasst werden konnte. (Delcuratolo et al. 2016). Daneben wurde in einem zweiten Versuch mit einem anderen Reporterkonstrukt die Aktivität der HPV31 URR und somit die Aktivität des frühen HPV Promotors PE untersucht (Fertey et al. 2011). Als Expressionsvektoren wurden die Plasmide pSG5-Flag-Sp100-A, pSG5-Flag-Sp100-B, pSG5-Flag-Sp100-C, pSG5-Flag-Sp100-HMG verwendet, die neben der jeweiligen Sp100 Isoform ein FLAG-Epitop am N-Terminus enthalten und unter Kontrolle des frühen SV40 Promotors stehen (Guldner et al. 1999). Als Kontrolle wurde der leere Expressionsvektor pSG5 (*Stratagene, San Diego, USA*) benutzt.

Für die Luziferase-Reporteranalysen wurden 24-well Platten verwendet, wobei 50 000 AVS-Zellen pro well ausgesät wurden. Am nächsten Tag wurden die Zellen entweder mit den Reporterkonstrukt HPV31 URR oder CRPV URR, einem Expressionsplasmid sowie dem Gaussia-Luziferase-Plasmid pCMV-GLuc transfiziert.

Transfektionsansatz pro well:

- 25 µl OptiMEM
- 200 ng Reporterkonstrukt (HPV31 URR oder CRPV URR)
- 200 ng Expressionsplasmid (pSG5, pSG5-Sp100A/B/C/HMG)
- 1 ng pCMV-GLuc
- 1 µl FuGENE® HD

24 Stunden nach der DNA-Transfektion wurde das Medium der Zellen gewechselt, 48 Stunden nach Transfektion erfolgten die Analysen im Luminometer.

Im ersten Schritt erfolgte die Bestimmung der Gaussia-Luziferase-Aktivität mit Hilfe des Gaussia-Juice Big Kit (*PJK GmbH, Kleinblittersdorf*). Es wurden aus jedem well 5 µl des Zellkulturüberstandes entnommen mit 100 µl Gaussia-Juice vermischt, wobei der Gaussia-Juice zuvor mit 2 µl CTZ (Coelenterazine) pro 100 µl versetzt wurde. Das emittierte Licht der enzymkatalysierten Reaktion wurde im Luminometer gemessen.

Im anschließenden Analyseschritt wurde die Firefly-Luziferase-Aktivität bestimmt. Die Zellen jedes wells wurden zuerst zweimal mit 500 µl kaltem PBS-Puffer gewaschen und danach in 150 µl Lysispuffer aufgenommen und auf Eis gelagert. Jeweils 100 µl Reaktionspuffer wurden mit 100 µl des Lysats vermischt und im Luminometer mit 100 µl Luziferinlösung zur Reaktion gebracht. Für jeden Transfektionsansatz wurden Doppelwerte gemessen und anschließend der Mittelwert bestimmt. Durch Bildung des Quotienten aus RLU (Firefly)/RLU (Gaussia) konnten Unterschiede in der Transfektionseffizienz rechnerisch korrigiert werden.

Luziferase-Lysispuffer: 100 mmol/l Kaliumphosphatpuffer pH 7,8; 1 % (v/v) Triton-X 100; 1 mmol/l DTT

Luziferase-Reaktionspuffer: 100 mmol/l Kaliumphosphatpuffer pH 7,8; 15 mmol/l MgSO₄; 5 mmol/l ATP

Luziferin-Lösung: 1 mmol/l D-Luziferin (*PJK GmbH, Kleinblittersdorf*) in Luziferase-Reaktionspuffer gelöst

10x PBS: 137 mmol/l NaCl; 2,7 mmol/l KCl; 1,5 mmol/l KH₂PO₄ pH 7,2

2.5.4 Herstellung lentiviraler shIFN- κ und shSp100 Expressionsplasmide

Konstruktion der Plasmide

Die stabile Expression von shRNAs durch Plasmide in eukaryotischen Zellen ermöglicht einen effektiven Knock-down von Genen mittels RNA-Interferenz (Svoboda et al. 2001). Aufgrund der schwankenden und wenig vorhersagebaren Effektivität von shRNA-Konstrukten wurden insgesamt sechs verschiedene shRNAs gegen IFN- κ und elf shRNAs gegen Sp100 konstruiert und in der Zellkultur getestet.

Als Vektor für die Expression der shRNAs wurde das lentivirale Plasmid pLKO.1 puro (*Plasmid #8453 Addgene, Cambridge, USA*) verwendet. Vorangegangene Experimente der Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass der Promotor H1 für die Expression von shRNAs innerhalb eines rekombinanten CRPV-Konstrukts, welches später für die Tierversuche verwendet wurde, gut geeignet ist (Leiprecht et al. 2014) Der U6 Promotor in pLKO.1 puro wurde deshalb durch den RNA III Polymerase Promotor H1 ersetzt. Hierzu wurde mit dem Plasmid pSUPER.basic (*OligoEngine, Seattle, USA*) als Template und den Primern H1 ClaI F sowie H1 EcoRI R eine PCR durchgeführt. Via PCR Mutagenese wurden die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen ClaI und EcoRI um das H1-Promotor Amplifikat erzeugt. Das Produkt wurde anschließend mit den passenden Restriktionsenzymen verdaut und mit Hilfe einer Gelelektrophorese aufgereinigt.

Nach Verdau des pLKO.1 puro durch die Restriktionsendonukleasen ClaI und EcoRI sowie der Dephosphorylierung durch alkalische Phosphatase konnte der Vektor mit dem PCR-Produkt ligiert werden. In das rekombinante Plasmid pLKO.1-H1 puro konnten anschließend die Sequenzen der shRNAs kloniert werden.

Für die Konstruktion von shRNAs gibt es verschiedene Software Tools, die beispielsweise von Biotechnologieunternehmen bereitgestellt werden und durch

verschiedene Algorithmen möglichst effiziente shRNA-Sequenzen vorhersagen. Aufgrund der Vielzahl an Empfehlungen für die Konstruktion effektiver shRNAs und deren unterschiedlicher Gewichtung geben verschiedene Tools ungleiche shRNA-Sequenzen aus. Es wurden deshalb fünf verschiedene Tools genutzt und shRNA-Sequenzen verwendet, die von möglichst vielen Tools als effektiv bewertet wurden. Als Zielsequenzen wurde neben IFN- κ die Transkriptvariante X1 des *Oryctolagus cuniculus* Sp100 Gens verwendet.

Die einzelsträngigen Oligonukleotide der unten gelisteten shRNA-Sequenzen wurden zu doppelsträngiger DNA hybridisiert. Anschließend wurde der Vektor pLKO.1-H1 puro mit den Restriktionsenzymen EcoRV und Sall verdaut und jeweils mit den einzelnen shRNA-Sequenzen ligiert. Abschließend wurden die pLKO-Konstrukte mittels Sequenzierung überprüft.

Primer

Folgende Primer wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific / Invitrogen (*Waltham, USA*) synthetisiert und für die PCR-Mutagenese oder zur Sequenzierung verwendet.

Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')
H1 ClaI F	aattatATCGATACGTAcgcatcaaccgc
H1 EcoRI R	atatatGAATTCGTCGACccggGATATCgtggtctcatacagaact
pLKO seq R	TCTTTCCCCTGCACTGTACC

Hergestellte Plasmide und shRNA-Sequenzen

Die im Folgenden gelisteten lentiviralen shRNA-Expressionsplasmide wurden in diesem Arbeitsschritt hergestellt. Die Oligonukleotide wurden von der Firma biomers.net GmbH (*Ulm*) synthetisiert und gereinigt.

Plasmid	pLKO.1-H1 (Vektor ohne shRNA Sequenz)
Plasmid	pLKO.1-H1-shIFN-κ-A
shRNA-Sequenz	shIFN-κ-A F
Forward (5' – 3')	ccccGTGACTTCTTGAATGTAAAttcaagagaTTAACATTCAAGAAGTCACttttgg

Material und Methoden

shRNA-Sequenz Reverse (5' – 3')	shIFN-κ-A R tcgaccaaaaaGTGACTTCTTGAATGTAAAtctcttgaaTTAACATTCAAGAAGTCACgggg
Plasmid	pLKO.1-H1-shIFN-κ-B
shRNA-Sequenz Forward (5' – 3')	shIFN-κ-B F ccccGCCATTCATTTCCCATAGAGTtcaagagaACTCTATGGGAAATGAATGGCttttgg
shRNA-Sequenz Reverse (5' – 3')	shIFN-κ-B R tcgaccaaaaaGCCATTCATTTCCCATAGAGTtctcttgaaACTCTATGGGAAATGAATGGCgggg
Plasmid	pLKO.1-H1-shIFN-κ-C
shRNA-Sequenz Forward (5' – 3')	shIFN-κ-C F ccccGGAACAATGCCTAATGGAAttcaagagaCCTTGTTACGGATTACCTTttttgg
shRNA-Sequenz Reverse (5' – 3')	shIFN-κ-C R tcgaccaaaaaGGAACAATGCCTAATGGAAtctcttgaaCCTTGTTACGGATTACCTTgggg
Plasmid	pLKO.1-H1-shIFN-κ-D
shRNA-Sequenz Forward (5' – 3')	shIFN-κ-D F ccccGGAAGTATTTCTACAGGATtcaagagaATCCTGTAGAAATACTTCCttttgg
shRNA-Sequenz Reverse (5' – 3')	shIFN-κ-D R tcgaccaaaaaGGAAGTATTTCTACAGGATtctcttgaaATCCTGTAGAAATACTTCCgggg
Plasmid	pLKO.1-H1-shIFN-κ-E
shRNA-Sequenz Forward (5' – 3')	shIFN-κ-E F ccccGTGTCTAAGAGAAATCAAAttcaagagaTTTGATTTCTCTTAGACACttttgg
shRNA-Sequenz Reverse (5' – 3')	shIFN-κ-E R tcgaccaaaaaGTGTCTAAGAGAAATCAAAtctcttgaaTTTGATTTCTCTTAGACACgggg
Plasmid	pLKO.1-H1-shIFN-κ-F
shRNA-Sequenz Forward (5' – 3')	shIFN-κ-F F ccccCTGGAAGATAAGAAATACAGTtcaagagaACTGTATTTCTTATCTTCCAGttttgg
shRNA-Sequenz Reverse (5' – 3')	shIFN-κ-F R tcgaccaaaaaCTGGAAGATAAGAAATACAGTtctcttgaaCTGTATTTCTTATCTTCCAGgggg
Plasmid	pLKO.1-H1-shSp100-A
shRNA-Sequenz Forward (5' – 3')	shSp100-A F ccccGCCAAGGGATCAAAGTAACTtcaagagaAGTTAACTTTGATCCCTTGGCttttgg
shRNA-Sequenz Reverse (5' – 3')	shSp100-A R tcgaccaaaaaGCCAAGGGATCAAAGTAACTtctcttgaaAGTTAACTTTGATCCCTTGGCgggg

Plasmid	pLKO.1-H1-shSp100-B
shRNA-Sequenz	shSp100-B F
Forward (5' – 3')	ccccGCAGGAATACCCTGATTTAATtcaagagaATTAAATCAGGGTATTCCTGCttttgg
shRNA-Sequenz	shSp100-B R
Reverse (5' – 3')	tcgacacaaaaGCAGGAATACCCTGATTTAATtctcttgaaATTAAATCAGGGTATTCCTGCgggg
Plasmid	pLKO.1-H1-shSp100-C
shRNA-Sequenz	shSp100-C F
Forward (5' – 3')	ccccGCACAACCTTGCCTGGAAATGttcaagagaCATTTCCAGGCAAAGTTGTGCttttgg
shRNA-Sequenz	shSp100-C R
Reverse (5' – 3')	tcgacacaaaaGCACAACCTTGCCTGGAAATGtctcttgaaCATTTCCAGGCAAAGTTGTGCgggg
Plasmid	pLKO.1-H1-shSp100-D
shRNA-Sequenz	shSp100-D F
Forward (5' – 3')	ccccGACATAAAGTGGAGATTTCAAttcaagagaTTGAAATCTCCACTTTATGTCTttttgg
shRNA-Sequenz	shSp100-D R
Reverse (5' – 3')	tcgacacaaaaGACATAAAGTGGAGATTTCAAtctcttgaaTTGAAATCTCCACTTTATGTCTgggg
Plasmid	pLKO.1-H1-shSp100-E
shRNA-Sequenz	shSp100-E F
Forward (5' – 3')	ccccGCGAACTCATCACAGACAAttcaagagaTTGTCTGTGATGAGTTTCGCTttttgg
shRNA-Sequenz	shSp100-E R
Reverse (5' – 3')	tcgacacaaaaGCGAACTCATCACAGACAAtctcttgaaTTGTCTGTGATGAGTTTCGCGgggg
Plasmid	pLKO.1-H1-shSp100-F
shRNA-Sequenz	shSp100-F F
Forward (5' – 3')	ccccCCAGGAAGCCAACAAGCAAAttcaagagaTTGCTTGTGGCTTCCTGGttttgg
shRNA-Sequenz	shSp100-F R
Reverse (5' – 3')	tcgacacaaaaCCAGGAAGCCAACAAGCAAAtctcttgaaTTGCTTGTGGCTTCCTGGgggg
Plasmid	pLKO.1-H1-shSp100-G
shRNA-Sequenz	shSp100-G F
Forward (5' – 3')	ccccGCAAGGAGAAAGGACACATCctcaagagaGGATGTGTCTTTCTCCTTGCTttttgg
shRNA-Sequenz	shSp100-G R
Reverse (5' – 3')	tcgacacaaaaGCAAGGAGAAAGGACACATCctctcttgaaGGATGTGTCTTTCTCCTTGCGgggg
Plasmid	pLKO.1-H1-shSp100-H
shRNA-Sequenz	shSp100-H F
Forward (5' – 3')	ccccGCAGCCATCTGACGTCATAGTtcaagagaACTATGACGTCAGATGGCTGCttttgg

Material und Methoden

shRNA-Sequenz	shSp100-H R
Reverse (5' – 3')	tcgacaaaaaGCAGCCATCTGACGTCATAGTtctcttgaaACTATGACGTCAGATGGCTGCgggg
Plasmid	pLKO.1-H1-shSp100-I
shRNA-Sequenz	shSp100-I F
Forward (5' – 3')	ccccGCAGAACAGACACAGGCAAttcaagagaTTGCCTGTGTCTGTTCTGCttttgg
shRNA-Sequenz	shSp100-I R
Reverse (5' – 3')	tcgacaaaaaGCAGAACAGACACAGGCAAtctcttgaaTTGCCTGTGTCTGTTCTGCgggg
Plasmid	pLKO.1-H1-shSp100-J
shRNA-Sequenz	shSp100-J F
Forward (5' – 3')	ccccGCAGAGGAACGGCTGATCTATtcaagagaATAGATCAGCCGTTCTCTGCttttgg
shRNA-Sequenz	shSp100-J R
Reverse (5' – 3')	tcgacaaaaaGCAGAGGAACGGCTGATCTATtctcttgaaATAGATCAGCCGTTCTCTGCgggg
Plasmid	pLKO.1-H1-shSp100-K
shRNA-Sequenz	shSp100-K F
Forward (5' – 3')	ccccGGAAGCTCCTGTGACTATTtcaagagaAATAGTCACAGGAGCTTCCttttgg
shRNA-Sequenz	shSp100-K R
Reverse (5' – 3')	tcgacaaaaaGGAAGCTCCTGTGACTATTtctcttgaaAATAGTCACAGGAGCTTCCgggg

Tabelle 1: Übersicht über die hergestellten lentiviralen Expressionsplasmide inklusive der shRNA-Sequenzen.

Verwendete Tools zur Konstruktion der shRNA-Sequenzen:

siRNA Wizard v3.1 (Invivogen, 2015)

BLOCK-iT™ RNAi Designer (ThermoFisher, 2015)

siDESIGN Center tool (GE Healthcare Dharmacon, 2015)

i-Score Designer (Nagoya University Graduate School of Medicine, 2015)

siDirect version 2.0 (siDirect web server, 2015)

2.5.5 Herstellung von stabilen Interferon- κ und Sp100 Knock-down Zelllinien

Um die Effektivität der shRNAs zu bestimmen wurden Zelllinien hergestellt, die die IFN- κ und Sp100 Knock-down shRNAs stabil transkribierten. Hierzu wurden infektiöse lentivirale Partikel benötigt, die die Knock-down-Plasmide in das Genom der Kaninchen-Keratinocyten integrierten.

Für die Herstellung der infektiösen Partikel wurden in 60 mm-Schalen Zellen der Zelllinie HEK293T ausgesät. 24 Stunden später wurden diese jeweils mit einem der lentiviralen Plasmide pLKO.1-H1-sh[...] transfiziert. Die lentiviralen Verpackungsplasmide psPAX und pMD2.G (*Addgene Plasmid #12259 / #12260, Cambridge, USA*) wurden im selben Arbeitsschritt in gleicher Menge wie der pLKO.1 Vektor mit jeweils 2 μ g kotransfiziert. Das Medium wurde 24 Stunden nach Transfektion gewechselt, bevor die viralen Partikel wiederum 24 Stunden später geerntet werden konnten. Der virushaltige Überstand wurde durch einen 0,22 μ m Filter sterilfiltriert, anschließend schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Quantifizierung des Knock-down Effekts wurden entweder AVS Zellen oder die Zelllinie RK1-16E7/Ras verwendet. Die zu infizierenden Zellen wurden am Vortag der Infektion in 60-mm Schalen ausgesät. Der eingefrorene virushaltige Überstand wurde aufgetaut, angewärmt und mit 5 μ g/ml Polybrene (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Darmstadt*) versetzt. Das Medium der Kaninchen-Keratinocyten wurde abgezogen und der virushaltige Überstand anschließend auf die Zellen gegeben. Da sich das Medium der Keratinocyten vom Medium der HEK293T unterscheidet, wurde 4 Stunden nach Infektion die gleiche Menge an frischem Keratinocyten-Medium hinzugegeben. Am darauf folgenden Tag wurde der Überstand der Zellen durch frisches Zellkulturmedium ersetzt und 6 Stunden später die Selektion durch 2 μ g Puromycin (*Calbiochem Novabiochem GmbH, Sandhausen*) pro ml Zellkulturmedium begonnen. Die Zellen wurden vor der Verwendung für weitere Versuche zweimal passagiert und durchgehend unter Puromycin gehalten.

Hergestellte Keratinozyten-Zelllinien

Im Rahmen dieses Arbeitsschrittes wurden folgende Zelllinien hergestellt:

RK1-16E7/Ras pLKO.1-H1	RK1-16E7/Ras shSp100 E
RK1-16E7/Ras shIFN- κ A	RK1-16E7/Ras shSp100 F
RK1-16E7/Ras shIFN- κ B	AVS pLKO.1-H1
RK1-16E7/Ras shIFN- κ C	AVS shSp100 A
RK1-16E7/Ras shIFN- κ D	AVS shSp100 B
RK1-16E7/Ras shIFN- κ E	AVS shSp100 D
RK1-16E7/Ras shIFN- κ F	AVS shSp100 G
RK1-16E7/Ras shSp100 A	AVS shSp100 H
RK1-16E7/Ras shSp100 B	AVS shSp100 I
RK1-16E7/Ras shSp100 C	AVS shSp100 K
RK1-16E7/Ras shSp100 D	

2.5.6 Untersuchung der Zellproliferation der Sp100 Knock-down

Keratinozyten

Für die Bestimmung der Zellproliferation zweier stabiler Sp100-Knock-down Keratinozytenzelllinien (AVS shSp100 B und AVS-shSp100 D) im Vergleich zur Zelllinie mit leerem Knock-down-Vektor (AVS pLKO.1-H1) wurden pro Zelllinie je zwei Wells mit 150.000 Zellen in 6-well Platten ausgesät. Am 2. und darauffolgenden Tag wurde eine von den insgesamt vier angefertigten Platten verwendet und die Zellzahl jedes Wells dieser Platte nach Ablösung der Zellen durch Trypsin in einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Hierdurch konnte in einer Versuchsreihe für jede Zelllinie an jedem Tag Doppelwerte bestimmt werden. Am dritten Tag wurde das Medium aller verbleibenden Platten durch frisches Zellkulturmedium ersetzt.

2.6 Spezielle Methoden und Versuchsaufbau der Tierexperimente

Alle durchgeführten Tierexperimente wurden vom Regierungspräsidium Tübingen genehmigt (Genehmigung H2/13). Es wurde auf Einhaltung aller geltenden Tierschutzgesetze geachtet.

2.6.1 Herstellung von rekombinanten CRPV-shIFN- κ und CRPV-shSp100 Genomen

Ziel war es eine shRNA Expressionskassette direkt in das CRPV-Genom zu integrieren. Hierbei wurde auf ein in unserer Arbeitsgruppe etabliertes rekombinantes CRPV-Konstrukt zurückgegriffen.

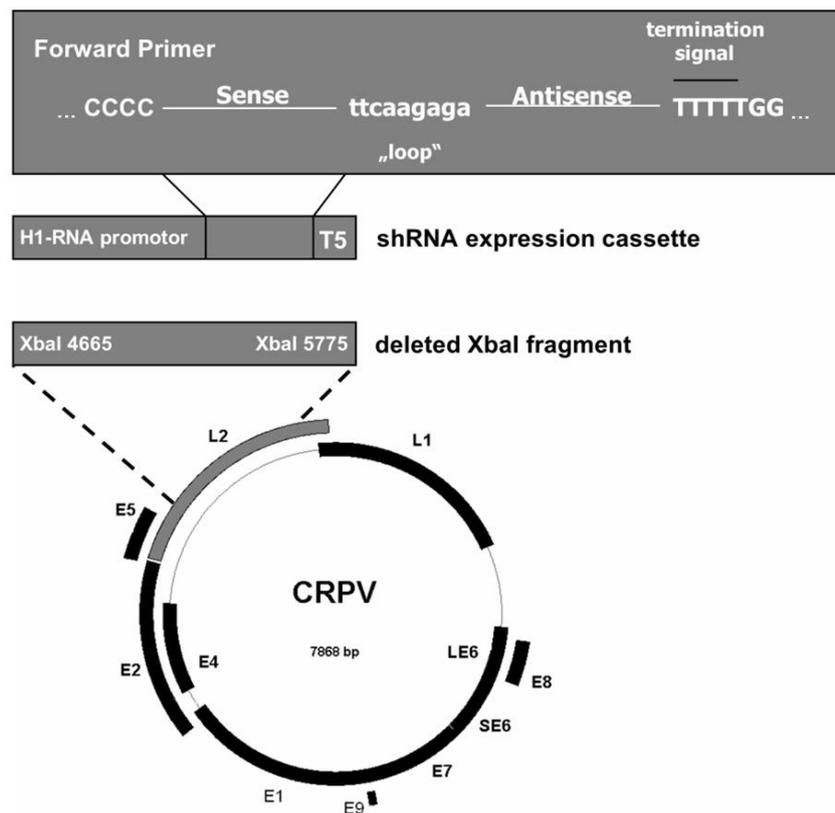


Abbildung 8: Rekombinantes CRPV-Genom. Anstelle des L2-Gens befindet sich die shRNA-Expressionskassette (nach Leiprecht et al. 2014).

Das CRPV-Xba1-mcs Genom (Probst et al. 2012) besteht aus einem CRPV-Genom, das mit XbaI verdaut wurde. Hierbei wurden die Nukleotide 4665 bis 5775 aus dem L2-Gen entfernt und durch eine Multiple Cloning Site ersetzt. Trotz des Fehlens des L2-Gens findet eine Papillombildung in Kaninchenhaut statt, die wenige Wochen zuvor mit dem Virusgenom infiziert wurde. Die Integration der shRNA Expressionskassetten wurde ähnlich wie in (Leiprecht et al. 2014) beschrieben aber mit einer anderen Klonierungsstrategie durchgeführt. Das Plasmid CRPV-Xba1-mcs wurde mit SnaBI und XhoI verdaut und anschließend mit Phosphatase behandelt. Das linearisierte Plasmid wurde danach mittels Gelelektrophorese aufgereinigt. Aus ausgewählten pLKO.1-H1-sh[...] Plasmiden mit hohem Knock-down Effekt wurde die shRNA Expressionskassette mittels SnaBI und Sall herausgeschnitten und das kurze DNA-Fragment ebenfalls mittels Gelelektrophorese aufgereinigt. Abschließend konnten beide DNA-Fragmente zum fertigen Plasmid ligiert werden.

Primer

Folgender Primer wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific / Invitrogen (*Waltham, USA*) synthetisiert und zur Sequenzierung verwendet.

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')
CRPV seq 6218 R	TGGGATTCTCGACATCATCA

Plasmide

Die im folgenden gelisteten CRPV-shRNA Genome wurden in diesem Arbeitsschritt hergestellt. Die Oligonukleotidsequenzen der shRNAs sind in der Tabelle 1 gelistet.

Bezeichnung	Verwendet in
CRPV-shIFN- κ B	Experiment #1
CRPV-shIFN- κ D	Experiment #1
CRPV-shSp100 B	Experiment #1 und #2
CRPV-shSp100 D	Experiment #1 und #2
CRPV-shSp100 G	Experiment #2
CRPV-shSp100 H	Experiment #2

2.6.2 Präzipitation der CRPV-DNA an Gold und Beladen der Tefzel-Schläuche

Für die Infektion der Kaninchenhaut wurde das Helios® Gene tem (*Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA*) verwendet. Sämtliche Verbrauchsmaterialien und Zubehörteile zu diesem System wurden, falls nicht anders angegeben, ebenfalls von Bio-Rad bezogen. Mit Hilfe der Gene Gun wurde die an Gold präzipitierte CRPV-DNA mit hohem Druck direkt in das Kaninchenepithel geschossen. Zunächst mussten die rekombinanten CRPV-Genome an die 1,0 µm großen Goldpartikel gekoppelt werden. Um unspezifische Effekte und Immunantworten zu vermeiden, wurde Endotoxin freie DNA verwendet. Die benötigte DNA wurde aus Bakterien mittels des EndoFree® Plasmid Maxi Kit (*Qiagen, Venlo, Niederlande*) isoliert. Bei der Wahl der DNA-Konzentration pro Gene Gun Patrone wurde sich an vorangegangenen unveröffentlichten Experimenten unserer Arbeitsgruppe orientiert. Während beim Einsatz einer DNA-Konzentration von 1 µg/µl im Präzipitationsansatz eine Papillom-Induktionsrate von 90 % mit dem CRPV Wildtyp-Konstrukt erreicht wird, wurde bei der gewählten Konzentration von 100 ng/µl eine Induktionsrate von 30 % pro Infektionsstelle erwartet (Xi & Iftner, persönliche Mitteilung). Die reduzierte Infektionsdosis wurde gewählt, um eine mögliche höhere und niedrigere Infektiosität der rekombinanten CRPV-Genome detektieren zu können.

Für die Herstellung von 100 Patronen (in Form von kurzen Kunststoffschläuchen) wurde 50 mg Gold in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß abgewogen und 100 µl kaltes 0,05 mmol/l Spermidin (*Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe*) zugegeben. Die Suspension wurde anschließend 4-mal 10 Sekunden sonifiziert (duty cycle 40 %) und dazwischen durch vortexen gemischt. Anschließend wurde 100 µl Endotoxin freie DNA der Konzentration 100 ng/µl zugegeben und durch nochmaliges vortexen gemischt. Durch die langsame Zugabe von 100 µl CaCl₂-Lösung in einer Konzentration von 1 mmol/l wurde die DNA gefällt und bei Raumtemperatur 10 min inkubiert. Nach Bindung der DNA an die Goldpartikel wurde das Gold für 15 Sekunden bei 10 000 rpm abzentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und anschließend durch Zugabe von 1 ml 100 % Ethanol gewaschen. Insgesamt wurde der Waschschrift 3-mal durchgeführt. Zum Abschluss wurden die

Goldpartikel in 6 ml Ethanol aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Im nächsten Arbeitsschritt wurde die an Gold gebundene DNA innenseitig auf Ethylen-Tetrafluorethylen-Copolymer (ETFE/Tefzel) Schläuche gebracht. Hierzu wurde der Kunststoffschlauch einmalig zu Beginn zur Trocknung 20 Minuten mit Stickstoff durchflutet. Es wurde ein Volumenstrom von 0,4 l pro Minute genutzt. Danach wurde vom Schlauch ein Teilstück von etwa 75 cm abgeschnitten, das nochmals unter dem Durchfluss von Stickstoff 5 Minuten getrocknet wurde. Die Gold/DNA-Ethanol-Mischung wurde bis auf Raumtemperatur erwärmt und zur Durchmischung der Suspension 3-mal abwechselnd 5 Sekunden sonifiziert und 5 Sekunden gevortext. Es wurde mit Hilfe einer Spritze bis zur kompletten Füllung des Schlauches etwa 3 ml der Suspension aufgezogen. Anschließend wurde der gefüllte Schlauch in die drehbare Vorrichtung von Bio-Rad eingelegt. Nach 4 Minuten, in denen sich das Gold absetzte, konnte der Ethanol langsam abgezogen werden. Um die Goldpartikel an der Schlauchinnenseite gleichmäßig zu verteilen wurde der Schlauch in der automatischen Vorrichtung von Bio-Rad zuerst ruckartig für 20 Sekunden, danach für eine Minute gleichmäßig gedreht. Anschließend wurde der Schlauch durch vollständiges Einführen in die Vorrichtung mit dem Stickstoffdurchfluss verbunden und unter konstantem gleichmäßigem Drehen 4 Minuten getrocknet. Zuletzt wurde der Schlauch mit Hilfe eines Schneidegeräts in für die Gene Gun passende kurze Stücke geschnitten. Aus einem 75 cm langen Schlauchstück konnten in etwa 60 Patronen geschnitten werden, die bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert wurden.

2.6.3 Qualitätskontrolle der Gene Gun Patronen

Zur Sicherstellung der gleichmäßigen Kopplungseffizienz der einzelnen Konstrukte wurden je 5 Patronen aus jedem Präzipitationsansatz untersucht. Die 5 Patronen wurden in ein 2 ml Eppendorfgefäß mit 500 µl TE-Puffer (*Qiagen, Venlo, Niederlande*) gegeben. Anschließend wurde das Eppendorfgefäß 3-mal abwechselnd 10 Sekunden sonifiziert (duty cycle 40 %) und gevortext. Das Gold

wurde 5 Minuten bei 12 000 rpm abzentrifugiert. Abschließend wurden 2 µl aus dem Überstand entnommen und mittels qPCR untersucht, wobei das Primerpaar CRPV SE6/LE6 verwendet wurde.

$$\frac{m}{V} = \frac{X_{Kopienanzahl} * m_{CRPVsh[...]}}{V_{Probe\ qPCR}}$$
$$Konz. \frac{ng}{ul} = \frac{X_{Kopienanzahl} * \frac{650 \frac{g}{mol}}{N_A} * 10508 * 10^9}{2ul}$$
$$1 \frac{ng}{ul} \triangleq 100 \%$$

Durch die vorangegangene Erstellung einer Standardkurve war es möglich mit der errechneten Masse eines einzelnen Plasmides und des bekannten eingesetzten Volumens die Kopplungseffizienz zu berechnen.

2.6.4 Infektionsschemata der Tierexperimente

Es wurden nacheinander zwei Tierexperimentreihen mit je 5 Kaninchen durchgeführt. Das Infektionsschema wurde im zweiten Experiment aufbauend auf die Ergebnisse des ersten Experimentes verändert. Der Fokus des zweiten Experimentes lag vollständig auf Sp100. Als Kontrollkonstrukt wurde in beiden Experimenten CRPV-shLuc verwendet, welches eine shRNA gegen Luziferase exprimiert (Leiprecht et al. 2014). Aus vorangegangenen Experimenten unserer Arbeitsgruppe sind keine Off-Target Effekte von CRPV-shLuc bekannt. Jedes Kaninchen wurde mit 5 verschiedenen CRPV-Konstrukten an je vier Stellen infiziert. Jede Infektionsstelle wurde mit 10 Schuss aus der Gene Gun (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) bei einem Druck von 350 psi behandelt.

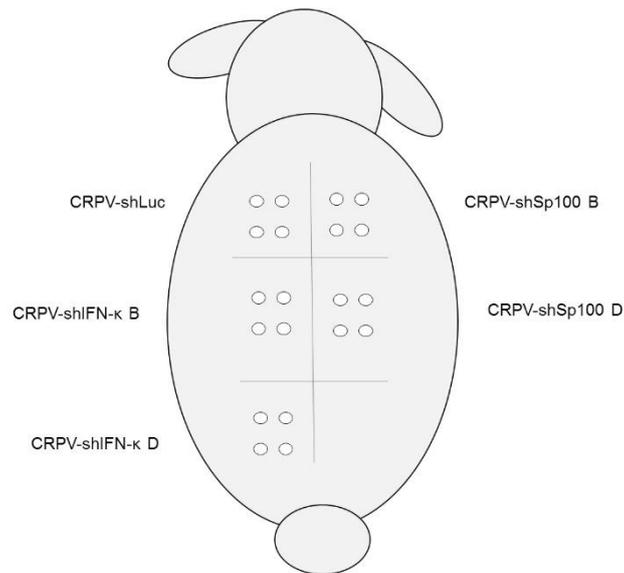


Abbildung 9: Infektionsschema Tierexperiment #1. Im ersten Tierexperiment wurden fünf Kaninchen der Spezies New Zealand White rabbit (Charles River Laboratories, Wilmington, USA) mit fünf verschiedenen CRPV-Konstrukten infiziert. Pro Konstrukt wurden vier Stellen mit je zehn Schuss infiziert.

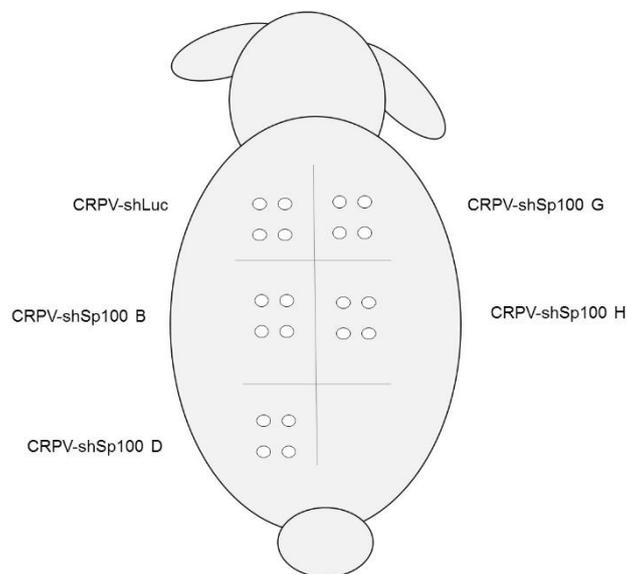


Abbildung 10: Infektionsschema Tierexperiment #2. Im zweiten Tierexperiment wurde der Versuchsaufbau geändert. Die Knock-down Konstrukte gegen IFN-κ wurden durch zwei weitere Knockdown Konstrukte gegen Sp100 ersetzt. Es wurden wiederum fünf Kaninchen der Spezies New Zealand White rabbit (Charles River Laboratories, Wilmington, USA) mit den CRPV-Konstrukten infiziert. Pro Konstrukt wurden vier Stellen mit je zehn Schuss infiziert.

2.6.5 Injektion der CRPV-DNA in Kaninchenhaut

Für die Versuche wurden Kaninchen der Spezies New Zealand White rabbit (*Charles River Laboratories, Wilmington, USA*) verwendet. Es handelte sich hierbei um Kaninchen aus Auszuchtstämmen. Die Narkose erfolgte mit 35 mg/kg Ketamin (*WDT e.G., Garbsen, Deutschland*) als Opiat und 0,25 mg/kg Medetomidin (*Albrecht GmbH, Aulendorf, Deutschland*) als Sedativum durch intramuskuläre Injektion. Im Anschluss wurden zwei Flächen beidseits der Wirbelsäule mit einer Schermaschine frei rasiert. Mit einem Nassrasierer wurden auch feinere Haare entfernt. Zur Markierung der Infektionsstellen und zur einfacheren Unterscheidung der CRPV-Konstrukte wurden mit einem Handtätowiergerät und schwarzer Tätowierfarbe (*jeweils bezogen von Eickemeyer - Medizintechnik für Tierärzte KG, Tuttlingen*) Punkte und Trennlinien tätowiert. Vor Injektion der DNA wurde die Haut vorsichtig mit einem feinen Sandpapier aufgeraut.

Im Anschluss konnte die an Gold gekoppelte DNA mit der Gene Gun in die Haut des Kaninchens injiziert werden. Mit einem Druck von 350 psi wurde jede Stelle 10-mal beschossen.

2.6.6 Bestimmung der Papillomprogression und Biopsientnahme

Die Papillomanzahl wurde nach 6, 10 und 12 Wochen bestimmt. Zusätzlich wurden die Papillome nach 10 und 12 Wochen in ihrer Länge und Breite vermessen. Da es hierfür erforderlich war die Kaninchen erneut zu rasieren, wurden die Kaninchen zuvor narkotisiert. Nach 12 Wochen wurden die Papillome vollständig entnommen und in Flüssigstickstoff schockgefroren.

2.6.7 Isolation von RNA aus den Papillombiopsien

Die schockgefrorenen Papillome wurden bis zur Isolation von RNA auf -80°C gelagert oder in flüssigem Stickstoff belassen. Je nach Größe des Papilloms wurde meist ein Viertel davon in 2,5 ml RLT-Puffer gegeben und mit einem Ultra-Turrax (*IKA® T18 basic, IKA IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen im Breisgau*)

auf höchster Stufe eine Minute zerkleinert. Bei kleinen Papillomen wurde die Hälfte des Papilloms in 0,8 ml RLT-Puffer gegeben. Nach jedem Papillom wurde der Aufsatz des Ultra-Turrax gewechselt, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden. 2 ml der Proben wurden in ein Eppendorfgefäß überführt und bei 14 000 rpm für 2 Minuten zentrifugiert. Aus dem Überstand konnte anschließend wie unter 2.4.1 beschrieben mit Hilfe eines RNeasy® Mini Kit (*Qiagen, Venlo, Niederlande*) die RNA isoliert werden.

2.6.8 Isolation von DNA aus den Papillombiopsien

Für die Isolation von DNA wurde das DNeasy® Blood & Tissue Kit (*Qiagen, Venlo, Niederlande*) verwendet. Hierbei wurden 0,25 mg eines Papilloms über Nacht bei 56°C mit Proteinase K verdaut. Eine Probe wurde nach Möglichkeit aus der Mitte des Papilloms entnommen, wobei die Schnittprobe darüber hinaus über die komplette vertikale Achse des Papilloms angefertigt wurde. Im weiteren Verlauf wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren. Vor einer weiterführenden Analyse mittels Real-Time PCR mussten die Proben aufgrund der hohen DNA-Konzentration in einem Verhältnis von 1:60 verdünnt werden.

3 Ergebnisse

Die Ergebnisse der Versuche mit Sp100 Proteinen wurden zum Teil bereits in (Wurdak et al. 2018) veröffentlicht. Die bereits veröffentlichten Ergebnisse sind in den Bildunterschriften der Abbildungen kenntlich gemacht. Der jeweilige Verweis umfasst auch die zugehörige Beschreibung der Ergebnisse.

3.1 Vergleich von Interferon- κ und Sp100 Isoformen zwischen Mensch und Kaninchen

Um besser beurteilen zu können, ob und in wie weit Ergebnisse der Zellkulturversuche und Tierexperimente auf den Menschen übertragbar sind, wurden die mRNA- und Aminosäuresequenzen von IFN- κ und Sp100 zwischen Mensch und Wildkaninchen (*Oryctolagus cuniculus*) verglichen. Die im Folgenden verwendeten Nukleotid- und Proteinsequenzen stammen aus den Datenbanken des National Center for Biotechnology Information (NCBI), USA. Die Sequenzalignments wurden ebenfalls mit den Algorithmen des NCBI durchgeführt.

3.1.1 Interferon- κ mRNA Alignment – Mensch/Kaninchen

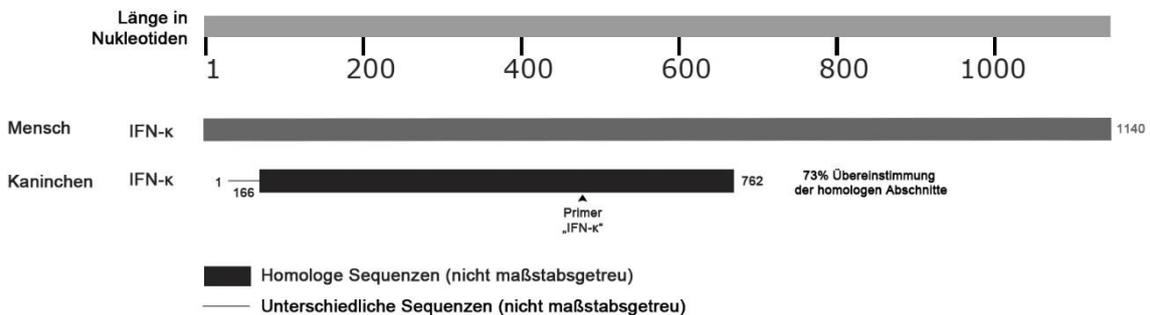


Abbildung 11: mRNA Sequenzalignment zwischen humanem IFN- κ und IFN- κ des Kaninchens. Die verwendeten Nucleotidsequenzen stammen aus den Datenbanken des NCBI. Die Sequenzalignments wurden ebenfalls mit den BLAST Algorithmen des NCBI durchgeführt.

Beim mRNA Sequenzalignment zeigte sich, dass die menschliche Sequenz von IFN- κ mit 1140 Basenpaaren deutlich länger ist als die mRNA Sequenz des Kaninchens mit 762 Basenpaaren. Die homologen Abschnitte weisen eine Übereinstimmung von 73 % auf. Für Real-Time PCR Analysen von IFN- κ wurde ein bereits in unserer Arbeitsgruppe etabliertes Primerpaar verwendet.

3.1.2 Interferon- κ Protein Alignment – Mensch/Kaninchen

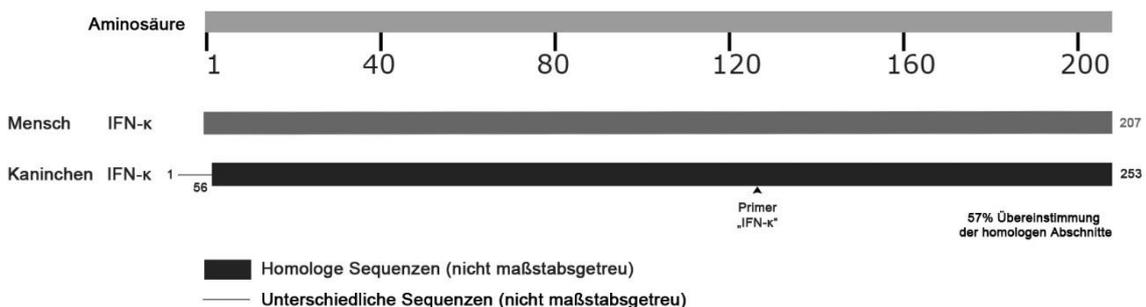


Abbildung 12: Protein Sequenzalignment zwischen humanem IFN- κ und IFN- κ des Kaninchens. Die verwendeten Nucleotidsequenzen stammen aus den Datenbanken des NCBI. Die Sequenzalignments wurden ebenfalls mit den BLAST Algorithmen des NCBI durchgeführt.

Im Gegensatz zur mRNA ist die IFN- κ Aminosäurekette des Kaninchens mit 253 Aminosäuren zu 207 Aminosäuren länger als die des Menschen. Die homologen Abschnitte weisen mit etwa 57 % eine niedrigere Übereinstimmung auf.

3.1.3 Die Sp100 Isoformen des Kaninchens

Ein Alignment der Sp100 Proteine wurde bereits in ähnlicher Form in (Wurdak et al. 2018) veröffentlicht. Das Sp100 Gen des Kaninchens ist auf Chromosom 7 lokalisiert. Durch unterschiedliches Spleißen können nach Vorhersagen des NCBI acht verschiedene mRNA Sequenzen beziehungsweise Protein-Isoformen entstehen. Die einzelnen Sp100 Isoformen werden in ihrer Benennung durchnummeriert (X1 bis X8). Sp100 Variante X1 ist die längste Sp100 Isoform mit 602 Aminosäuren (mRNA Sequenz 1989 Basenpaare), wobei keine Sp100 Isoform kürzer als Sp100 Variante X8 mit 552 Aminosäuren ist (mRNA Sequenz 1840 Basenpaare). Die Proteine Sp100 X2, X4, X5, X7 und X8 unterscheiden sich im Vergleich zur X1-Isoform nur hinsichtlich des Fehlens von einzelnen kurzen Aminosäuresequenzen innerhalb der Aminosäurekette. Sp100 X3 und X7 besitzen hingegen alternative C-Termini. Insgesamt sind sich alle Isoformen sehr ähnlich. Inwieweit die Vorhersagen der NCBI Algorithmen über die Spleißformen der mRNA Sequenzen und der daraus hervorgehenden Proteine zutreffen, oder ob es auch bedeutende posttranslationale Modifikationen an den Sp100 Proteinen der Kaninchen gibt, ist unbekannt.

3.1.4 Sp100 mRNA Alignment – Mensch/Kaninchen

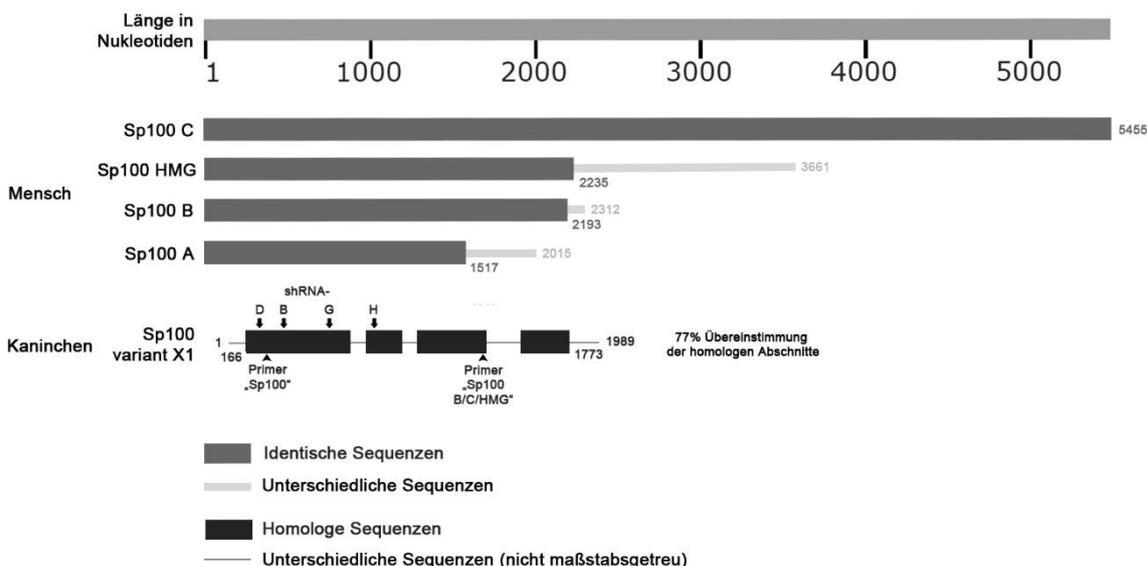


Abbildung 13: mRNA Sequenzalignment zwischen den humanen Sp100 Isoformen und der Sp100 variant X1 Isoform des Kaninchens. Die verwendeten Nucleotidsequenzen stammen aus den Datenbanken des NCBI. Die Sequenzalignments wurden ebenfalls mit den BLAST Algorithmen des NCBI durchgeführt.

Es wurde mit allen menschlichen Sp100 mRNA Sequenzen und der längsten Sp100 Sequenz des Kaninchens Sp100 X1 ein Alignment durchgeführt. Abbildung 13 zeigt schematisch die Ergebnisse des Sequenzvergleichs.

Bei den menschlichen Sp100 Isoformen fällt auf, dass obwohl Sp100HMG nach Translation eine etwa gleich lange Aminosäuresequenz wie Sp100C aufweist, die mRNA Sequenz von Sp100C mit Abstand am längsten ist. Alle mRNA Isoformen enthalten am Ende eigenständige Sequenzen. Zwischen Basenpaar 166 und 1773 der Kaninchen Sp100 mRNA Sequenz konnten vier homologe Bereiche den menschlichen Sp100 Sequenzen zugeordnet werden. Die homologen Bereiche endeten etwa auf Höhe des Endes der menschlichen Sp100B Sequenz. Es wurde eine Übereinstimmung der homologen Abschnitte von 77 % ermittelt. Da es sich bei den Kaninchen mRNA und Aminosäuresequenzen ausgehend vom Genom des Kaninchens nur um Vorhersagen handelte, wurde darauf geachtet die zum Knock-down verwendeten shRNAs möglichst im vorderen Teil der X1 Sequenz zu platzieren. Es wurde

Ergebnisse

davon ausgegangen, dass analog zu den menschlichen Sp100 Sequenzen der vordere Teil in allen Isoformen enthalten ist.

Bei der Platzierung der Primer in der Sp100 mRNA Sequenz des Kaninchens wurde sich stark am Sequenzalignment mit den menschlichen Isoformen orientiert. Das Primerpaar „Sp100“ wurde im vorderen Teil der Sequenz platziert, sodass mit diesem, falls mehrere Isoformen existieren, möglichst alle Sp100 Isoformen detektiert werden können. Das Primerpaar „Sp100 B/C/HMG“ wurde hingegen nach dem zum menschlichen Sp100A homologen Abschnitt platziert. Mit diesem Primer sollten speziell alle weiteren Sp100 Isoformen detektiert werden, die am ehesten den menschlichen Isoformen B, C oder HMG entsprechen. Dies war eine einfache Methode, um unterschiedliche Effekte auf mögliche unterschiedliche Sp100 Isoformen des Kaninchens in den Experimenten zu detektieren.

3.1.5 Sp100 Protein Alignment – Mensch/Kaninchen

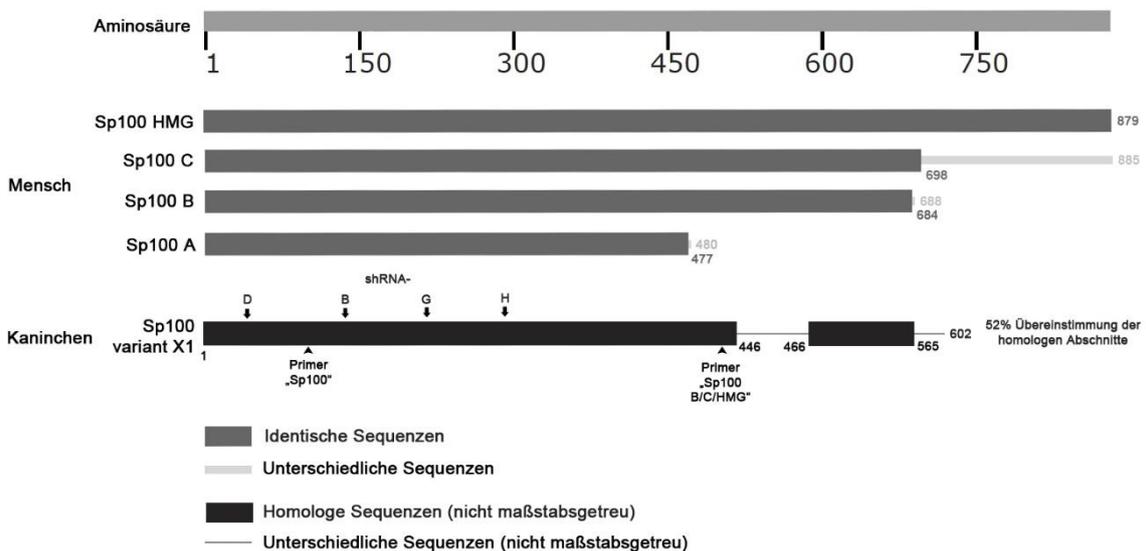


Abbildung 14: Protein Sequenzalignment zwischen den humanen Sp100 Isoformen und der Sp100 variant X1 Isoform des Kaninchens. Die verwendeten Proteinsequenzen stammen aus den Datenbanken des NCBI. Die Sequenzalignments wurden ebenfalls mit den BLAST Algorithmen des NCBI durchgeführt.

Neben dem mRNA Sequenzalignment wurde auch ein Protein Sequenzalignment durchgeführt. Die homologen Sp100 Aminosäure Sequenz Abschnitte endeten ebenfalls etwa auf Höhe des Endes der menschlichen Sp100B Isoform. Die Aminosäuresequenz des Kaninchens überragt mit weiteren 37 Aminosäuren die menschliche Sp100B Isoform, ist aber aufgrund von Lücken in den homologen Sequenzen insgesamt etwas kürzer. Es wurde eine Übereinstimmung der homologen Abschnitte von 52 % ermittelt. Die HSR Sequenz, über die die Proteine dimerisieren können und die Lokalisation an den ND10 bodies ermöglicht wird, ist sowohl in allen humanen Sp100 Isoformen enthalten (Aminosäure 21 bis 140), als auch in den Isoformen des Kaninchens konserviert. Ergänzend konnte festgestellt werden, dass die SAND-Domäne, die an unmethylierte DNA binden kann und in den menschlichen Isoformen Sp100B, Sp100C und Sp100HMG enthalten ist, auch in der X1 Isoform des Kaninchens vorhanden ist. Zusammenfassend kommt man zu dem Ergebnis, dass die vorhergesagten Isoformen des Kaninchens am ehesten der menschlichen Sp100B Isoform entsprechen. Auch hier gilt, dass die Prognosen über die Aminosäuresequenzen des Kaninchens in der NCBI Datenbank kritisch betrachtet werden müssen. In Abbildung 13 und Abbildung 14 sind ebenfalls die Positionen der shRNAs sowie die Primer Positionen markiert.

3.2 Wirkung von Typ I Interferonen und Sp100-Proteinen in Kaninchen-Keratinocyten

3.2.1 Charakterisierung der Interferon- κ und Sp100 Expression in Kaninchen-Keratinocyten Zelllinien

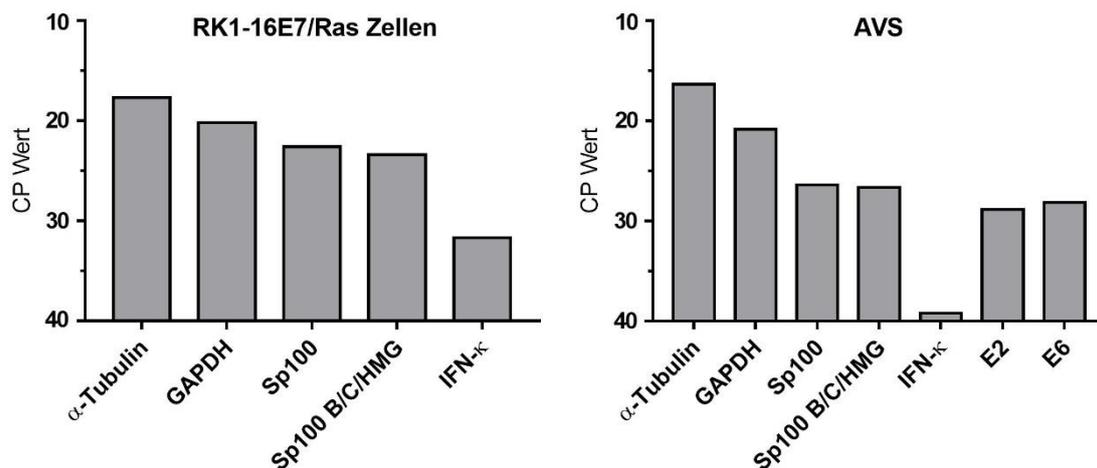


Abbildung 15: CP-Werte der Real-Time PCR verschiedener Transkripte in RK1-16E7/Ras Zellen und AVS Zellen. Dargestellt sind neben zweier Referenzgenen und den viralen Transkripten die Expression von IFN- κ und Sp100. Da mit fallendem CP-Wert die Menge an vorhandenen Transkripten ansteigt, nehmen die Werte der y-Achse ausgehend vom höchsten CP-Wert 40 nach oben hin ab.

Ziel war es Zelllinien zu identifizieren, die für die geplanten Versuche eine robuste Expression von Sp100 und IFN- κ aufweisen. Problematisch war hierbei Kaninchen-Keratinocyten mit zufriedenstellender Transkription von IFN- κ aufzufinden. Die RK1-16E7/Ras Zelllinie zeigte schließlich mit einem Crossing Point-Wert (CP-Wert) von 32 eine niedrige aber ausreichende Expression von IFN- κ und wurde neben der AVS-Zelllinie für weitere Versuche verwendet. Die AVS-Zelllinie zeichnet sich durch das Vorhandensein des CRPV-Genoms aus, weshalb mit ihr verschiedene Einflüsse auf die virale Transkription getestet werden konnten. Derzeit sind keine Antikörper gegen Kaninchen Sp100 oder IFN- κ , die für Analysen im Western Blot geeignet wären, kommerziell erhältlich. Eine mögliche anwendbare Kreuzreaktivität von humanen Sp100 Antikörpern auf Kaninchen Sp100 konnte in zwei durchgeführten Western-Blot Analysen nicht

festgestellt werden. Alle Quantifizierungen der Genexpression wurden deshalb mittels Real-Time PCR Analysen durchgeführt.

3.2.2 Effekte von Interferon- β auf die Expression von Sp100 in RK1-16E7/Ras Zellen

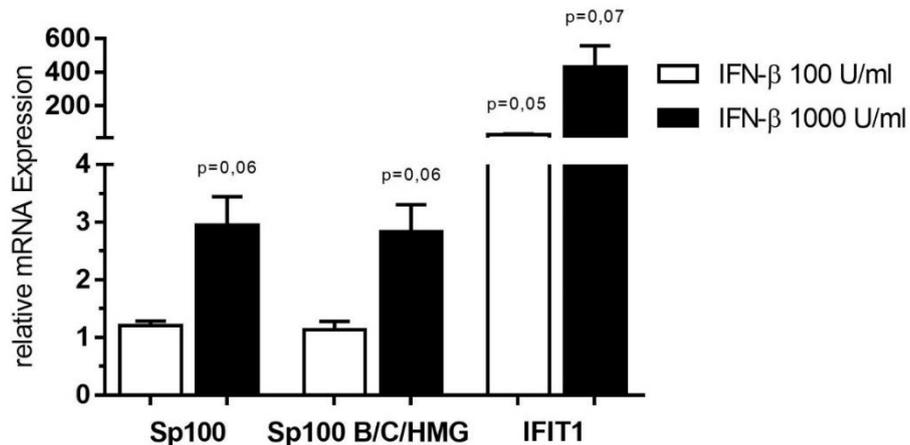


Abbildung 16: Effekte von IFN- β auf die Expression von Sp100 in RK1-16E7/Ras Zellen (nach Wurdak et al. 2018). Die Zellen wurden 24 Stunden mit IFN- β behandelt. Anschließend wurde die RNA extrahiert und die Transkription von IFIT1 und Sp100 mittels qPCR untersucht. Durch die Bestimmung von GAPDH als Referenzgen war es möglich die relative Genexpression in Bezug auf unbehandelte Kontroll-Zellen zu berechnen. In der Abbildung sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten sowie der jeweilige Standardfehler (SEM) dargestellt. Für die statistische Analyse der Ergebnisse wurden Einstichproben t-Tests ($\mu_0=1$) verwendet.

In einem ersten Versuch sollte festgestellt werden, ob Sp100 in Kaninchenzellen ein Interferon-stimulierbares Gen (ISG) ist. Hierzu wurden RK1-16E7/Ras Zellen wie in 2.5.1 beschrieben mit IFN- β behandelt. In der anschließenden Real-Time PCR konnte mittels GAPDH als Referenzgen die relative Genexpression im Vergleich zu unbehandelten Zellen berechnet werden. IFIT-1 ist ein bekanntes ISG. Aufgrund des sehr starken Anstiegs von IFIT-1 (22-fach bei 100 U IFN- β pro ml Zellkulturmedium und über 600-fach bei 1000 U/ml), kann davon ausgegangen werden, dass das verwendete rekombinante, humane IFN- β auch bei Kaninchenzellen wirksam ist. Die untersuchten Sp100 Isoformen zeigten einen Anstieg um das 1,2-fache bei Zugabe von 100 U/ml, während bei einer

Konzentration von 1000 U/ml Sp100 um das 3-fache anstieg. Die p-Werte befinden sich mit 0,05 bis 0,07 an der Signifikanzgrenze.

3.2.3 Effekte von Interferon-β auf die Expression von Sp100 und virale Transkription in AVS Zellen

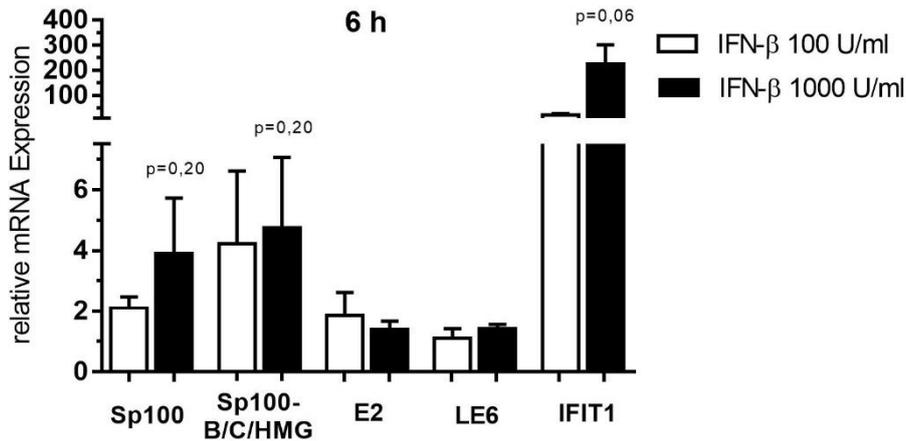


Abbildung 17: Effekte von IFN-β auf die Expression von Sp100 und virale Transkription in AVS-Zellen nach 6 Stunden (nach Wurdak et al. 2018). Die Zellen wurden 6 Stunden mit IFN-β behandelt. Anschließend wurde die RNA extrahiert und die Transkription von IFIT1, Sp100, E2 und LE6 mittels qPCR untersucht. Durch die Bestimmung von GAPDH als Referenzgen war es möglich die relative Genexpression in Bezug auf unbehandelte Kontroll-Zellen zu berechnen. In der Abbildung sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten sowie der jeweilige Standardfehler (SEM) dargestellt. Für die statistische Analyse der Ergebnisse wurden Einstichproben t-Tests ($\mu_0=1$) verwendet.

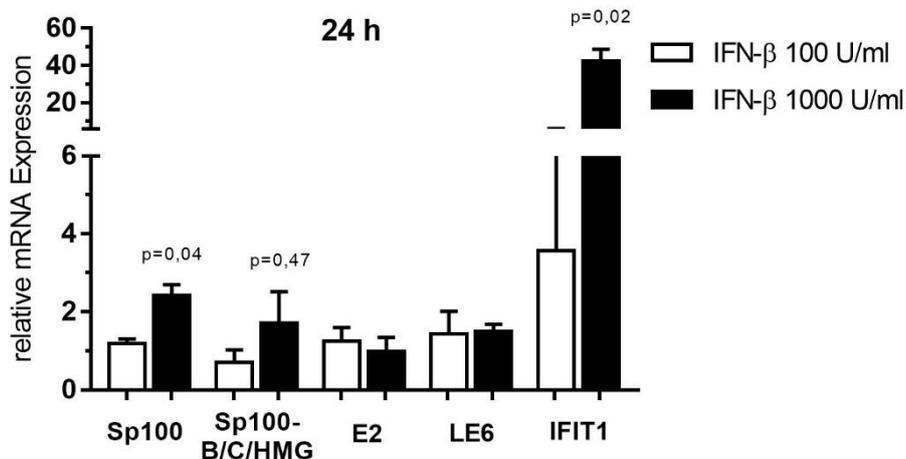


Abbildung 18: Effekte von IFN-β auf die Expression von Sp100 und virale Transkription in AVS-Zellen nach 24 Stunden (nach Wurdak et al. 2018). Die Zellen wurden 24 Stunden mit IFN-β behandelt.

Ergebnisse

Anschließend wurde die RNA extrahiert und die Transkription von IFIT1, Sp100, E2 und LE6 mittels qPCR untersucht. Durch die Bestimmung von GAPDH als Referenzgen war es möglich die relative Genexpression in Bezug auf unbehandelte Kontroll-Zellen zu berechnen. In der Abbildung sind die Mittelwerte von vier unabhängigen Experimenten sowie der jeweilige Standardfehler (SEM) dargestellt. Für die statistische Analyse der Ergebnisse wurden Einstichproben t-Tests ($\mu_0=1$) verwendet.

Im vorangegangenen Versuch konnte gezeigt werden, dass Sp100 in immortalisierten Kaninchenzellen durch IFN- β induzierbar ist. In den nun folgenden zwei Versuchen sollte der Einfluss von IFN- β auf die Transkription von Sp100 in der Anwesenheit von CRPV untersucht werden. Darüber hinaus wurden die viralen Transkripte quantifiziert. AVS Zellen wurden hierfür wie in 2.5.1 beschrieben für 6 oder 24 Stunden mit IFN- β behandelt und die extrahierte RNA anschließend in einer qPCR untersucht.

Das zur Kontrolle untersuchte Gen IFIT-1 wurde in beiden Experimenten wie erwartet stark induziert. Darüber hinaus stieg Sp100 bei beiden Versuchen konzentrationsabhängig an, wobei der Effekt sowohl bei Sp100 als auch bei IFIT1 nach 6 Stunden deutlich größer war als nach 24 Stunden. Daraus kann geschlossen werden, dass das rekombinante IFN- β über die Zeit in seiner Wirksamkeit nachließ. Die p-Werte der Sp100 Induktion nach 6 Stunden befanden sich aufgrund der im Vergleich zu den RK1-16E7/Ras-Zellen höheren Varianzen der Effekte bei 0,20. Im zweiten Versuch nach 24 Stunden war die Varianz der Effekte niedriger. Aufgrund eines Ausreißers in den Rohdaten konnte trotzdem nur einer der beiden Sp100 Primer die Signifikanzgrenze mit einem p-Wert von 0,04 unterschreiten. Der Versuch gibt deshalb lediglich ein Hinweis darauf, dass Sp100 auch in der Anwesenheit von CRPV durch Typ I Interferone induzierbar ist.

In beiden Experimenten konnte nach Zugabe von IFN- β keine erniedrigte virale Transkription beobachtet werden.

3.2.4 Die Wirkung von Interferon- κ auf Sp100 und virale Transkription in AVS Zellen

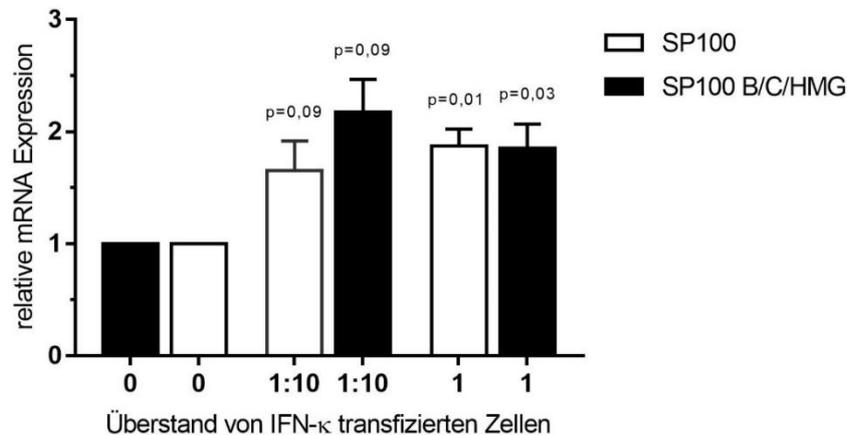


Abbildung 19: Wirkung von IFN- κ auf Sp100-Proteine in AVS Zellen. Überstand von zuvor mit pSG5 oder pSG5-ocIFN- κ transfizierten AVS-Zellen wurde entweder unverdünnt oder in einer 1:10 Verdünnung auf unbehandelte AVS Zellen überführt. Nach 6 Stunden wurde die RNA extrahiert und die Transkripte von Sp100 mittels Real-Time PCR quantifiziert. Durch die Bestimmung von GAPDH als Referenzgen war es möglich die relative Genexpression in Bezug auf die entsprechende Kontrolle zu berechnen. In der Abbildung sind die Mittelwerte von vier unabhängigen Experimenten sowie der jeweilige Standardfehler (SEM) dargestellt. Für die statistische Analyse der Ergebnisse wurden Einstichproben t-Tests ($\mu_0=1$) verwendet.

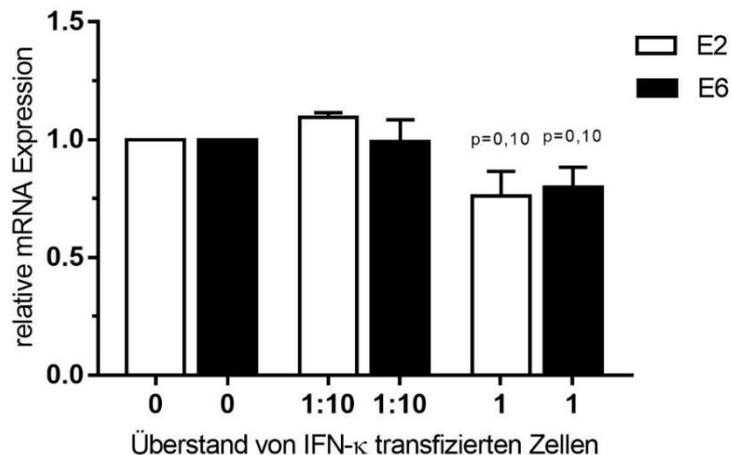


Abbildung 20: Wirkung von IFN- κ auf die viralen Transkripte in AVS Zellen. Überstand von zuvor mit pSG5 oder pSG5-ocIFN- κ transfizierten AVS-Zellen wurde entweder unverdünnt oder in einer 1:10 Verdünnung auf unbehandelte AVS Zellen überführt. Nach 6 Stunden wurde die RNA extrahiert und die Transkripte von E2 und E6 mittels Real-Time PCR quantifiziert. Durch die Bestimmung von GAPDH als Referenzgen war es möglich die relative Genexpression in Bezug auf die entsprechende Kontrolle zu berechnen. In der Abbildung sind die Mittelwerte von vier unabhängigen Experimenten sowie der jeweilige Standardfehler (SEM) dargestellt. Für die statistische Analyse der Ergebnisse wurden Einstichproben t-Tests ($\mu_0=1$) verwendet.

In den bisher beschriebenen Experimenten wurde mittels humanem IFN- β getestet, ob Typ I Interferone im Allgemeinen einen Einfluss auf die Expression von Sp100-Proteinen haben. Zusätzlich wurden die viralen Transkripte in AVS Zellen beobachtet. In diesem Experiment sollte untersucht werden, ob Kaninchen IFN- κ im Speziellen ebenfalls die Expression von Sp100 induziert und wie sich hierbei die viralen Transkripte verhalten. Der Versuch wurde wie in 2.5.2 beschrieben durchgeführt.

Sp100 wurde durch die Zugabe von sowohl unverdünntem als auch 1:10-fach verdünntem IFN- κ haltigem Überstand um das ca. 2-fache induziert. Bei den viralen Transkripten E2 und E6 war eine Abnahme um 20 % bis 25 % 6 Stunden nach Zugabe des unverdünntem Überstandes zu beobachten. Der beobachtete Effekt von IFN- κ auf die Expression von Sp100 war bei Zugabe von unverdünntem Überstand signifikant. Die Reduktion der viralen Transkripte war mit p-Werten von 0,10 nicht signifikant.

3.2.5 Effekte der Überexpression von humanen Sp100-Proteinen in AVS-Zellen auf die Promotoraktivität von HPV31 und CRPV

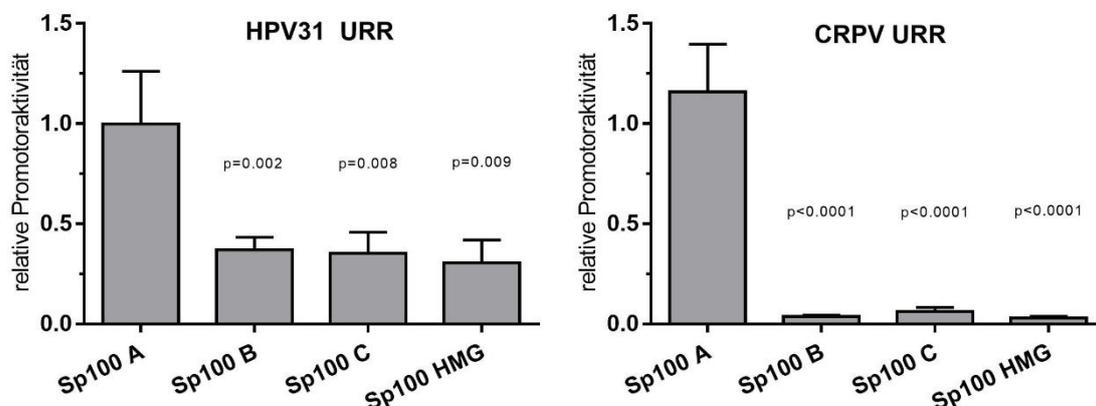


Abbildung 21: Effekte der Überexpression von humanen Sp100 Proteinen in AVS-Zellen auf die Promotoraktivität von HPV31 und CRPV. AVS-Zellen wurden mit pCMV-Gluc, CRPV oder HPV31 Reporterplasmiden, sowie Sp100-Expressionsplasmiden cotransfiziert. Mit Hilfe eines Luminometers wurde die Aktivität des Promotors bestimmt. In der Auswertung wurde die relative Promotoraktivität berechnet und jeweils mit einem Einstichproben t-Test ($\mu_0=1$) statistisch überprüft. In der Abbildung sind die Mittelwerte von vier unabhängigen Experimenten sowie der jeweilige Standardfehler (SEM) dargestellt.

Bisher konnte gezeigt werden, dass Sp100 in Kaninchen-Keratinocyten ein ISG ist und sowohl durch IFN- β als auch durch IFN- κ induzierbar ist. Ein deutlicher Einfluss auf die virale Transkription durch Behandlung mit den Interferonen konnte nicht festgestellt werden. Vorangegangene Versuche unserer Arbeitsgruppe haben aber gezeigt, dass die direkte Überexpression von Sp100 Isoformen in humanen Zellen Promotoren von HPV inhibieren kann (Habiger et al. 2015). Ziel dieses Versuches war es nun den Einfluss der verschiedenen Sp100 Isoformen auf die HPV31 und CRPV URR in AVS-Zellen zu untersuchen. Da eine klare Aufteilung und Abgrenzung der verschiedenen Kaninchen Sp100 Isoformen aufgrund der Datenlage in den Genom-Datenbanken derzeit noch nicht möglich ist, wurde in diesem Experiment auf die humanen Sp100 Isoformen zurückgegriffen. Der Versuch wurde wie in 2.5.3 beschrieben durchgeführt. Sowohl der HPV31 Promotor, als auch der CRPV Promotor haben bei der Überexpression von Sp100B, Sp100C und Sp100HMG eine reduzierte Aktivität. Hierbei inhibieren die drei Sp100 Isoformen die CRPV URR deutlich stärker (Reduktion um 94 bis 97 Prozent) als den HPV31 Promotor (Reduktion um 65 bis

Ergebnisse

70 Prozent). Eine Inhibierung der HPV31 und CRPV Promotoraktivität ist bei der Überexpression von Sp100A nicht zu beobachten. Die Ergebnisse der Überexpression von Sp100B, Sp100C und Sp100HMG waren in beiden Versuchen hoch signifikant.

3.3 Herstellung und Analyse verschiedener stabiler Interferon- κ und Sp100 Knock-down Zelllinien

3.3.1 Vergleich der shRNA Knock-down Effizienzen

In den vorangegangenen Versuchen wurde untersucht, ob sich durch Zugabe von Typ I Interferonen die virale Transkription beeinflussen lässt. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Sp100 auch in Kaninchenzellen ein ISG ist und die Überexpression von Sp100 starken Einfluss auf Papillomviren Promotoren hat. Im den folgenden Versuch sollte die Rolle von Sp100 und IFN- κ bei der CRPV-Transkription, Replikation und Tumorinduktion in vivo durch eine Reduktion der Sp100 und IFN- κ Mengen mit Hilfe von RNA-Interferenz analysiert werden. Vor Beginn der Tierexperimente sollten in Zellkulturversuchen möglichst effiziente shRNAs identifiziert werden. Um die shRNA-Effekte vergleichen zu können, wurden Keratinozyten-Zelllinien hergestellt, die die Knock-down Konstrukte stabil exprimierten. Die shRNA-Expressionsplasmide wurden via Lentiviren in das Genom der Keratinozyten integriert. Das Protokoll zur Herstellung ist im Material und Methodenteil unter 2.5.4 und 2.5.5 beschrieben. Die Gesamt-RNA aller hergestellten Zelllinien wurde im Anschluss isoliert und die Expression der Knock-down Zielgene mittels Real-Time PCR relativ quantifiziert. Die dargestellten relativen Genexpressionen wurden in Bezug auf Zellen, in die der Leervektor pLKO.1-H1 eingebracht wurde, berechnet. Als Referenzgen wurde GAPDH gewählt.

Ergebnisse

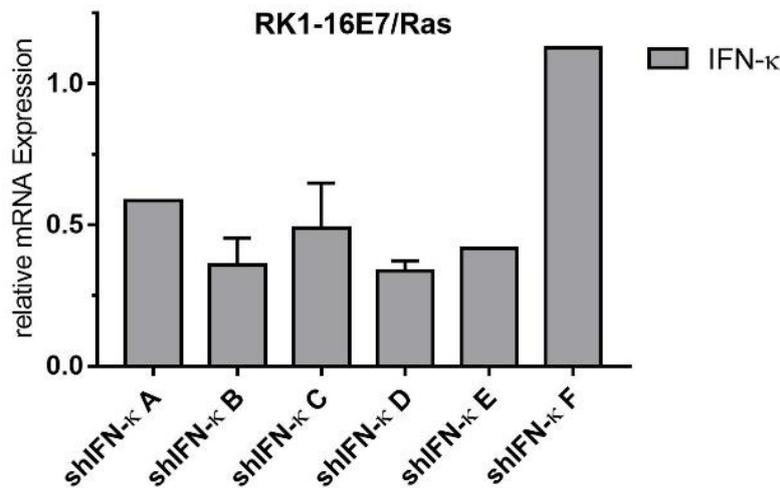


Abbildung 22: Vergleich der shIFN- κ Effizienzen in RK1-16E7/Ras Zellen. Die shRNA Expressionsplasmide pLKO.1-H1-shIFN- κ [...] wurden durch lentivirale Partikel in die Zellen eingebracht und stabile Zelllinien durch Puromycin-Selektion erzeugt. Dargestellt ist die in einer Real-Time PCR ermittelte relative Genexpression mit GAPDH als Referenzgen. Von den shRNAs A, E und F wurde RNA aus einer und von B, C und D von zwei unterschiedlichen Zellpassagen analysiert. Dargestellt sind hierbei die Mittelwerte mit Standardfehler (SEM).

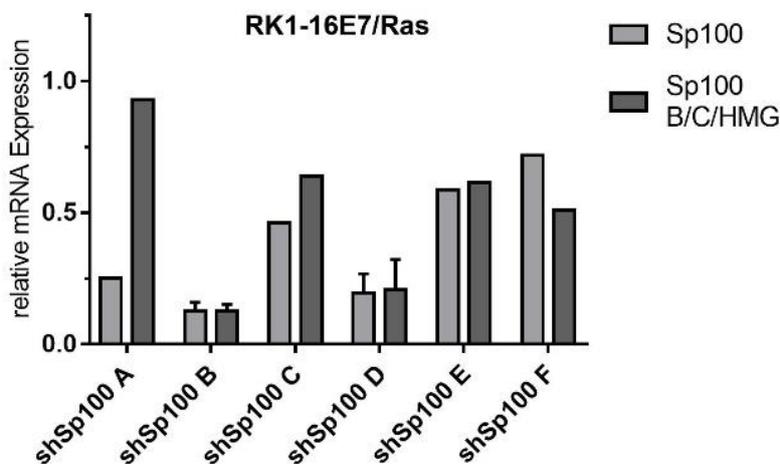


Abbildung 23: Vergleich der shSp100 Effizienzen in RK1-16E7/Ras Zellen. Die shRNA Expressionsplasmide pLKO.1-H1-shSp100 [...] wurden durch lentivirale Partikel in die Zellen eingebracht und stabile Zelllinien durch Puromycin-Selektion erzeugt. Dargestellt ist die in einer Real-Time PCR ermittelte relative Genexpression mit GAPDH als Referenzgen. Von den shRNAs A, C, E und F wurde RNA aus einer und von B und D von zwei unterschiedlichen Zellpassagen analysiert. Dargestellt sind hierbei die Mittelwerte mit Standardfehler (SEM).

Ergebnisse

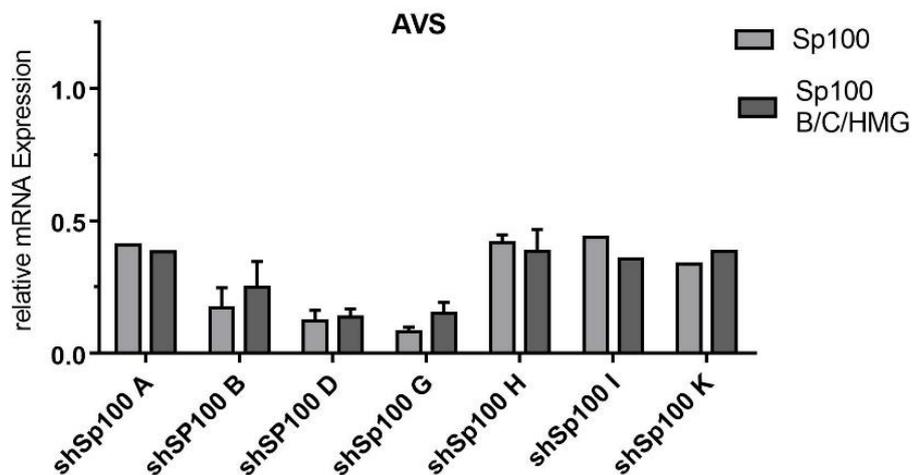


Abbildung 24: Vergleich der shSp100 Effizienzen in AVS Zellen (nach Wurdak et al. 2018). Die shRNA Expressionsplasmide pLKO.1-H1-shSp100 [...] wurden durch lentivirale Partikel in die Zellen eingebracht und stabile Zelllinien durch Puromycin-Selektion erzeugt. Dargestellt ist die in einer Real-Time PCR ermittelte relative Genexpression mit GAPDH als Referenzgen. Von den shRNAs A, I und K wurde RNA aus einer und von B, D, G und H von drei unterschiedlichen Zellpassagen analysiert. Dargestellt sind hierbei die Mittelwerte mit Standardfehler (SEM).

Da nur die RK1-16E7/Ras Zellen IFN- κ in einer ausreichenden Menge exprimieren, wurden die sechs shIFN- κ Konstrukte in diesen Zellen getestet. Dennoch ist eine präzise Aussage über die Effizienz einer shRNA bei CP-Werten zwischen 32 und 34 schwierig. Die Real-Time PCR Analyse von jeweils zwei verschiedenen Zellpassagen zeigte, dass die Konstrukte shIFN- κ B (Reduktion um 64 %) und shIFN- κ D (Reduktion um 66 %) am effizientesten waren. Diese shRNAs wurden ausgewählt und im Tierexperiment #1 verwendet.

Die Sp100 Knock-down Konstrukte für das Tierexperiment #1 wurden ebenfalls in der RK1-16E7/Ras Zelllinie getestet, wobei die zwei effizientesten shRNAs zusätzlich in AVS Zellen untersucht wurden. Es zeigte sich keine große Diskrepanz der Ergebnisse hinsichtlich der verwendeten Zelllinie. Aus diesem Grund wurden die zusätzlich benötigten shSp100 Konstrukte für das Tierexperiment #2 ausschließlich in AVS Zellen getestet. Für das Tierexperiment #1 wurden die Konstrukte shSp100 B (Reduktion um etwa 80 %) und shSp100 D (Reduktion um etwa 87 %) ausgewählt. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei Proben, die aus unterschiedlichen Zellpassagen isoliert wurden.

Aufgrund der Datenlage nach dem Tierexperiment #1 wurde entschieden den Fokus des folgenden Tierexperimentes #2 ausschließlich auf die Sp100 Proteine zu verschieben, weshalb die CPRV-shIFN- κ Genome durch zwei weitere Sp100 Knock-down Konstrukte ersetzt wurden (vgl. 2.6.4). Weitere shRNAs wurden in AVS Zellen getestet, wobei die shRNAs shSp100 G (Reduktion um etwa 89 %) und shSp100 H (Reduktion um etwa 60 %) für das Tierexperiment #2 ausgewählt wurden. Dargestellt sind ebenfalls die Mittelwerte von drei Proben, die aus unterschiedlichen Zellpassagen isoliert wurden.

3.3.2 Sp100 Knock-down Effekt auf die virale Transkription in AVS-Zellen

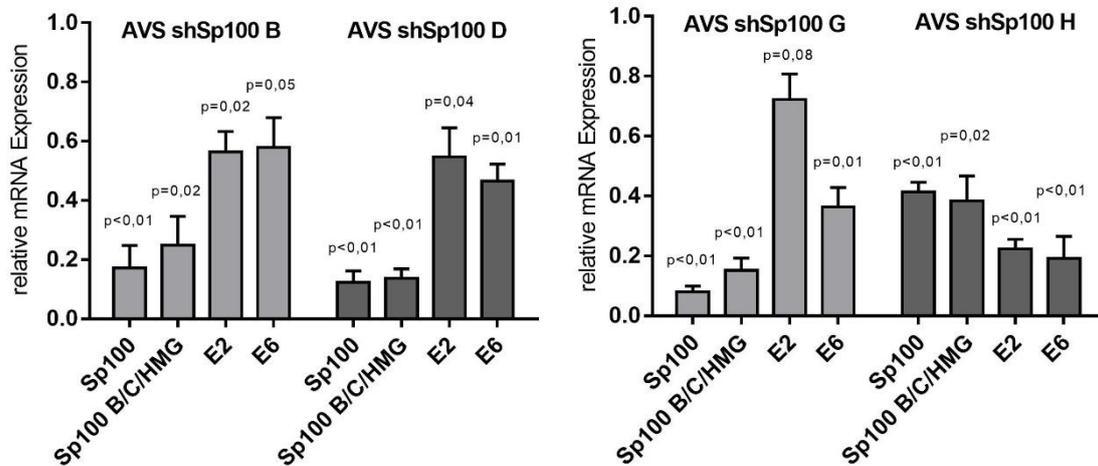


Abbildung 25: Sp100 Knock-down Effekt auf die virale Transkription in AVS-Zellen (nach Wurdak et al. 2018). Die shRNA Expressionsplasmide wurden durch lentivirale Partikel in die Zellen eingebracht und anschließend mittels Puromycin selektiert. Die Gesamt-RNA wurde extrahiert und die Transkripte von Sp100, E2 und E6 mittels Real-Time PCR quantifiziert. Durch die Bestimmung von GAPDH als Referenzgen war es möglich die relative Genexpression in Bezug auf die entsprechende Kontrolle zu berechnen. In der Abbildung sind die Mittelwerte von drei Proben unterschiedlicher Zellpassagen sowie der jeweilige Standardfehler (SEM) dargestellt. Die statistische Analyse wurde mittels Einstichproben t-Tests ($\mu_0=1$) durchgeführt.

In den AVS Knockdown Zelllinien wurden neben der mRNA Menge von Sp100 gleichzeitig die virale Transkription in Form von E2 und E6 analysiert. Auch hier wurde die relative Genexpression in Bezug auf Zellen mit dem Leervektor pLKO.1-H1 errechnet. Als Referenzgen wurde GAPDH verwendet. Die Diagramme zeigen die Durchschnittswerte von drei Real-Time PCR Messungen unterschiedlicher Zellpassagen. Bei allen Knock-down Zelllinien mit reduzierter Sp100 Menge fiel auch die virale Transkription ab. E2 und E6 fielen um 28 bis 81 % ab. Darüber hinaus war zu beobachten, dass bei einer deutlichen Sp100 Reduktion (shSp100 B, D und G) die virale Transkription weniger abfällt als bei einer schwächeren Reduktion von Sp100. Obwohl shSp100 H die Sp100 Transkripte nur um 62 % reduzierte, fiel die virale Transkription mit 81 % am stärksten ab. Die Transkripte von E2 und E6 wurden mit der Expression von shSp100 B, D und H um dieselbe Menge reduziert. Bei shSp100 G zeigte sich hingegen eine Differenz hinsichtlich der Reduktion von E2 und E6. Der Grund

hierfür ist unklar, aber im Gegensatz zu den anderen shRNAs wird die Isoform Sp100 X8 nicht von shSp100 G reduziert. Sowohl die Reduktion von Sp100 als auch die Reduktion der viralen Transkripte waren signifikant.

3.3.3 Untersuchung der Zellproliferation der Sp100 Knock-down Keratinozyten

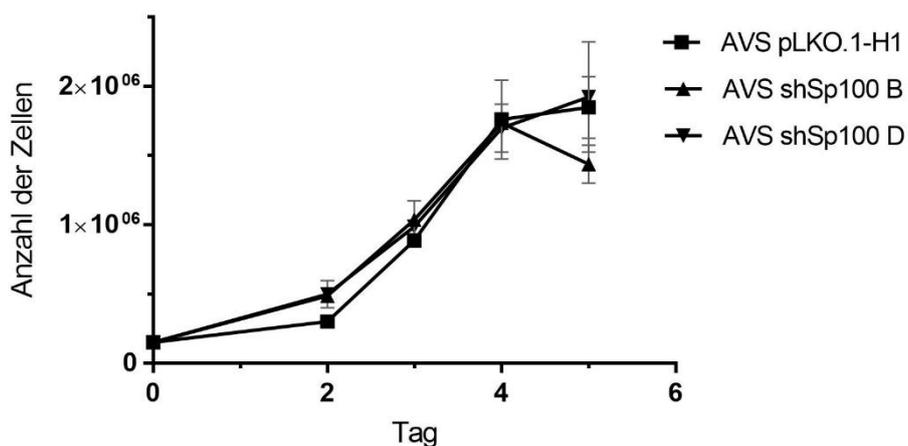


Abbildung 26: Untersuchung der Zellproliferation der Sp100 Knock-down Keratinozyten (nach Wurdak et al. 2018). Pro Zellreihe wurden jeweils 150.000 Zellen in 6-well Platten ausgesät und die Zellproliferation über Auszählen der Zellen in einer Neubauer Zählkammer an den Tagen 2, 3, 4 und 5 bestimmt. Es wurden für jeden Datenpunkt Doppelwerte erhoben. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler (SEM).

Es konnten shRNAs identifiziert werden, die die Sp100-Menge effektiv reduziert werden konnte. Dabei zeigte sich, dass die virale Transkription ebenfalls vermindert wurde. Nun sollte geprüft werden, ob der Knock-down von Sp100 in AVS Zellen direkt oder indirekt (über die Reduktion der viralen Transkripte E6 und E7) auch einen Einfluss auf die Zellproliferation hat. Der Versuch wurde wie in 2.5.6 beschrieben mit den Zelllinien AVS pLKO.1-H1 und AVS shSp100 B und AVS shSp100 D durchgeführt. An allen Tagen wurde kein bedeutsamer Unterschied in der Anzahl der Zellen und damit rückschließend auch in der Proliferation detektiert. Die deutlich reduzierte Sp100 Menge und die reduzierte virale Transkription scheint somit keinen messbaren Einfluss auf die Zellproliferation der Keratinozyten zu haben.

3.4 In vivo Versuche mit rekombinanten CRPV Interferon- κ und Sp100 Knock-down Genomen am Kaninchenmodell

In den Zellkulturversuchen konnte gezeigt werden, dass Sp100 in Kaninchen-Keratinocyten ein ISG ist. Durch Überexpression von bestimmten Sp100 Isoformen konnten zwei verschiedene Promotoren von Papillomviren inhibiert werden. Gleichzeitig konnte dagegen gezeigt werden, dass beim Knock-down von Sp100 die virale Transkription signifikant abnimmt. Für humane Zellen ist jedoch beschrieben, dass durch siRNA vermittelte Reduktion von Sp100 die virale Transkription ansteigt (Habiger et al. 2015). Unabhängig davon wird Sp100 als wichtiger antiviraler Faktor vor allem zu Beginn beziehungsweise bei Etablierung von Virusinfektionen beschrieben (Stepp et al. 2013). In den Zellkulturversuchen konnte diese Phase nicht simuliert werden. Für die Tierexperimente wurde deshalb eine Infektionsdosis gewählt, bei der eine Papillom-Induktionsrate von etwa 30 % pro Infektionsstelle für das CRPV Kontrollkonstrukt zu erwarten war. Dadurch sollte ermöglicht werden, bei den Induktionsraten sowohl eine Zunahme, als auch eine Abnahme detektieren zu können.

Es wurden nacheinander zwei Tierexperimente durchgeführt. Aufgrund der Ergebnisse des Tierexperimentes #1 wurde der Fokus des Tierexperimentes #2 vollständig auf Sp100 verschoben. Die Herstellung der rekombinanten CRPV-Genome sowie der Aufbau und Ablauf der Tierversuche ist im Kapitel Material und Methoden beschrieben. Unter Punkt 2.6.4 ist ein Infektionsschema der zwei Tierexperimente zu finden. Aufgrund der besseren Übersichtlichkeit, sowie der höheren Aussagekraft infolge des größeren Gesamterhebungsumfangs, sind die Ergebnisse der zwei Tierexperimente im folgenden Kapitel meist zusammen dargestellt.

Im Tierexperiment #1 wurde ein Kaninchen schon in der 6. anstatt in der 12. Wochen nach Infektion eingeschläfert und Hautproben aller Infektionsstellen für weitere Analysen entnommen. In beiden Tierexperimenten gab es jeweils ein Kaninchen, auf dem sich nach 12 Wochen keine Papillome zeigten. Fraglich ist

hierbei ob diese Kaninchen generell keine Papillome entwickelten oder ob sich induzierte Papillome innerhalb kürzester Zeit wieder zurückbildeten. Bei den makroskopischen Kontrollen nach 6 Wochen zeigten sich bei diesen Kaninchen an den Infektionsstellen analog zu den anderen Kaninchen zum Teil erhabene, etwa stecknadelkopfgroße raue Papeln, die dem normalen Anfangsstadium eines Papilloms entsprechen. Eine sichere Zuordnung als Papilloms ist in diesem Stadium makroskopisch dennoch nicht möglich. Dieses Phänomen ist aus vorangegangenen Experimenten unserer Arbeitsgruppe bekannt. Eine Antwort auf die Frage warum manche Kaninchen nach Infektion mit CRPV mittelfristig keine Papillome entwickeln beziehungsweise warum sich alle Papillome zurückbilden konnte bisher nicht gefunden werden.

3.4.1 Qualitätskontrolle der Gene Gun Patronen

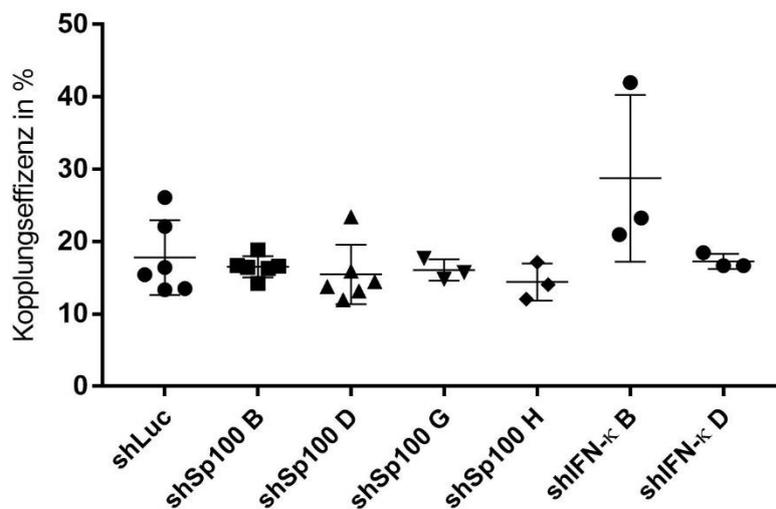


Abbildung 27: Qualitätskontrolle der Gene Gun Patronen Tierexperiment #1 und #2. Es wurde die Kopplungseffizienz jedes Präzipitationsansatzes überprüft. Die an Goldpartikel gekoppelte rekombinante CRPV-DNA wurde aus jeweils fünf Patronen gelöst und in einer Real-Time PCR mit dem Primer CRPV SE6/LE6 quantifiziert. Mit Hilfe einer zuvor erstellten Standardkurve konnte die Kopienanzahl bestimmt und somit auch die Kopplungseffizienz errechnet werden. Dargestellt sind die Datenpunkte aller 6 beziehungsweise drei Präzipitationsansätze eines CRPV Konstruktes, sowie der jeweilige Mittelwert mit Standardfehler (SEM).

Um sicherzustellen, dass alle Infektionsstellen unabhängig vom verwendeten rekombinanten Virusgenom mit der gleichen DNA-Menge infiziert werden,

wurden stichprobenartig Patronen aller Präzipitationsansätze zuvor hinsichtlich ihres DNA-Gehalts untersucht. Die Qualitätskontrolle wurde wie in 2.6.3 beschrieben durchgeführt. Die ermittelten DNA-Mengen der Patronen sind in Form der Kopplungseffizienz eines jeden Präzipitationsansatzes in Abbildung 27 dargestellt. Zusätzlich ist der jeweilige Mittelwert mit Standardfehler abgebildet. Ausgenommen eines Ausreißers bei CRPV-shIFN- κ B bewegen sich die Mittelwerte mit einer Kopplungseffizienz zwischen 14,4 % und 17,2 % in einem engen Rahmen. Darüber hinaus ist auch die Varianz der Werte niedrig. Die verwendeten Patronen erfüllten somit die Qualitätsanforderungen für die Tierexperimente, sodass auch die beobachteten Effekte nicht auf unterschiedliche Infektionsdosen zurückgeführt werden konnten.

3.4.2 Papillom-Induktionsrate der rekombinanten CRPV Genome

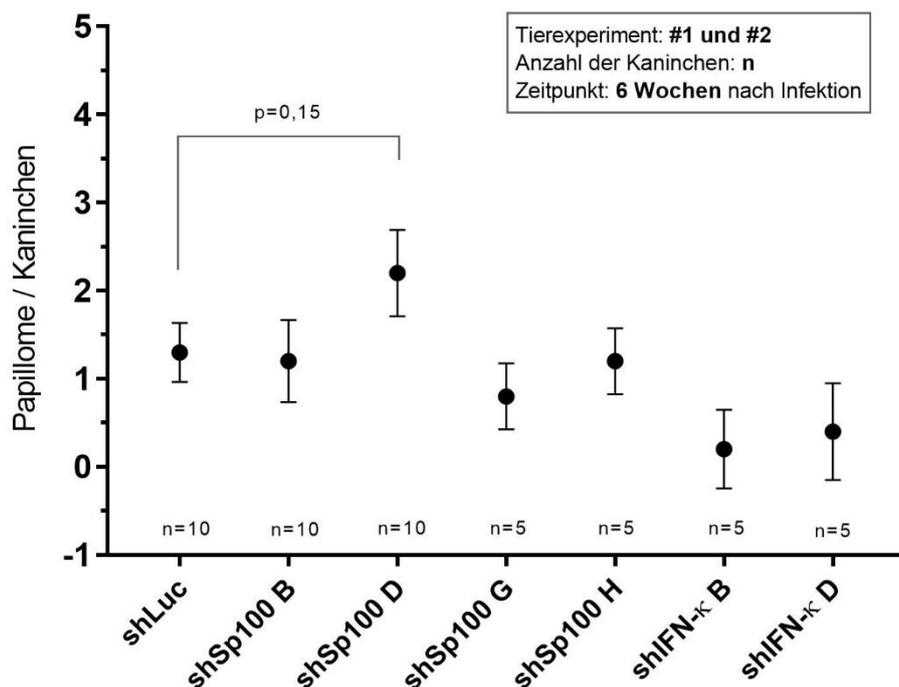


Abbildung 28: Papillom-Induktionsrate der rekombinanten CRPV Genome 6 Wochen nach Infektion (nach Wurdak et al. 2018). Die Papillom-Induktionsraten beider Tierexperimente wurden in diesem Diagramm zusammengefasst. Jedes Kaninchen wurde abhängig vom Experiment mit fünf verschiedenen CRPV-Knockdown Konstrukten an jeweils vier Infektionsstellen beschossen. n gibt die Anzahl an Kaninchen an, welche mit dem jeweiligen rekombinanten CRPV Konstrukt infiziert wurden. Neben den Mittelwerten ist der jeweilige Standardfehler angegeben (SEM). Mit einem Welch-

Test wurden die Induktionsraten von CRPV-shLuc und CRPV-shSp100 D auf einen signifikanten Unterschied geprüft.

Bei beiden Tierexperimenten wurde die Anzahl der Papillome nach 6, 10 und 12 Wochen ermittelt. Die meisten Papillome zeigten sich hierbei schon nach 6 Wochen mit einer zu diesem Zeitpunkt maximalen Größe von 2 x 2 mm. Nur sehr wenige Papillome haben sich nach diesem Zeitpunkt im Verlauf wieder zurückgebildet. Ebenfalls bildeten sich nur wenige einzelne Papillome erst im späteren Verlauf des Experimentes. In Abbildung 28 ist jeweils die durchschnittliche Anzahl der Papillome jedes rekombinanten CRPV Konstruktes pro Kaninchen 6 Wochen nach der Infektion dargestellt. Neben den Mittelwerten der Induktionsraten ist der jeweilige Standardfehler angegeben.

Im Tierexperiment #1 zeigte sich eine deutlich erhöhte Papillom-Induktionsrate von CRPV-shSp100 D gegenüber der Kontrolle CRPV-shLuc. Die Papillom-Induktionsrate von CRPV-shSp100 B entsprach hingegen in etwa der Kontrolle CRPV-shLuc. Aufgrund dieses Ergebnisses wurden im zweiten Tierexperiment insgesamt vier verschiedene CRPV-Sp100-Knockdown Konstrukte getestet. Die deutlich erhöhte Papillom-Induktionsrate von CRPV-shSp100 D konnte hierbei nicht reproduziert werden. Auch die zwei neuen Knock-down Konstrukte G und H unterschieden sich kaum von der Kontrolle. Zusammengefasst kommt man zu dem Ergebnis, dass bei den Sp100-Knock-down-Konstrukten keine Veränderung in der Papillom-Induktionsrate beobachtet werden konnte.

Im Tierexperiment #1 wurden neben den Sp100-Knock-down-Konstrukten auch zwei IFN- κ Knock-down Konstrukte getestet. Erwartet wurde eine erhöhte Induktionsrate, die aber nicht nachgewiesen werden konnte. Beobachtet wurde eine fraglich verminderte Papillom-Induktionsrate. Die Anzahl an untersuchten Infektionsstellen und Kaninchen war hierbei gering. Der Versuch mit CRPV-IFN- κ Knock-down Genomen wurde aufgrund des unsicheren Knock-down Erfolges, der verhältnismäßig geringen konstitutiven Expression von IFN- κ in den Keratinozyten von Kaninchen, sowie der biologischen Plausibilität des Ergebnisses nicht wiederholt. Aufgrund der geringen Anzahl an Papillomen, die durch CRPV-shIFN- κ Konstrukte induziert wurden, waren weitere Analysen nur

Ergebnisse

eingeschränkt aussagekräftig und sind deshalb im Folgenden teilweise nicht dargestellt.

Tierexperiment #1	Infektionsstellen	Woche 6	Woche 10	Woche 12
CRPV-shLuc	20	4	5	5
CRPV-shSp100 B	20	3	3	3
CRPV-shSp100 D	20	13	15	16
CRPV-shIFN- κ B	20	1	1	1
CRPV-shIFN- κ D	20	1	1 + 1*	1 + 1*

Tabelle 2: Übersicht über die Papillomanzahl im Verlauf des Tierexperimentes #1. *Papillom von zuvor eingeschläfertem Kaninchen

Tierexperiment #2	Infektionsstellen	Woche 6	Woche 10	Woche 12
CRPV-shLuc	20	9	8	7
CRPV-shSp100 B	20	9	8	7
CRPV-shSp100 D	20	9	8	8
CRPV-shSp100 G	20	4	3	3
CRPV-shSp100 H	20	7	6	6

Tabelle 3: Übersicht über die Papillomanzahl im Verlauf des Tierexperimentes #2.

3.4.3 Progression der Sp100-Knock-down Papillome

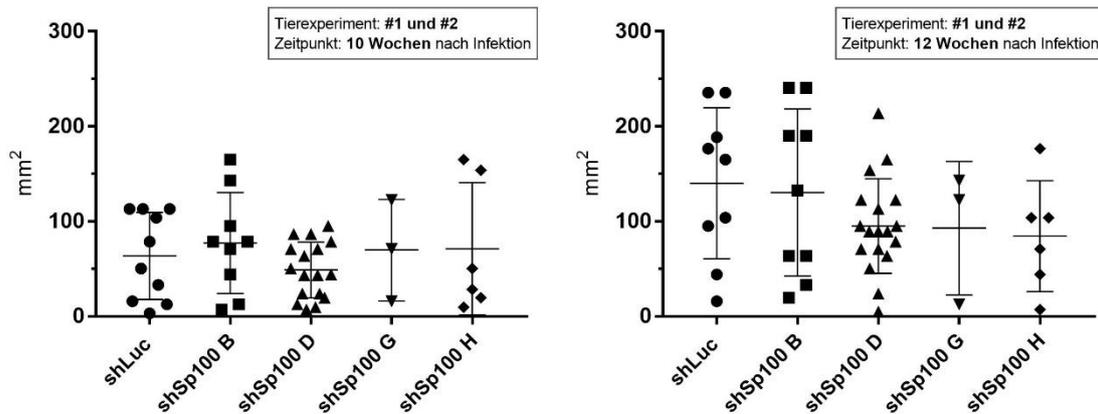


Abbildung 29: Größen der Papillome nach 10 und 12 Wochen (nach Wurdak et al. 2018). Die Papillome wurden in der Länge und Breite vermessen und der Mittelwert gebildet. Durch Berechnung einer Kreisfläche mit dem Mittelwert als Durchmesser wurde sich der tatsächlichen Fläche des Papilloms angenähert. Dargestellt sind die Werte aller Papillome sowie der jeweilige Mittelwert mit Standardabweichung (SD).

Es konnten keine reproduzierbaren Unterschiede in der Papillom-Induktionsrate beobachtet werden. Mit der Bestimmung der Größe aller Papillome nach 10 und 12 Wochen sollten mögliche direkte oder indirekte Einflüsse von Sp100 auf die Wachstumsgeschwindigkeit der Papillome detektiert werden. Nach 10 Wochen konnte im Mittel kein Unterschied zwischen den vier CRPV Sp100 Knock-down Konstrukten und CRPV-shLuc festgestellt werden. Nach 12 Wochen scheinen die Sp100 Knock-down Papillome im Mittel etwas kleiner zu sein als die Kontrolle. Ein starker Einfluss von Sp100 auf die Größenprogression der Papillome konnte allerdings nicht nachgewiesen werden.

3.4.1 Crossing-Point Werte für ausgewählte Transkripte in Papillomen

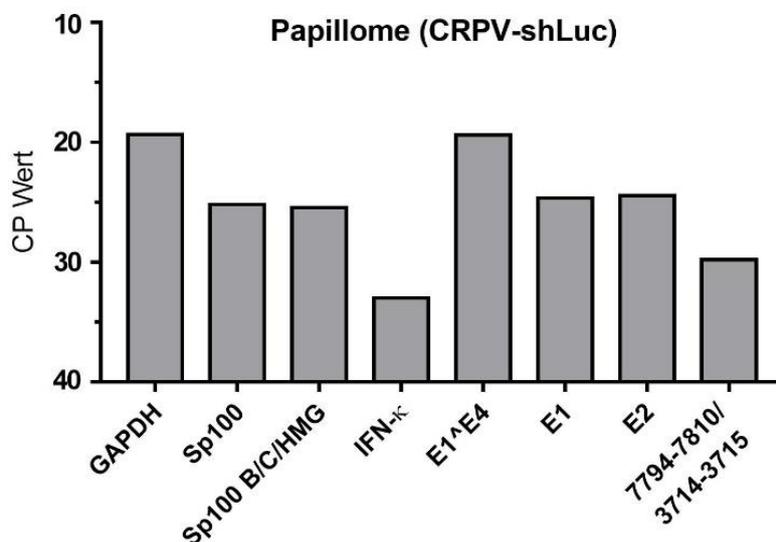


Abbildung 30: Crossing Point (CP)-Werte der Real-Time PCR eines Kontrollpapilloms (CRPV-shLuc). Dargestellt sind neben dem Referenzgen GAPDH und vier viralen Transkripten die Expression von IFN-κ und Sp100. Da mit fallendem CP-Wert die Menge an vorhandenen Transkripten ansteigt, nehmen die Werte der y-Achse ausgehend vom höchsten CP-Wert 40 nach oben hin ab.

Zur Quantifizierung der viralen Transkripte und der Knock-down Effizienzen wurden Real-Time PCR Analysen von entnommenen Papillombiopsien durchgeführt. In Abbildung 30 sind die CP-Werte eines Kontrollpapilloms (CRPV-shLuc) dargestellt. Aufgrund der über die Zellpassagen etwas schwankenden viralen Expression der AVS Zellen ist ein direkter Vergleich zwischen den Papillomen und den AVS Zellen schwierig. Es fällt jedoch auf, dass IFN-κ in den Papillomen mit CP-Werten um 33 konstant auf niedrigem Niveau exprimiert wird. In AVS Zellen wird kein IFN-κ exprimiert (CP>40). Darüber hinaus scheint die virale Expression in den Papillomen etwas höher zu sein als in den AVS Zellen.

3.4.4 Knock-down Effizienzen der rekombinanten CRPV Genome in vivo

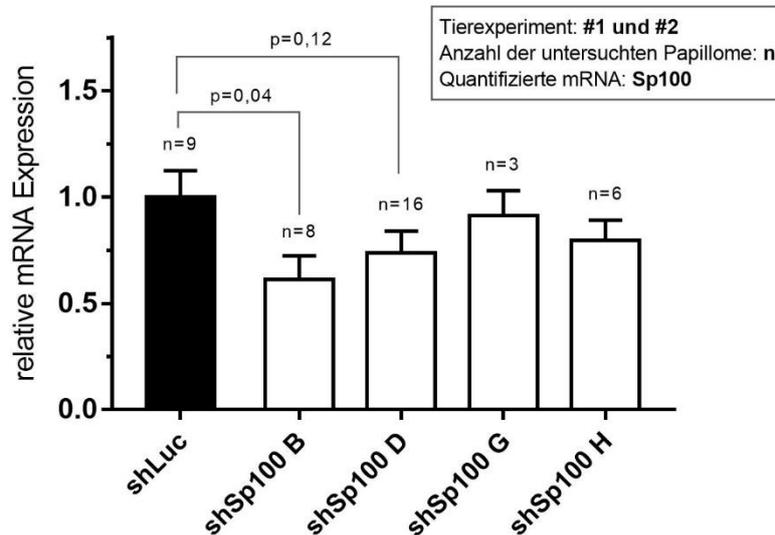


Abbildung 31: Knock-down Effizienzen der CRPV-shSp100 Konstrukte in vivo (nach Wurdak et al. 2018). Die Gesamt-RNA wurde aus den Papillomen isoliert und die Transkripte von Sp100 mittels Real-Time PCR und dem Primerpaar Sp100 quantifiziert. Durch die zusätzliche Bestimmung von GAPDH als Referenzgen war es möglich die relative Genexpression zu berechnen. In der Abbildung sind die Mittelwerte der Genexpression von jeweils n Papillomen sowie die dazugehörigen Standardfehler (SEM) dargestellt. Die statistische Analyse wurde mittels Welch-Tests durchgeführt.

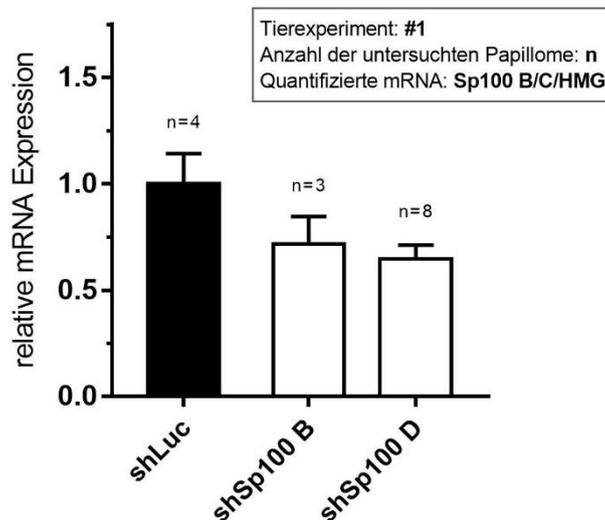


Abbildung 32: Knock-down Effizienzen der CRPV-shSp100 Konstrukte in vivo. Die Gesamt-RNA wurde aus den Papillomen isoliert und die Transkripte von Sp100 B/C/HMG mittels Real-Time PCR quantifiziert. Durch die zusätzliche Bestimmung von GAPDH als Referenzgen war es möglich die relative Genexpression zu berechnen. In der Abbildung sind die Mittelwerte der Genexpression von jeweils n Papillomen sowie die dazugehörigen Standardfehler (SEM) dargestellt.

Ergebnisse

Die shRNAs reduzierten die Transkripte von Sp100 in der Zellkultur mit einer Abnahme zwischen 60 % und 89 % sehr effektiv. Um die Transkriptreduktion der rekombinanten CRPV Knock-down Konstrukte in vivo zu ermitteln wurde die Gesamt-RNA aus den allen entnommenen Papillomen isoliert. Bei allen Papillomen beider Tierexperimente wurden die Sp100 Transkripte quantifiziert und die relative Genexpression auf ein Kontrollpapillom bezogen mit dem Referenzgen GAPDH berechnet. Anschließend wurde der Mittelwert aller Kontrollpapillome (CRPV-shLuc) auf 100 % normiert. Im Gegensatz zur starken Reduktion der Transkripte in den Zellkulturversuchen wurde in den entnommenen Papillomen die Sp100 Menge nur um 9 % (CRPV-shSp100 G) bis 39 % (CRPV-shSp100 B) reduziert. Hierbei war nur die Reduktion in den durch CRPV-shSp100 B induzierten Papillomen mit einem p-Wert von 0,04 signifikant. Die durch CRPV-shSp100 D induzierten Papillome erreichten mit $p = 0,12$ das Signifikanzniveau nicht.

Im Tierversuch #1 wurde zusätzlich die mRNA-Menge von Sp100 B/C/HMG untersucht. Die Reduktion der Transkripte bewegte sich in etwa der gleichen Größenordnung.

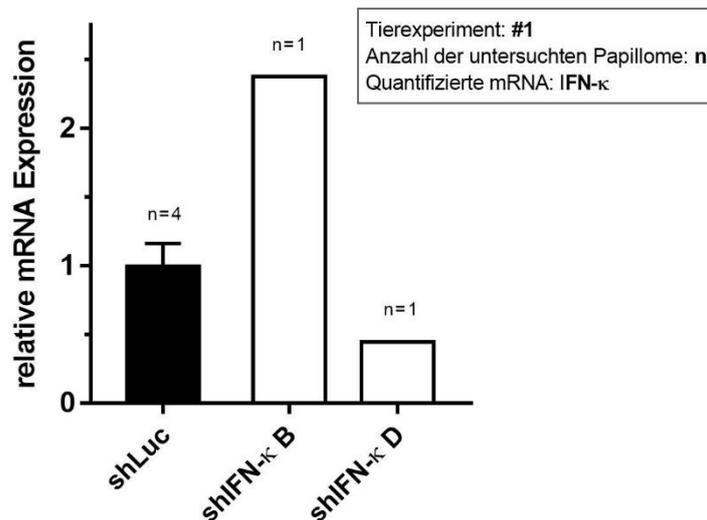


Abbildung 33: Effizienz der IFN- κ Knock-down Konstrukte in vivo. Die Gesamt-RNA wurde aus den Papillomen isoliert und die Transkripte von IFN- κ mittels Real-Time PCR quantifiziert. Durch die zusätzliche Bestimmung von GAPDH als Referenzgen war es möglich die relative Genexpression zu berechnen. In der Abbildung sind die Mittelwerte der Genexpression von jeweils n Papillomen sowie die dazugehörigen Standardfehler (SEM) dargestellt.

Ergebnisse

Aufgrund der geringen Anzahl von IFN- κ Knock-down Papillomen, konnte keine klare Aussage über die jeweilige Effektivität der Reduktion getroffen werden. Erschwerend kam die vergleichsweise geringe Expression von IFN- κ bei CP-Werten um 33 hinzu.

3.4.5 Effekte des Sp100 Knock-downs auf die virale Transkription

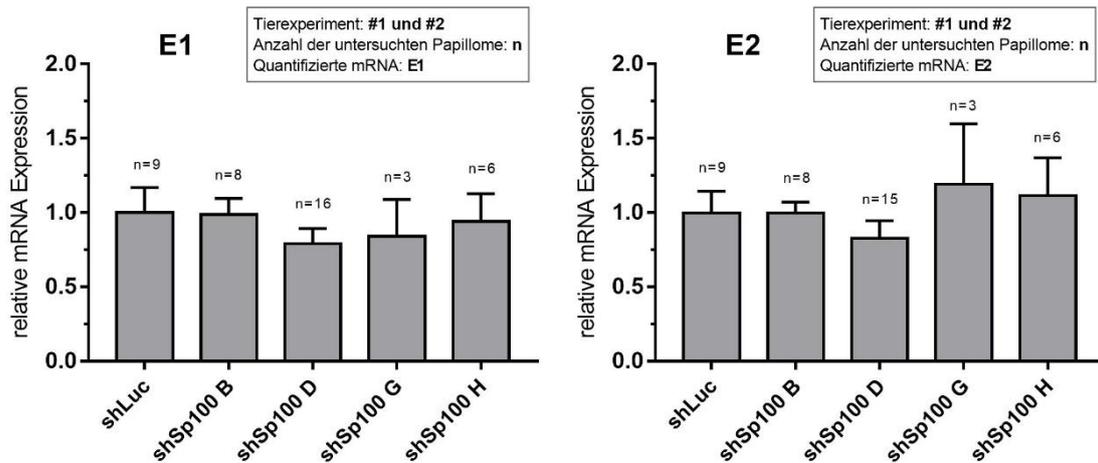


Abbildung 34: Effekte des Sp100 Knock-downs auf die viralen Transkripte E1 und E2 (nach Wurdak et al. 2018). Die Gesamt-RNA wurde aus den Papillomen isoliert und die Transkripte von E1, E2 und GAPDH als Referenzgen mittels Real-Time PCR quantifiziert. In der Abbildung sind die Mittelwerte der Genexpression von jeweils n Papillomen sowie die dazugehörigen Standardfehler (SEM) dargestellt.

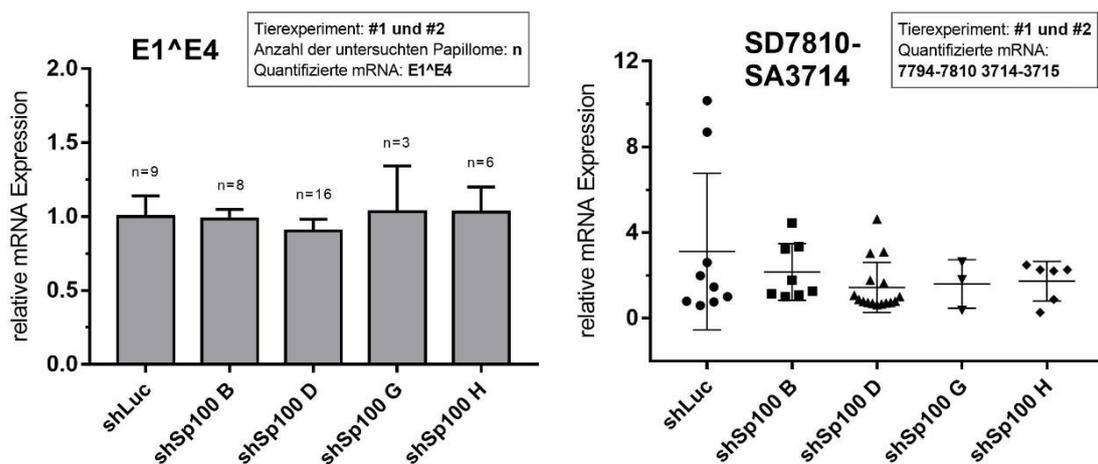


Abbildung 35: Effekte des Sp100 Knock-downs auf die viralen Transkripte E1^E4 und SD7810-SA3714 (nach Wurdak et al. 2018). Die Gesamt-RNA wurde aus den Papillomen isoliert und die Transkripte von E1^E4, SD7810-SA3714 und GAPDH als Referenzgen mittels Real-Time PCR quantifiziert. Mittelwerte der E1^E4 Expression von jeweils n Papillomen sowie die dazugehörigen

Ergebnisse

Standardfehler (SEM) sind im linken Diagramm dargestellt. Neben den einzelnen Werten des Transkriptes SD7810-SA3714 ist der jeweilige Mittelwert mit Standardabweichung (SD) im rechten Diagramm abgebildet.

Ziel weiterer Analysen war es Effekte des Sp100 Knock-downs auf die Transkription verschiedener viraler Gene zu detektieren. Hierzu wurden die Transkripte E1, E2, E1^{E4} und das Transkript SD7810-SA3714 mittels Real-Time PCR quantifiziert. Mit dem Referenzgen GAPDH wurde die relative Genexpression auf ein bestimmtes Kontrollpapillom bezogen berechnet. Anschließend wurde der Mittelwert aller Kontrollpapillome (CRPV-shLuc) auf 100 % normiert. Bei E1, E2 und E1^{E4} zeigten sich keine großen Differenzen in der Genexpression zwischen den Kontrollpapillomen und den Sp100 Knock-down Papillomen. Auffällig war nur eine Tendenz zu leicht reduzierten viralen Transkriptmengen bei CRPV-shSp100 D.

Bei SD7810-SA3714 handelt es sich um ein Transkript, das unter Kontrolle des späten CRPV Promotors PL steht. Das gespleißte Transkript geht aus der CRPV URR Region (Basenpaar 7810) in das E2/E4 Exon (Basenpaar 3714) über (Probst-Hunczek et al. 2015). Insgesamt zeigte sich im Vergleich zu den anderen untersuchten viralen Transkripten eine höhere Varianz der ermittelten Werte. Bei allen Papillomen mit reduzierter Sp100 Menge war im Mittel eine reduzierte Menge des SD7810-SA3714 Transkriptes zu beobachten. Bei zwei Papillomen, die durch das durch das Kontrollkonstrukt CRPV-shLuc induziert wurden, zeigte sich darüber hinaus eine deutlich erhöhte Expression des späten Transkriptes.

3.4.6 Effekte des Sp100 Knock-downs auf die CRPV Kopienanzahl

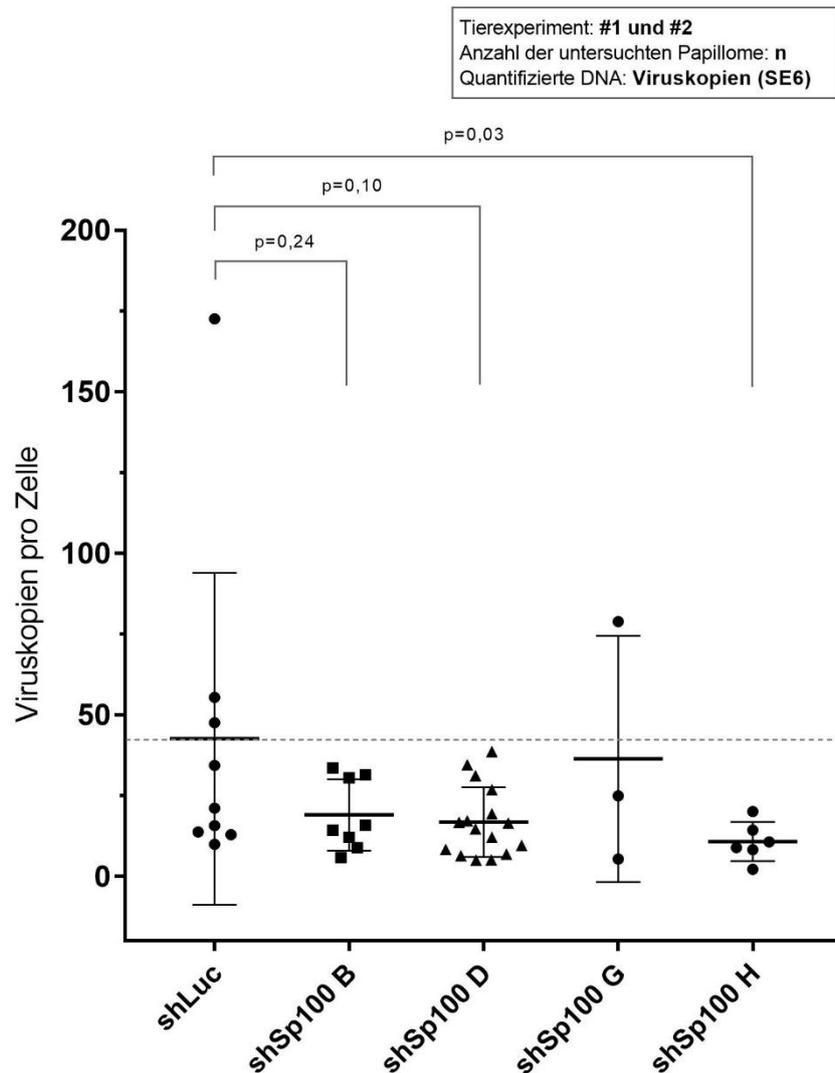


Abbildung 36: Effekte des Sp100 Knock-downs auf die CRPV Kopienanzahl (nach Wurdak et al. 2018). Es wurde die DNA aus den Papillomproben isoliert und die Viruskopien mittels Real-Time PCR absolut quantifiziert. Durch die zusätzliche absolute Quantifizierung von GAPDH konnte die CRPV Kopienanzahl pro Zelle berechnet werden. Dargestellt sind die CRPV Kopien pro Zelle aller Papillome, sowie die jeweiligen Mittelwerte mit Standardabweichung (SD). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests.

Ziel dieser Analyse war es Effekte des Sp100 Knock-downs auf die CRPV Kopienanzahl zu detektieren. Die DNA wurde wie unter 2.6.8 beschrieben aus den Papillombiopsien isoliert. Anschließend wurden mit den Primern CRPV SE6/LE6 und ocGAPDH-DNA die entsprechende virale DNA Kopienzahl in einer Real-Time PCR ermittelt. Durch zuvor erstellte Standardkurven war es möglich

die Kopien absolut zu quantifizieren. Bei der Bestimmung der CRPV Kopienanzahl pro Zelle musste beachtet werden, dass 17 Kopien von GAPDH im Kaninchengenom vorhanden sind. Der Mittelwert der Kontrollpapillome CRPV-shLuc ist deutlich höher als die Mittelwerte der einzelnen Papillome aus den CRPV shSp100 Konstrukten. Aufgrund der hohen Varianz der Viruskopienzahl, vor allem bei den Kontrollpapillomen, kann dennoch keine sichere Aussage über den Effekt des Sp100 Knock-downs auf die CRPV Kopienanzahl und damit indirekt auf die Replikation getätigt werden. Auffällig war jedoch, dass die zwei durch CRPV-shLuc induzierten Papillome mit der höchsten Viruskopienzahl dieselben waren, die auch das Transkript SD7810-SA3714 deutlich erhöht exprimierten. Auf die anderen quantifizierten viralen Transkripte E1, E2, E1^{E4} traf dies nicht zu.

3.4.7 Korrelation der CRPV-Kopienanzahl mit dem Transkript SD7810-SA3714

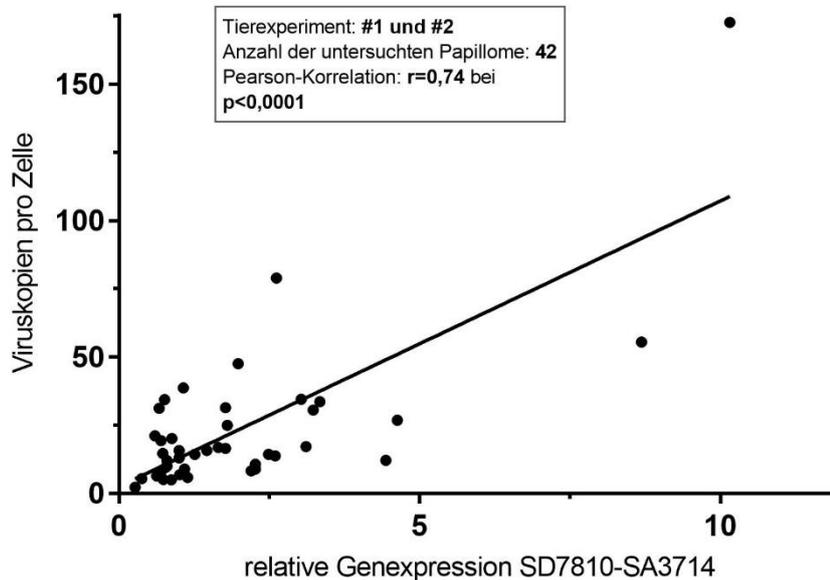


Abbildung 37: Korrelation der CRPV-Kopienanzahl mit dem Transkript SD7810-SA3714 (nach Wurdak et al. 2018). Die Viruskopien aller analysierten Papillome wurden mit der relativen Expression des Transkriptes SD7810-SA3714 verglichen. Es zeigt sich eine positive Korrelation bei einem Korrelationsquotienten nach Pearson von $r=0,74$.

Es ist bekannt, dass die Viruskopienzahl von humanen Papillomviren mit der Expression von späten viralen Transkripten korreliert (Spink & Laimins 2005). Bei der Analyse der CRPV-Kopienanzahl ist aufgefallen, dass die Papillome mit der höchsten Kopienanzahl ebenfalls eine stark erhöhte Expression des späten Transkriptes SD7810-SA3714 aufwiesen. Aus diesem Grund wurde mit den Werten aller analysierten Papillome getestet, ob es einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen den beiden Parametern gibt. Es zeigt sich eine positive Korrelation bei einem Korrelationsquotienten nach Pearson von $r=0,74$. Die Expression von E1, E2 und E1[^]E4 korrelierte hingegen nicht mit der CRPV-Kopienanzahl. Dies bedeutet, dass die Aktivität des späten CRPV Promotors ebenfalls stark mit der Viruskopienzahl korreliert.

3.4.8 CRPV Kopienanzahl in infizierter Haut ohne Papillombildung

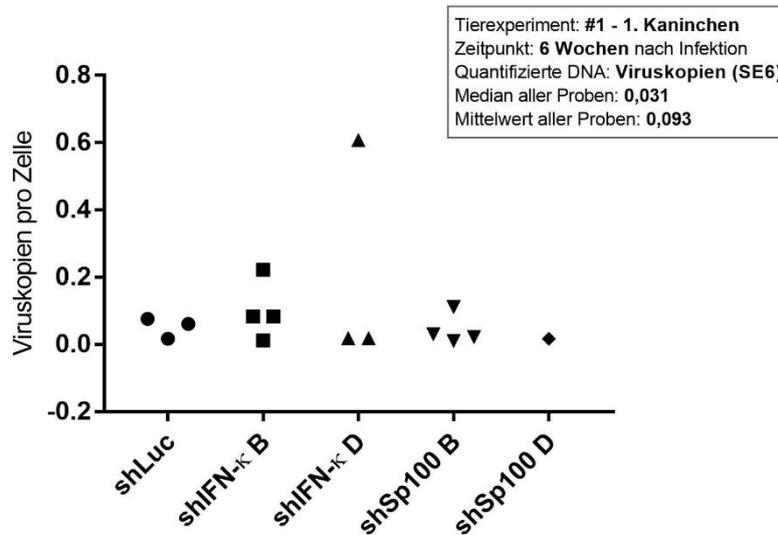


Abbildung 38: CRPV Kopienanzahl in infizierter Haut ohne Papillome. Es wurde die DNA aus den Hautproben isoliert und mittels Real-Time PCR absolut quantifiziert. Durch die zusätzliche absolute Quantifizierung von GAPDH konnte die CRPV Kopienanzahl pro Zelle berechnet werden. Dargestellt sind neben den CRPV Kopien pro Zelle aller Hautproben der Mittelwert mit Standardabweichung (SD). Die rekombinanten CRPV Knock-down Konstrukte werden im Diagramm nicht unterschieden.

Die meisten Papillome entstanden innerhalb von 6 Wochen. Bei der gewählten Infektionsdosis bildeten sich nur auf etwa 30 % aller Infektionsstellen Papillome. Im folgenden Versuch sollte geklärt werden, ob und wie viele Virusgenome 6 Woche nach Infektion in der infizierten Haut noch nachweisbar sind. Im Tierexperiment #1 wurden von einem Kaninchen nach 6 Wochen alle infizierten Hautstellen und Papillome entnommen. Die DNA wurde wie unter 2.6.8 beschrieben aus den Hautbiopsien isoliert. Anschließend wurden mit den Primern CRPV SE6/LE6 und ocGAPDH-DNA die Viruskopienzahl in einer Real-Time PCR ermittelt. Im Median kamen auf 100 Hautzellen etwa 3 Viruskopien. Die Varianz der Kopienanzahl war hierbei niedrig. Zwischen den rekombinanten CRPV Sp100 Knock-down Genomen und CRPV-shLuc gab es keine offensichtlichen Unterschiede. Ob sich die Virusgenome in Form einer latenten Infektion innerhalb der Keratinozyten oder als Überreste der Infektion im Extrazellulärraum befanden, lässt sich mit dieser Methode nicht unterscheiden.

3.4.9 Weitere exprimierte Interferontypen

Da die vorangegangenen Experimente keine klare Rolle für IFN-κ bei CRPV Infektionen demonstrierten, wurde durch qPCR Analysen die Expression weiterer Typ I und Typ III Interferone in Kontrollpapillomen von Tierexperiment #1 untersucht. Gemessen wurden die Transkripte von IFN-β, IFN-ε und IFN-λ. Hierzu wurden jeweils zwei verschiedene Primerpaare pro Gen verwendet. Das jeweils besser funktionierende Primerpaar ist unter Material und Methoden gelistet, wobei nicht mit Bestimmtheit gesagt werden kann wie effektiv die Primer jeweils sind. Es konnten keine IFN-λ Transkripte in den Papillomen nachgewiesen werden. IFN-β bewegte sich mit einem CP-Wert von 37 an der Nachweisbarkeitsgrenze, wobei die Schmelzkurven des PCR Produkts darauf hinwiesen, dass es sich tatsächlich um IFN-β Transkripte handelte. IFN-ε wurde mit CP-Werten um 34 in etwa gleicher Menge exprimiert wie IFN-κ. Dies lässt vermuten, dass nur IFN-κ und IFN-ε in sehr geringen Mengen, aber nicht die virus-induzierbaren IFN-β und IFN-λ in CRPV-induzierten Papillomen vorkommen.

Interferon	CP-Wert
Interferon-λ	>40
Interferon-β	37
Interferon-ε	34
Interferon-κ	33

Tabelle 4: Real-Time PCR CP-Werte verschiedener Interferone. Isoliert wurden die RNA Proben aus Papillomen, die aus rekombinanten CRPV-shLuc Genomen hervorgingen.

4 Diskussion

4.1 Analyse der Effekte der Typ I Interferone

4.1.1 Effekte von Interferon- β und Interferon- κ in den Zellkultur-Experimenten

Mittels mRNA- und Aminosäuresequenz Alignments wurden vor Beginn der Versuche die mRNA- und Aminosäuresequenzen von IFN- κ zwischen Mensch und Wildkaninchen verglichen. Problematisch war hierbei, dass für die Alignments lediglich Vorhersagen der mRNA-Struktur und der Aminosäuresequenzen des Kaninchens genutzt werden konnten. Kaninchen IFN- κ ist dem menschlichen IFN- κ vor allem in der Proteinsequenz sehr ähnlich. In den durchgeführten Versuchen zeigte sich durch die effektive Induktion verschiedener ISGs eine hohe Wirksamkeit von humanem IFN- β in Kaninchenzellen, was im Einklang steht mit der hohen Konservierung des Interferonsystems unter Vertebraten.

In Zellkulturversuchen sollte die Wirkung von Typ I Interferonen auf die virale Transkription von CRPV-positiven Kaninchen-Keratinocyten untersucht werden. Aus neueren Studien ist bekannt, dass durch die Behandlung mit rekombinantem IFN- β die viralen Transkripte in humanen Keratinocyten mit replizierenden HPV16 oder HPV31 Genomen reduziert werden. Zusätzlich wird das Wachstum der Zellen inhibiert (Habiger et al. 2015; Chang et al. 2002; Herdman et al. 2006). In AVS Zellen konnte durch die Zugabe von 1000 U/ml IFN- β hingegen weder nach 6 noch nach 24 Stunden eine Reduktion der viralen Transkripte beobachtet werden. Die erhöhte Expression von IFIT1 und Sp100 als nachgeschaltete ISGs zeigte jedoch, dass das verwendete IFN- β auch in den Kaninchen-Keratinocyten biologische Aktivität besitzt. Der Grund der fehlenden Inhibierung der CRPV

Transkription könnte auf eine zuvor abgelaufene Resistenzbildung der Zelllinie zurückgeführt werden. Aus Versuchen mit HPV16- und HPV31-positiven Zellen ist bekannt, dass die Behandlung mit IFN- β über mehrere Tage zur Integration des Virusgenoms und zur Ausbildung einer Resistenz gegenüber IFN- β führt (Chang et al. 2002; Herdman et al. 2006). In vorangegangenen Versuchen der Arbeitsgruppe beeinflusste auch die Behandlung von HeLa-Zellen mit IFN- β weder die virale Transkription noch das Wachstum der Zellen (Habiger 2015). Bei der HeLa Zelllinie handelt es sich um Zellen eines HPV18-positiven Zervixkarzinoms, bei der die viralen Genome ebenfalls in das Genom der Wirtszelle integriert sind (Gey et al. 1952). Bei der AVS Zelllinie liegt das CRPV Genom jedoch in episomaler Form vor (Huber et al. 2004). Eine denkbare Erklärung wäre die Integration des viralen Genoms und die damit möglicherweise verbundene Resistenzbildung gegenüber Interferonen nach mehrmaligem Passagieren der AVS Zellen. Ein weiterer Erklärungsansatz ist, dass die Inhibierung der Transkription und des Zellwachstums mittels Interferonen stark vom Papillomvirustyp abhängig ist. Vorangegangene Versuche haben gezeigt, dass die Effektivität der Inhibierung der viralen Transkription durch IFN- β in HPV16- und HPV31-positiven Zellen sich deutlich unterscheidet. Die Transkription von HPV31 wird durch IFN- β hierbei effektiver gehemmt (Habiger et al. 2015). CRPV könnte somit auch eine generelle Resistenz gegenüber IFN- β besitzen. Einige Humane Papillomviren besitzen in ihrem frühen Promotoren ISRE, die durch IRF1 und somit durch Typ I Interferone aktiviert werden. Aufgrund dieser Tatsache wird auch der paradoxe Effekt erklärt, dass die Transkription von verschiedenen HPV Typen durch geringe Mengen IFN- β verstärkt wird, während bei Zugabe von ausreichend IFN- β die Transkription abnimmt (Lace et al. 2009). Sich gegenseitig aufhebende Effekte, die dem gleichen Prinzip folgen, wären beispielsweise auch als Resistenzmechanismus bei CRPV denkbar.

IFN- κ wird in humanen Keratinozyten in hohen Mengen konstitutiv exprimiert (Reiser et al. 2011; LaFleur et al. 2001). Auch in vorangegangenen Versuchen der Arbeitsgruppe zeigte sich eine robuste Expression von IFN- κ in kultivierten Keratinozyten (Habiger et al. 2015). In kultivierten Kaninchen-Keratinozyten mit

dem kompletten CRPV Genom konnten hingegen keine IFN- κ Transkripte nachgewiesen werden. Grund hierfür könnten die bekannten inhibierenden Effekte der Virusproteine sein. Bei vorliegenden Hochrisiko-HPV Infektionen wird in Zellkultur-Experimenten eine deutliche Abnahme der konstitutiven Expression von IFN- κ durch die Methylierung des IFN- κ Promotors beschrieben. Auch in Biopsien von Zervixkarzinomen konnte kein IFN- κ nachgewiesen werden (Rincon-Orozco et al. 2009; DeCarlo et al. 2010). Zu dieser Theorie passt auch, dass Kaninchen-Keratinocyten, die nur mit dem HPV16-E7-Gen sowie dem Onkogen Ras immortalisiert wurden, IFN- κ zumindest auf einem niedrigen Level exprimieren.

Aufgrund der stark inhibierenden Effekte von Papillomviren gegenüber der Expression von IFN- κ liegt es nahe, dass IFN- κ ein wichtiges Typ I Interferon mit anti-Papillomvirus-Aktivität sein könnte. Neuere Studien der Arbeitsgruppe zeigen, dass die Expression von IFN- κ in CIN612-9E Zellen bereits nach 4 bis 6 Stunden die virale Transkription halbiert. Kurz darauf ist auch eine Abnahme der Viruskopien zu beobachten (Habiger et al. 2015). Bei den CIN612-9E Zellen handelt es sich um Keratinocyten einer cervikalen intraepithelialen Neoplasie (CIN), die episomale HPV31-Kopien enthält (Bedell et al. 1991). Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, ob IFN- κ ebenfalls eine antivirale Wirkung auf CRPV hat und ob diese Wirksamkeit auch in Tierexperimenten reproduzierbar ist. IFN- κ wird nach Synthese in den Zellkulturüberstand sekretiert (Habiger et al. 2015; LaFleur et al. 2001). In einem durchgeführten Experiment wurde IFN- κ haltiger Zellkulturüberstand auf unbehandelte AVS Zellen überführt und die viralen Transkripte 6 Stunden später quantifiziert. Der 1:10 verdünnte Überstand bewirkte keine Veränderung der viralen Transkription. Bei unverdünntem Überstand nahmen die viralen Transkripte zwischen 20 % und 25 % ab, wobei die Ergebnisse jedoch nicht die Signifikanzgrenze erreichten. Trotzdem ist dies ein weiterer Hinweis, dass IFN- κ unter den Typ I Interferonen eine spezielle Rolle bei der Abwehr von Papillomvirusinfektionen einnimmt. Während mit IFN- β in der Zellkultur bei CRPV keine Inhibierung der viralen Transkription erreicht werden konnte, war mittels IFN- κ zumindest eine Tendenz zur Reduktion der Transkripte zu beobachten.

4.1.2 Effekte von Interferon- κ in den Tierexperimenten

In den Tierexperimenten sollte mittels shRNA vermitteltem Knock-down der Einfluss von IFN- κ auf die Virulenz der CRPV Infektion untersucht werden. Es wurden im ersten Tierversuch zwei gegen IFN- κ gerichtete shRNA Knock-down Kassetten in das CRPV-Genom integriert und die Tiere mittels Gene Gun infiziert. Es zeigte sich keine erhöhte Papillom-Induktionsrate, wobei innerhalb der normalen Schwankungsbreite sogar weniger Papillome induziert wurden als beim CRPV Kontrollkonstrukt. Eine aussagekräftig weitere Analyse der Papillome war aufgrund der geringen Anzahl nicht möglich. Angesichts der sehr niedrigen IFN- κ Transkriptmengen in vivo und eines ausbleibenden Effektes wurde der Knock-down von IFN- κ im zweiten Tierexperiment nicht wiederholt.

Es kommen verschiedene Möglichkeiten in Betracht, warum trotz des Knock-downs keine erhöhte Virulenz der CRPV Infektionen erreicht wurde. Zuvor ausgeschlossen wurden mittels Qualitätskontrollen der Gene Gun Patronen unterschiedliche Infektionsdosen der CRPV Konstrukte. Eine naheliegende Hypothese zum Ausbleiben eines messbaren Effektes ist, dass der Knock-down von IFN- κ nicht effektiv genug war. In der Zellkultur wurden zuvor 6 verschiedene shRNAs getestet und die zwei effektivsten für die in vivo Experimente ausgewählt. Beide shRNAs reduzierten die Transkripte in der Zellkultur um etwa 65 %. Im Gegensatz zu den durch CRPV-shIFN- κ induzierten Papillomen konnte die Knock-down Effizienz bei den CRPV-shSp100 induzierten Papillomen aufgrund der deutlich höheren Anzahl an Papillomen durch Biopsien statistisch aussagekräftig bestimmt werden. Hierbei zeigt sich, dass trotz der sehr effektiven Knock-down Wirkung in der Zellkultur die Sp100 Transkripte in den Papillomen 12 Wochen nach Infektion abhängig vom Knock-down Konstrukt im Durchschnitt nur zwischen 9 % und 39 % reduziert waren. Überträgt man diese Ergebnisse auf die CRPV-shIFN- κ Konstrukte und beachtet dabei, dass der Knock-down schon in der Zellkultur weniger effektiv war als bei den Sp100 Knock-down Zelllinien, scheint diese Hypothese wahrscheinlich.

Was gegen diese Annahme spricht, ist die bereits erfolgreiche Nutzung von CRPV-shRNA Knock-down Konstrukten in vorangegangenen in-vivo Versuchen,

die von der Laborarbeitsgruppe nach ähnlichen Protokollen durchgeführt wurden. In einem Versuch wurde gezeigt, dass durch den Knock-down des Gens YB-1 mit Hilfe von zwei verschiedenen CRPV-shYB1 Konstrukten die Papillom-Induktionsrate erheblich reduziert wird (Leiprecht et al. 2014). In einem weiteren Versuch konnte durch den Knock-down von Brd4 mit derselben Methodik ebenfalls eine geringere Papillom-Induktionsrate erreicht werden (Delcuratolo et al. 2016). Die beiden beschriebenen Versuche und die Tierexperimente im Rahmen dieser Arbeit unterscheiden sich methodisch nur hinsichtlich der verwendeten Infektionsdosis. Aufgrund der erwarteten erhöhten Papillom-Induktionsrate in den durchgeführten Versuchen wurde im Vergleich zu den oben beschriebenen Versuchen nur 1/10 der Infektionsdosis verwendet.

Möglich erscheint deshalb auch, dass die Knock-down Effektivität erst im Laufe der Zeit abgenommen hat. Vor beziehungsweise bei der malignen Progression einer mit CRPV infizierten Zelle wird ein Teil der viralen DNA-Kopien in das Genom der Zelle integriert (Wettstein & Stevens 1982). Integrierte Fremd-DNA wird von eukaryontischen Zellen oftmals epigenetisch durch DNA-Methylierungen stillgelegt. Die Methylierung von Fremd-DNA verhindert deren Transkription, weshalb dieser Mechanismus wahrscheinlich eine Abwehrreaktion der Zelle ist (Doerfler 2011). Ob auch extrachromosomale DNA, insbesondere shRNA-Expressionskassetten methyliert werden, ist derzeit noch unklar. Methylierung des HPV-Genoms in unterschiedlichen Stadien der Infektion ist momentan ebenfalls Thema vieler Untersuchungen, wobei auch bekannt ist, dass die viralen Gene E6 und E7 wiederum selbst die zelluläre DNA Methyltransferase beeinflussen (Doolittle-Hall et al. 2015; Durzynska et al. 2017). Es wäre denkbar, dass der Anfangs starke Knock-down Effekt der rekombinanten CRPV Konstrukte durch die Methylierung der shRNA-Expressionskassetten mit der Zeit abgenommen hat. Da die Knock-down Effizienz in den oben beschriebenen vorangegangenen Projekten mit den gleichen rekombinanten CRPV Konstrukten nicht gemessen worden ist, ist nicht auszuschließen, dass auch dort die Effizienz des jeweiligen Knock-downs 12 Wochen nach Infektion deutlich abgenommen hatte. Trotzdem war in diesen Experimenten der Knock-down wahrscheinlich vor allem zu Beginn der Infektion effizient genug, um

deutliche Effekte in der Papillom-Induktionsrate hervorzurufen. Folgt man dieser Argumentation, hätte die gemessene Effizienz wenig zu bedeuten und man müsste die Grundannahme der Relevanz von IFN- κ bei der Abwehr von Papillomvirusinfektionen diskutieren.

Beim Ansprechen auf die Behandlung mit IFN- κ scheint in den in vitro Versuchen neben dem Integrationsstatus des Virusgenoms vor allem der Papillomvirus Typ eine entscheidende Rolle zu spielen. Da sich die Relevanz von IFN- κ zwischen den HPV Typen unterscheidet, ist es daher möglich, dass IFN- κ bei der Kontrolle von CRPV keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielt. Hierzu würde passen, dass in Real-Time PCR Analysen deutlich höhere Mengen von IFN- κ in humanen Keratinozyten als in Kaninchen-Keratinozyten nachgewiesen werden konnte. Weitere Unsicherheit ergibt sich aus der Tatsache, dass sich nicht immer vorangegangene Erkenntnisse aus Zellkultur-Experimenten auch in vivo reproduzieren lassen müssen.

Zusammenfassend lässt sich Schlussfolgern, dass in den durchgeführten Tierexperimenten keine anti-Papillomvirus Wirkung von IFN- κ auf CRPV nachgewiesen werden konnte. Gründe hierfür liegen am ehesten beim Kaninchen als Wirtstier, sowie am untersuchten Virustyp. Aufgrund dieser Einflussfaktoren darf auch kein umgekehrter Schluss über die Wirkung von IFN- κ auf Papillomviren im Allgemeinen gezogen werden. Um aufzuklären, ob IFN- κ eine spezielle Rolle bei der Abwehr von Papillomvirus Infektionen einnimmt, sind weitere Versuche notwendig.

4.2 Analyse der Effekte der Sp100 Proteine

Die Diskussion zu den Ergebnissen der Sp100 Versuche wurde in ähnlicher, weniger detaillierter Form bereits in (Wurdak et al. 2018) veröffentlicht.

4.2.1 Effekte der Sp100 Proteine in den Zellkultur-Experimenten

Die Sp100 Proteine des Menschen und des Wildkaninchens wurden ebenfalls mittels mRNA- und Aminosäuresequenz Alignments verglichen. Auch hier konnten nur Vorhersagen der mRNA- und Aminosäuresequenzen des Kaninchens genutzt werden. Die Datenbank weist acht verschiedene Sp100 Isoformen auf, die sich jeweils nur in einem Exon unterscheiden. Aufgrund der Länge der mRNA und Aminosäuresequenzen und den homologen Bereichen scheinen die vorhergesagten Sp100 Isoformen des Kaninchens am ehesten der menschlichen Sp100B Isoform zu entsprechen. Für diese Annahme spricht auch, dass in der X1 Isoform des Kaninchens sowohl die HSR Sequenz als auch die SAND-Domäne konserviert sind. Beide Sequenzen sind ebenfalls in der humanen Sp100B Isoform vorhanden (Berscheminski et al. 2014; Sternsdorf et al. 1999). Das Vorhandensein von einer oder mehreren kürzeren Isoformen, die am ehesten Sp100A ähnlich sind, ist wahrscheinlich. Aufgrund fehlender homologer Sequenzen, die spezifisch für Sp100C oder HMG sind, und aufgrund fehlender Vorhersagen der Algorithmen des NCBI ist die Existenz von längeren Sp100 Isoformen im Kaninchen fraglich. Vorangegangene Untersuchungen in humanen Zellen haben gezeigt, dass zumindest beim Menschen die Unterscheidung zwischen den einzelnen Sp100 Isoformen wichtig ist. Im Gegensatz zu den längeren Sp100 Isoformen mit antiviraler Wirkung werden Sp100A eher gegenteilige Effekte zugeschrieben (Berscheminski et al. 2014; Negorev et al. 2006; Newhart et al. 2013; Wilcox et al. 2005; Porter et al. 2016). Die konträren Effekte der humanen Sp100 Proteine wurden auch bei der Transkription von HPV beobachtet (Habiger et al. 2015). Dies wirft allerdings die Frage auf, warum IFN- κ in humanen Keratinozyten neben Sp100C vor allem Sp100A induziert (Habiger et al. 2015). In den durchgeführten Zellkultur- und

Tierexperimenten wurden alle verwendeten shRNAs zum Knock-down von Sp100 im vorderen Abschnitt der längsten mRNA Sequenz platziert. Dies hatte zum Ziel, dass, falls mehrere Isoformen existieren, möglichst alle reduziert werden. Beide verwendeten Primerpaare für Sp100 zeigten in allen durchgeführten Experimenten jeweils in etwa die gleiche Zu- oder Abnahme und lieferten somit keinen Hinweis auf das Vorhandensein mehrerer Kaninchen Sp100 Isoformen.

In den ersten Zellkultur-Experimenten wurde gezeigt, dass Sp100 auch in Kaninchen-Keratinocyten sowohl durch IFN- β als auch durch IFN- κ dosisabhängig induzierbar ist. Die gemessenen Effekte nach einmaliger Behandlung mit IFN- β waren nach 6 Stunden deutlich höher als nach 24 Stunden. Eine erhöhte Varianz war hierbei in den CRPV-positiven Keratinocyten zu beobachten, was darauf hindeuten könnte, dass die viralen Proteine nicht nur die Expression von Interferonen, sondern auch direkt nachgeschaltete ISGs beeinflussen. In einem weiteren Experiment konnte nachgewiesen werden, dass Sp100 in CRPV-positiven Kaninchen-Keratinocyten auch durch die Behandlung mit IFN- κ haltigem Überstand signifikant induzierbar ist. Insgesamt lässt sich daraus ableiten, dass Sp100 in Kaninchen-Keratinocyten sowohl durch Typ I Interferone allgemein, als auch durch IFN- κ im speziellen induzierbar ist. Dies passt zu publizierten Resultaten anderer Arbeitsgruppen, die ebenfalls aufzeigen konnten, dass Sp100 Proteine in verschiedenen humanen Zellen durch Typ I Interferone induzierbar sind (Negorev et al. 2009; Negorev et al. 2006; Guldner et al. 1992). Darüber hinaus konnten neuere Ergebnisse der Arbeitsgruppe bestätigt werden, die Sp100 Proteine speziell als IFN- κ induzierbare ISGs in Keratinocyten beschrieben (Habiger et al. 2015). Zuletzt wurde mit den Versuchen auch gezeigt, dass Sp100 in Kaninchenzellen sich analog zu humanem Sp100 verhält und durch IFN- κ induzierbar ist.

In weiteren Versuchen konnte mittels Reporterassays gezeigt werden, dass die Überexpression der humanen Isoformen Sp100B, Sp100C und Sp100HMG in CRPV-positiven Kaninchen-Keratinocyten die Aktivität der CRPV URR um etwa 95 % reduzierte. Die Inhibierung der CRPV URR war somit nochmals deutlich effizienter als die Inhibierung der HPV18 oder HPV31 URR in vorangegangenen

ähnlichen Versuchen der Arbeitsgruppe (Habiger et al. 2015). Sp100A inhibiert hingegen weder die URR der humanen Papillomviren, noch die CRPV URR.

Es ist derzeit noch nicht abschließend geklärt, ob die antivirale Wirksamkeit der Sp100 Proteine abhängig vom Stadium der Papillomvirus Infektion ist. SiRNA vermittelte Knock-down Experimente zeigten stärkste Effekte während der Etablierungsphase der HPV18 Infektion in humanen Keratinozyten. Während sich hierbei die virale Transkription 3- bis 6-fach erhöhte, konnte durch den Knock-down von Sp100 in Zelllinien mit stabil replizierenden HPV18 Genomen nur eine 1,5-fache Erhöhung der viralen Transkription erreicht werden (Stepp et al. 2013). Daten der Arbeitsgruppe haben des Weiteren gezeigt, dass durch einen Knock-down von Sp100 mittels siRNA die virale Transkription in HPV31 positiven Zelllinien ebenfalls um etwa das 1,5-fache erhöht wurde. Ergänzend wurde die Expression der Sp100 Isoformen in verschiedenen stabil HPV-positiven Zelllinien mit der Sp100 Expression in humanen Keratinozyten verglichen. Es zeigte sich, dass die Isoformen Sp100A und Sp100C in HPV-positiven Zellen signifikant reduziert waren. Mutmaßlich ist die verminderte Expression von Sp100 Folge der reduzierten Expression von IFN- κ (Habiger et al. 2015). Aufgrund der Datenlage in humanen Zellen wurde erwartet, dass der Knock-down von Sp100 in CRPV-positiven Kaninchen-Keratinozyten ebenfalls zu einer Zunahme der viralen Transkription führt. Überraschenderweise führte der shRNA vermittelte stabile Knock-down jedoch zu reduzierten viralen Transkripten. Die Reduktion zwischen 40 % und 80 % war hierbei mit vier unterschiedlichen shRNAs reproduzierbar und signifikant. Dieser scheinbar klare Widerspruch der Ergebnisse kann am ehesten mit dem Vorhandensein anderer Sp100 Isoformen, anderen Mengenverhältnissen der Sp100 Isoformen in Kaninchen-Keratinozyten oder Spezies-spezifischen Funktionen von Sp100 Proteinen aufgelöst werden.

Im Gegensatz zu den anderen humanen Sp100 Isoformen scheint Sp100A keine anti-Papillomvirus Wirkung zu besitzen. Experimente einiger Arbeitsgruppen zeigen, dass Sp100A darüber hinaus sogar die Transkription verschiedener Viren verstärkt (Berscheminski et al. 2014; Negorev et al. 2006; Newhart et al. 2013). Auch aus den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Reporterassays geht

hervor, dass humanes Sp100A die HPV31 URR und die CRPV URR nicht inhibiert. Wie oben bereits beschrieben, geben die zu Beginn durchgeführten mRNA- und Protein-Alignments zwischen humanem Sp100 und Kaninchen Sp100 keine Hinweise, dass im Kaninchen die Sp100C oder Sp100HMG Isoformen existieren. Die längste Sp100 Isoform des Kaninchens ist der menschlichen Sp100B Isoform ähnlich. Durch unterschiedliches Spleißen wären darüber hinaus eine oder mehrere Isoformen denkbar, die der menschlichen Sp100A Isoform ähneln. Geht man davon aus, dass die Isoformen des Menschen und des Kaninchens auch funktionell homolog zueinander sind, könnte das Kaninchen zwei viral-inhibitorische Isoformen weniger besitzen. Durch das im Verhältnis vermehrt vorhandene „Sp100A“, das die virale Transkription verstärkt, wäre eine erniedrigte virale Transkription bei Reduktion aller Sp100 Isoformen in den CRPV-positiven Kaninchen-Keratinocyten die logische Konsequenz.

Obwohl die viralen Transkripte durch den Knock-down von Sp100 in den CRPV-positiven Zellen signifikant reduziert waren, hatte dies keinen Einfluss auf die Proliferation der Zellen. Um einen messbaren Effekt auf das Wachstum der Zellen zu erzielen, müsste die Menge an viralem E6 und E7 wahrscheinlich noch deutlicher reduziert werden.

4.2.2 Effekte der Sp100 Proteine in den Tierexperimenten

In den anschließenden Tierexperimenten wurde analog zu den IFN- κ Versuchen ein Sp100 Gen-Knock-down in das CRPV-Genom integriert. Eine im ersten Tierexperiment beobachtete stark erhöhte Papillom-Induktionsrate bei einem von zwei verwendeten CRPV-shSp100 Knock-down Konstrukten war in einem zweiten Tierexperiment nicht reproduzierbar. Auch zwei weitere CRPV-shSp100 Knock-down Konstrukte im zweiten Tierversuch unterschieden sich nicht vom Kontrollkonstrukt hinsichtlich der Papillom-Induktionsrate sowie der Wachstumsgeschwindigkeit der Papillome. Gegenüber den CRPV-shIFN- κ induzierten Papillomen bestand bei einer hohen Anzahl an CRPV-shSp100 induzierten Papillomen aus zwei Tierversuchen nach Abschluss der Experimente

die Möglichkeit mit Papillombiopsien statistisch aussagekräftige Analysen durchzuführen.

Untersuchungen von Biopsien, welche 12 Wochen nach Infektion entnommen wurden, zeigten, dass die Sp100 Menge abhängig vom Knock-down Konstrukt im Durchschnitt nur zwischen 9 % und 39 % reduziert war. Die deutlich schlechtere Sp100 Knock-down Effizienz gegenüber den Zellkultur-Experimenten kann verschiedene Ursachen haben und wurde schon für die IFN- κ Knock-down Tierversuche unter 4.1.2 erörtert. Mutmaßlich nimmt die Knock-down Effizienz erst mit der Zeit ab. Zusätzlich muss beachtet werden, dass der Knock-down abhängig von der CRPV Kopienanzahl ist. Zu Beginn einer Infektion gibt es nur wenige CRPV Kopien und damit nur wenige Knock-down Expressionskassetten. Darüber hinaus benötigt ein durch RNA-Interferenz vermittelter Knock-down naturgemäß einige Zeit, bis die mRNA-Kopienanzahl sowie die Menge der schon translatierten Proteine abnimmt. Stärkste Effekte bei der Herunterregulation der Sp100-Expression zeigten sich jedoch bei der Etablierung von HPV Infektionen (Stepp et al. 2013). Der Knock-down von Sp100 könnte somit ganz zu Beginn der Infektion ineffizient gewesen sein, sowie im Laufe der Infektion durch Deaktivierung der Knock-down Kassetten an Effizienz verloren haben. Ein effektiver Knock-down von Sp100 während der mittleren Phase des Experimentes war wahrscheinlich insgesamt zu schwach um messbare Effekte bei der Papillom-Induktionsrate oder beim Wachstum der Papillome hervorzurufen.

Die Analyse der viralen Transkripte in den Papillombiopsien zeigte, dass zumindest zum Zeitpunkt der Biopsie-Entnahme 12 Wochen nach Infektion keine Veränderung der Transkriptmenge von E1, E2, sowie E1^{E4} nachweisbar war. Auffällig war hingegen, dass das Transkript SD7810-SA3714 in allen Knock-down Konstrukten im Durchschnitt erniedrigt war. Dies wurde vor allem durch wenige Kontroll-Papillome mit stark erhöhter SD7810-SA3714 Menge verursacht. Das Transkript SD7810-SA3714 steht unter Kontrolle des späten Promotors und ist wahrscheinlich in der Expression der Kapsidproteine L1 und L2 involviert (Probst-Hunczek et al. 2015). Bei Analyse der CRPV Kopienanzahl pro Zelle fiel auf, dass die Viruskopienzahl in einigen Kontroll-Papillomen

gegenüber den CRPV-shSp100 Knock-down Papillomen ebenfalls erhöht war. Dies führte dazu, dass auch die durchschnittliche Viruskopienzahl der Kontroll-Papillome erhöht war. Humane Papillomviren replizieren erst in den oberen Epithelschichten vermehrt ihr Genom und exprimieren auch nur dort die Kapsidproteine L1 und L2 (Harden & Munger 2017). Es ist bekannt, dass die produktive Replikation und die Induktion des späten viralen Promotors in humanen Papillomviren etwa gleichzeitig starten. Sowohl der Beginn der Amplifikation als auch die Induktion des späten Promotors sind an die Differenzierung der Wirtszellen gekoppelt. Für die maximale Induktion des späten Promotors ist die Virusamplifikation jedoch Voraussetzung (Spink & Laimins 2005). Es konnte gezeigt werden, dass auch die CRPV Kopienzahl in den Biopsien insgesamt stark mit der Expression des späten Transkript SD7810-SA3714 korreliert. Da die Papillome mit sehr stark erhöhter Kopienzahl jeweils hohe Mengen des späten Transkriptes exprimierten, kann auch ein technischer Messfehler ausgeschlossen werden. Die erhöhte Viruskopienzahl und die vermehrte Expression des späten Transkriptes SD7810-SA3714 sprechen für einen häufigeren Eintritt in die späte Phase des CRPV Replikationszyklus der Kontrollpapillome. Dies lässt vermuten, dass der Knock-down von Sp100 den Übergang in die produktive Replikation und die Induktion des späten Promotors verschlechtert.

Es lässt sich zusammenfassen, dass die Zellkultur-Experimente sowie die Tierversuche darauf hinweisen, dass das Vorhandensein von Sp100 Proteinen im Kaninchen sich positiv auf die Replikation und Transkription von CRPV auswirkt. Sp100 könnte hierbei in vivo speziell auch für den Übergang in die produktive Replikation von CRPV wichtig sein. Die zu HPV-Infektionen konträren Effekte können am ehesten durch vermehrt vorhandenes „Kaninchen-Sp100A“ oder Spezies-spezifischen Effekten der Sp100 Proteine erklärt werden. Weniger wahrscheinlich ist hingegen, dass die Effekte von Sp100 sich gegenüber HPV und CRPV unterscheiden, da zumindest die CRPV URR durch Überexpression von humanem Sp100 in der Zellkultur inhibiert werden kann. Um die komplexe Rolle der einzelnen Sp100 Proteine bei Papillomvirusinfektionen aufzuklären sind jedoch weitere Versuche notwendig.

4.3 Sonstige Schlussfolgerungen aus den Experimenten

Im Screen nach weiteren exprimierten Interferonen in den durch CRPV induzierten Papillomen war vor allem IFN- ϵ interessant. IFN- ϵ wurde kürzlich als wichtiges Typ I Interferon im weiblichen Reproduktionstrakt von Mäusen beschrieben. Ähnlich wie IFN- κ wird IFN- ϵ in Epithelzellen konstitutiv exprimiert und zusätzlich hormonell reguliert (Fung et al. 2013). IFN- ϵ könnte somit ebenfalls ein wichtiger Restriktionsfaktor gegenüber Papillomvirusinfektionen sein.

5 Zusammenfassung

Persistierende Infektionen mit humanen Papillomviren (HPV) vom Hochrisiko-Typ können zu malignen Tumoren des Ano-Genitaltraktes sowie des Mund-Rachenraums führen. HPV ist weltweit verbreitet und wird meist sexuell übertragen. Interferone (IFN) sind Zytokine, die eine Vielzahl von Genen induzieren, welche zum Teil antivirale Aktivität besitzen. IFN- κ wird in kultivierten humanen Keratinozyten im Gegensatz zu anderen Typ I Interferonen konstitutiv und in hohen Mengen exprimiert. Hochrisiko HPV Typen inhibieren die Expression von IFN- κ , was eine besondere Rolle von IFN- κ bei der Abwehr von Papillomvirus Infektionen nahelegt. Neuere Zellkulturarbeiten haben diese Annahme bestärkt und gezeigt, dass die anti-HPV Aktivität von IFN- κ zumindest teilweise auf der Induktion von Sp100 Proteinen beruhen könnte. Neuere Studien beschreiben unabhängig davon Sp100 als Restriktionsfaktor gegenüber HPV18 und HPV31.

Um die Wirkung von IFN- κ und Sp100 Proteinen in vivo zu untersuchen, wurde das Cottontail Rabbit Papillomavirus (CRPV)/Wildkaninchen Modell genutzt. Die Infektion von Wildkaninchen mit CRPV führt zur Entstehung von Papillomen, die zu invasiven Plattenepithelkarzinomen progredieren können. In Zellkultur-Experimenten konnte zunächst gezeigt werden, dass Kaninchen Sp100 sowohl durch IFN- β als auch durch IFN- κ induzierbar ist. Gleichzeitig konnte die virale Transkription von CRPV-positiven Kaninchen-Keratinozyten mittels IFN- κ haltigem Zellkultur-Überstand nur leicht inhibiert werden. Mit Reporterassays konnte gezeigt werden, dass durch die Überexpression der humanen Isoformen Sp100B, Sp100C und Sp100HMG in CRPV-positiven Kaninchen-Keratinozyten die transkriptionelle Aktivität der upstream regulatory region von CRPV um etwa 95 % reduziert wird. In Vorbereitung auf die Tierversuche wurden effektive IFN- κ und Sp100 shRNA Knock-down Sequenzen konstruiert und in Kaninchen-

Keratinocyten getestet. Überraschenderweise verringerte sich hierbei die virale Transkription durch den Knock-down von Sp100 Proteinen in CRPV-positiven Keratinocyten um bis zu 81 %. Mittels rekombinanten CRPV-shIFN- κ beziehungsweise CRPV-shSp100 Genomen konnte schließlich der Einfluss der Proteine auf Papillomvirus-Infektionen am Kaninchen untersucht werden. Es konnten keine messbaren Effekte des Knock-downs von IFN- κ oder Sp100 auf die Papillom-Induktionsrate oder die Progression der Papillome nachgewiesen werden. Anschließende Gewebebiopsien zeigten jedoch, dass in den CRPV-shSp100 induzierten Papillomen sowohl die Viruskopienzahl als auch Transkripte des späten Promotors leicht erniedrigt waren. Das Vorhandensein von Sp100 Proteinen im Kaninchen könnte somit speziell auch für den Übergang in die produktive Replikations-Phase von CRPV wichtig sein. Die zu humanem Sp100 konträren Effekte der Zellkultur-Experimente und der Tierversuche können neben Spezies-spezifischen Effekten auch durch andere Mengenverhältnisse der Sp100 Isoformen erklärt werden. Vermehrt vorhandene Sp100 Isoformen, welche der humanen Sp100A Isoform ähneln und somit die virale Transkription und Replikation verstärken, sind denkbar.

6 Literaturverzeichnis

- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore D, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1990):** Current protocols in molecular biology. Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, USA.
- Barbosa MS, Wettstein FO (1987):** Transcription of the cottontail rabbit papillomavirus early region and identification of two E6 polypeptides in COS-7 cells. *J Virol.* 61, 2938-2942.
- Bedell MA, Hudsonn JB, Golub TR, Turyk ME, Hosken M, Wilbanks GD & Laimins LA (1991):** Amplification of human papillomavirus genomes in vitro is dependent on epithelial differentiation. *J Virol* 65, 2254-2260.
- Bergvall M, Melendy T, Archambault J (2013):** The E1 proteins. *Virology* 445, 35-56.
- Berscheminski J, Wimmer P, Brun J, Ip WH, Groitl P, Horlacher T, Jaffray E, Hay RT, Dobner T, Schreiner S (2014):** Sp100 isoform-specific regulation of human adenovirus 5 gene expression. *J Virol.* 88, 6076-6092.
- Bodily J, Laimins LA (2011):** Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression. *Trends Microbiol* 19, 33-39.
- Borden EC, Sen GC, Uze G, Silverman RH, Ransohoff RM, Foster GR, Stark GR (2007):** Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nat Rev Drug Discov.* 12, 975-990.
- Bottomley MJ, Collard MW, Huggenvik JI, Liu Z, Gibson TJ, Sattler M (2001):** The SAND domain structure defines a novel DNA-binding fold in transcriptional regulation. *Nat Struct Biol* 8, 626-633.
- Buontempo PJ, Jubin RG, Buontempo CA, Wagner NE, Reyes GR, Baroudy BM (2006):** Antiviral activity of transiently expressed IFN-kappa is cell-associated. *J Interferon Cytokine Res* 26, 40-52.
- Chang YE, Pena L, Sen GC, Park JK, Laimins LA (2002):** Long-term effect of interferon on keratinocytes that maintain human papillomavirus type 31. *J Virol* 76, 8864-8874.
- Chelbi-Alix MK, Pelicano L, Quignon F, Koken MH, Venturini L, Stadler M, Pavlovic J, Degos L, de The H (1995):** Induction of the PML protein by interferons in normal and APL cells. *Leukemia* 9, 2027-2033.
- Christensen ND (2016):** HPV disease transmission protection and control. *Microb Cell.* 3, 476-490.

- Cogliano V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F (2005):** Carcinogenicity of human papillomaviruses. *Lancet Oncol* 6, 204.
- Day PM, Baker CC, Lowy DR, Schiller JT (2004):** Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101, 14252-14257.
- DeCarlo CA, Severini A, Edler L, Escott NG, Lambert PF, Ulanova M, Zehbe I (2010):** IFN-kappa, a novel type I IFN, is undetectable in HPV-positive human cervical keratinocytes. *Lab Invest* 90, 1482-1491.
- Delcuratolo M, Fertey J, Schneider M, Schuetz J, Leiprecht N, Hudjetz B, Brodbeck S, Corall S, Dreer M, Schwab RM, Grimm M, Wu SY, Stubenrauch F, Chiang CM, Iftner T (2016):** Papillomavirus-Associated Tumor Formation Critically Depends on c-Fos Expression Induced by Viral Protein E2 and Bromodomain Protein Brd4. *PLoS Pathog.* 12, e1005366.
- de Martel C, Ferlay J, Franceschi S, Vignat J, Bray F, Forman D, Plummer M (2012):** Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol.* 13, 607-615.
- de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H (2004):** Classification of papillomaviruses. *Virology* 324, 17-27.
- Doerfler W (2011):** Epigenetic consequences of foreign DNA insertions: de novo methylation and global alterations of methylation patterns in recipient genomes. *Rev Med Virol.* 21, 336-346.
- Doolittle-Hall JM, Cunningham Glasspoole DL, Seaman WT, Webster-Cyriaque J (2015):** Meta-Analysis of DNA Tumor-Viral Integration Site Selection Indicates a Role for Repeats, Gene Expression and Epigenetics. *Cancers* 7, 2217–2235.
- Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, Stanley MA (2012):** The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine* 30 Suppl 5, F55-70.
- Doorbar J (2016):** Model systems of human papillomavirus-associated disease. *J Pathol.* 238, 166-179.
- Durzynska J, Lesniewicz K, Poreba E (2017):** Human papillomaviruses in epigenetic regulations. *Mutat Res Rev Mutat Res.* 772, 36-50.
- Everett RD, Chelbi-Alix MK (2016):** PML and PML nuclear bodies: implications in antiviral defence. *Biochimie.* 89, 6-7.
- Fertey J, Hurst J, Straub E, Schenker A, Iftner T, Stubenrauch F (2011):** Growth inhibition of HeLa cells is a conserved feature of high-risk human papillomavirus E8^{E2C} proteins and can also be achieved by an artificial repressor protein. *J Virol.* 85, 2918-2926.
- Frattini MG, Laimins LA (1994):** The role of the E1 and E2 proteins in the replication of human papillomavirus type 31b. *Virology* 204, 799-804.

- Florin L, Schäfer F, Sotlar K, Streeck RE, Sapp M (2002):** Reorganization of nuclear domain 10 induced by papillomavirus capsid protein I2. *Virology*. 295, 97-107.
- Fung KY, Mangan NE, Cumming H, Horvat JC, Mayall JR, Stifter S, De Weerd N, Roisman LC, Rossjohn J, Robertson S, Schjenken J, Parker B, Gargett C, Nguyen HPT, Carr DJ, Hansbro PM, Hertzog PJ (2013):** Interferon ϵ protects the female reproductive tract from viral and bacterial infection. *Science* 339, 1088–1092.
- GE Healthcare Dharmacon (2015):** siDESIGN Center tool. [online] <http://dharmacon.gelifesciences.com/design-center/> [Zugriff 12.08.2016].
- Gey GO, Coffman WD & Kubicek MT (1952):** Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res*, 264-265.
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977):** Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36, 59-74.
- Graham SV (2010):** Human papillomavirus: gene expression, regulation and prospects for novel diagnostic methods and antiviral therapies. *Future Microbiol.* 5, 1493-1506.
- Guldner HH, Szostecki C, Grötzinger T, Will H (1992):** IFN enhance expression of Sp100, an autoantigen in primary biliary cirrhosis. *J Immunol.* 149, 4067-4073.
- Guldner HH, Szostecki C, Schroder P, Matschl U, Jensen K, Luders C, Will H, Sternsdorf T (1999):** Splice variants of the nuclear dot-associated Sp100 protein contain homologies to HMG-1 and a human nuclear phosphoprotein-box motif. *J Cell Sci* 112 (Pt 5), 733-747.
- Habiger C (2015):** Die Wirkung von Interferon-kappa auf karzinogene humane Papillomviren. Naturwissenschaftliche Dissertation an der Eberhard Karls Universität Tübingen.
- Habiger C, Jager G, Walter M, Iftner T, Stubenrauch F (2015):** IFN-kappa inhibits HPV31 transcription by inducing Sp100 proteins. *J Virol* 90, 694-704.
- Harden ME, Munger K (2017):** Human papillomavirus molecular biology. *Mutat Res.* 772, 3-12.
- Hardy MP, Owczarek CM, Jermini LS, Ejdebäck M, Hertzog PJ (2004):** Characterization of the type I interferon locus and identification of novel genes. *Genomics.* 84, 331-345.
- Harper DM, DeMars LR (2017):** HPV vaccines - A review of the first decade. *Gynecol Oncol.* 146, 196-204.
- Herdman MT, Pett MR, Roberts I, Alazawi WO, Teschendorff AE, Zhang XY, Stanley MA, Coleman N (2006):** Interferon-beta treatment of cervical keratinocytes naturally infected with human papillomavirus 16

episomes promotes rapid reduction in episome numbers and emergence of latent integrants. *Carcinogenesis* 27, 2341-2353.

- Hong S, Laimins LA (2017):** Manipulation of the innate immune response by human papillomaviruses. *Virus Res.* 231, 34-40.
- Horvath CA, Boulet GA, Renoux VM, Delvenne PO, Bogers JP (2010):** Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. *Virology* 7, 11.
- HPV Information Centre (2017):** Human Papillomavirus and Related Diseases Report (Version 19.05.2017). [online] <http://www.hpvcentre.net/> [Zugriff 25.06.2016].
- Huber E, Vlasny D, Jeckel S, Stubenrauch F, Iftner T (2004):** Gene profiling of cottontail rabbit papillomavirus-induced carcinomas identifies upregulated genes directly involved in stroma invasion as shown by small interfering RNA-mediated gene silencing. *J Virol* 78, 7478-7489.
- Hu J, Budgeon LR, Cladel NM, Culp TD, Balogh KK, Christensen ND (2007):** Detection of L1, infectious virions and anti-L1 antibody in domestic rabbits infected with cottontail rabbit papillomavirus. *J Gen Virol.* 88, 3286-3293.
- Invivogen (2015):** siRNA Wizard v3.1. [online] <http://www.invivogen.com/sirnazizard/> [Zugriff 12.08.2016].
- Isaac A, Wilcox KW, Taylor JL (2006):** SP100B, a repressor of gene expression preferentially binds to DNA with unmethylated CpGs. *J Cell Biochem.* 98, 1106-1122.
- Jeckel S, Loetsch E, Huber E, Stubenrauch F, Iftner T (2003):** Identification of the E9/E2C cDNA and functional characterization of the gene product reveal a new repressor of transcription and replication in cottontail rabbit papillomavirus. *J Virol* 77, 8736-8744.
- Karstensen B, Poppelreuther S, Bonin M, Walter M, Iftner T, Stubenrauch F (2006):** Gene expression profiles reveal an upregulation of E2F and downregulation of interferon targets by HPV18 but no changes between keratinocytes with integrated or episomal viral genomes. *Virology* 353, 200-209.
- Kivipõld P, Võsa L, Ustav M, Kurg R (2015):** DAXX modulates human papillomavirus early gene expression and genome replication in U2OS cells. *Virology* 12, 104.
- Lace MJ, Anson JR, Klingelhutz AJ, Harada H, Taniguchi T, Bossler AD, Haugen TH, Turek LP (2009):** Interferon-beta treatment increases human papillomavirus early gene transcription and viral plasmid genome replication by activating interferon regulatory factor (IRF)-1. *Carcinogenesis* 30, 1336-1344.
- LaFleur DW, Nardelli B, Tsareva T, Mather D, Feng P, Semenuk M, Taylor K, Buergin M, Chinchilla D, Roshke V, Chen G, Ruben SM, Pitha PM,**

- Coleman TA, Moore PA (2001):** Interferon-kappa, a novel type I interferon expressed in human keratinocytes. *J Biol Chem* 276, 39765-39771.
- Leiprecht N, Notz E, Schuetz J, Haedicke J, Stubenrauch F, Iftner T (2014):** A novel recombinant papillomavirus genomeenabling in vivo RNA interference reveals that YB-1, which interacts with the viral regulatory protein E2, is required for CRPV-induced tumor formation in vivo. *Am J Cancer Res* 4, 222-233.
- Maul GG (1998):** Nuclear domain 10, the site of DNA virus transcription and replication. *Bioessays*. 20, 660-667.
- McBride AA (2013):** The papillomavirus E2 proteins. *Virology* 445, 57-79.
- Moody CA, Laimins LA (2010):** Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer* 10, 550-560.
- Moscicki AB, Schiffman M, Burchell A, Albero G, Giuliano AR, Goodman MT, Kjaer SK, Palefsky J (2012):** Updating the natural history of human papillomavirus and anogenital cancers. *Vaccine* 30, F24-33.
- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA (2009):** *Medical Microbiology* (6th edition). Mosby Elsevier, Philadelphia, USA.
- Nagoya University Graduate School of Medicine (2015):** i-Score Designer. [online] http://www.med.nagoya-u.ac.jp/neurogenetics/i_Score/i_score.html [Zugriff 12.08.2016].
- National Center for Biotechnology Information (2017):** alle benötigten DNA, RNA und Proteinsequenzen sowie die durchgeführten Alignments. [online] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> [Zugriff 16.06.2017].
- Nees M, Geoghegan JM, Hyman T, Frank S, Miller L, Woodworth CD (2001):** Papillomavirus type 16 oncogenes downregulate expression of interferon-responsive genes and upregulate proliferation-associated and NF-kappaB-responsive genes in cervical keratinocytes. *J Virol* 75, 4283-4296.
- Negorev DG, Vladimirova OV, Ivanov A, Rauscher 3rd F, Maul GG (2006):** Differential role of Sp100 isoforms in interferon-mediated repression of herpes simplex virus type 1 immediate-early protein expression. *J. Virol.* 80, 8019–8029.
- Negorev DG, Vladimirova OV, Maul GG (2009):** Differential functions of interferon-upregulated Sp100 isoforms: herpes simplex virus type 1 promoter-based immediate-early gene suppression and PML protection from ICP0-mediated degradation. *J Virol.* 83, 5168-5180.
- Newhart A, Negorev DG, Rafalska-Metcalf IU, Yang T, Maul GG, Janicki SM (2013):** Sp100A promotes chromatin decondensation at a cytomegalovirus-promoter-regulated transcription site. *Mol. Biol. Cell* 24, 1454–1468.

- Papillomavirus Episteme (2017) a:** Transcript Maps [online]
<https://pave.niaid.nih.gov/images/transcript/SfPV1/SfPV1.png>
[Zugriff 19.08.2017].
- Papillomavirus Episteme (2017) b:** Transcript Maps [online]
https://pave.niaid.nih.gov/images/transcript/SfPV1/SfPV1_legend.pdf
[Zugriff 19.08.2017].
- Peh WL, Brandsma JL, Christensen ND, Cladel NM, Wu X, Doorbar J (2004):** The viral E4 protein is required for the completion of the cottontail rabbit papillomavirus productive cycle in vivo. *J Virol.* 78, 2142-2151.
- Pfaffl MW (2001):** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45.
- Probst S, Notz E, Wolff M, Buehlmann J, Stubenrauch F, Iftner T (2012):** A recombinant cottontail rabbit papillomavirus genome for ectopic expression of genes in cells infected with virus in vivo. *J Virol Methods* 187, 110-133.
- Probst-Hunczek S, Jäger G, Schneider M, Notz E, Stubenrauch F, Iftner T (2015):** RNA sequencing analysis identifies novel spliced transcripts but does not indicate quantitative or qualitative changes of viral transcripts during progression of cottontail rabbit papillomavirus-induced tumours. *J Gen Virol.* 96, 3083-3089.
- Reiser J, Hurst J, Voges M, Krauss P, Münch P, Iftner T, Stubenrauch F (2011):** High-risk human papillomaviruses repress constitutive kappa interferon transcription via E6 to prevent pathogen recognition receptor and antiviral-gene expression. *J Virol.* 85, 11372-11380.
- Rincon-Orozco B, Halec G, Rosenberger S, Muschik D, Nindl I, Bachmann A, Ritter TM, Dondog B, Ly R, Bosch FX, Zawatzky R, Rösl F (2009):** Epigenetic silencing of interferon-kappa in human papillomavirus type 16-positive cells. *Cancer Res* 69, 8718-8725.
- Robert-Koch-Institut (2016):** Epidemiologisches Bulletin. 29. August 2016/Nr. 34.
- Sambrook J, Russell DW (2001):** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Schelhaas M, Shah B, Holzer M, Blattmann P, Kühling L, Day PM, Schiller JT, Helenius A (2012):** Entry of human papillomavirus type 16 by actin-dependent, clathrin- and lipid raft-independent endocytosis. *PLoS Pathog.* 8.
- Scherer M, Stamminger T (2016):** Emerging Role of PML Nuclear Bodies in Innate Immune Signaling. *J Virol.* 90, 5850-5854.
- Sen E, Bromberg-White JL, Meyers C (2002):** Genetic analysis of cis regulatory elements within the 5' region of the human papillomavirus type 31 upstream regulatory region during different stages of the viral life cycle. *J Virol.* 76, 4798-4809.

- Spink KM, Laimins LA (2005):** Induction of the human papillomavirus type 31 late promoter requires differentiation but not DNA amplification. *J Virol.* 79, 4918-4926.
- Stepp WH, Meyers JM, McBride AA (2013):** Sp100 provides intrinsic immunity against human papillomavirus infection. *MBio.* 4, 6.
- Sternsdorf T, Jensen K, Reich B, Will H (1999):** The nuclear dot protein sp100, characterization of domains necessary for dimerization, subcellular localization, and modification by small ubiquitin-like modifiers. *J Biol Chem* 274, 12555-12566.
- Sternsdorf T, Jensen K, Will H (1997):** Evidence for covalent modification of the nuclear dot-associated proteins PML and Sp100 by PIC1/SUMO-1. *J Cell Biol* 139, 1621-1634.
- siDirect web server (2015):** siDirect version 2.0. [online] <http://sidirect2.rnai.jp> [Zugriff 12.08.2016].
- Stubenrauch F, Laimins LA (1999):** Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Semin Cancer Biol* 9, 379-386.
- Svoboda P, Stein P, Schultz RM (2001):** RNAi in mouse oocytes and preimplantation embryos: effectiveness of hairpin dsRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 287, 1099–1104.
- Syverton JT (1952):** The pathogenesis of the rabbit papilloma-to-carcinoma sequence. *Ann N Y Acad Sci.* 54 1126-1140.
- Terenzi F Saikia P, Sen GC (2008):** Interferon-inducible protein, P56, inhibits HPV DNA replication by binding to the viral protein E1. *EMBO J.* 27, 3311-3321.
- ThermoFisher (2015):** BLOCK-iT™ RNAi Designer. [online] <https://rnaidesigner.thermofisher.com/rnaiexpress/design.do> [Zugriff 12.08.2016].
- Viarisio D, Gissmann L, Tommasino M (2017):** Human papillomaviruses and carcinogenesis: well-established and novel models. *Curr Opin Virol.* 26, 56-62.
- Wettstein FO, Stevens JG (1982):** Variable-sized free episomes of Shope papilloma virus DNA are present in all non-virus-producing neoplasms and integrated episomes are detected in some. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 79, 790-794.
- Wurdak M, Schneider M, Iftner T, Stubenrauch F (2018):** The contribution of SP100 to Cottontail Rabbit Papillomavirus Transcription and Replication. *J Gen Virol* 99, 344-354.
- Wilcox KW, Sheriff S, Isaac A, Taylor JL (2005):** SP100 B is a repressor of gene expression. *J. Cell. Biochem.* 95, 352–365.

Zeltner R, Borenstein LA, Wettstein FO, Iftner T (1994): Changes in RNA expression pattern during the malignant progression of cottontail rabbit papillomavirus-induced tumors in rabbits. *J Virol.* 68, 3620-3630.

Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde am Institut für Medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten in Tübingen unter Betreuung von Professor Dr. Frank Stubenrauch durchgeführt.

Die Konzeption der Zellkultur- und Tierversuche erfolgte in Zusammenarbeit mit Professor Dr. Frank Stubenrauch und basiert zum großen Teil auf Ergebnissen eines vorangegangenen Projektes von Dr. Christina Habiger, die in derselben Arbeitsgruppe tätig war.

Sämtliche Zellkulturversuche wurden nach Einarbeitung durch Elke Straub (MTA) von mir eigenständig durchgeführt.

Alle Arbeiten an den Tieren wurden von mir in Zusammenarbeit mit M.Sc. Markus Schneider (Doktorand am selben Institut) durchgeführt. Die anschließende Analyse der Papillombiopsien wurde nach Einarbeitung durch Herrn Schneider von mir selbständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung sowie die Erstellung der Grafiken erfolgte eigenständig. Die anschließende Einordnung und Interpretation der Ergebnisse erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Stubenrauch.

Die Veröffentlichung wurde von Herr Prof. Dr. Stubenrauch, M.Sc. Markus Schneider, Prof. Dr Thomas Iftner und mir verfasst. Die zugehörigen Abbildungen und Grafiken wurden von mir erstellt.

Ich versichere diese Dissertation selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, 09.01.2018 - Marcel Wurdak

Veröffentlichungen

Wurdak M, Schneider M, Iftner T, Stubenrauch F (2018): The contribution of SP100 to Cottontail Rabbit Papillomavirus Transcription and Replication. J Gen Virol 99, 344-354.

Danksagung

Mein außerordentlicher Dank gilt meinem Doktorvater **Prof. Dr. Frank Stubenrauch** für die engagierte Betreuung während der gesamten Zeit. Eine bessere Betreuung wäre kaum möglich gewesen.

Vielen Dank an **Markus Schneider**, der mit mir zusammen die Tierversuche durchführte und für Fragen immer ein offenes Ohr hatte.

Mein besonderer Dank gilt auch **Elke Straub**, die mich vor allem in der schwierigen Anfangszeit unterstützte und mir bei Problemen praktischer Art immer zur Seite stand.

Ebenfalls möchte ich **Felix Foth** herzlich danken.

Zuletzt möchte ich auch dem **IZKF Promotionskolleg** der medizinischen Fakultät Tübingen unter der Leitung von Prof. Dr. Marlies Knipper und Dr. Inka Montero für die Unterstützung des Projektes, sowie für die vielen praxisbezogenen Ratschläge danken.