

Aus dem Department für Diagnostische Labormedizin der
Universität Tübingen

Institut für Medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrank-
heiten

FosB

**Einfluss des AP1-Komponenten auf die Transkription
von Papillomviren**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Matt, Katrin Rebecca

2022

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. T. Iftner

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. T. Ott

Tag der Disputation: 06.07.2022

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VII
1. Einleitung	1
1.1 <i>Klassifikation und Klinik der Papillomviren.....</i>	<i>1</i>
1.2 <i>Genomorganisation humaner Papillomviren</i>	<i>2</i>
1.3 <i>Lebenszyklus der Papillomviren in Epithelien</i>	<i>4</i>
1.4 <i>Proteine humaner Papillomviren.....</i>	<i>7</i>
1.5 <i>Cottontail Rabbit Papillomvirus und Tiermodell.....</i>	<i>8</i>
1.6 <i>AP1 Transkriptionsfaktor.....</i>	<i>9</i>
1.7 <i>Ziele dieser Arbeit.....</i>	<i>11</i>
2. Material und Methoden	12
2.1 <i>Material.....</i>	<i>12</i>
2.1.1 <i>Chemikalien</i>	<i>12</i>
2.1.2 <i>Geräte</i>	<i>12</i>
2.1.3 <i>Kleingeräte und Verbrauchsmaterialien</i>	<i>13</i>
2.1.4 <i>Marker und Chemikalien für Gelelektrophoresen</i>	<i>14</i>
2.1.5 <i>Plasmide.....</i>	<i>15</i>
2.1.6 <i>Enzyme und Enzympuffer</i>	<i>16</i>
2.1.7 <i>Fertige Reagenzsysteme</i>	<i>16</i>
2.1.8 <i>Medien für Bakterienkultur</i>	<i>17</i>
2.1.9 <i>Medien und Puffer für Zellkultur</i>	<i>18</i>
2.1.10 <i>DNA-Oligonukleotide</i>	<i>19</i>
2.1.11 <i>RNA-Oligonukleotide.....</i>	<i>24</i>
2.1.12 <i>Zelllinien</i>	<i>26</i>
2.1.13 <i>Bakterienstämme</i>	<i>26</i>
2.2 <i>Methoden.....</i>	<i>27</i>

2.2.1	Mikrobiologische Methoden.....	27
2.2.1.1	Herstellung von kompetenten Bakterienstämmen	27
2.2.1.2	Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Bakterien.....	27
2.2.1.3	Kultivieren von Bakterien zum Amplifizieren von Plasmid DNA	27
2.2.1.4	Bakterien lagern	27
2.2.2	DNA-Methoden.....	27
2.2.2.1	Plasmid-DNA aus Bakterien isolieren	27
2.2.2.2	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	28
2.2.2.3	Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten	28
2.2.2.4	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	28
2.2.2.5	Hybridisierung von DNA-Oligonukleotiden	29
2.2.2.6	Amplifikation von DNA mittels PCR.....	29
2.2.2.7	Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-Ligase.....	29
2.2.2.8	Sequenzierung.....	30
2.2.3	RNA-Methoden	30
2.2.3.1	Extraktion von RNA aus eukaryotischen Zellen.....	30
2.2.3.2	Herstellen von copy-DNA	30
2.2.3.3	Quantitative RealTime PCR	30
2.2.4	Zellkulturmethoden	32
2.2.4.1	Allgemeine Zellkulturmethoden.....	32
2.2.4.2	HEK293T Zellen.....	33
2.2.4.3	Kaninchenkeratinozyten.....	33
2.2.4.4	NIH3T3-J2 Fibroblasten	34
2.2.4.5	CIN612-9E Zellen	34
2.2.4.6	Herstellung von FosB Knockdown-Zelllinien	34
2.2.4.7	FosB Knockdown mittels siRNA.....	35
3.	Ergebnisse	37
3.1	<i>Vergleich der verschiedenen FosB Formen zwischen Mensch und Kaninchen</i>	<i>37</i>
3.1.1	FosB mRNA Alignment – Mensch/Kaninchen	37
3.1.2	FosB Protein Alignment – Mensch/Kaninchen	38
3.2	<i>FosB Knockdown in Kaninchenkeratinozyten</i>	<i>39</i>
3.2.1	FosB Knockdown via shRNA-Lentivirus.....	39
3.2.2	FosB Knockdown via siRNA	45
3.2.3	Veränderte Expression viraler Transkripte nach FosB Knockdown	48
3.3	<i>FosB Knockdown in humanen Keratinozyten</i>	<i>49</i>

3.3.1	FosB Knockdown – Vergleich der Transfektionsreagenzien RNAimax und HiPerfect.....	51
3.3.2	Veränderte Expression viraler Transkripte nach FosB Knockdown	52
4.	Diskussion.....	54
4.1	<i>FosB Funktionen, Alignment und Splice-Varianten</i>	<i>54</i>
4.2	<i>Einfluss eines FosB Knockdowns auf die virale Transkription.....</i>	<i>55</i>
4.2.1	Hinweise für einen induzierenden Effekt von FosB in humanen Zellen	56
4.2.2	Hinweise für einen hemmenden Effekt von FosB in Kaninchenkeratinozyten	57
4.3	<i>FosB Knockdown mittels lentiviralem System</i>	<i>60</i>
4.4	<i>Ausblick</i>	<i>61</i>
5.	Zusammenfassung.....	62
	Literaturverzeichnis	63
6.	Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift	71
7.	Danksagung	72

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ANOVA	Analysis of Variance; Varianzanalyse
AP-1	Aktivator Protein 1
ATP	Adenosintriphosphat
AVS	Asian Virus Stock
CaCl ₂	Kalziumchlorid
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
ChIP	Chromatin Immunoprecipitation
CRPV	Cottontail Rabbit Papillomavirus

CS	Kälberserum
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered Saline
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid; Ethylendiamintetraessigsäure
FKS	Fötale Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HPV	Humanes Papillomavirus
HR	High Risk; Hoch-Risiko
IARC	International Agency for Research on Cancer
KCl	Kaliumchlorid
KSFM	Keratinocyten-serumfreies Medium
LB	Luria-Bertani
LCR	Long Control Region
LR	Low Risk; Niedrig-Risiko
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MnCl ₂	Manganchlorid
mRNA	messenger Ribonukleinsäure; Boten-Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information

ORF	Open Reading Frame; Offener Leserahmen
Ori	Origin of DNA-Replication
p.a.	pro analysis; zur Analyse
PCR	Polymerase Chain Reaction; Polymerasekettenreaktion
pRB	Retinoblastom Protein
qPCR	quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction; quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
RbCL ₂	Rubidiumchlorid
RNA	Ribonukleinsäure
shRNA	small hairpin Ribonukleinsäure
siRNA	small interfering Ribonukleinsäure
SOC	Super Optimal broth with Catabolites repression
TAE	Tris-Acetat-EDTA
URR	Upstream Regulatory Region
UV	Ultraviolett
VLP	Virus-like particle; Virus-ähnlicher Partikel
YFP	Yellow Fluorescent Protein, gelb-fluoreszierendes Protein

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Genomstruktur HPV 31	4
Abbildung 2: Papillomaviruslebenszyklus.....	6
Abbildung 3: FosB mRNA-Sequenzalignment Mensch/Kanninchen	37
Abbildung 4: FosB Protein-Sequenzalignment Mensch/Kaninchen.....	38

Abbildung 5: Positionierung der si/shRNA-Sequenzen auf der Kaninchen-FosB-mRNA.....	39
Abbildung 6: HEK293T Zellen 24h post Transfektion.....	40
Abbildung 7: AVS-Zellen 24h post Infektion.....	41
Abbildung 8: AVS-Zellen 7 Tage post Infektion; post Selektion.....	41
Abbildung 9: RK1-16E7/ras Zellen 24h post Infektion.....	42
Abbildung 10: RK1-16E/ras-Zellen 6 Tage post Infektion; post Selektion.....	42
Abbildung 11: FosB Knockdown via shRNA in AVS-Zellen.....	43
Abbildung 12: FosB Knockdown via shRNA – RK1-16E7/ras-Zellen.....	44
Abbildung 13: FosB Knockdown via siRNA - AVS-Zellen.....	45
Abbildung 14: FosB Knockdown via siRNA –RK1-16E7/ras-Zellen.....	46
Abbildung 15: FosB Knockdown via siRNA in VX2-Zellen.....	47
Abbildung 16: Effekt des FosB Knockdowns auf die Expression viraler Transkripte in VX2-Zellen.....	48
Abbildung 17: FosB Knockdown via siRNA in Cin612-9E RNAimax-Protokoll.....	51
Abbildung 18: FosB Knockdown via siRNA in Cin612-9E Hiperfect-Protokoll.....	51
Abbildung 19: Effekt des FosB Knockdowns auf die viralen Transkripte in Cin612-9E Zellen – RNAimax.....	52
Abbildung 20: Effekt des FosB Knockdowns auf die viralen Transkripte in Cin612-9E Zellen – Hiperfect.....	53

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Geräte.....	12
Tabelle 2: Kleingeräte und Verbrauchsmaterialien.....	13
Tabelle 3: Bezeichnung und Verwendung der Enzyme und Enzympuffer.....	16
Tabelle 4: Fertige Reagenzsysteme.....	16
Tabelle 5: DNA-Oligonukleotide.....	19
Tabelle 6: RNA-Oligonukleotide.....	25
Tabelle 7: Ausreiser bei FosB Knockdown in humanen Keratinozyten.....	50

1. EINLEITUNG

1.1 KLASSIFIKATION UND KLINIK DER PAPILOMVIREN

Papillomviren sind unbehüllte DNA Viren. Das virale Genom liegt als doppelsträngiges DNA-Molekül umschlossen von einem ungefähr 55 nm großen ikosaedrischen Kapsid vor. Aufgrund der Gensequenz des L1 Gens werden die Papillomviren in 39 Gattungen unterteilt (Villiers, 2013). Fünf davon befallen den Menschen (alpha, beta, gamma, mu, nu). Weiter werden die Gattungen in über 400 verschiedene Papillomvirustypen unterteilt, wovon über 200 humanspezifisch sind und etwa 200 weitere andere Säugetiere, Reptilien und auch Vögel befallen (<https://pave.niaid.nih.gov/> Datenbank, Stand Juli 2019).

Humane Papillomviren werden hauptsächlich durch direkten Kontakt übertragen und infizieren undifferenzierte Keratinozyten der Haut und Schleimhaut. Dabei finden sich Papillomviren mit mukösem Tropismus ausschließlich in der Gattung der Alpha-Papillomviren. Die Alpha-Viren sind klinisch am wichtigsten, denn zu dieser Gattung gehören die Virustypen, welche mit intraepithelialen Neoplasien und invasiven Karzinomen assoziiert sind, die sogenannten „High-Risk“ (HR) Typen (Harden and Munger, 2017). „High-Risk“ Typen können humane Keratinozyten immortalisieren, während die ebenfalls zu den Alpha-Papillomaviren zählenden „Low-Risk“ (LR) Typen dies nicht tun. Diese sind häufig in benignen Hautläsionen wie Genitalwarzen zu finden (Villiers *et al.*, 2004).

Die International Agency for Research on Cancer (IARC) hat 13 HPV Typen (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68) in die stärkste und zweitstärkste Evidenzstufe für Karzinogenität, (Gruppe I und IIa), eingestuft. Ausreichende Evidenz gibt es für alle diese Typen im Zusammenhang mit Zervixkarzinomen, für Typ 16 ist die Evidenz genauso hoch in Bezug auf die Karzinogenität bei Vulva- und Vaginalkarzinomen, Penis- und Analkarzinomen, sowie Tumoren des Mundes und des Oropharynx

(International Agency for Research on Cancer and Meeting. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2007).

Bei Frauen weltweit ist Gebärmutterhalskrebs die vierthäufigste Krebsart, wobei er in weniger entwickelten Ländern sogar den zweiten Platz einnimmt und jährlich etwa 300.000 Todesfälle verursacht (Ferlay *et al.*, 2019). Fast alle Fälle von Zervixkarzinomen lassen sich auf persistente Infektionen mit verschiedenen HPV-Typen zurückführen, dabei sind am häufigsten HPV Typ 16 und 18 vertreten. Diese beiden sind zusammen für 70 % aller invasiven Zervixkarzinome verantwortlich. Nur beim Analkarzinom ist der Anteil an Fällen, die der HPV-Infektion zugeschrieben werden, mit etwa 90 % annähernd so hoch. Aber auch etwa ein Drittel der Vaginal- und Peniskarzinomfälle wird auf eine HPV-Infektion zurückgeführt. Bei Krebs im Oropharynx und im Mund ist der Anteil steigend (Crow, 2012).

Seit Juli 2007 empfiehlt die ständige Impfkommission (STIKO) allen Mädchen zwischen 12 und 17 Jahren die Impfung gegen HPV 16 und HPV 18. Im Laufe der Jahre wurde die Empfehlung immer wieder angepasst, unter anderem wurde das Impfalter auf 9 bis spätestens 14 Jahre gesenkt und 2016 wurde sie auf alle Jungen ausgeweitet. Im April 2016 wurde außerdem der im Jahr 2015 zugelassene, nonavalente Impfstoff Gardasil® 9 empfohlen. Dieser ist wirksam gegen die Typen 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 und 58. Der Impfstoff basiert auf sogenannten „virus-like-particles“ (VLP) die durch spontane Zusammenlagerung der jeweiligen L1-Proteinen entstehen. Das L1-Protein ist eines der beiden Proteine die das Kapsid des Virus bilden (ema.europa.eu, 2020; Robert Koch-Institut, 2016; Ständige Impfkommission, 2019).

1.2 GENOMORGANISATION HUMANER PAPILLOMVIREN

Das doppelsträngige DNA-Molekül der humanen Papillomviren ist etwa 8000 Basenpaare groß, dabei dient nur einer der beiden Stränge als Template für die Transkription. Zunächst enthält das Genom die „long control region“ (LCR), auch „upstream regulatory region“ (URR) genannt. Hier finden sich keine Protein-kodierenden Sequenzen, stattdessen, neben

dem viralen Replikationsursprung, Bindestellen für virales E1 und E2 und zelluläre Transkriptionsfaktoren.

In der sogenannten „early region“ sind sechs offene Leserahmen („open reading frames“, ORF) vorhanden, die für die frühen Gene („early genes“) E1, E2, E4, E5, E6 und E7 kodieren. Diese übernehmen verschiedenste regulatorische Funktionen im viralen Lebenszyklus. Nach der frühen („early“) Region folgt die späte („late“) Region. Diese beinhaltet zwei ORFs, die für die beiden Kapsidproteine L1 und L2 kodieren. Getrennt sind die beiden Abschnitte „early- und late- region“ durch zwei Polyadenylierungssignale. Transkripte der „early region“ werden am frühen Polyadenylierungssignal polyadenyliert, Transkripte der „late region“ am späten Polyadenylierungssignal (Zheng and Baker, 2006).

Die virale Transkription wird hauptsächlich durch zwei Promotoren reguliert. Der frühe Promotor (HPV16: P97; HPV31: P99) kontrolliert die E1, E2, E6 und E7 Expression, über den späten Promotor (HPV16: P670; HPV31: P742) können E1, E2, E4, E5 und die beiden Kapsidproteine L1 und L2 abgelesen werden. Die Aktivität des späten Promotors wird maßgeblich durch die fortschreitende Differenzierung der Wirtszelle angestoßen (Bodily and Meyers, 2005). Alle Transkripte werden zunächst als bi- oder polycistronische Prä-mRNAs transkribiert, dann posttranskriptional modifiziert (Splicing), um schließlich translatiert zu werden (Harden and Munger, 2017; Zheng and Baker, 2006).

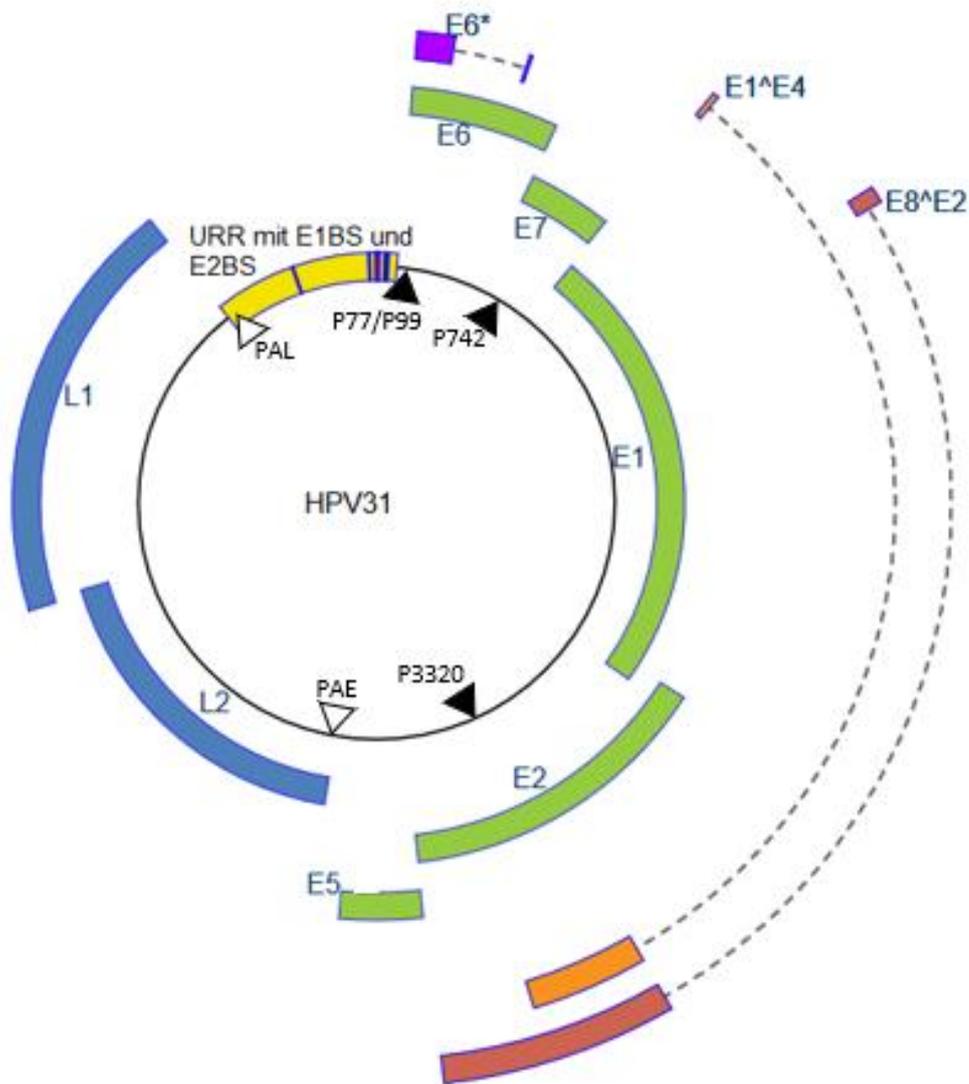


ABBILDUNG 1: GENOMSTRUKTUR HPV 31

DARGESTELLT IST DIE GENOMSTRUKTUR VON HPV 31 MIT ALLEN ORFS, DEN POSITIONEN DER VIER BEKANNTEN PROMOTOREN (P77, P99, P742, P3320) UND DER POLYADENYLIERUNGSSIGNALE (PAE: FRÜH, PAL: SPÄT). FÜR FRÜHE TRANSKRIPTE IST P99 AM WICHTIGSTEN, FÜR DIE SPÄTEREN P742 UND P77 (PAVE.NIAID.NIH.GOV#EXPLORE/TRANSCRIPT_MAPS/HPV31, 2019). GRAFIK MODIFIZIERT NACH (PAVE.NIAID.NIH.GOV #EXPLORE/REFERENCE_GENOMES/HUMAN_GENOMES/LOCUS_VIEW/FETCH?ID=HPV31REF&FORMAT=LOCUS%20VIEW&HASSTRUCTURE=NONE, 2019)

MODIFIZIERT NACH (DOORBAR *ET AL.*, 2012)

1.3 LEBENSZYKLUS DER PAPILLOMVIREN IN EPITHELIIEN

Da Papillomviren die undifferenzierte, basale Zellschicht von mehrschichtigen Plattenepithelien infizieren, müssen sie zunächst durch Mikroverletzungen des Epithels in diese Schichten vordringen (Schiller, Day and

Kines, 2010). Bei Infektion des mehrschichtigen Plattenepithels der Zervix ist möglicherweise außerdem der Zugang zu vulnerablen Zellschichten am Übergang (Transformationszone) zum einschichtigen, hochprismatischen Plattenepithel der Endozervix erleichtert (Doorbar *et al.*, 2012).

Über das L1-Kapsidprotein binden die Viren an Heparansulfat-Proteoglykane der Zelloberfläche. Es folgt ein mehrschrittiger, mehrstündiger Endozytoseprozess, bei dem unter anderem auch das L2-Protein involviert ist (Harden and Munger, 2017; Schäfer, Blumenthal and Katz, 2015; Schiller, Day and Kines, 2010). Das virushaltige Endosom reift in der Zelle, dabei sinkt der pH-Wert. Der niedrigere pH-Wert ist Voraussetzung für das „Uncoating“ des Virus Partikels. Es kommt zu Strukturveränderung des Kapsids, L2 und das Virusgenom werden exponiert, während L1 abgebaut wird (Cerqueira and Schelhaas, 2012). Das virale Genom und das L2-Protein bilden einen Komplex der wiederum den Nukleus penetriert. Hier positioniert sich der Komplex an den „ND10 nuclear bodies“, diese Lokalisation ermöglicht die initiale Genamplifikation des Virus (Schäfer, Blumenthal and Katz, 2015).

Der virale Lebenszyklus ist sehr eng an die fortschreitende Differenzierung des Epithels gebunden. In der initial infizierten, basalen Zellschicht wird in einer ersten Amplifikationsphase, E1- (virale Helikase) und E2- (virales Regulationsprotein) abhängig, eine Genommenge von etwa 50-200 Kopien pro Zelle erreicht (Harden and Munger, 2017). Das virale Genom persistiert als Episom in den Zellen, und vermehrt sich immer bei Zellteilungen synchron zur zellulären DNA. Dabei wird es mithilfe des E2-Proteins gleichmäßig auf beide Tochterzellen aufgeteilt (McBride, 2008), was zu einer gleichbleibenden Kopienzahl des viralen Genoms in allen Tochterzellen führt. In diesem latenten Stadium verbleibt das Virus, bis die Zelldifferenzierung fortschreitet und das Virus in die Phase der massiven Vermehrung des Genoms eintritt (Bedell *et al.*, 1991). Zur Vermehrung des eigenen Genoms nutzt das Virus das Replikationssystem der Wirtszelle. Dieses ist normalerweise in differenzierten Keratinozyten nicht mehr aktiv,

da die Zellen den Zellzyklus verlassen haben und sich nicht mehr teilen. Deshalb muss das Virus die Wirtszelle weiter im Zellzyklus halten, um Zugang zum zellulären Replikationsapparat zu haben. Die wichtigsten Faktoren um diesen Wiedereintritt in den Zellzyklus zu erreichen, sind die beiden viralen Proteine E6 und E7. Hierfür interagieren sie mit verschiedenen zentralen Proteinen der Zellzyklusregulation (Doorbar *et al.*, 2012; McBride, 2008). Weiterhin wird bei fortschreitender Differenzierung der Zellen die Expression der viralen frühen Gene („early genes“) erhöht, bis schließlich in den obersten Schichten des Epithels auch die späten Gene („late genes“) L1 und L2 exprimiert werden. Die letztendliche Reifung des Virus geschieht in den Keratinozyten der obersten Epithelschicht, hier wird das aus L1 und L2 bestehende Kapsid assembliert und die virale DNA verpackt. Schließlich werden die infektiösen Viruspartikel freigesetzt (Doorbar *et al.*, 2012).

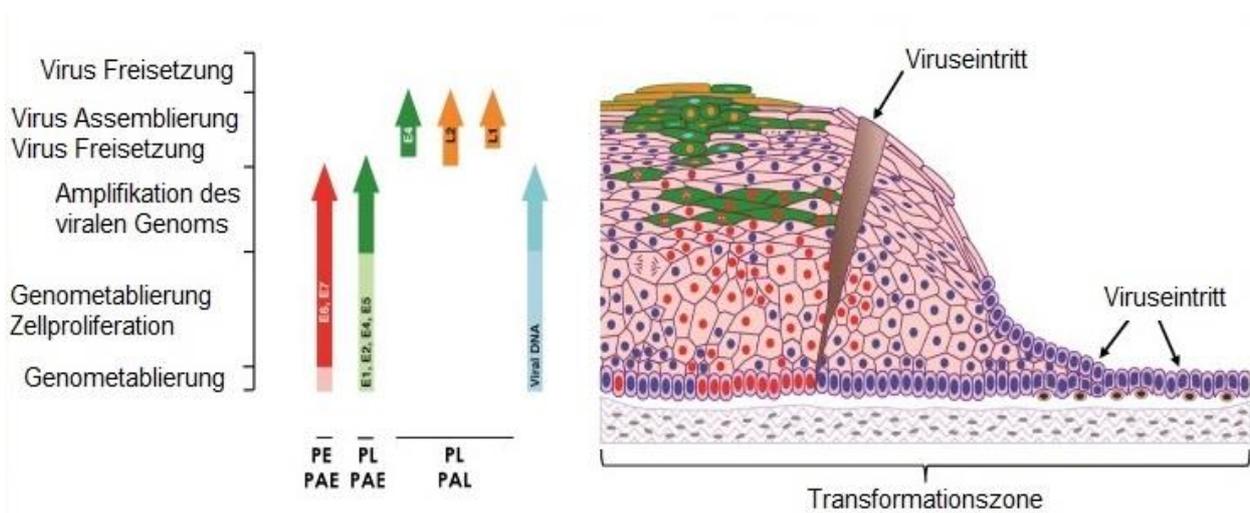


ABBILDUNG 2: PAPILLOMAVIRUSLEBENSZYKLUS

SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES MEHRSCHTIGEN UNVERHORNTEN PLATENEPITHELS DER ZERVIX. DAS PAPILLOMAVIRUS INFIZIERT DIE BASALEN ZELLEN. EINE ANZAHL VON EPISOMALEN KOPIEN DES VIRALEN GENOMS WIRD ETABLIERT. IN DEN UNTEREN SCHICHTEN WIRD VIRALES E6 UND E7 (ROT) EXPRIMIERT. WERDEN HÖHERE SCHICHTEN ERREICHT FINDET DIE AMPLIFIKATION DES VIRALEN GENOMS STATT, ES WERDEN WEITERE VIRALE PROTEINE WIE E4 EXPRIMIERT. IN DEN OBEREN SCHICHTEN WERDEN DIE HÜLLPROTEINE L1 UND L2 EXPRIMIERT, DAS VIRUS ASSEMBLIERT UND SCHLIEßLICH FREIGESETZT. PE: FRÜHER PROMOTER; PL: SPÄTER PROMOTER; PAE: POSITION DER FRÜHEN POLYADENILIERUNGSSTELLE; PAL: POSITION DER SPÄTEN POLYADENILIERUNGSSTELLE

MODIFIZIERT NACH (DOORBAR *ET AL.*, 2012)

1.4 PROTEINE HUMANER PAPILLOMVIREN

E1 ist eine Helikase, die als Hexamer am Replikationsursprung („Origin of DNA-Replication“, ori) in der URR des Virusgenoms bindet und ATP-abhängig die DNA entwinden kann. Die Funktion von E2 bei der Replikation besteht darin E1 am Replikationsursprung auf die DNA zu laden und gleichzeitig unspezifische Bindungen von E1 an die DNA zu verhindern. Hierfür befinden sich mehrere E2-spezifische Bindestellen in nächster Nähe zur E1 Bindestelle im ori. An diesem E1-E2-ori-Komplex werden die zellulären Replikationsfaktoren rekrutiert, um die Replikation des Genoms zu initiieren (Bergvall, Melendy and Archambault, 2013). Darüber hinaus hat E2 viele weitere Funktionen im viralen Lebenszyklus (McBride, 2013). Es ist der wichtigste virale Transkriptionsfaktor, dabei kann es sowohl aktivierend als auch supprimierend wirken, je nach E2-Menge, zellulären Interaktionspartnern und den jeweiligen spezifischen Bindestellen im viralen Genom. Neben der Regulation viraler Gene beeinflusst E2 als Transkriptionsfaktor ebenso die Expression zellulärer Gene (Delcuratolo *et al.*, 2016; Ramírez-Salazar *et al.*, 2011). Es existiert außerdem ein E8^{E2} Fusionsprotein, das als negativer Regulator sowohl der viralen Replikation, als auch der Transkription fungiert (Zobel, Iftner and Stubenrauch, 2003). E2 bindet das virale Genom während der Mitose der Wirtszelle an die mitotischen Chromosomen. So wird der Verlust der viralen DNA während der Mitose verhindert und sie wird sicher in die Nuklei der Tochterzellen transportiert (McBride, 2013; Sekhar, Reed and McBride, 2010). Weiter erfüllt E2 Funktionen beim Verpacken der viralen DNA (Zhao *et al.*, 2000) und bei der posttranskriptionellen Modifikation viraler RNA (Bodaghi, Jia and Zheng, 2009). Über die Funktion von E4 ist bekannt, dass es in der Lage ist zelluläre Keratinstrukturen zu unterbrechen und es könnte somit eine Rolle bei der Freisetzung des Virus spielen. Dazu passt, dass E4 hauptsächlich in den oberen Schichten der Epithelien exprimiert wird (Doorbar, 2013). E5 ist ein Transmembranprotein, das mit vielen zellulären Proteinen interagiert und insgesamt onkogen wirkt (DiMaio and Petti, 2013). E6

ist mit E7 das wichtigste Onkogen der Papillomviren. Die wichtigste Funktion von High-Risk-E6 ist mit Hilfe von E6AP, einer zellulären Ubiquitin-Ligase, die Ubiquitinierung des Tumorsuppressors p53 was zu dessen proteasomalen Abbau führt. Dagegen behindert Low-Risk-E6 die Funktion von p53 durch andere, weniger effektive Mechanismen. Außerdem aktiviert High-Risk-E6 die zelleigene Telomerase (Harden and Munger, 2017; Münger and Howley, 2002; Vande Pol and Klingelutz, 2013). E7 interagiert mit einer Vielzahl zellulärer Proteine. High-Risk-E7 bindet an den Retinoblastom Tumorsuppressor (pRB) (Dyson *et al.*, 1989) wodurch E2F freigesetzt und somit aktiviert wird. E2F ist ein Transkriptionsfaktor für viele Gene, deren Expression zum Eintritt der Zelle in die S-Phase führt (Harden and Munger, 2017; Münger and Howley, 2002; Roman and Munger, 2013). Schließlich bilden L1 und L2 das Kapsid des Virus, wobei L1 auch ohne L2 zu VLPs („virus-like-particles“) assemblieren kann. Sowohl L1 als auch L2 erfüllen Funktionen beim Kontakt zur und beim Eintritt in die Zelle und L2 darüber hinaus beim intrazellulären Transport des Genoms in den Nukleus (Buck, Day and Trus, 2013).

1.5 COTTONTAIL RABBIT PAPILLOMVIRUS UND TIERMODELL

Das Cottontail Rabbit Papillomvirus (CRPV) wurde erstmals 1933 beschrieben (Shope and Hurst, 1933). Es gehört zur Gruppe der kappa-Papillomviren. Im natürlichen Wirt, dem Baumwollschwanzkaninchen (*Sylvilagus floridanus*), führt es zu verhornten, warzenartigen Läsionen der Haut. Meist regredieren diese spontan, jedoch kommt es in etwa 25 % der Fälle zur malignen Progression. Im domestizierten New Zealand White Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus*) persistieren alle Läsionen und progredieren mit circa 75 % deutlich häufiger. Die häufige Progredienz in diesem Tiermodell macht es für die Forschung interessant. Zur Produktion von infektiösen Viruspartikeln kommt es im New Zealand White Kaninchen hingegen nicht (SYVERTON, 1952). Die Genomstruktur von CRPV ist derer von humanen Papillomviren sehr ähnlich. Ein Unterschied ist, dass der E6-ORF des Cottontail-Rabbit-Papillomvirus deutlich länger ist und dabei für zwei unterschiedlich lange Varianten des E6 Proteins kodiert (Barbosa

and Wettstein, 1988). Im Unterschied zu vielen humanen E6 Proteinen binden die CRPV-E6 Proteine nicht direkt an p53, stattdessen bindet CRPV-E6 die Acetyltransferase p300 und verhindert so die Acetylierung und damit die Aktivierung von p53 (Muench *et al.*, 2010). Verschiedene Funktionen von p53 werden also unterdrückt, unter anderem die Induktion der Apoptose (Muench *et al.*, 2010). Im Gegensatz dazu hat das CRPV-E7 Protein sehr viele funktionelle Gemeinsamkeiten mit humanen E7 Proteinen. Es bindet an pRB um E2F freizusetzen und so die Mitose einzuleiten (Breitburd, Salmon and Orth, 1997). Insgesamt basiert die Störung des Zellzyklus im Kaninchensystem auf sehr ähnlichen Mechanismen wie die durch Alpha-HPVs verursachte Deregulation. Trotz des unterschiedlichen Gewebetropismus (Alpha-HPV: unverhorntes Plattenepithel; CRPV: verhorntes Plattenepithel) besteht eine große Ähnlichkeit der biologischen Mechanismen. So wird das CRPV-Tiermodell seit langem in der Forschung zu verschiedensten Aspekten der Papillomvirus-induzierten Karzinogenese verwendet (Doorbar, 2016). Das CRPV-Genom wird dabei in die Haut der Kaninchen eingebracht. Rekombinante CRPV-Genome ermöglichen den Knockdown einzelner zellulärer Gene *in vivo*. So kann ihr Einfluss auf die Tumorentstehung am lebenden Kaninchen beobachtet werden. Erreicht werden kann der Knockdown über eine shRNA-Expressions-kassette anstelle des L2-ORFs (Leiprecht *et al.*, 2014).

1.6 AP1 TRANSKRIPTIONSFAKTOR

Der Aktivator Protein 1 (AP1) Transkriptionsfaktor ist ein dimerer Proteinkomplex. Er setzt sich aus Proteinen aus vier verschiedenen Proteinfamilien zusammen: JUN, FOS, ATF und MAF. Da jeder dieser Familien mindestens vier Mitglieder zugeordnet sind, ist eine Vielfalt von Kombinationen denkbar. Wobei nur die JUN und ATF Familien in der Lage sind Homodimere zu bilden. Die Komponenten dimerisieren über ein Leucin-Zipper-Motiv. Außerdem enthält der Komplex eine Domäne zur Interaktion mit DNA. JUN/JUN und JUN/FOS Dimere binden das TPA-responsive-element (TRE) in der DNA. Andere Kombinationen (JUN/ATF und ATF/ATF) können das cAMP-responsive-element binden (Mirzaei *et al.*,

2020). Die zelluläre Signalkaskade, in die AP1 eingebunden ist, kann von verschiedensten ex- und internen Stimuli aktiviert werden. Diese Stimuli führen über den MAPK-Weg „downstream“ zur Aktivierung (Phosphorylierung) und verstärkten Expression sowohl von JUN- als auch von FOS-Faktoren.

AP1 als regulatorisches Protein spielt eine zentrale Rolle in der Papillomavirus-induzierten Tumorigenese. Essentiell dabei ist die Tatsache, dass die Expression der viralen Onkogene E6 und E7 eine AP1-abhängige Aktivierung des Promotors in der URR benötigt (Mirzaei *et al.*, 2020). Im *in vivo* Kaninchenmodell sind intakte AP1 Bindestellen in der URR des CRPV-Genoms unverzichtbar für die Tumorigenese. Dabei hat die distale Bindestelle einen größeren Effekt. Die Manipulation dieser Bindestelle führt zu einer Tumorreduktion von 70 %, während die Mutation der proximalen Bindestelle nur eine Reduktion von 30 % bewirkt. Bei Mutation beider vorhandener AP1-Bindestellen, kommt es zu keiner Tumorentwicklung mehr (Delcuratolo *et al.*, 2016).

Außerdem ist das CRPV-E2 Protein essentiell, dessen transaktivierende Funktion *in vivo* unverzichtbar für die Tumorentwicklung im Kaninchenmodell ist (Jeckel *et al.*, 2002). Die Expression von CRPV-E2 in C33A Zellen (HPV-negative Zervixkarzinomzellen) führt zur Induktion der Expression zweier AP1 Komponenten: c-fos und FosB. Auch die Expression von E2 Proteinen anderer HPV-Typen (z.B. HPV16, HPV 38) können die beiden Faktoren *in vitro* induzieren. Der genaue Mechanismus, wie E2 die Expression von c-fos induziert, konnte aufgeklärt werden. E2 bindet dabei zusammen mit Brd4 eine bekannte E2-Bindestelle im c-fos-Promoter (Delcuratolo *et al.*, 2016). Es gibt verschiedene Studien die c-fos als zelluläres Onkogen im Zusammenhang mit Papillomvirus-abhängiger Tumorigenese beschreiben (Chakraborty *et al.*, 2014; Mahata *et al.*, 2011; Prusty and Das, 2005; Soto *et al.*, 1999).

Im Gegensatz dazu ist die Rolle von FosB im Lebenszyklus von Papillomviren und darüber hinaus auch hinsichtlich Papillomvirus-induzierter

Tumorformation weitestgehend unklar. Um die beobachtete E2-abhängige Induktion der FosB-Expression (Delcuratolo *et al.*, 2016) einzuordnen, braucht es deshalb noch weitere Aufklärung.

1.7 ZIELE DIESER ARBEIT

Vorarbeiten konnten zeigen, dass AP1-Bindestellen in der URR des CRPV-Genoms unverzichtbar sind für eine *in vivo* Tumorentstehung im Kaninchenmodell. Außerdem wurde eine Induktion der beiden AP1-Komponenten c-fos und FosB durch CRPV-E2 *in vitro* nachgewiesen. In weiteren Experimenten konnte festgestellt werden, dass c-fos als Komponente des AP1-Komplexes den E6/E7-Promotor aktiviert. In Zusammenschau mit anderen Ergebnissen, kann c-fos als essentieller Faktor der Tumorigenese im Kaninchenmodell zählen (Delcuratolo *et al.*, 2016). Zur Aufklärung der Rolle von FosB in diesem Prozess wurde ein shRNA-Ansatz gewählt. Es sollte eine shRNA-Sequenz gefunden werden die FosB *in vitro* ausreichend reduziert, um sie über ein rekombinantes CRPV-Genom (siehe Einleitung 2.5) *in vivo* einzuschleusen und so beobachten zu können, ob FosB essentiell für die Papillomavirus abhängige Tumorentwicklung im Kaninchen ist. Außerdem wurde ein *in vitro* Ansatz verfolgt, um mittels siRNA-Interferenz die regulatorische Wirkung von FosB auf die virale Transkription sowohl in Kaninchenzellen, als auch in humanen Keratinozyten zu untersuchen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien im Reinheitsgrad p.a. („pro analysis“, zur Analyse) verwendet. Die Chemikalien wurden von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Bio-Rad (Laboratories, Hercules, USA), Biozym® (Hessisch Oldendorf), Honeywell (Morristown, USA), Karl Roth (Karlsruhe), Medac (Wedel), Merck (Darmstadt), Perkin-Elmer (Waltham, USA), Roche (Basel, Schweiz), Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) und VWR life science (Darmstadt) bezogen.

2.1.2 Geräte

TABELLE 1: GERÄTE

Bezeichnung	Hersteller
Agarose-Gelelektrophoresekammern: Mini-Sub® Cell GT und Wide Mini-Sub® Cell GT	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Akku-betriebene Pipettierhilfe, Pipettus®	Hirschmann, Eberstadt
CO2 Inkubator C200	Labotect, Rosdorf
Einkanalpipette, elektronisch, bis 100µl, Eppendorf Research® pro	Eppendorf, Hamburg
Feinwage GJ	KERN, Balingen-Frommern
Fluoreszenzmikroskop AxioObserver.Z1	Carl Zeiss, Oberkochen
Kamerasystem Gel Doc 2000	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Lichtmikroskop DM IRB	Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar
LightCycler®480	Roche, Basel, Schweiz
PCR-Maschine, PCT 200 Peltier Thermal Cycler- MJ Research	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

Schüttelinkubator Certomat®IS	B.Braun/Sartorius, Göttingen
Spannungsversorgung; power pack 200	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Spektralphotometer Nanodrop® ND-1000	Nalgene/Thermo Fisher, Waltham, USA
Sterile laminar flow Werkbank Hera-safe	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Wasserbad, WB 10	Memmert, Schwabach
Zentrifuge, Centrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge, Centrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge, Centrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg

2.1.3 Kleingeräte und Verbrauchsmaterialien

TABELLE 2: KLEINGERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN

Bezeichnung	Hersteller
Cryo-Einfriergerät Frosty	Mr. Nalgene®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Einwegskalpelle	B.Braun™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kryoröhrchen, Cryo.s	Cellstar Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Multiwell-Petrischale Nunclon™ Delta Surface 6-well	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Neubauer Zählkammer	Hecht Assistent®, Sondheim/Rhön
Parafilm	Neenah, USA
PCR-Reaktionsgefäße, PCR-Softtubes 0,2 ml	Biozym®, Hessisch Oldendorf
Petrischale Nunclon™ Delta Surface 100 mm	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Petrischale Nunclon™ Delta Surface 60 mm	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Pipettenspitzen 0,5-10 µl (transparent)	Biozym®, Hessisch Oldendorf
Pipettenspitzen 10-200 µl (gelb); 200 – 1000 µl (blau)	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Pipettenspitzen gestopft, ART® Aerosol Resistant Tips 10, 20, 200, 1000 µl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Polystyrol-Röhrchen für Bakterienkulturen, PP-Tube 14 ml steril	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Reaktionsgefäße, Safe- Lock Tubes 1,5 ml und 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg
Real-Time Platten, Light- Cycler® 480 Multiwell Plate 96	Roche, Basel, Schweiz
Röhrchen für Bakterien- stock, Cryotube 3,5 ml SI	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Serologische Pipette, ge- stopft 5, 10, 25, 50 ml	Falcon®, Corning, New York, USA
Sterilfilter, 0,44 µm	Merck Millipore, Billerica, USA
Transfektionsröhrchen: 3,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Untersuchungshand- schuhe, puderfrei	Asid Bonz, Herrenberg
Zentrifugenröhrchen, Cel- Istar® Tubes 15 ml und 50 ml	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich

2.1.4 Marker und Chemikalien für Gelelektrophoresen

Agarose SeaKem® LE Agarose (Lonza, Basel, Schweiz)

DNA Längenstandard: TrackIt 1 Kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher, Waltham, USA)

Ethidiumbromidlösung, wässrig 0,025 % (250 µg/ml) (Carl Roth, Karlsruhe)

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

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

2.1.5 Plasmide

pLKO1.H1 puro: Lentiviraler Vektor zur shRNA Expression in Zellkultur (Wurdak *et al.*, 2018)

pMD2.G: Verpackungsplasmid zur Lentivirusproduktion (#12259, Addgene, Warrertown, USA)

pSPAX2: Verpackungsplasmid zur Lentivirusproduktion (#12260, Addgene, Warrertown, USA)

pCDH-C1-YFP-EF1_Puro: Lentiviraler Vektor zur YFP Expression in Zellkultur (Kontrollansatz zum shRNA-Knockdown Experiment)

Im Rahmen der Arbeit entstandene Plasmide:

plko1.H1puro-rabbitFosBshRNA1: Lentiviraler Vektor zur shRNA Expression in Zellkultur

plko1.H1puro-rabbitFosBshRNA2: Lentiviraler Vektor zur shRNA Expression in Zellkultur

plko1.H1puro-rabbitFosBshRNA3: Lentiviraler Vektor zur shRNA Expression in Zellkultur

plko1.H1puro-rabbitFosBshRNA4: Lentiviraler Vektor zur shRNA Expression in Zellkultur

plko1.H1puro-rabbitFosBshRNA5: Lentiviraler Vektor zur shRNA Expression in Zellkultur

plko1.H1puro-rabbitFosBshRNA6: Lentiviraler Vektor zur shRNA Expression in Zellkultur

2.1.6 Enzyme und Enzympuffer

Folgende Enzyme und Enzympuffer der Firma Thermo Fisher, Waltham, USA wurden für DNA Manipulationen nach Herstellerangaben verwendet:

TABELLE 3: BEZEICHNUNG UND VERWENDUNG DER ENZYME UND ENZYMPUFFER

Bezeichnung	Verwendung
FastDigest Eco105I	Testrestriktion
FastDigest Eco32I	Vektorrestriktion zur Klonierung
FastDigest EcoRI	Testrestriktion und Klonierung
FastDigest Green Buffer 10x	Testverdau und Klonierung
FastDigest Sall	Vektorrestriktion zur Klonierung
Rapid ligation buffer 5x (Rapid DNA Ligation Kit)	Klonierung
T4 DNA ligase (Rapid DNA Ligation Kit)	Klonierung

2.1.7 Fertige Reagenzsysteme

TABELLE 4: FERTIGE REAGENZSYSTEME

Bezeichnung	Anwendung	Hersteller
FuGENE® HD Transfection Reagent	Transfektion von DNA in 293T Zellen	Promega Corporation, Fitchburg, USA
HiPerFect Transfection Reagent	Transfektion von siRNA in humane Keratinocyten	Qiagen, Venlo, Niederlande
Lipofectamine™ RNAi-MAX Transfection Reagent	Transfektion von siRNA in Keratinocyten	Thermo Fisher, Waltham, USA
Mini QIAprep® Spin Miniprep Kit	Plasmidextraktion	Qiagen, Venlo, Niederlande

Pyrobest™ DNA Polymerase Kit	Klonierung	Takara Holdings Inc., Shimogyō-ku, Kyoto, Japan
QIAGEN® Plasmid Plus Midi Kit	Plasmidextraktion	Qiagen, Venlo, Niederlande
QIAquick® Gel Extraction Kit	DNA-Extraktion aus Agarosegel	Qiagen, Venlo, Niederlande
QIAshredder® homogenizer	Homogenisieren von Zelllysaten	Qiagen, Venlo, Niederlande
QuantiTect® Reverse Transcription Kit (200)	Herstellen von copy-DNA aus RNA	Qiagen, Venlo, Niederlande
Rapid DNA Ligation Kit	Klonierung	Thermo Fisher, Waltham, USA
RNeasy Mini Kit®	RNA Extraktion aus eukaryotischen Zellen	Qiagen, Venlo, Niederlande
SYBR® Green I Master Mix	qPCR	Roche, Basel, Schweiz

2.1.8 Medien für Bakterienkultur

Ampicillin Natriumsalz (Carl Roth, Karlsruhe)

Bakterien Einfriermedium: 65 % Glycerol; 0,1 M MgSO₄; 0,025 M Tris; pH = 8,0

LB-Agar (Luria-Bertani-Agar): 25 g/l LB Medium (Carl Roth) und 12 g/l Select Agar (Invitrogen), bei Bedarf Zugabe von 100 mg/l Ampicillin

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium): 25 g/l LB Medium (Carl Roth); bei Bedarf Zugabe von 100 mg/l Ampicillin

SOC-Medium: 2 % (w/v) Bacto-Trypton; 0,5 % (w/v) Bacto-Yeast Extract; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄; 20 mM Glucose; pH = 7,0

2.1.9 Medien und Puffer für Zellkultur

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) CS (Gibco, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA): Fertiglösung mit 10 % Kälberserum (CS, Gibco Invitrogen) und bei Bedarf Zugabe von 50 mg/l Gentamicin

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) FKS (Gibco, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA): Fertiglösung mit 10 % FKS (v/v) bei Bedarf Zugabe von 50 mg/l Gentamicin

DMSO Dimethylsulfoxid (PanReac Applichem, ITW, Chicago, USA)

DPBS Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (1x) (Gibco, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA): Fertiglösung ohne Kalzium, Magnesium und Natriumbikarbonat

DPBS Dulbecco's phosphate-buffered saline (Gibco, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA): ohne CaCl₂, ohne MgCl₂

E-Medium: Adenin (1,8 mM); Hydrocortison (417 µg/ml); Insulin (50 µg/ml); Transferrin (50 µg/ml); Trijodthyronin T3 (20 pM); Cholera toxin (10 nM); 50 % DMEM + 50 % DMEM/Ham's F12 1:1; 10 µl/ml Penicillin/Streptomycin; mit 5 % definiertem fötalem Kälberserum (HC-FKS; Perbio, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA)

FKS Fetales Kälber Serum, qualifiziert, Herkunft Südamerika (Gibco, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA)

Gentamicin Stammlösung 10 mg/ml (Gibco, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA)

HyClone®, definiertes, fetales Rinder Serum (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA)

Keratinocyte-SFM (Keratinocyten-serumfreies Medium) (Gibco, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA): Fertiglösung angesetzt nach Herstellerangaben

Mitomycin C (MedacGmbH, Wedel): Stammlösung 4 mg/ml in PBS

Opti-MEM® I Reduced-Serum Medium (Gibco, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA)

Puromycin, Dihydrochlorid, 1 mg/ml (Calbiochem®, EMD Biosciences, Merck KGaA, Darmstadt)

Trypsin-EDTA (0,25 %), phenol red (Gibco, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA): 0,5 g/l Trypsin (1:250) und 0,2 g/l EDTA

2.1.10 DNA-Oligonukleotide

Alle DNA-Oligonukleotide für shRNA wurden mit folgenden Onlinetools erstellt:

<https://www.invivogen.com/sirnazizard/siRNA.php>

<https://rnaidesigner.thermofisher.com/rnaiexpress/design.do>

<http://dharmacon.horizondiscovery.com/custom-sirna/?EditId=4068697>

https://www.med.nagoya-u.ac.jp/neurogenetics/i_Score/i_score.html

Da verschiedene Onlinetools aufgrund unterschiedlicher Berechnungsweise verschiedene Ergebnisse produzieren, wurden diejenigen shRNAs ausgewählt, für die es die größte Übereinstimmung zwischen den verschiedenen OnlineTools gab. Für das Primerdesign sowohl für die qPCR als auch für die Sequenzierungen wurde das OnlineTool <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi> verwendet.

TABELLE 5: DNA-OLIGONUKLEOTIDE

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung	Hersteller
shFosB1 fw	5' ccccGAGTCCCAG-TATCTGTCTTtcaagagaAAGACA-GATACTGGGACTCtttttg 3'	shRNA	biomers.net GmbH, Ulm

shFosB1 rv	5' tcgaccaaaaaGAGTCCCAG- TATCTGTCTTtctcttgaaAAGACA- GATACTGGGACTCgggg 3'	shRNA	biomers.net GmbH, Ulm
shFosb2 fw	5' ccccCAACCAGCCAGGACCTT- CAttcaagagaT- GAAGGTCCTGGCTGGTTGttttg 3'	shRNA	biomers.net GmbH, Ulm
shFosB2 rv	5' tcgaccaaaaaCAACCAGCCAG- GACCTTCAtctcttgaaT- GAAGGTCCTGGCTGGTTGgggg 3'	shRNA	biomers.net GmbH, Ulm
shFosB3 fw	5' ccccCCGTTGAC- CCCTACGACATtcaagagaAT- GTCGTAGGGGTCAACGGttttg 3'	shRNA	biomers.net GmbH, Ulm
shFosB3 rv	5' tcgaccaaaaaCCGTTGAC- CCCTACGACATtctcttgaaAT- GTCGTAGGGGTCAACGGgggg 3'	shRNA	biomers.net GmbH, Ulm
shFosB4 fw	5' ccccTGGCTACAGCAGTGGCG- GAttcaagagaTCCGCCACTGCTG- TAGCCAAttttg 3'	shRNA	biomers.net GmbH, Ulm
shFosB4 rv	5' tcgaccaaaaaT- GGCTACAGCAGTGGCGGAtctctt- gaaTCCGCCACTGCTGTAGCCAg ggg 3'	shRNA	biomers.net GmbH, Ulm
shFosB5 fw	5' ccccCGAGGAAGAG- GAGAAACGAttcaagagaTCGTTT- CTCCTCTTCCTCGttttg 3'	shRNA	biomers.net GmbH, Ulm
shFosB5 rv	5' tcgaccaaaaaCGAGGAAGAG- GAGAAACGAtctcttgaaTCGTTT- CTCCTCTTCCTCGgggg 3'	shRNA	biomers.net GmbH, Ulm
shFosB6 fw	5' ccccGATCAGTTGGAAGAAGA- GAttcaagagaTCTCTTCTT- CCAAGTATCttttg 3'	shRNA	biomers.net GmbH, Ulm

shFosB6 rv	5' tcgaccaaaaaGATCAGTTG- GAAGAAGAGAtctcttgaaTCTCTT- CTTCCA ACTGATCggggg 3'	shRNA	biomers.net GmbH, Ulm
FosB_1 oc fw	5' GTCACAGCCATCACAACCAG 3'	qPCR	Thermo Fisher Scientific, Wal- tham, USA
FosB_1 oc rv	5' TGGTTCCTGGCATGTCGTAG 3'	qPCR	Thermo Fisher Scientific, Wal- tham, USA
pLKO1 fw	5' CATTGATTAGTGAACG- GATCTC 3'	Sequen- zierung	Thermo Fisher Scientific, Wal- tham, USA
pLKO1 rv	5' GGATGAATACTGCCATTT- GTCTC 3'	Sequen- zierung	Thermo Fisher Scientific, Wal- tham, USA
a-tub oc fw	5' GCTTCTTGGTTTTCCACAGC 3'	qPCR	Thermo Fisher Scientific, Wal- tham, USA
a-tub oc rv	5' GGTGGTGAGGATGGAGTTGT 3'	pPCR	Thermo Fisher Scientific, Wal- tham, USA
ocSp100 F	5' GTCCTGTGCAAAAAGTGGT 3'	qPCR	Thermo Fisher Scientific, Wal- tham, USA
ocSp100 R	5' CTCTCTCTCCTCCACCATCG 3'	qPCR	Thermo Fisher Scientific, Wal- tham, USA
ocSp100 B/C/HMG F	5' ACGGACCAAAAAGTGACCAAG 3'	qPCR	Thermo Fisher Scientific, Wal- tham, USA

ocSp100 B/C/HMG R	5' GAGGCACCTTTCAGCAACTC 3'	qPCR	Thermo Fisher Scientific, Wal- tham, USA
CRPV E2 For 1306	5' AATCGACTGCTATCCGCATC 3'	qPCR	Thermo Fisher Scientific, Wal- tham, USA
CRPV E2 Rev 3085	5' AGTTCTAAGGTGGACCA- GAACC 3'	qPCR	Thermo Fisher Scientific, Wal- tham, USA
CRPV E9/E2C_1730 For SD1751/SA3714	5' TTCTGGTGCTGAGTCGTTACA 3'	qPCR	Thermo Fisher Scientific, Wal- tham, USA
CRPV E9/E2C_3965 Rev SD1751/SA3714	5' TCGTAGTTCTTCGTCCAACG 3'	qPCR	Thermo Fisher Scientific, Wal- tham, USA
CRPV E1E4 For 1338	5' GTGCCCGGAGTGTTGTAA 3'	qPCR	Thermo Fisher Scientific, Wal- tham, USA
CRPV E1E4 Rev 3751	5' GGTGTCTTCAGGGGCACT 3'	qPCR	Thermo Fisher Scientific, Wal- tham, USA
CRPV URR/E4 For 7794- 7810/3714-3715	5' GCCAGGTGTGCATGACTCT 3'	qPCR	Thermo Fisher Scientific, Wal- tham, USA
CRPV URR/E4 Rev 3831 R	5' CTGGTGACCTTGACCTTCGT 3'	qPCR	Thermo Fisher Scientific, Wal- tham, USA

HPV31 E6* F	5' AATT- GTGTCTACTGCAAAGGTGTA 3'	qPCR	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
HPV31 508 R (E6*)	5' CCAACATGCTATGCAACGTC 3'	qPCR	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
HPV31 804 F (E1^E4)	5' TGTTAATGGGCTCATTGGAA 3'	qPCR	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
HPV31 3373 R (E1^E4)	5' GGTTTTGGAATTCGATGTGG 3'	qPCR	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
HPV31 1242 F (E8^E2)	5' ACTTCCAGACAGCGGGTATG 3'	qPCR	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
HPV31 3461 R (E8^E2)	5' GGTGGGTGTTTCTGTGCTCT 3'	qPCR	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
HPV31 3528 F (E4^L1)	5' CATGCACAAACCAAACAAGG 3'	qPCR	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
HPV31 5651 R (E4 ^L1)	5' GCACTGCCTGCGTGATAATA 3'	qPCR	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
hsFosB F	5' CGCCGGGAACGAAATAAACT 3'	qPCR	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
hsFosB R	5' AAATCTCTCACCTCCGCCAG 3'	qPCR	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.1.11 RNA-Oligonukleotide

Aus der Sequenz der shRNA Oligonukleotide gegen Kaninchen-FosB wurden entsprechende siRNA- Sequenzen abgeleitet. Diese wurden von der Firma als doppelsträngige siRNA Nukleotide geliefert. Die siRNA-Sequenzen gegen humanes FosB sind ein kommerziell erhältlicher Pool und wurden von der Firma Qiagen bezogen.

TABELLE 6: RNA-OLIGONUKLEOTIDE

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung	Hersteller
siRNA oc-fosB1	Sense: 5' GAGUCCCAGUAUCU- GUCUUUU 3' Antisense: 5' AAGACAGAUACUGG- GACUCUU 3'	siRNA knock- down	Dhamacon, Lafayette, Colorado, USA
siRNA oc-fosB2	Sense: 5' CAACCAGCCAGGAC- CUUCAUU 3' Antisense: 5' UGAAGGUCCUGGCUG- GUUGUU 3'	siRNA knock- down	Dhamacon, Lafayette, Colorado, USA
siRNA oc-fosB3	Sense: 5' CCGUUGACCCCUA- CGACAUUU 3' Antisense: 5' AUGUCGUAGGG- GUCAACGGUU 3'	siRNA knock- down	Dhamacon, Lafayette, Colorado, USA
siRNA oc-fosB4	Sense: 5' UGGCUACAGCAGUGGCG- GAUU 3' Antisense: 5' UCCGCCA- CUGCUGUAGCCAUU 3'	siRNA knock- down	Dhamacon, Lafayette, Colorado, USA
siRNA oc-fosB5	Sense: 5' CGAGGAAGAG- GAGAAACGAUU 3' Antisense: 5' UCGUUUCUCCUCUUC- CUCGUU 3'	siRNA knock- down	Dhamacon, Lafayette, Colorado, USA
siRNA oc-fosB6	Sense: 5' GAUCAGUUG- GAAGAAGAGAUU 3' Antisense: 5' UCUCUUCUUCCAA- CUGAUCUU 3'	siRNA knock- down	Dhamacon, Lafayette, Colorado, USA
siRNA ocSp100-D	Sense: 5' GACAUAAAGUG- GAGAUUUCAAUU 3' Antisense: 5' UUGAAAUCUCCACUUU- AUGUCUU 3'	siRNA knock- down	Dhamacon, Lafayette, Colorado, USA

siRNA hsfosb-1	5´ CTAGGTCACGTTGGCCCTCAA 3´	siRNA knock- down	Qiagen, Venlo, Nie- derlande
siRNA hsfosb-4	5´ TTCCTGGTTTCCGAAAGGCAA 3´	siRNA knock- down	Qiagen, Venlo, Nie- derlande
siRNA hsfosb-5	5´ CTGGAGTGATTTATACTGTGA 3´	siRNA knock- down	Qiagen, Venlo, Nie- derlande
siRNA hsfosb-6	5´ TACAATCTGTATCTTTGACAA 3´	siRNA knock- down	Qiagen, Venlo, Nie- derlande

2.1.12 Zelllinien

AVS Zellen (Asia Virus Stock): Kaninchenkeratinozyten; immortalisiert mit episomalem CRPV Gesamtgenom (Huber *et al.*, 2004)

HEK293T Zellen: humane embryonale Nierenzellen; zur Herstellung von Viruspartikeln; immortalisiert via Adenovirus 5 DNA (Graham *et al.*, 1977)

RK1-16E7/Ras Zellen: Kaninchenkeratinozyten; immortalisiert mit HPV16-E7 und Protoonkogen Ras (Jeckel *et al.*, 2003)

VX2 Zellen: Kaninchenkeratinozyten isoliert aus einem anaplastischem, transplantierbaren, CRPV induzierten Karzinom (Georges *et al.*, 1985)

CIN612-9E Zellen: humane Keratinozyten isoliert aus einer HPV31-positiven CIN1-Läsion, das virale Genom liegt episomal vor (Bedell *et al.*, 1991)

NIH3T3-J2 : murine Fibroblasten-Zelllinie (RHEINIWALD, 1975)

2.1.13 Bakterienstämme

Escherichia coli DH5 α (Clonetech): Genotyp: endA1 hsdR17 supE44 thi-1 recA1 gyrA (Naly) relA1 Δ (lacIZYA-argF)U169 deoR

(ϕ 80dlac Δ (lacZ)M15); Endonukleasen- und Rekombinase-defizienter Bakterienstamm zur DNA-Amplifikation

2.2 METHODEN

2.2.1 Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1 Herstellung von kompetenten Bakterienstämmen

Exponentiell wachsende *Escherichia coli* Bakterien wurden mit CaCl₂, RbCl₂ und MnCl₂ behandelt um sie zu befähigen, zirkuläre Plasmid DNA aufzunehmen (Ausubel, op. 1994-2000).

2.2.1.2 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Bakterien

Die Transformation der kompetenten Bakterien erfolgte nach der Hitzeschockmethode (Ausubel, op. 1994-2000).

2.2.1.3 Kultivieren von Bakterien zum Amplifizieren von Plasmid DNA

Der Plasmid enthaltende *Escherichia coli* DH5 α Bakterienstamm wurde direkt aus dem Einfrierröhrchen in 5 ml (für kleinere DNA-Mengen - Mini QIAprep® Spin Miniprep Kit) oder in 30 ml (für größere DNA Mengen - QIAgen® Plasmid Plus Midi Kit) (*Qiagen, Venlo, Niederlande*) LB-Medium oder LB-Medium mit 100 μ g/ml Ampicillin angezüchtet. Hierfür wurde die Kultur über Nacht (16-18 h) im Schüttelinkubator bei 37° C inkubiert. Aufgrund der auf dem Plasmid vorhandenen Ampicillinresistenz und des Ampicillingehalts des verwendeten LB-Mediums wurden nur die Plasmid-haltigen Bakterien amplifiziert.

2.2.1.4 Bakterien lagern

Zum Einfrieren wurde eine Bakterien-Flüssigkultur (siehe 2.2.1.3) im Verhältnis 1:1 mit Bakterien-Einfriermedium vermischt und anschließend in einem Einfrierröhrchen bei -80° C gelagert.

2.2.2 DNA-Methoden

2.2.2.1 Plasmid-DNA aus Bakterien isolieren

Zur Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde das Mini QIAprep® Spin Miniprep Kit nach Angaben des Herstellers verwendet.

Wurden größere Mengen DNA verwendet, erfolgte die Isolation mit dem QIAgen® Plasmid Plus Midi Kit ebenfalls nach Angaben des Herstellers. Konzentration und Reinheit wurden mit einem Spektralphotometer Nanodrop® bestimmt.

2.2.2.2 *Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen*

Zur Spaltung von DNA wurden fast-digest Restriktionsenzyme der Firma Thermo Fisher, Waltham, USA nach Angaben des Herstellers verwendet. Der Vektor plko1.H1 puro wurde für die Konstruktion neuer rekombinanter Plasmide mit FastDigest EcoR32I und FastDigest Sall geschnitten und anschließend per Gelelektrophorese aufgereinigt. Für die Testrestriktion der entstandenen rekombinanten DNA-Plasmide wurden die beiden Enzyme FastDigest EcoRI und Eco105I verwendet. Zur Bewertung der Testrestriktion wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt.

2.2.2.3 *Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten*

Zur größenbezogenen Trennung von DNA-Fragmenten wurden Agarose-Gele hergestellt. Hierzu wurde einfacher TAE-Puffer mit 0,7 % (w/v) bis 2 % (w/v) Agarose vermischt und aufgekocht. Anschließend wurden 2 Tropfen Ethidiumbromidlösung pro 50 ml Puffer hinzugefügt. Das Gel wurde in die entsprechenden Agarose-Gelelektrophorese-Kammern gegeben. Nach Auspolymerisieren des Gels wurde die Kammer mit einfachem TAE-Puffer gefüllt, bis das Gel bedeckt war. Nachdem die DNA-Proben geladen wurden, wurde die Spannungsquelle (60-120 V) angeschlossen. Als Längenmarker wurde die DNA Ladder (ThermoFisher) verwendet. Zur Geldokumentation wurde das Kamearasystem Gel Doc 2000 genutzt.

2.2.2.4 *Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen*

Unter UV-Licht wurden die DNA-Fragmente mit einem Skalpell ausgeschnitten und anschließend mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit nach dem Handbuch des Herstellers aufgereinigt.

2.2.2.5 Hybridisierung von DNA-Oligonukleotiden

Zunächst wurden die einsträngigen DNA-Oligonukleotide für shRNA in ddH₂O zur Endkonzentration 1 µg/µl gelöst. Dann wurde je 12,5 µl des forward und 12,5 µl des backward Oligonukleotids mit 25 µl 2-fach Hybridisierungspuffer angesetzt. Die Hybridisierung der einzelsträngigen DNA-Oligonukleotide zu doppelsträngiger DNA erfolgte in der PCR-Maschine nach folgendem Programm:

- 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 Geschwindigkeit der Temperaturänderung betrug jeweils 0,1° C.

2.2.2.6 Amplifikation von DNA mittels PCR

Zur Amplifikation bestimmter DNA-Abschnitte wurden 20 ng der Template DNA mit 33,75 µl H₂O, 5 µl Polymerase Buffer II, 4 µl dNTPs, 0,25 µl Pyrobest™ DNA Polymerase, 2,5 µl forward-Primer und 2,5 µl backward-Primer in der PCR-Maschine nach folgendem Programm amplifiziert:

- 5 min 95° C
 - 30 s 95° C
 - 30 s 55° C
 - 30 s 72° C
 - 10 min 10° C
 - ∞ 4° C
- } 30 Zyklen

2.2.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-Ligase

Zur Ligation von Vektoren mit doppelsträngigen DNA-Oligonukleotiden wurde das Rapid DNA Ligation Kit der Firma Thermo Fisher nach Herstellerangaben verwendet. Dieser Ligationsansatz wurde zur Transformation von kompetenten DH5 α Bakterien verwendet.

2.2.2.8 Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden von der Firma eurofins (Luxemburg, Luxemburg) durchgeführt.

2.2.3 RNA-Methoden

2.2.3.1 Extraktion von RNA aus eukaryotischen Zellen

Zur Extraktion der RNA aus eukaryotischen Zellen wurde das RNAeasy Mini Kit[®] der Firma Qiagen nach Herstellerangaben verwendet. Die Zellen wurden (nach Absaugen des Mediums) direkt aus den Petrischalen in RLT Puffer (im RNAeasy Mini Kit[®] enthalten) aufgenommen. Anschließend wurde die Lösung mithilfe des QIAshredder[®]homogenizer der Firma Qiagen homogenisiert. Nach dem Eluieren wurde die RNA bei -80° C gelagert.

2.2.3.2 Herstellen von copy-DNA

Zur Analyse der extrahierten RNA mittels realtime-PCR muss diese zunächst in DNA umgeschrieben werden. Hierfür wurde das QuantiTect[®] Reverse Transcription Kit (200) der Firma Qiagen nach Herstellerangaben verwendet. Es wurde eine Gesamtmenge von 1000 ng RNA umgeschrieben und anschließend mit 80 μ l ddH₂O auf 100 μ l aufgefüllt. Somit ergab sich eine cDNA-Konzentration von 10 ng/ μ l, die anschließend für qPCR verwendet wurde.

2.2.3.3 Quantitative RealTime PCR

Quantitative RT-PCR wurden mit dem LightCycler[®] der Firma Roche und dem zugehörigen SYBR[®] Green I Master Mix durchgeführt. Hierfür wurden je 5 μ l der zu analysierenden cDNA der Konzentration 10 ng/ μ l mit 10 μ l SYBR[®] Green I Master Mix, 1 μ l ddH₂O, 2 μ l zugehörigem forward-Primer und 2 μ l zugehörigem backward-Primer in einen

Reaktionsansatz der LightCycler® Multiwell Plate 96 (white) gegeben. SYBR® Green ist ein Fluoreszenzfarbstoff der in doppelsträngige DNA interkaliert. Am Ende jeder Elongationsphase erfolgte eine Messung der Fluoreszenz. So wurde eine quantitative Erfassung der entstehenden PCR-Produkte ermöglicht. Die befüllte Platte wurde mit einer mitgelieferten selbstklebenden Folie versiegelt, zentrifugiert (1000 rpm, 22° C, 3 min) und anschließend mit dem LightCycler® 480 (Roche) analysiert.

Folgendes Programm wurde durchlaufen:

Initiale Denaturierung	95° C, 10 min	
Denaturierung	95° C, 10 s	} 45 Zyklen
Primerbindung	60° C, 15 s	
Amplifikation	72° C, 15 s	
Schmelzkurve	95° C, 10 s	
	65° C, 30 s	
	90° C	
Ende	4° C, bis zur Abschaltung	

Die Software des LightCycler®s berechnet für jeden Reaktionsansatz den CP-Wert (Crossing Point). Dieser Wert gibt an, nach wie viel Zyklen ein eindeutig von der Hintergrundfluoreszenz zu unterscheidendes Fluoreszenzsignal messbar ist. Zu jeder gemessenen cDNA wurde ein Duplet gemessen, um methodisch bedingt Schwankungen auszugleichen.

Mithilfe der Pfaffl-Formel (Pfaffl, 2001) wurden alle gemessenen Werte auf ein zusätzlich gemessenes Referenzgen (housekeeping gene), das unbeeinflusst von der durchgeführten Behandlung bleibt, bezogen. So konnten

verschiedene Proben und Experimente verglichen werden. Als Referenzgen in den Kaninchenkeratinozyten diente α -tubulin, in den humanen Keratinozyten GAPDH.

$$\text{Relative mRNA Expression}_{\text{Zielgen}} = \frac{(\text{Primereffizienz}_{\text{Zielgen}})^{\Delta\text{CP}_{\text{Zielgen}}(\text{Kontrolle-Probe})}}{(\text{Primereffizienz}_{\text{Referenz}})^{\Delta\text{CP}_{\text{Referenz}}(\text{Kontrolle-Probe})}}$$

Zur Primereffizienzbestimmung des Kaninchen FosB-Primers wurde eine Plasmidverdünnungsreihe hergestellt und nach anschließender qPCR im LightCycler® mithilfe der zugehörigen Software eine Standardkurve erstellt und aus dieser die Effizienz berechnet (Effizienz=1,924). Für α -Tubulin, SP100 und die CRPV-Transkripte wurde vereinfacht eine Effizienz von zwei angenommen.

Für den menschlichen FosB-Primer, GAPDH und die HPV31-Transkripte wurde ebenfalls eine gerundete Effizienz von zwei angenommen.

2.2.4 Zellkulturmethoden

2.2.4.1 Allgemeine Zellkulturmethoden

Alle für diese Arbeit verwendeten Zellen wurden in Plastikpetrischalen als Adhäsionskulturen bei 37° C, 5 % CO₂ und bei 75 % relativer Luftfeuchtigkeit gehalten. Alle Arbeiten an den Zellen wurden unter sterilen Bedingungen an der laminar-flow Werkbank durchgeführt.

Passagieren: (alle Volumenangaben beziehen sich auf eine 100 mm Schale). Zunächst wurde das Medium der Zellen entfernt, die Zellen mit 4 ml DPBS gewaschen, mit 2 ml Trypsin bedeckt und 5 min im Brutschrank inkubiert. Das Trypsin wurde mit 8 ml mit FKS-haltigem Medium (DMEM-FKS) gestoppt, die vereinzelter Zellen wurden resuspendiert und anschließend in Zelllinien-abhängigem Verhältnis auf neue Schalen aufgeteilt. Wenn es nötig war eine exakte Anzahl an Zellen auszusähen, wurde eine Neubauer Zählkammer verwendet.

Einfrieren: Das Medium einer konfluenten 100 mm Schale wurde abgenommen und die Schale mit 4 ml DPBS gewaschen, anschließend wurden 2 ml Trypsin auf die Schale gegeben und etwa 5 min bei 37 °C

inkubiert. Das Trypsin wurde mit 8 ml FKS-haltigem Medium gestoppt und anschließend bei 20 °C mit 1394 rpm fünf Minuten lang zentrifugiert. Die Zellen wurden in 2 ml Einfriermedium aufgenommen und die Suspension auf zwei Einfrierröhrchen aufgeteilt. Die Röhrchen wurden im Cryo-Einfriergerät Mr. Frosty langsam (1° C/ min) auf -80° C abgekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff bei -173° C langzeitgelagert.

Auftauen: Die Zellen wurden im Wasserbad bei 37° C schnell aufgetaut und dann das Einfriermedium mit den Zellen zu 9 ml Kulturmedium hinzugegeben. Die Zellen wurden bei 20° C mit 1394 rpm fünf Minuten lang abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen anschließend in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und auf eine 10 mm Plastikpetrischale ausgesät.

2.2.4.2 HEK293T Zellen

Die HEK292T Zellen wurden für die Produktion von Viruspartikeln verwendet. Sie wurden auf Plastik-Petrischalen in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) mit 10 % FKS Fötalem Kälber Serum und 50 mg/l Gentamicin kultiviert und etwa alle 3-4 Tage im maximalen Verhältnis 1:10 geteilt. Das Einfriermedium bestand aus 80 % des Kulturmediums, 10 % FKS und 10 % DMSO.

2.2.4.3 Kaninchenkeratinozyten

Die beiden Kaninchenkeratinozyten-Zelllinien (RK1-16E7 ras, AVS) (Huber *et al.*, 2004) wurden auf Plastik-Petrischalen in KFSM gehalten und etwa alle 3-4 Tage im maximalen Verhältnis 1:5 passagiert. Nach Inaktivieren des Trypsins mit FKS-haltigem Medium wurde die Zellsuspension bei 20° C mit 1394 rpm fünf Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in KFSM resuspendiert und anschließend geteilt. Das Einfriermedium bestand aus 80 % des Kulturmediums, 10 % HyClone® und 10 % DMSO).

Die VX2-Kaninchenkeratinozyten (Georges *et al.*, 1985) wurden auf Plastik-Petrischalen in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) mit

10 % FKS ohne Antibiotikum kultiviert und etwa alle 3-4 Tage im maximalen Verhältnis 1:5 geteilt. Das Einfriermedium bestand aus 80 % des Kulturmediums, 10 % FKS und 10 % DMSO.

2.2.4.4 *NIH3T3-J2 Fibroblasten*

Die NIH3T3-J2 Zellen wurden in DMEM-CS (10 % CS und 50 mg/l Gentamicin) auf Plastikpetrischalen kultiviert und etwa alle 3-4 Tage etwa im Verhältnis 1:4 geteilt. Um die Zellen teilungsunfähig und so nutzbar als „Feeder“-Zellen für die CIN612-9E Zellen zu machen, wurden die Fibroblasten mit Mitomycin C behandelt. Die Teilung der Zellen wird dadurch gestoppt, dass Mitomycin C die Bildung des Spindelapparates verhindert. Eine etwa zu 90 % konfluente 100 mm Petrischale wurde zunächst mit 5 ml neuem DMEM-CS befüllt und dann mit 100 µl Mitomycin C (400 µg/ml in PBS) für etwa 60 Minuten bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS konnten die nun teilungsunfähigen NIH3T3-J2 Zellen als „Feeder“ verwendet werden.

2.2.4.5 *CIN612-9E Zellen*

Die CIN612-9E Zellen wurden auf Plastikpetrischalen in E-Medium-HC zusammen mit teilungsunfähigen NIH3T3-J2 in Kokultur kultiviert. Die Zellen wurden etwa alle 3-4 Tage im maximalen Verhältnis 1:4 auf eine neue Petrischale (mit teilungsunfähigen NIH3T3-J2 „Feeder“-Zellen) gesplittet.

2.2.4.6 *Herstellung von FosB Knockdown-Zelllinien*

Zur Produktion von Zelllinien mit einer reduzierten FosB-Expression, wurden Lentiviren verwendet. Diese infizieren die Zielzellen mit dem pLKO1.H1-shRNA-Plasmid. Die enthaltene shRNA bewirkt den Knockdown des Zielgens. Zur Virusherstellung wurden 2×10^6 HEK-293T Zellen auf eine 60 mm Plastikpetrischale in DMEM-FKS mit Gentamicin ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit 2 µg psPax-Plasmid, 2 µg pMDM2.G-Plasmid und 2 µg plko1.H1-shRNA Plasmid transfiziert. Als Transfektionsreagenz wurde für den gesamten Ansatz 30 µl

Fugene® verwendet. Die Transfektion wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach 24 h wurde das Medium der Zellen mit DMEM-FKS ohne Antibiotikum ersetzt. Am selben Tag wurden die Zielzellen ausgesät. Dafür wurden die Zellen einer 80-100 % konfluenten 100 mm Platte auf drei 60 mm Platte aufgeteilt. 24 Stunden später wurde das Medium der HEK-293T Zellen abgenommen und durch einen 0,45 mm Filter filtriert. Anschließend wurde 5 µg/ml Polybrene hinzugefügt. Das Medium der Zielzellen wurde entfernt und zur Infektion durch das filtrierte DMEM der HEK-293T Zellen ersetzt. Vier bis sechs Stunden später wurde dieselbe Menge antibiotikafreies KFSM hinzugefügt. 24 h nach der Infektion wird das Medium der Zielzellen komplett ausgetauscht und durch antibiotikafreies KFSM ersetzt. Sechs Stunden später wird mit 1 µg/ml Puromycin selektioniert. Die Zellen wurden eine Woche unter Puromycin gehalten und nach ein bis zweimaligem Passagieren zur RNA-Extraktion geerntet. Anschließend wurde eine qPCR durchgeführt.

Als Kontrollansatz für die lentivirale Infektion wurde das lentivirale Plasmid pCDH-C1-YFP-EF1_Puro benutzt. Die Virusherstellung wurde analog zur Herstellung der shRNA-enthaltenden Lentiviren in HEK293T Zellen durchgeführt. Anschließend wurden dieselben Zielzellen auf die gleiche Weise infiziert und schließlich selektioniert. Die genaue Vorgehensweise wird im vorherigen Abschnitt beschrieben.

2.2.4.7 *FosB* Knockdown mittels siRNA

Um einen siRNA vermittelten Knockdown in Keratinozyten durchzuführen, wurden die Zielzellen in 6-well Plastikpetrischalen ausgesät. (RK1-16E7 ras/AVS: 200.000 Zellen/Well; VX2: 300.000 Zellen/Well; CIN612-9E: 250.000 Zellen/Well). Nach 24 h wurden die etwa 60-80 % konfluenten Zellen mit den siRNA-Oligonukleotiden transfiziert. Die Transfektion wurde nach Herstellerangaben mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamine™ RNAiMAX durchgeführt. Hierfür wurden 90 pmol siRNA in 150 µl OptiMem gelöst. 9 µl RNAiMAX wurden ebenfalls

in 150 µl OptiMem gelöst. Beide Ansätze wurden gevortexed, anschließend zusammengebracht, erneut gevortexed und schließlich 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Medium der Zielzellen wurde ausgetauscht und der Transfektionsansatz auf die Zellen getropft. 24 h nach der Transfektion wurde das Medium ausgetauscht und weitere 24 h später wurden die Zellen zur RNA-Extraktion geerntet. Anschließend wurde eine qPCR durchgeführt. In den CIN612-9E Zellen wurde außerdem ein Knockdown mit dem Transfektionsreagenz HiPerFect (Qiagen, Venlo, Niederlande) durchgeführt. 24 h nach Aussähen von 250.000 Zellen/Well in einer 6-well Petrischale wurde 46 pmol siRNA und 20 µl Hiperfect in 100 µl OptiMem gelöst, etwa 10 s gevortexed und dann 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Medium der CIN612-9E-Zellen gewechselt und der siRNA-Ansatz hinzugefügt. 24 h nach der Transfektion wurde das Medium erneut gewechselt und 48 h nach Transfektion wurden die Zellen zur RNA-Extraktion geerntet.

3. ERGEBNISSE

3.1 VERGLEICH DER VERSCHIEDENEN FOSB FORMEN ZWISCHEN MENSCH UND KANINCHEN

Um die Übertragbarkeit der geplanten Experimente im Kaninchenmodell auf den Menschen abschätzen zu können, wurde ein Sequenzalignment durchgeführt. Je höher die Konservierung des FosB Proteins über die Speziesgrenze hinweg, desto besser lassen sich Daten aus dem Kaninchenmodell auf den Menschen übertragen. Zusätzlich wurden die Experimente die zeigten, dass CRPV-E2 die Expression von FosB induziert in der menschlichen Zervixkarzinomzelllinie C33A durchgeführt (Delcuratolo *et al.*, 2016). Ob dies auch auf Kaninchenzellen übertragbar ist, hängt ebenfalls von der Konservierung des FosB Proteins ab.

Sowohl mRNA- als auch Proteinsequenzen stammen aus der NCBI (National Center for Biotechnology Information) Datenbank ('Database resources of the National Center for Biotechnology Information', 2016). Nukleotidsequenzen wurden mit dem BLAST-Tool (Zhang *et al.*, 2000) verglichen und Proteinsequenzen mit dem COBALT-Tool (Papadopoulos and Agarwala, 2007). Beide Alignment-Tools können ebenfalls auf der Web-Seite des NCBI's gefunden werden.

3.1.1 FosB mRNA Alignment – Mensch/Kaninchen

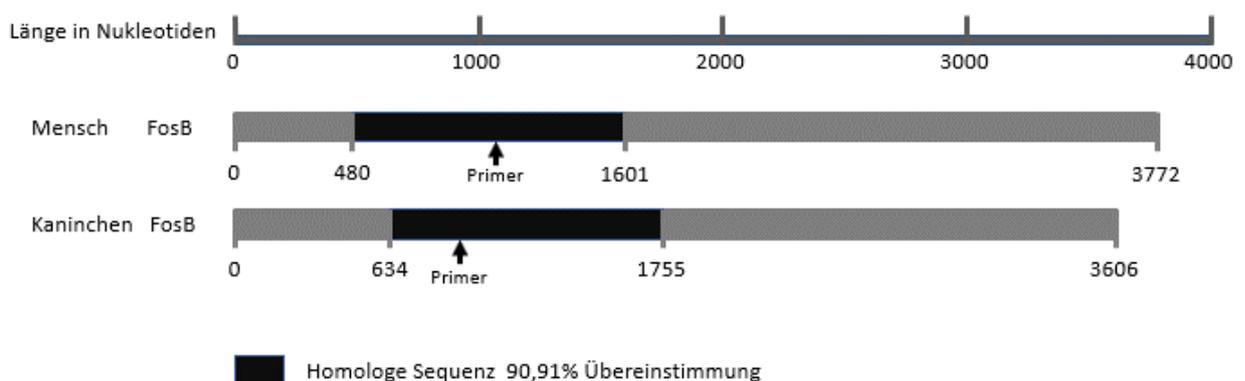


ABBILDUNG 3: FOSB mRNA-SEQUENZALIGNMENT MENSCH/KANNINCHEN

ZUSÄTZLICH ZUM HOMOLOGEN ABSCHNITT SIND DIE JEWEILIGEN PRIMER EINGETRAGEN MIT DENEN DIE QPCR DURGEFÜHRT WURDE.

Die FosB-mRNA des Kaninchens (*Oryctolagus Cuniculus*) ist mit 3606 Basenpaaren etwas kürzer als die 3775 Basenpaare lange menschliche mRNA. Der homologe Abschnitt ist 1122 Basenpaare lang und stimmt zu 90,91% überein. Das heißt nur an 102 Stellen befindet sich eine andere Base. Der verwendete pPCR-Primer für Kaninchen FosB befindet sich in Exon 1, es werden also alle möglichen Splice-Varianten detektiert. Der verwendete qPCR-Primer für humanes FosB befindet sich Exon-übergreifend zwischen Exon 3 und Exon 4.

3.1.2 FosB Protein Alignment – Mensch/Kaninchen

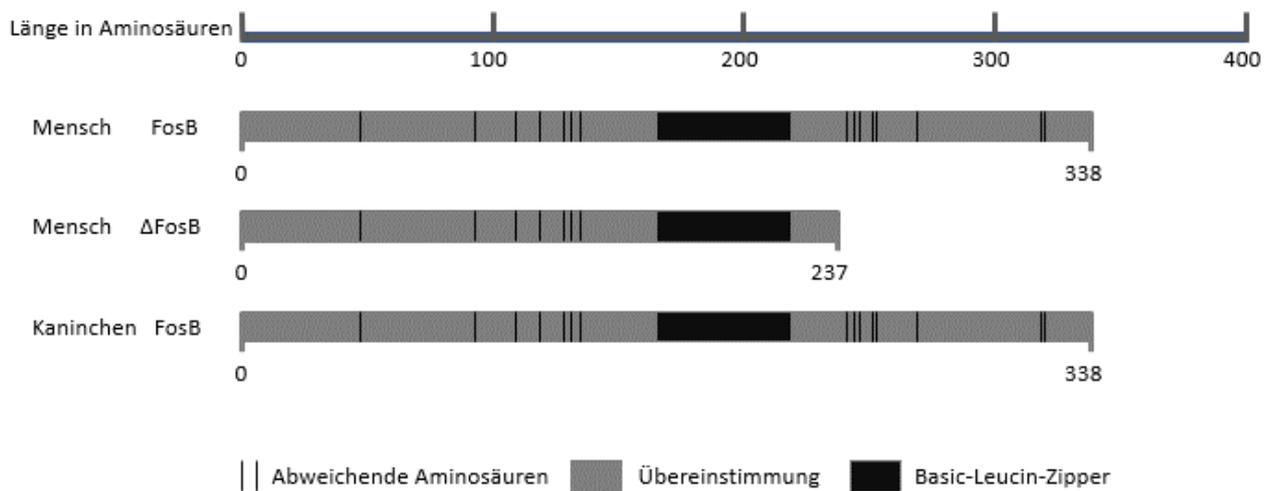


ABBILDUNG 4: FOSB PROTEIN-SEQUENZALIGNMENT MENSCH/KANINCHEN

Menschliches und Kaninchen-FosB hat eine Länge von 338 Aminosäuren. Über den gesamten Bereich ist das Protein hochkonserviert. Nur an 16 Positionen kommt es zwischen den Spezies zu einem Aminosäureaustausch, die meisten der Abweichungen sind konservativ. Keine der abweichenden Aminosäuren befindet sich in der Basic-Leucin-Zipper-Region, die essentiell für die Dimerisierung ist. In der humanen Datenbank findet sich eine am C-Terminus um 101 Aminosäuren gekürzte Proteinvariante, die in der Literatur oft als Δ FosB bezeichnet wird (Yen *et al.*, 1991). Außerdem findet sich in der menschlichen Genomdatenbank eine 302 Aminosäuren lange Variante, welche jedoch nicht ausreichend untersucht wurde.

Das FosB-Protein ist über die Speziesgrenze hinweg hoch konserviert. Das unterstreicht die Eignung des Modells für die Forschung an diesem Protein. Die Voraussetzung um die Ergebnisse aus Experimenten im Kaninchenmodell und Schlüsse, die aus diesen Daten gezogen werden, auf den Menschen übertragen zu können ist damit gegeben.

3.2 FosB KNOCKDOWN IN KANINCHENKERATINOZYTEN

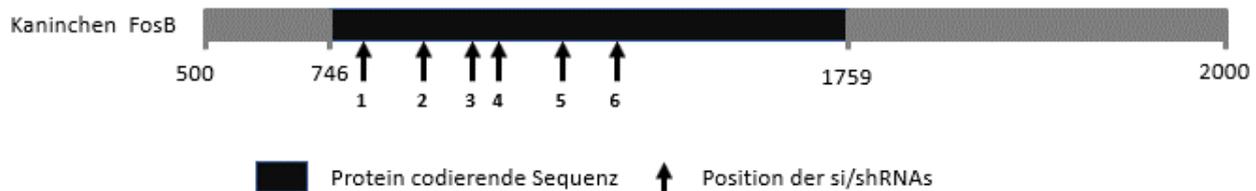


ABBILDUNG 5: POSITIONIERUNG DER SI/SHRNA-SEQUENZEN AUF DER KANINCHEN-FOSB-MRNA

ABGEBILDET IST EIN AUSSCHNITT AUS DER KANINCHEN-FOSB-MRNA VON NUKLEOTID 500-2000. DIE SI/SHRNAS1-6 SIND VERKÜRZT MIT DEN ZAHLEN 1-6 BEZEICHNET.

3.2.1 FosB Knockdown via shRNA-Lentivirus

Im Kaninchenmodell kann *in vivo* ein Knockdown mittels shRNA-Interferenz erzielt werden, wie zuvor schon beschrieben wurde (siehe Einleitung 1.5). Deshalb wurden zwei Kaninchenzelllinien ausgewählt, in denen ein FosB Knockdown mittels shRNA in Zellkultur vorgenommen wurde. Mit verschiedenen Online-tools wurden sechs vielversprechende, Kaninchen-FosB adressierende Sequenzen ausgewählt.

Mit Hilfe von lentiviralen Partikeln, welche die entsprechenden shRNA-Sequenzen enthielten, wurden die Zielzellen transduziert. Nach einer Antibiotika-basierten Selektion erhält man stabile Knockdown-Zelllinien, die nach etwa einer Woche geerntet und mittels qPCR analysiert werden können. Mittels der Pfaffl-Formel wurde auf das Referenzgen α -tubulin normalisiert. Als Negativkontrolle (mock) diente der Leervektor pLKO1.H1 puro. Das genaue Vorgehen wird im Methodenteil 2.2.3.3 und 2.2.4.6 beschrieben.

3.2.1.1 Kontrolle mittels YFP-enthaltendem Lentivirus

Zur Kontrolle, ob die Methode generell funktioniert, wurde ein YFP-enthaltendes lentivirales Plasmid anstelle des shRNA-enthaltenden lentiviralen Plasmids verwendet. Alle anderen Schritte, Plasmide, Reagenzien und Zelllinien waren identisch.

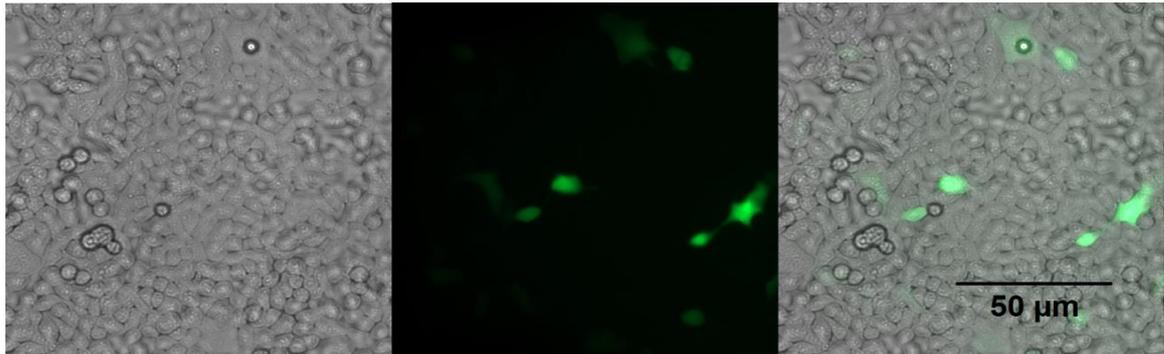


ABBILDUNG 6: HEK293T ZELLEN 24H POST TRANSFEKTION

FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE AUFNAHME VIRUSPRODUZIERENDER HEK293T-ZELLEN 24H NACHDEM SIE MIT YFP-ENHALTENDEM LENTIVIRALEM PLASMID TRANSFIZIERT WURDEN

Das Aufleuchten einer signifikanten Anzahl von Zellen zeigt die erfolgreiche Transfektion der HEK293T-Zellen an. Es ist somit zu erwarten, dass sie die gewünschten Lentiviren produzieren.

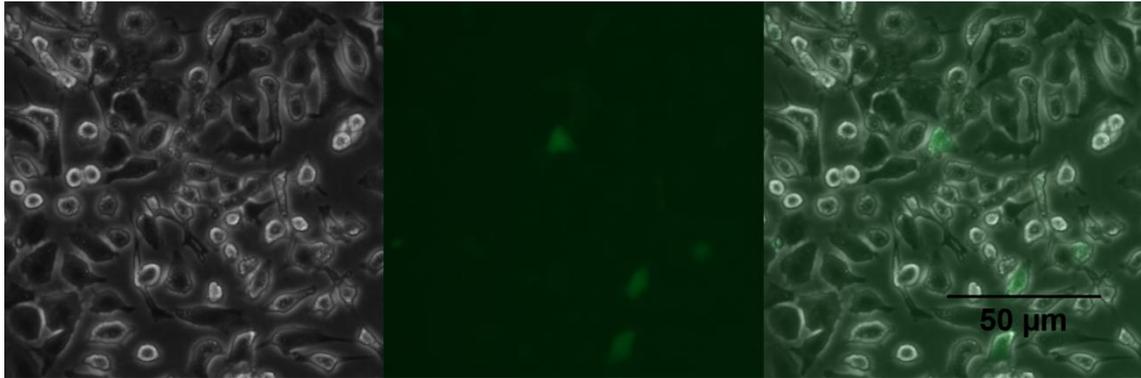


ABBILDUNG 7: AVS-ZELLEN 24H POST INFEKTION

FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE AUFNAHME VON AVS-ZELLEN (KANINCHENKERATINOZYTEN) 24H NACHDEM SIE VON YFP-ENHALTENDEN LENTIVIREN INFIZIERT WURDEN; NOCH VOR SELEKTIONIERUNG

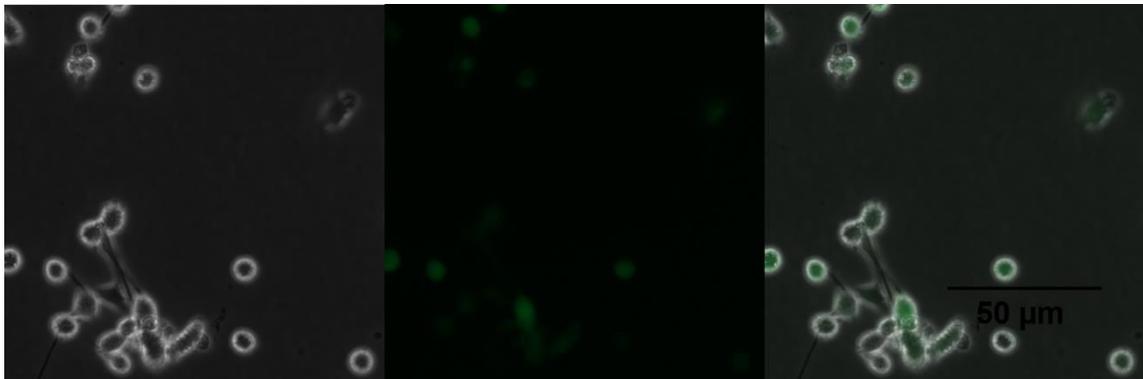


ABBILDUNG 8: AVS-ZELLEN 7 TAGE POST INFEKTION; POST SELEKTION

FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE AUFNAHME VON AVS-ZELLEN (KANINCHENKERATINOZYTEN) 7 TAGE NACHDEM SIE VON YFP-ENHALTENDEN LENTIVIREN INFIZIERT WURDEN UND 6 TAGE NACH BEGINN DER SELEKTION MIT PUROMYCIN

Nach der Infektion mit den Lentiviren fluoreszieren zunächst nur einige der AVS-Zellen unter dem Mikroskop. Nach einigen Tagen unter Selektion sind alle noch verbleibenden Zellen YFP-positiv und somit infiziert.

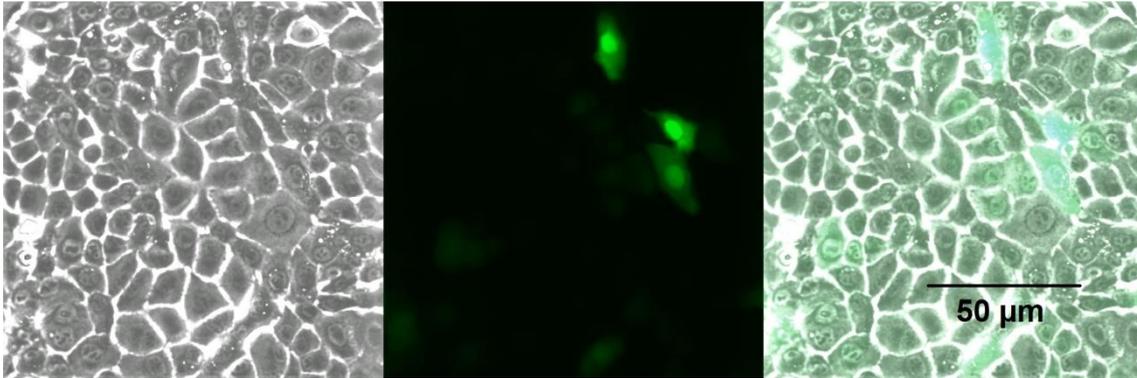


ABBILDUNG 9: RK1-16E7/RAS ZELLEN 24H POST INFEKTION

FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE AUFNAHME VON RK1-16E7/RAS-ZELLEN (KANINCHENKERATINOZYTEN) 24 H NACHDEM SIE MIT YFP-ENHALTENDEN LENTIVIREN INFIZIERT WURDEN; NOCH VOR SELEKTIONIERUNG

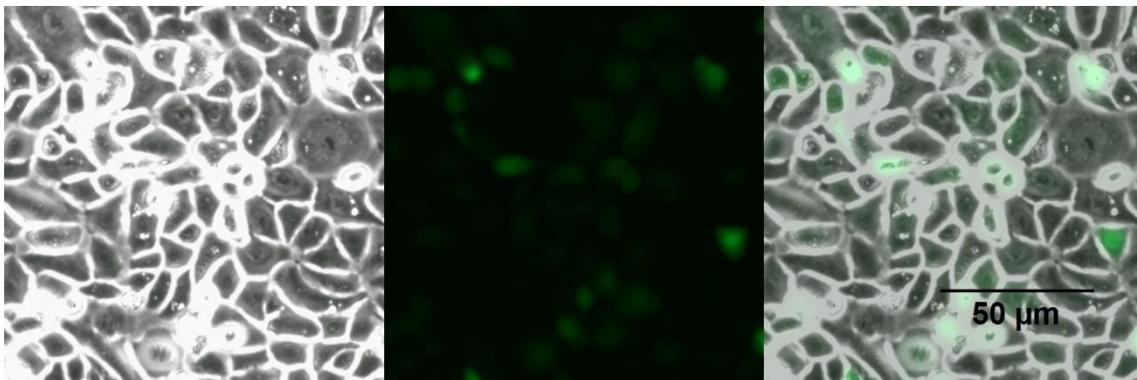


ABBILDUNG 10: RK1-16E/RAS-ZELLEN 6 TAGE POST INFEKTION; POST SELEKTION

FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE AUFNAHME VON RK1-16E/RAS -ZELLEN (KANINCHENKERATINOZYTEN) 6 TAGE NACHDEM SIE MIT YFP-ENHALTENDEN LENTIVIREN INFIZIERT WURDEN UND 5 TAGE NACH BEGINN DER SELEKTION MIT PUROMYCIN

Die RK1-16E7/ras Zellen scheinen initial etwas effektiver durch die Lentiviren infiziert zu werden, man findet 24h post Infektion einen etwas größeren Anteil an YFP-positiven Zellen. Nach einigen Tagen Selektion unter Puromycin kann man erkennen, dass alle noch verbleibenden vitalen Zellen YFP-positiv sind. Auch hier haben also die Infektion und anschließende Selektion gut funktioniert.

3.2.1.2 AVS Zellen

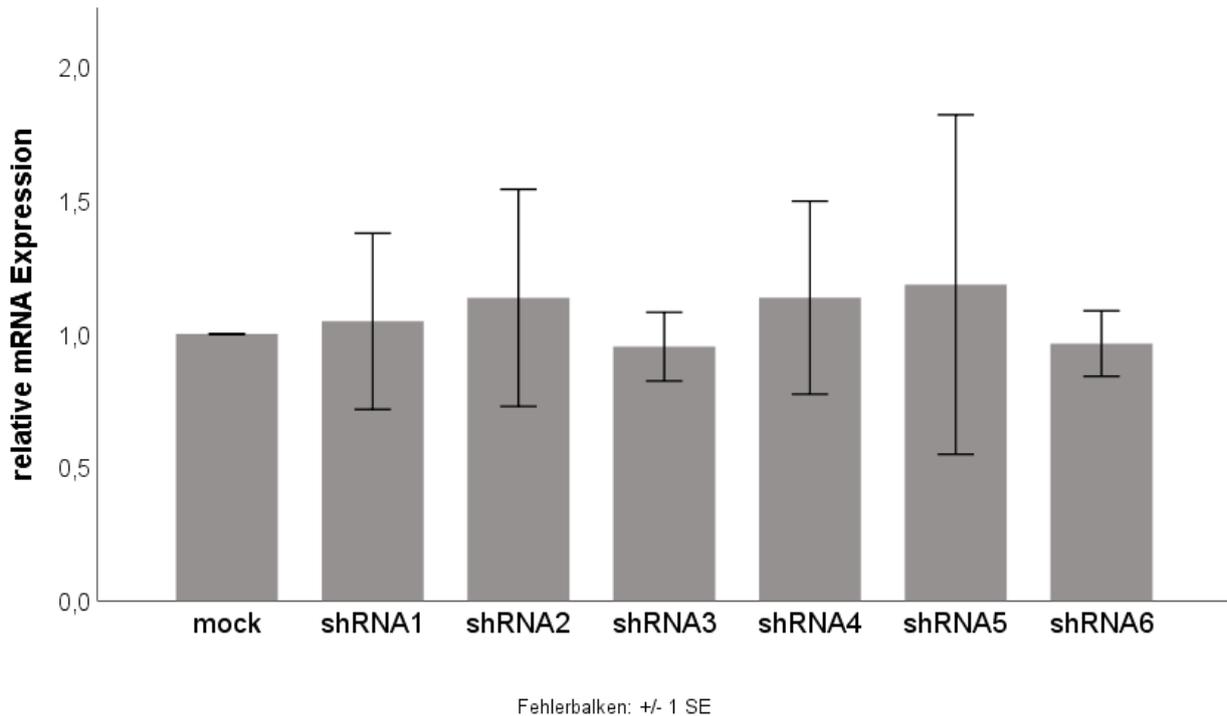


ABBILDUNG 11: FOSB KNOCKDOWN VIA SHRNA IN AVS-ZELLEN

RELATIVE FOSB-MRNA-EXPRESSION IN SHRNA-INFIZIERTEN AVS-ZELLEN. DARGESTELLT WIRD DER MITTELWERT DREIER UNABHÄNGIGER EXPERIMENTE, DIE FEHLERBALKEN ZEIGEN DEN STANDARDFEHLER (SE). MOCK-ZELLEN WURDEN MIT EINEM LENTIVIRUS INFIZIERT, DER KEINE SHRNA ENTHÄLT. DIE STATISTISCHE AUSWERTUNG WURDE NACH NACHWEIS DER NORMALVERTEILUNG MITTELS ANOVA DURCHGEFÜHRT (P=0.998).

Zur Untersuchung der Rolle von FosB wurde als erster Ansatz ein Knockdown *in vitro* angestrebt. Die gewählten AVS-Zellen sind Kaninchenkeratinozyten, die durch das CRPV-Genom immortalisiert wurden (Huber *et al.*, 2004). Das Virusgenom liegt dabei episomal vor. Zur Reduktion der FosB-Menge wurde ein lentivirales System mit sechs verschiedenen shRNAs, die gegen FosB gerichtet sind, genutzt. Die AVS-Zellen wurden mit den shRNA-enthaltenden Lentiviren infiziert und anschließend mittels qPCR auf die Expression von FosB hin untersucht. Jedoch konnte mit keiner dieser sechs shRNA-Sequenzen eine signifikante Reduktion der FosB Menge erzielt werden.

3.2.1.3 RK1-16E7/ras Zellen

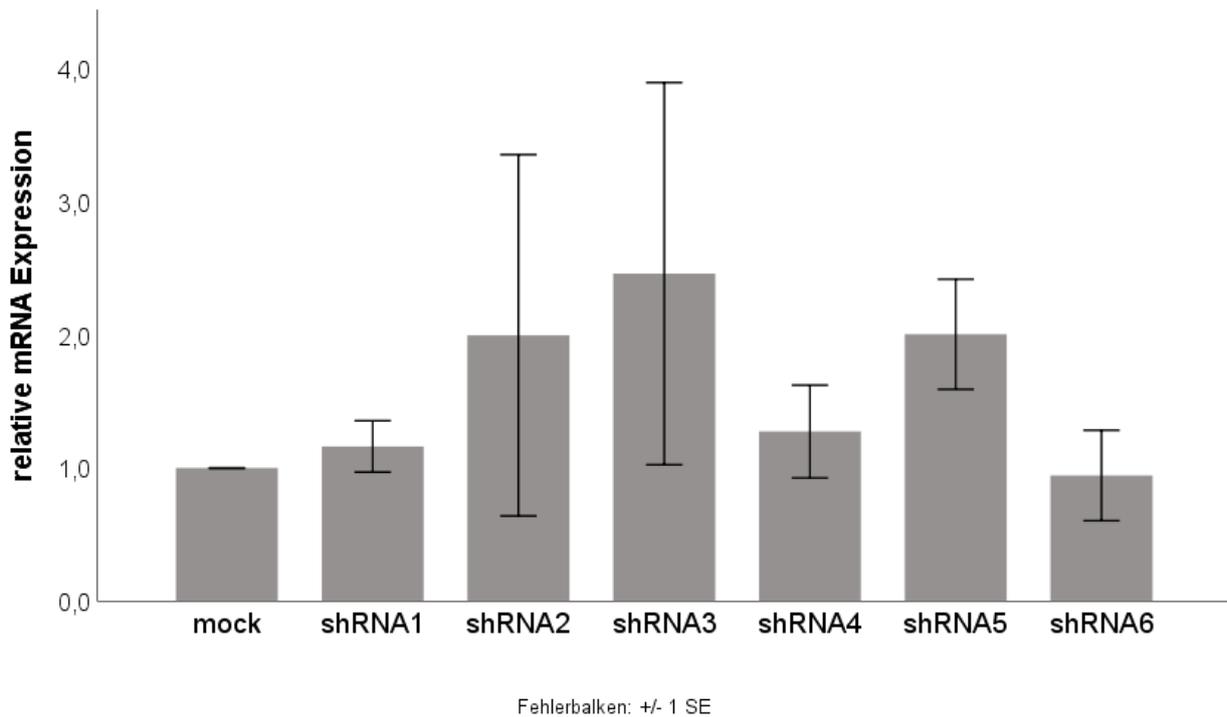


ABBILDUNG 12: FOSB KNOCKDOWN VIA SHRNA – RK1-16E7/RAS-ZELLEN

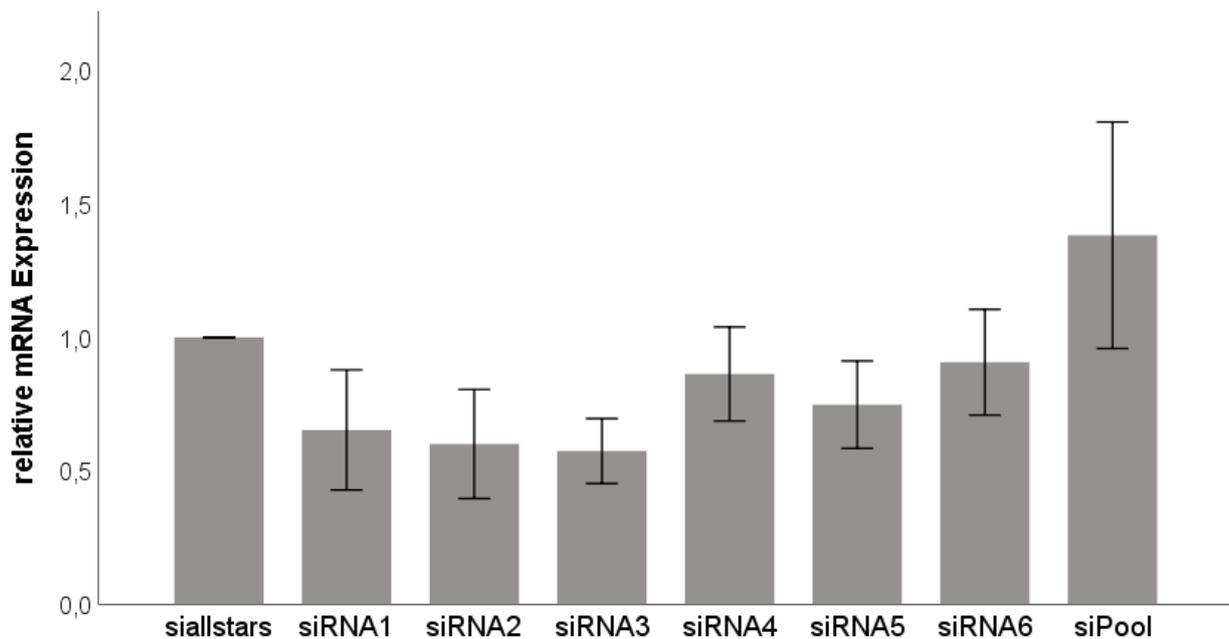
RELATIVE FOSB-MRNA-EXPRESSION IN SHRNA-INFIZIERTEN RK1-16/E7-ZELLEN. DIE FEHLERBALKEN ZEIGEN DEN STANDARDFEHLER DER MITTELWERTE VON DREI UNABHÄNGIGEN EXPERIMENTEN. MOCK-ZELLEN WURDEN MIT EINEM LENTIVIRUS INFIZIERT DER KEINE SHRNA ENTHÄLT. FÜR DIE STATISTISCHE AUSWERTUNG WURDEN DIE DATEN, NACHDEM KEINE NORMALVERTEILUNG FESTGESTELLT WERDEN KONNTE, LOGARITHMISCH TRANSFORMIERT UND DANN MITTELS ANOVA AUSGEWERTET (P=0,658).

Da in AVS-Zellen kein FosB Knockdown erreicht werden konnte, wurden die shRNAs in einer zweiten Kaninchenkeratinozytenlinie getestet. So sollte ein zelllinienspezifischer Effekt ausgeschlossen werden. Gewählt wurden RK1-16E7/ras Zellen, diese sind immortalisiert durch das HPV16-E7 Protein und dem Onkogen v-ras (Jeckel *et al.*, 2003). Wieder wurden die Zellen mit den shRNA-enthaltenden Lentiviren infiziert und die FosB Expression mittels qPCR gemessen. In diesen Zellen konnte ebenfalls mit keiner der getesteten shRNAs ein signifikanter FosB Knockdown erzielt werden. Zusätzlich lässt sich eine teilweise sehr große Varianz der Werte beobachten.

3.2.2 FosB Knockdown via siRNA

Zur Aufklärung der Rolle von FosB wurde ein zweiter *in vitro* Ansatz verfolgt. Die sechs ermittelten FosB-adressierenden shRNA-Sequenzen wurden als siRNA designt und transient in verschiedene Kaninchenkeratinozytenzelllinien transfiziert. Dabei wurde nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen und die Zellen nach 48 h zur qPCR geerntet. Es wurde wieder auf das Referenzgen α -tubulin normalisiert. Als Negativkontrolle diente eine kommerziell erhältliche, wirkungslose siRNA (siallstars). Zusätzlich wurde ein siRNA-Pool hergestellt. Dieser bestand aus je gleichen Teilen der siRNAs 1-3.

3.2.2.1 AVS Zellen



Fehlerbalken: +/- 1 SE

ABBILDUNG 13: FOSB KNOCKDOWN VIA SIRNA - AVS-ZELLEN

RELATIVE FOSB-MRNA-EXPRESSION IN SIRNA TRANSFEZIERTEN AVS-ZELLEN. DARGESTELLT WIRD DER MITTELWERT DREIER UNABHÄNGIGER EXPERIMENTE, DIE FEHLERBALKEN ZEIGEN DEN STANDARDFEHLER (SE). SIALLSTARS IST EINE KONTROLL-SIRNA. SIPOOL BEZEICHNET EINEN POOL AUS DEN SIRNAS 1,2 UND 3. DIE STATISTISCHE AUSWERTUNG WURDE, NACH LOGARITHMISCHER TRANSFORMATION, MITTELS ANOVA DURCHGEFÜHRT (P=0,089).

In AVS-Zellen (Kaninchenkeratinozyten mit CRPV-Genom immortalisiert (Huber *et al.*, 2004)) konnte mit keiner der siRNAs ein signifikanter FosB

Knockdown erreicht werden. Zudem kam es zu einer großen Varianz der Ergebnisse.

3.2.2.2 RK1-16E7/ras Zellen

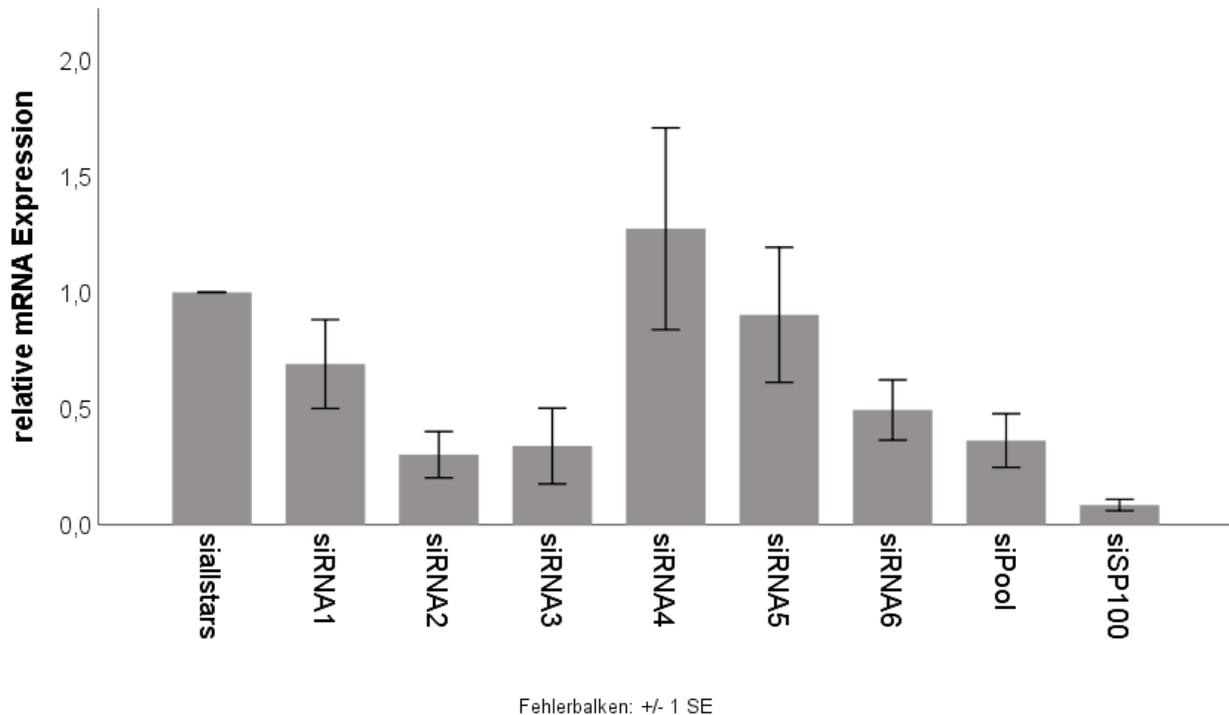


ABBILDUNG 14: FOSB KNOCKDOWN VIA SIRNA –RK1-16E7/RAS-ZELLEN

RELATIVE FOSB-MRNA-EXPRESSION IN SIRNA TRANSFIZIERTEN RK1-16E7/RAS-ZELLEN. DIE FEHLERBALKEN ZEIGEN DEN STANDARDFEHLER DER MITTELWERTE VON DREI UNABHÄNGIGEN EXPERIMENTEN. SIALSTARS IST EINE KONTROLL-SIRNA. SIPOOL BEZEICHNET EINEN POOL AUS DEN SIRNAS 1,2 UND 3. SISP100 ADRESSIERT DAS SP100-PROTEIN UND DIENT ALS POSITIVKONTROLLE. DIE STATISTISCHE AUSWERTUNG WURDE, NACH NACHWEIS DER NORMALVERTEILUNG, MITTELS ANOVA DURCHGEFÜHRT (** P=0,004).

In den RK1-16E7/ras Zellen wurde eine siRNA, mit nachgewiesener Effektivität gegen das Kaninchen-SP100-Protein, zusätzlich als Positivkontrolle eingeführt (Wurdak *et al.*, 2018). Für SP100 konnte eine gute Effektivität des Knockdowns erreicht werden (post-hoc-Analyse (Tukey-HSD): signifikant unterschiedlich zu siallstars; * p=0,029) und damit technische Probleme bei der Durchführung ausgeschlossen werden. Für FosB konnte in der Post-hoc-Analyse (Tukey-HSD) keine statistisch signifikante Reduktion im Vergleich zu siallstars gefunden werden.

3.2.2.3 VX2 Zellen

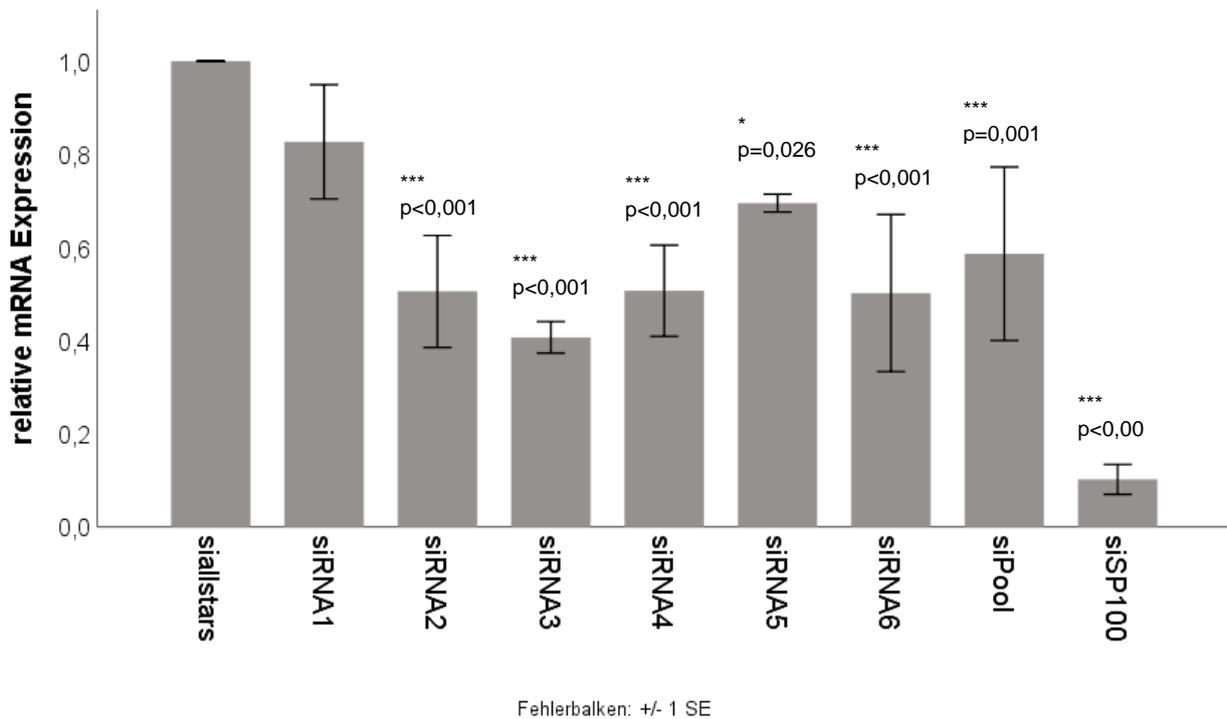


ABBILDUNG 15: FOSB KNOCKDOWN VIA SIRNA IN VX2-ZELLEN

RELATIVE FOSB-MRNA-EXPRESSION IN SIRNA-TRANSFEZIERTEN VX2-ZELLEN. DIE FEHLERBALKEN ZEIGEN DEN STANDARDFEHLER DER MITTELWERTE VON DREI UNABHÄNGIGEN EXPERIMENTEN. SIALLISTARS IST EINE KONTROLL-SIRNA. SIPOOL BEZEICHNET EINEN POOL AUS DEN SIRNAS 1,2 UND 3. SISP100 ADRESSIERT DAS SP100-PROTEIN UND DIENT ALS POSITIVKONTROLLE. DIE STATISTISCHE AUSWERTUNG WURDE, NACH NACHWEIS DER NORMALVERTEILUNG, MITTELS ANOVA DURCHGEFÜHRT (***) P<0,001).

Als dritte Kaninchenkeratinozytenzelllinie in der die FosB Funktionen untersucht werden sollten, wurden die VX2-Zellen ausgewählt. Die VX2-Zellen sind Kaninchenkeratinozyten, die aus einem transplantierbaren, CRPV induzierten Karzinom abgeleitet wurden (Georges *et al.*, 1985). Die Zellen enthalten dementsprechend das CRPV Genom. Nachdem mittels ANOVA ein signifikanter Knockdown in den VX2-Zellen gefunden werden konnte (***) p<0,001), wurde ebenfalls eine Post-hoc Analyse (Tukey-HSD) durchgeführt. Diese ergab, dass sich sowohl die Positivkontrolle (SP100) als auch die siRNA2-6 und der siRNAPool signifikant von siallstars unterscheiden. Die p-Werte dieser Analyse sind im Diagramm abzulesen. Das bedeutet, dass mit allen siRNAs, außer siRNA1, FosB auf mRNA- Niveau signifikant reduziert werden konnte. Dabei wird die FosB-Transkriptmenge durch siRNA2 um etwa 30 %, durch siRNA3 um etwa 60 %, durch siRNA4

um etwa 30 % und durch siRNA6 um etwa 50 % reduziert. Der Pool aus siRNA1, 2 und 3 reduziert die FosB-Transkriptmenge um etwa 40 %.

Die Positivkontrolle, eine bereits getestete Sequenz gegen SP100 (Wurdak *et al.*, 2018), reduziert das Sp100-Transkript um etwa 90 %. Es wird damit gezeigt, dass die technische Durchführung korrekt ist.

3.2.3 Veränderte Expression viraler Transkripte nach FosB Knock-down

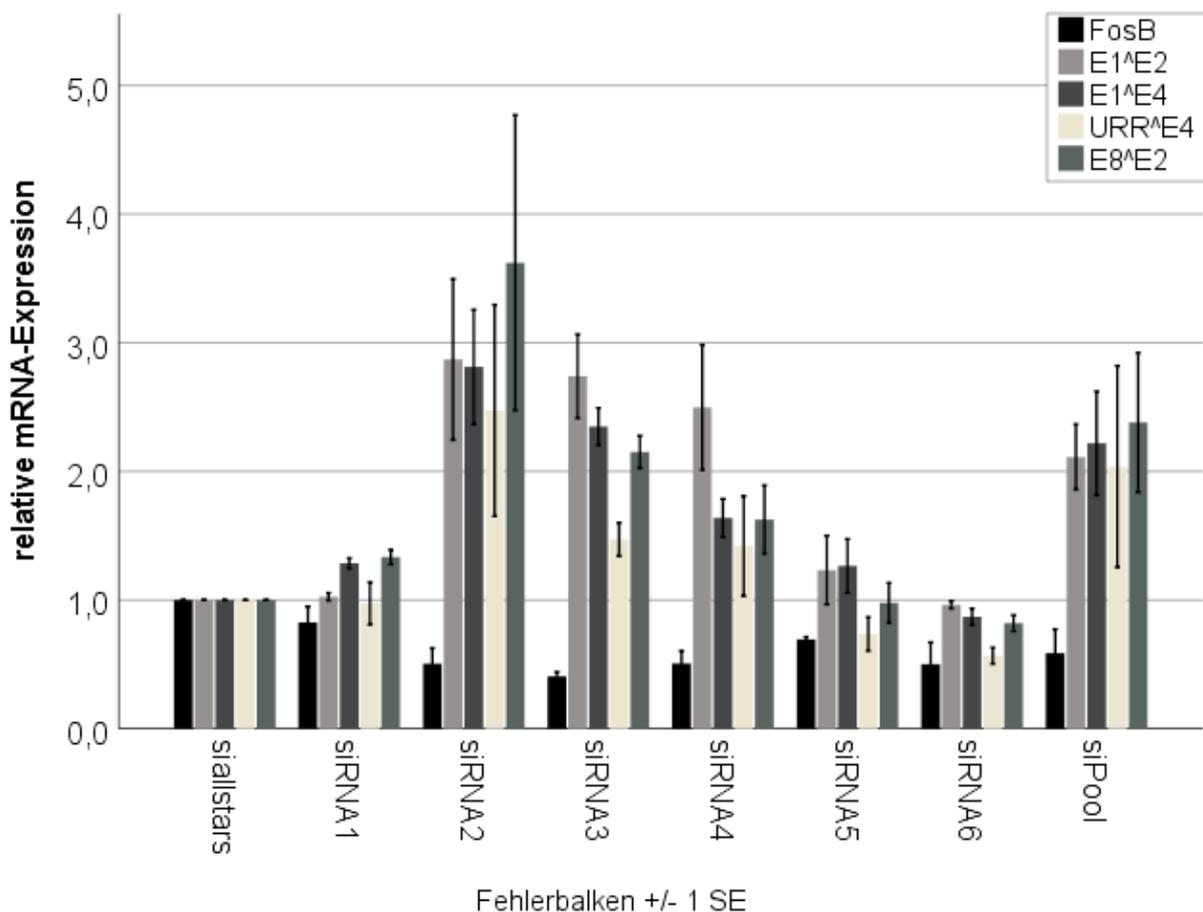


ABBILDUNG 16: EFFEKT DES FOSB KNOCKDOWNS AUF DIE EXPRESSION VIRALER TRANSKRIPTE IN VX2-ZELLEN

RELATIVE MRNA-EXPRESSION VON FOSB (SIEHE ABBILDUNG 17) UND DEN VIRALEN TRANSKRIPTEN E1^{E2}, E1^{E4}, URR^{E4}, E8^{E2} IN SIRNA-TRANSFIZIERTEN VX2-ZELLEN. DIE FEHLERBALKEN ZEIGEN DEN STANDARDFEHLER DER MITTELWERTE VON DREI UNABHÄNGIGEN EXPERIMENTEN. SIALLSTARS IST EINE WIRKUNGSGLOSE SIRNA UND DIENT ALS NEGATIVKONTROLLE. SIPOOL BEZEICHNET EINEN POOL AUS DEN SIRNAS 1,2 UND 3. DIE STATISTISCHE AUSWERTUNG WURDE, NACH NACHWEIS DER NORMALVERTEILUNG, MITTELS ANOVA UND ANSCHLIEßENDER POST-HOC TURKEY-HSD DURCHGEFÜHRT (P-WERTE DER ANOVA: P(E1^{E2})<0,001; P(E1^{E4})<0,001; P(URR^{E4})=). FÜR E1^{E4}, URR^{E4} UND E8^{E2} WURDE ZUNÄCHST EINE LOGARITHMISCHE TRANSFORMATION DURCHGEFÜHRT.

Nach erfolgreicher Reduktion der FosB-Expression in VX2-Zellen (Georges *et al.*, 1985), sollten die Effekte des FosB-Proteins in der Zelle untersucht werden. Nach transientem FosB Knockdown, mittels siRNA, wurde hierfür die Expression viraler Transkripte mittels qPCR gemessen.

Für das E1^{E2} Transkript konnte für vier (siRNA2 ($p < 0,001$), siRNA3 ($p < 0,001$), siRNA4 ($p < 0,001$), siPool ($p = 0,006$)) der sieben siRNA-Ansätze eine signifikante Erhöhung gefunden werden. In allen diesen Ansätzen verdoppelt bis verdreifacht sich die Menge des E1^{E2} Transkripts in den Zellen.

Für das E1^{E4} Transkript ergab sich ein signifikanter Unterschied zu siRNA2 ($p < 0,001$), siRNA3 ($p < 0,001$) und siRNA4 ($p < 0,001$) und dem siPool ($p = 0,006$). Es findet sich etwa die 1,6- (siRNA4) bis 2,8-fache (siRNA2) Menge des Transkripts in den Zellen.

Die Analyse des URR^{E4} Transkripts ergab sich eine signifikante Änderung bei dem FosB Knockdown mit siRNA2 ($p = 0,002$) und siPool ($p = 0,023$). Die Menge des Transkripts steigt auf etwa das Doppelte (siPool) bzw das 2,4-fache (siRNA2) an.

Die Menge des E8^{E2} Transkripts ändert sich signifikant bei einem FosB Knockdown mit siRNA2 ($p < 0,001$), siRNA3 ($p < 0,003$), siRNA4 ($p = 0,029$) und siPool ($p < 0,001$). Die Menge des Transkripts steigt auf das 1,6-fache (siRNA4) bis 3,6-fache (siRNA2) an.

Durch den FosB Knockdown wurden die viralen Transkripte zum Großteil induziert.

3.3 FosB KNOCKDOWN IN HUMANEN KERATINOZYTEN

Um die Rolle von FosB aufzuklären und die Übertragbarkeit der Ergebnisse aus den Experimenten in Kaninchenzellen besser einschätzen zu können, wurde außerdem noch eine humane Zelllinie untersucht. Die ausgewählte Zelllinie CIN612-9E wurde aus einer HPV31-positiven CIN1-Läsion der Zervix gewonnen (Bedell *et al.*, 1991). Der siRNA-Knockdown in

den CIN612-9E Zellen wurde mit den beiden Transfektionsreagenzien RNAimax und HiPerfect jeweils nach Herstellerangaben durchgeführt und anschließend jeweils die Menge des FosB-Transkripts mittels qPCR bestimmt. Außerdem wurde eine qPCR durchgeführt, um festzustellen, ob sich die Expression der viralen Transkripte verändert. In der Effektivität des FosB Knockdowns waren beide Protokolle gleichwertig, allerdings unterschieden sie sich beim Effekt auf die viralen Transkripte. Deshalb werden sie im Folgenden getrennt ausgewertet.

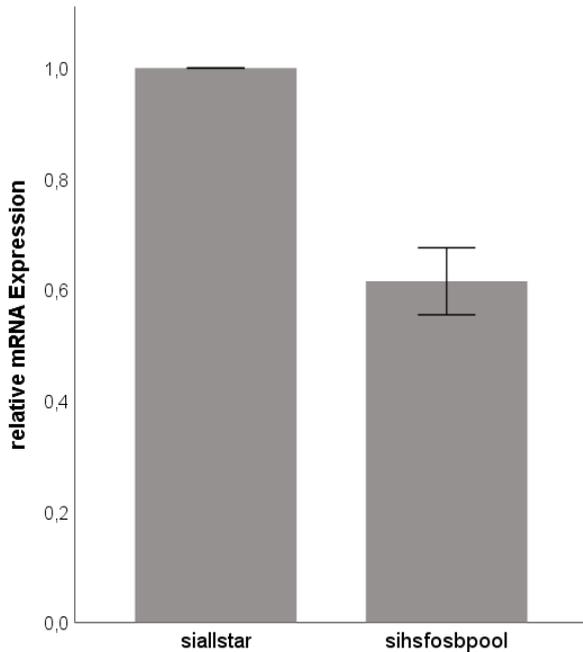
Im RNAimax-Protokolldatensatz wurde eine Wiederholung ausgeschlossen, da in dieser Wiederholung alle Messungen für die viralen Transkripte deutlich mehr als 2 Standardabweichungen vom Mittelwert der vier anderen Werte differieren. Man kann also davon ausgehen, dass es sich um Ausreißer im Sinne von Messfehlern oder Prozessfehlern handelt.

TABELLE 7: AUSREISER BEI FOSB KNOCKDOWN IN HUMANEN KERATINOZYTEN

MITTELWERT UND STANDARDABWEICHUNG DER RELATIVEN MRNA-EXPRESSION DER VIRALEN TRANSKRIPTS NACH FOSB KNOCKDOWN IN CIN612-9E ZELLEN – VERGLEICH ZUM AUSREISER

	Mittelwert	Std.-Abweichung	Experiment4 - Ausreiser
Pfaffl e6*	,63538	,058407	,914
Pfaffl e1^e4	,71280	,051671	1,231
Pfaffl e4^11	,30408	,095434	3,000
Pfaffl e8^e2	,82715	,077628	1,4294

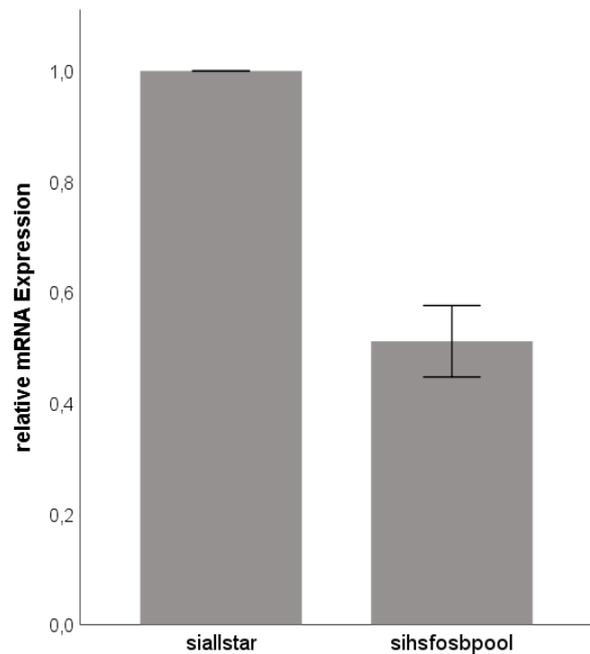
3.3.1 FosB Knockdown – Vergleich der Transfektionsreagenzien RNAimax und HiPerfect



Fehlerbalken: +/- 1 SE

ABBILDUNG 17: FOSB KNOCKDOWN VIA SIRNA IN CIN612-9E RNAIMAX-PROTOKOLL

RELATIVE FOSB-MRNA-EXPRESSION IN SIRNA-TRANSFIZIERTEN CIN612-9E-ZELLEN. DIE FEHLERBALKEN ZEIGEN DEN STANDARDFEHLER DER MITTELWERTE VON VIER UNABHÄNGIGEN EXPERIMENTEN. SIALLSTARS IST EINE KONTROLL-SIRNA. SIHSFOSBPOOL BEZEICHNET EINEN POOL AUS VIER KOMERZIELL ERHÄLTlichen SIRNAS. DIE STATISTISCHE AUSWERTUNG WURDE MITTELS EINSTICHPROBEN T-TEST ($\mu_0=1$) DURCHGEFÜHRT (P=0,008).



Fehlerbalken: +/- 1 SE

ABBILDUNG 18: FOSB KNOCKDOWN VIA SIRNA IN CIN612-9E HIPERFECT-PROTOKOLL

RELATIVE FOSB-MRNA-EXPRESSION IN SIRNA-TRANSFIZIERTEN CIN612-9E-ZELLEN. DIE FEHLERBALKEN ZEIGEN DEN STANDARDFEHLER DER MITTELWERTE VON DREI UNABHÄNGIGEN EXPERIMENTEN. SIALLSTARS IST EINE KONTROLL-SIRNA. SIHSFOSBPOOL BEZEICHNET EINEN POOL AUS VIER KOMERZIELL ERHÄLTlichen SIRNAS. DIE STATISTISCHE AUSWERTUNG WURDE MITTELS EINSTICHPROBEN T-TEST ($\mu_0=1$) DURCHGEFÜHRT (P=0,017).

Mit beiden Protokollen konnte FosB auf mRNA-Niveau in den CIN612-9E Zellen signifikant auf die etwa 0,6-fache (RNAiMax) beziehungsweise 0,5-fache (HiPerfect) Menge reduziert werden.

3.3.2 Veränderte Expression viraler Transkripte nach FosB Knock-down

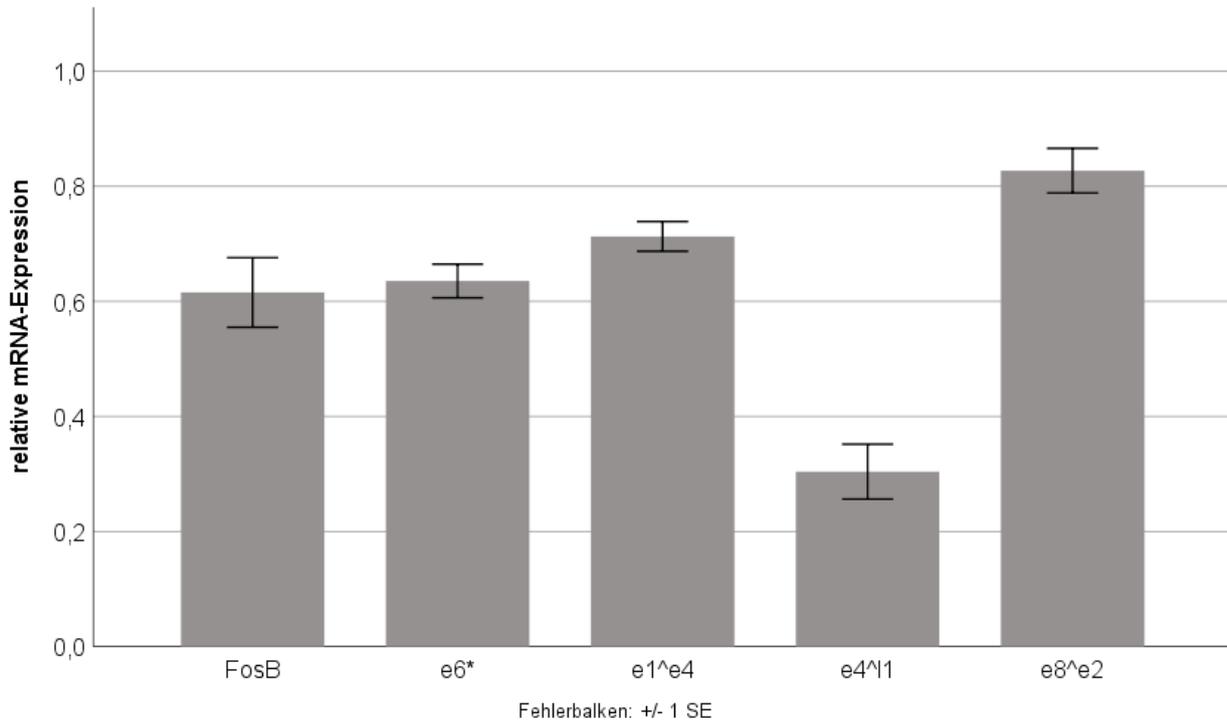


ABBILDUNG 19: EFFEKT DES FOSB KNOCKDOWNS AUF DIE VIRALEN TRANSKRIPTE IN CIN612-9E ZELLEN – RNAIMAX
RELATIVE MRNA-EXPRESSION VON FOSB UND DEN VIRALEN TRANSKRIPTEN E6*, E1^E4, E4^L1, E8^E2 IN SIRNA-TRANSFEZIERTEN CIN612-9E-ZELLEN. DIE FEHLERBALKEN ZEIGEN DEN STANDARDFEHLER DER MITTELWERTE VON VIER UNABHÄNGIGEN EXPERIMENTEN. DER KNOCKDOWN WURDE MIT EINEM POOL AUS VIER KOMMERZIELL ERHÄLTlichen SIRNAS NACH RNAIMAX-PROTOKOLL (SIEHE METHODEN) DURCHGEFÜHRT. DIE STATISTISCHE AUSWERTUNG WURDE MITTELS EINSTICHPROBEN T-TEST ($\mu_0=1$) DURCHGEFÜHRT $P(E6^*)=0,001$; $P(E1^E4)=0,002$; $P(E4^L1)=0,001$; $P(E8^E2)=0,021$.

Die Menge aller mittels qPCR gemessenen viralen Transkripte hat sich nach FosB Knockdown mittels RNAiMax-Protokoll signifikant verringert. Die stärkste Reduktion findet sich für das E4^{L1} Transkript, dieses wird auf das etwa 0,3-fache ursprünglichen Menge reduziert. Die Veränderung der anderen Transkripte ist mit einer Reduktion auf das 0,6- bis 0,8-fache des Ausgangswerts geringer.

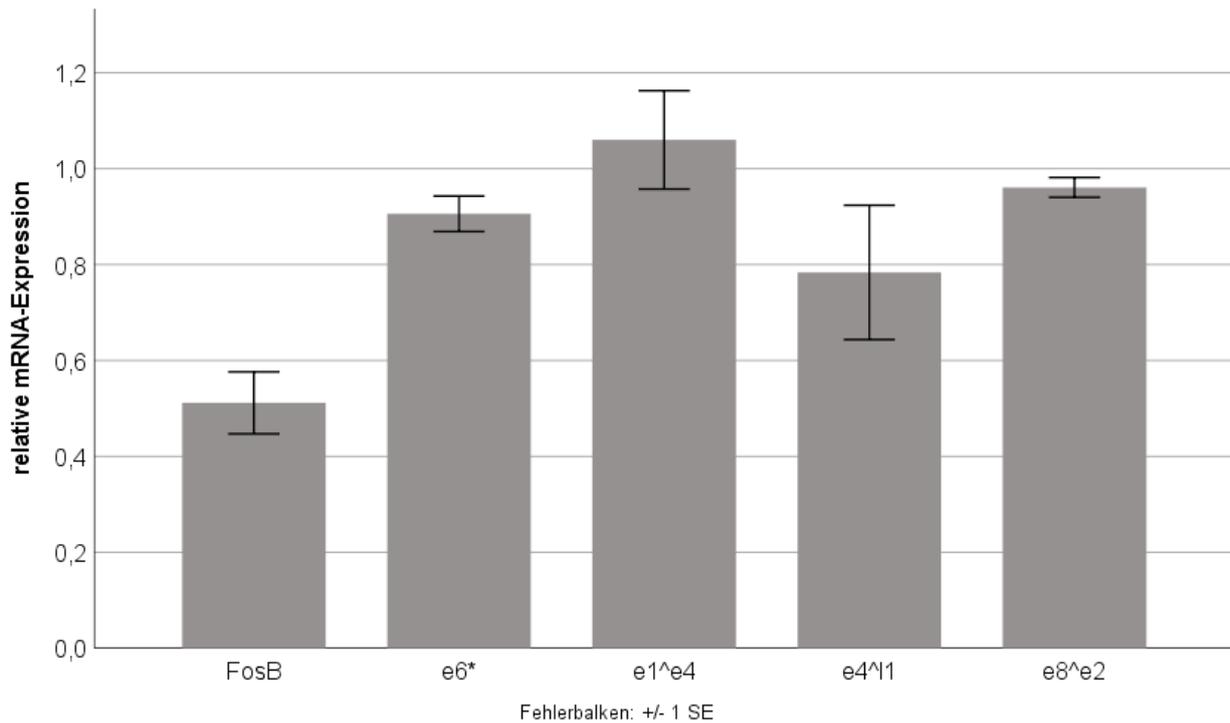


ABBILDUNG 20: EFFEKT DES FOSB KNOCKDOWNS AUF DIE VIRALEN TRANSKRIPTE IN CIN612-9E ZELLEN – HIPERFECT
RELATIVE MRNA-EXPRESSION VON FOSB UND DEN VIRALEN TRANSKRIPTEN E6*, E1^E4, E4^L1, E8^E2 IN SIRNA-TRANS-
FIZIERTEN CIN612-9E-ZELLEN. DIE FEHLERBALKEN ZEIGEN DEN STANDARDFEHLER DER MITTELWERTE VON DREI UN-
ABHÄNGIGEN EXPERIMENTEN. DER KNOCKDOWN WURDE MIT EINEM POOL AUS VIER KOMMERZIELL ERHÄLTlichen
SIRNAS NACH HIPERFECT-PROTOKOLL (SIEHE METHODEN) DURCHGEFÜHRT. DIE STATISTISCHE AUSWERTUNG
WURDE MITTELS EINSTICHPROBEN T-TEST ($\mu_0=1$) DURCHGEFÜHRT P(E6*)=0,126; P(E1^E4)=0,618; P(E4^L1)=0,262;
P(E8^E2)=0,198.

Nach FosB Knockdown mittels HiPerfect-Protokoll, welches in drei unabhängigen Experimenten getestet wurde, hat sich die Menge der viralen Transkripte auf mRNA-Niveau nicht signifikant verändert.

4. DISKUSSION

4.1 FOSB FUNKTIONEN, ALIGNMENT UND SPLICE-VARIANTEN

Sowohl das mRNA Sequenzalignment, als auch das Protein Sequenzalignment für FosB zeigt eine hohe Sequenzidentität über die Speziesgrenze hinweg. Dies unterstreicht die Eignung des Kaninchens als Modellorganismus für die Forschung an diesem Gen. Die hohe Konservierung erlaubt Erkenntnisse, die bei Untersuchungen in einem Organismus gewonnen wurden, auf den anderen zu übertragen, da ein so hoch konserviertes Gen sehr wahrscheinlich gleiche oder sehr ähnliche Funktionen erfüllt. Es ist bekannt, dass im Menschen eine verkürzte Form des Proteins existiert. Dieses wird als Δ FosB bezeichnet und ist am C-Terminus um 101 Aminosäuren kürzer (Nakabeppu and Nathans, 1991). Das Wissen zu verschiedene Varianten im Kaninchen beruht nur auf Vorhersagen, diese zeigen neben dem „vollständigen“ Protein zwei weitere verkürzte Varianten. Eine ist 188 Aminosäure lang, die andere 289 Aminosäuren. Da es sich nur um Vorhersagen handelt, ist schwer zu sagen, ob diese genau in der Form auch tatsächlich vorliegen.

Die Rolle von AP-1 in der Tumorigenese ist ambivalent. Der Transkriptionsfaktor ist involviert in die Regulation von Zellwachstum, Transformation, Apoptose, Entwicklung der Invasivität und weiteren Tumor-relevanten Funktionen. Die einzelnen AP-1-Faktoren können in verschiedenen Kontexten (Zelltyp, Dimerzusammensetzung, post-translationale Modifikationen, Interaktionspartner und andere) sowohl pro- als auch antionkogen wirken (Eferl and Wagner, 2003). C-fos beispielsweise wird meist als Onkogen betrachtet (Delcuratolo *et al.*, 2016; Saez *et al.*, 1995). Bei der Betrachtung der AP-1-Zusammensetzung in unterschiedlich stark entartetem Zervixgewebe konnte eine Erhöhung des c-fos Gehalts mit Zunahme der Schwere der Läsionen beobachtet werden, während sich Fra1 genau gegenteilig entwickelte. In dieser Studie konnte für FosB kein konsistentes Muster gefunden werden (Prusty and Das, 2005). Ganz ähnliche Veränderungen der AP-1-Zusammensetzung konnte in Zellkultur in HPV-immortalisierten Keratinozyten beobachtet werden (Soto *et al.*, 1999; Wilde *et al.*,

2008). Welche Funktionen FosB bei der Entstehung von Krebs und im Lebenszyklus der Papillomviren einnimmt ist bisher wenig eindeutig. Es gibt Studien die *in vitro* transformierendes Potenzial zeigen (Kovary *et al.*, 1991), eine erhöhte Tumorigenität in transgenen Mäusen konnte aber nicht gefunden werden (Grigoriadis *et al.*, 1993).

Für menschliches Δ FosB, konnten in den Jahren nach der Entdeckung andere, teils gegenteilige Funktionen, nachgewiesen werden als die Funktionen der „vollständigen“ Variante (Dobrazanski *et al.*, 1991; Mumberg *et al.*, 1991; Nakabeppu and Nathans, 1991). Sie bildet ebenfalls Dimere mit Jun-Proteinen und kann DNA binden, aber die transaktivierende Funktion fehlt (Nakabeppu and Nathans, 1991) und ohne die transaktivierende Funktion verschwindet auch das transformierende Potential (Wisdom and Verma, 1993). Bei Koexpression kann Δ FosB sogar die transaktivierende Funktion des „vollständigen“ FosB-Proteins unterdrücken (Mumberg *et al.*, 1991). Die Forschung hat sich vor allem auf die Rolle konzentriert, die Δ FosB im Gehirn bei der Suchtentwicklung, bei Depressionen und vermutlich auch bei der Reaktion auf chronische Schmerzen und Stress spielt (McClung and Nestler, 2003; Nestler, 2012; Perrotti *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2016). In der Literatur ist im Zusammenhang mit Tumorentstehung Δ FosB dagegen weniger präsent. Welche Funktionen die vorhergesagten kürzeren FosB-Formen im Kaninchen haben ist unklar. Durch die hohe Konservierung ist es gut möglich, dass ähnliche Unterschiede in der Funktion bestehen. Auch denkbar ist, dass im Kaninchen eine zur menschlichen Delta-Form in Länge und Funktion ähnliche Variante existiert.

4.2 EINFLUSS EINES FOSB KNOCKDOWNS AUF DIE VIRALE TRANSKRIPTION

In C33A-Zellen (HPV-negative Zervixkarzinomzellen) konnte in Voruntersuchungen eine Induktion von FosB durch virales E2 gefunden werden. Unter anderem wurde High-Risk HPV-16 E2 und das CRPV-E2 Protein untersucht (Delcuratolo *et al.*, 2016).

In dieser Arbeit lag der Fokus auf der Funktion, die FosB im Hinblick auf den viralen Lebenszyklus haben könnte. Dafür wurde zum einen die humane Zervixkarzinomzelllinie CIN612-9E (Bedell *et al.*, 1991) ausgewählt, die High-Risk HPV-31 Genom enthält. Und zum anderen drei verschiedene Kaninchenkeratinozytenzelllinien. Als experimenteller Ansatz wurde ein siRNA-Knockdown durchgeführt, gefolgt von der Analyse der viralen Transkripte mittels qPCR.

4.2.1 Hinweise für einen induzierenden Effekt von FosB in humanen Zellen

Der FosB Knockdown in humanen CIN612-9E Zellen (HPV-31 positive Zervixkarzinomzelllinie) (Bedell *et al.*, 1991) gelang mit beiden verwendeten siRNA-Protokollen. Zwischen beiden Protokollen (RNAiMax und HiPerfect) konnte hinsichtlich der Effizienz des Knockdowns kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Bei Verwendung von RNAiMax wird eine Verringerung der Menge der viralen Transkripte gefunden, die beim HiPerfect Ansatz ausbleibt. Die Unterdrückung der viralen Transkription nach einem FosB Knockdown mit RNAiMax weist auf eine induzierende Wirkung von FosB auf die Transkription von HPV-31 hin.

Es gibt viele potentielle Bindestellen für AP1-Dimere in der HPV-31 URR, diese unterscheiden sich in der Sequenz in nur wenigen Positionen vom bekannten TRE-Element. Für einige Sequenzen davon konnte *in vitro* gezeigt werden, dass der cJun/FosB-Dimer ähnlich gut und teils stärker an sie bindet, als an das bekannte TRE-Motiv (Wang *et al.*, 2011). Potenzielle Bindestellen, auch über die bereits bekannten hinaus, sind also vorhanden. Über diese könnte FosB als Partner von c-Jun Einfluss auf das Expressionsmuster der viralen Transkripte nehmen.

Die Daten aus den humanen Zelllinien unterstützen also am ehesten die Theorie von einem positiven Feedback-Loop. Virales E2 induziert die Expression der AP1-Komponenten, welche ihrerseits wiederum zur verstärkten viralen Transkription beitragen.

Vorsichtig betrachtet werden sollten diese Ergebnisse vor allem aufgrund der Unterschiede zwischen den verschiedenen verwendeten Transfektionsreagenzien. In beiden Protokollen wurden dieselben siRNA-Sequenzen verwendet und ein effizienter FosB Knockdown konnte mit beiden Protokollen erreicht werden. Die Unterdrückung der viralen Transkription konnte allerdings nur bei Verwenden des RNAiMax-Protokolls beobachtet werden. Erwähnenswert ist dabei, dass im RNAiMax-Protokoll etwa doppelt so viel siRNA verwendet wird, wie im HiPerfect-Protokoll (90 pmol beziehungsweise 46 pmol). Eine der siRNAs könnte bei Verwendung von größeren Mengen einen Off-Target Effekt bewirken. Man könnte die siRNAs des Pools einzeln testen und überprüfen, ob der Effekt nur bei einer der Sequenzen auftritt.

Inwiefern die Delta-Variante eine Rolle spielt, lässt sich im Rahmen dieser Arbeit nicht sagen, da der verwendete qPCR-Primer zur Detektion der humanen FosB-Transkripte die Δ FosB-Variante höchstwahrscheinlich nicht erfasst. Der reverse Primer hat nur eine Überschneidung von 9 Basenpaaren mit der m-RNA der Delta-Variante. Das ist deutlich zu kurz um ein sicheres Annealing und damit die Amplifikation während der qPCR-Zyklen zu erreichen (Thornton and Basu, 2011). Die Platzierung der siRNAs in der 3'-UTR der mRNA, die bei beiden Varianten identisch ist, sollte zu einem Knockdown beider Varianten führen. Experimentell überprüft werden konnte dies im Rahmen der Arbeit aber nicht. Wenn beide Varianten in dieser Zelllinie exprimiert werden, und tatsächlich beide Varianten gleichmäßig ausgeschaltet werden, zeigt der Rückgang der viralen Transkripte durch den Knockdown eine insgesamt induzierende Wirkung des FosB/ Δ FosB-Gemisches auf die virale Transkription. Die induzierende Wirkung des vollständigen FosB-Proteins kann unabhängig vom möglichen Vorhandensein einer Δ FosB-Variante angenommen werden.

4.2.2 Hinweise für einen hemmenden Effekt von FosB in Kaninchenkeratinozyten

In den Voruntersuchungen wurde für CRPV-E2, genau wie für verschiedene humane E2-Proteine ein induzierender Effekt auf FosB gefunden (Delcuratolo *et al.*,

2016). Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch in verschiedenen Kaninchenkeratinozytenzelllinien ein Knockdown mittels siRNA durchgeführt, um die Funktion von FosB genauer zu verstehen. Anschließend wurde die virale Transkription wieder mittels qPCR beobachtet.

Der Knockdown gelang in der VX2-Kaninchenkeratinozytenzelllinie. Dabei führten alle siRNA-Sequenzen bis auf eine (siRNA1) zu einer signifikanten Reduktion der FosB-Transkriptmenge und anschließend konnte eine veränderte Expression der viralen Transkripte festgestellt werden (3.2.3). Untersucht wurden vier verschiedene Transkripte E1^{E2}, E2^{E4}, URR^{E4} und E8^{E2}. Alle vier Transkripte wurden nach Knockdown von FosB tendenziell verstärkt exprimiert. Auffallend allerdings ist, dass bei Verwendung der siRNA 5 und 6, trotz gutem und signifikantem FosB Knockdown, kein Effekt auf die viralen Transkripte festgestellt werden konnte. Bei dem Transkript URR^{E4} konnte eine veränderte Expression nur nach einem Knockdown mit siRNA 2 und dem siRNA Pool gefunden werden. Lässt man die Abweichung der Auswirkung des Knockdowns bei Verwendung von siRNA5 und siRNA6 außen vor, weist dieses Experiment auf eine Inhibition der viralen Transkription durch FosB in Kaninchenkeratinozyten hin.

Dies ist zunächst einmal aus unterschiedlichen Gründen erstaunlich. Voruntersuchungen legten nahe, dass das virale E2 Protein zelluläre AP1 Komponenten induziert und diese wiederum über Bindestellen im viralen Genom die virale Transkription und Translation im Sinne eines positiven Feedback-Mechanismus anfangen (Delcuratolo *et al.*, 2016). In dieser Arbeit durchgeführte siRNA-Knockdown Experimente in Kaninchenzellen weisen allerdings, wie oben erwähnt, vielmehr auf einen negativen Einfluss des AP1-Komponenten FosB bezüglich der viralen Transkription hin. Eine Induktion von FosB durch E2 würde also die virale Transkription verringern, im Sinne eines negativen Feedbacks. Das Virus würde seine eigene Transkription reduzieren, was zunächst kontraintuitiv ist, da es einer Virusvermehrung entgegensteht.

Eine geringe Transkription und damit auch Translation kann allerdings in frühen Stadien des Viruslebenszyklus in den basalen Zellschichten des Epithels von Vorteil sein. Das Papillomavirus persistiert bis zu Jahrzehnten im Epithelium und

in dieser Phase der Persistenz kann eine geringe Genexpression dafür sorgen, dass das Virus dem Immunsystem des Wirtsorganismus, durch eine dementsprechend geringe Antigenpräsentation, verborgen bleibt und den Eintritt in spätere Phasen (bei Reifung der Wirtszellen) erst ermöglichen (Steinbach and Riemer, 2018). Eine Induktion von FosB (durch virales E2), welches wiederum die virale Transkription und damit auch Translation negativ reguliert, könnte also in dieser Phase durchaus sinnvoll für das Virus sein.

Ein weiterer interessanter Punkt des negativen Einfluss von FosB auf die virale Transkription in Kaninchenzellen ist, dass im Rahmen dieser Arbeit in humanen Zellen, trotz der hohen Konservierung des Proteins, Hinweise auf einen genau gegenteiligen Effekt von FosB gefunden wurden. Die Ergebnisse weisen auf eine mögliche Induktion der viralen Transkription durch FosB hin.

Eine mögliche Erklärung für diesen Widerspruch wäre, dass die Experimente, die die Induktion von FosB durch virales E2 (CRPV und verschiedene humane Viren) zeigten in humanen C33A-Zellen durchgeführt wurden (Delcuratolo *et al.*, 2016). Möglicherweise kann CRPV-E2 hier die E2-Proteine humaner Viren in ihrer Funktion ersetzen und bewirkt als Teil des positiven Feedbacks eine Induktion der AP1 Komponenten. Damit ist nicht sicher, dass CRPV-E2 auch in Kaninchenzellen (den eigentlichen Wirtszellen) auf diese Weise wirkt. Es wäre möglich, dass FosB in Kaninchenzellen nicht durch CRPV-E2 induziert wird, und damit auch keine Hemmung der Transkription stattfindet. Somit würde es auch nicht zu der beobachteten negativen Regulation der Transkription kommen. Alternativ wäre denkbar, dass das CRPV-E2 FosB auch in Kaninchenzellen induziert und das Cottontail-Rabbit-Papillomvirus, auf andere Weise als das untersuchte humane Papillomvirus, nämlich auf die im vorigen Abschnitt beschriebene Weise (Immunevasion) von der ausgelösten verringerten Transkription profitiert.

In den beiden anderen Kaninchenzelllinien RK1-16E7/ras Zellen und AVS-Zellen konnte kein Knockdown von FosB erreicht werden. Die RK1-16E7/ras-Zellen sind wie bereits erwähnt, durch Transfektion mit dem E7-Protein (HPV16) und onkogenem ras immortalisiert worden (Jeckel *et al.*, 2003). Ras aktiviert den

MAP-Kinase Weg und nachgeordnet damit auch die Expression der AP1 Komponenten (Connie P. Matthews, Nancy H. Colburn and Matthew R. Young, 2007; Mirzaei *et al.*, 2020). Möglicherweise liegt es an dieser Deregulation des MAP-Kinase Weges, dass FosB in RK1-16E7/ras-Zellen nicht unterdrückt werden konnte.

4.3 FOSB KNOCKDOWN MITTELS LENTIVIRALEM SYSTEM

Als weiteres Telexperiment wurde ein Knockdown von FosB mittels lentiviralem System in zwei Kaninchenzelllinien durchgeführt. Dabei wurde eine FosB-adressierende shRNA-Sequenz mittels eines Lentivirus in die Zielzellen gebracht, anschließend integriert sich diese in die zelluläre DNA und wird konstant transkribiert. Die transkribierte Sequenz wird zu einer mit FosB-mRNA interferierenden RNA-Sequenz prozessiert. Auf diese Weise kann ein stabiler anhaltender FosB Knockdown in den Zellen erreicht werden. Da der Lentivirus außerdem eine Puromycinresistenz trägt, können erfolgreich infizierte Zellen über Zugabe dieses Antibiotikums selektioniert werden. Besonders spannend ist das, weil die shRNA-Sequenzen in ein rekombinantes CRPV-Genom eingefügt werden können und so der Knockdown des jeweiligen Gens und sein Einfluss auf die CRPV-abhängige Tumorigenese im *in vivo* Kaninchenmodell getestet werden kann (Leiprecht *et al.*, 2014).

Die Unterdrückung von FosB mit einem lentiviralen System konnte weder in RK1-16E7/ras-Zellen noch in AVS-Zellen effektiv durchgeführt werden. Genau wie bei der verwendeten siRNA-Methode ist für die RK1-16E7/ras-Zellen, da sie unter anderem mit onkogenem Ras immortalisiert wurden (Jeckel *et al.*, 2003), ein zellspezifischer Effekt denkbar (siehe Abschnitt 4.2.2).

Eine ineffektive Infektion oder ein Prozessfehler konnte durch verwenden eines YFP-enthaltenden lentiviralen Vektors (pCDH-C1-YFP-EF1_Puro) mittels Fluoreszenz ausgeschlossen werden. Die Infektion wurde auf dieselbe Art und Weise, mit denselben Verpackungsplasmiden, Virus-produzierenden Zellen und Reagenzien durchgeführt. Allein das lentivirale Plasmid wurde durch eines ersetzt, welches YFP enthielt. Hier konnte die Fluoreszenz in beiden Zelllinien nachgewiesen werden.

4.4 AUSBLICK

In Vorexperimenten konnte nachgewiesen werden, dass verschiedene E2 Proteine zelluläres FosB induzieren (Delcuratolo *et al.*, 2016). In dieser Arbeit konnten Hinweise darauf gefunden werden, dass FosB in humanen Zellen möglicherweise wiederum die virale Transkription verstärkt. Zum weiteren Verständnis dieses potenziellen „positiven Feedbackmechanismus“ in humanen Zellen, könnten in einem nächsten Schritt mögliche E2-Bindestellen im FosB-Promoter beispielsweise mittels eines ChIP-Assay charakterisiert werden.

Um die gefundenen Unterschiede der Auswirkungen von FosB auf die virale Transkription in humanen und in Kaninchenzellen zu verstehen, wäre es interessant zu untersuchen, wie CRPV-E2 in Kaninchenzellen wirkt, und ob die in menschlichen Zellen gefundene Induktion der AP1-Komponente FosB auch hier beobachtet werden kann. Eine Expression von CRPV-E2 in Kaninchenkeratinozyten mit nachfolgender qPCR für FosB wäre dafür der erste Schritt.

Um die in dieser Arbeit mittels Knockdown-Experimenten gefundenen möglichen Auswirkungen von FosB auf die virale Transkription zu bestätigen, käme ein Experiment mit FosB-Überexpression in Frage. Zu erwarten wäre eine verstärkte virale Transkription in humanen Zellen und eine verminderte in Kaninchenkeratinozyten (VX2-Zelllinie).

Um sich den Funktionen von FosB von einer anderen Seite zu nähern, und besonders auch den Untersuchungen in Zellkultur, Experimente *in vivo* hinzufügen zu können, wäre der nächste Schritt, die lentivirale Methode in VX2-Zellen zu testen. In diesen Zellen gelang ein Knockdown via siRNA. Deswegen erscheint es unwahrscheinlich, dass hier zellspezifische Effekte das Gelingen verhindern. Gelingt der Knockdown kann man die effektivste shRNA-Sequenz in ein rekombinantes CRPV-Genom einfügen und auf diese Weise den Einfluss von FosB auf die Tumorentwicklung im Tiermodell und damit *in vivo* untersuchen (Leiprecht *et al.*, 2014).

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Beteiligung des dimeren Transkriptionsfaktor AP1 an verschiedensten tumorrelevanten Funktionen ist bekannt, dabei ist unter anderem die jeweilige Zusammensetzung des Komplexes eine Möglichkeit die transkriptionelle Aktivität zu regulieren (Eferl and Wagner, 2003). Die HPV-abhängige Tumorentwicklung der Zervix ist auf AP1 angewiesen (Delcuratolo *et al.*, 2016; Mirzaei *et al.*, 2020). Virales E2 wiederum induziert die Expression der beiden AP1-Komponenten c-fos und FosB (Delcuratolo *et al.*, 2016). Das Ziel dieser Arbeit war die Funktionen von FosB in diesem Zusammenhang genauer zu beleuchten.

Es wurden mehrere Experimente in verschiedenen Zelllinien durchgeführt. In humanen CIN612-9E Zellen, die das HPV-31-Genom enthalten, wurde ein transienter Knockdown mittels siRNA durchgeführt und anschließend die Expression der viralen Transkripte mittels qPCR gemessen. In drei verschiedenen Kaninchenkeratinozytenzelllinien wurde ebenso ein transienter FosB Knockdown angestrebt. Zusätzlich wurde versucht, mittels Lentivirus, eine shRNA-Sequenz stabil in die zelluläre DNA zu integrieren um eine Zelllinie zu erhalten, die FosB konstant supprimiert.

Nach erfolgreichem transientem Knockdown konnte in den humanen CIN612-9E Zellen ein Hinweis auf verminderte Expression verschiedener viraler Transkripte gefunden werden. FosB hat hier also möglicherweise einen induzierenden Effekt auf die virale Transkription. Im Gegensatz dazu wurden nach erfolgreichem Knockdown in der VX2-Zelllinie (Kaninchenkeratinozyten aus CRPV-induziertem Karzinom) Hinweise auf eine mögliche Steigerung der viralen Transkription gefunden. FosB scheint in diesen Zellen einen negativen Einfluss auf die virale Transkription zu haben. Ein stabiler Knockdown mittels shRNA konnte in RK1-16/E7 und AVS-Zellen nicht erreicht werden, sinnvoll wäre hier die Durchführung in VX2-Zellen. Ein erfolgreicher stabiler Knockdown in Kaninchenkeratinozyten würde ein weiterführendes *in vivo* Experiment im Kaninchenmodell ermöglichen (Leiprecht *et al.*, 2014).

LITERATURVERZEICHNIS

Ausubel, F.M. (ed.) (op. 1994-2000) *Current protocols in molecular biology*. New York: John Wiley.

Barbosa, M.S. and Wettstein, F.O. (1988) 'The two proteins encoded by the cottontail rabbit papillomavirus E6 open reading frame differ with respect to localization and phosphorylation', *Journal of Virology*, 62(3), pp. 1088–1092.

Bedell, M.A. *et al.* (1991) 'Amplification of human papillomavirus genomes in vitro is dependent on epithelial differentiation', *Journal of Virology*, 65(5), pp. 2254–2260.

Bergvall, M., Melendy, T. and Archambault, J. (2013) 'The E1 proteins', *Virology*, 445(1-2), pp. 35–56. doi: 10.1016/j.virol.2013.07.020

Bodaghi, S., Jia, R. and Zheng, Z.-M. (2009) 'Human papillomavirus type 16 E2 and E6 are RNA-binding proteins and inhibit in vitro splicing of pre-mRNAs with suboptimal splice sites', *Virology*, 386(1), pp. 32–43. doi: 10.1016/j.virol.2008.12.037

Bodily, J.M. and Meyers, C. (2005) 'Genetic analysis of the human papillomavirus type 31 differentiation-dependent late promoter', *Journal of Virology*, 79(6), pp. 3309–3321. doi: 10.1128/JVI.79.6.3309-3321.2005

Breitburd, F., Salmon, J. and Orth, G. (1997) 'The rabbit viral skin papillomas and carcinomas: A model for the immunogenetics of HPV-associated carcinogenesis', *Clinics in Dermatology*, 15(2), pp. 237–247. doi: 10.1016/S0738-081X(97)00009-6

Buck, C.B., Day, P.M. and Trus, B.L. (2013) 'The papillomavirus major capsid protein L1', *Virology*, 445(1-2), pp. 169–174. doi: 10.1016/j.virol.2013.05.038

Cerqueira, C. and Schelhaas, M. (2012) 'Principles of polyoma- and papillomavirus uncoating', *Medical Microbiology and Immunology*, 201(4), pp. 427–436. doi: 10.1007/s00430-012-0262-1

Chakraborty, S. *et al.* (2014) 'Nuclear matrix protein SMAR1 represses c-Fos-mediated HPV18 E6 transcription through alteration of chromatin histone deacetylation', *Journal of Biological Chemistry*, 289(42), pp. 29074–29085. doi: 10.1074/jbc.M114.564872

Connie P. Matthews, Nancy H. Colburn and Matthew R. Young (2007) 'AP-1 a Target for Cancer Prevention', *Current Cancer Drug Targets*, 7(4), pp. 317–324.

Crow, J.M. (2012) 'HPV: The global burden', *Nature*, 488(7413), S2-3. doi: 10.1038/488S2a

'Database resources of the National Center for Biotechnology Information' (2016), *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D7-19.

Delcuratolo, M. *et al.* (2016) 'Papillomavirus-Associated Tumor Formation Critically Depends on c-Fos Expression Induced by Viral Protein E2 and Bromodomain Protein Brd4', *PLoS Pathogens*, 12(1), e1005366. doi: 10.1371/journal.ppat.1005366

DiMaio, D. and Petti, L.M. (2013) 'The E5 proteins', *Virology*, 445(1-2), pp. 99–114. doi: 10.1016/j.virol.2013.05.006

Dobrazanski, P. *et al.* (1991) 'Both products of the fosB gene, FosB and its short form, FosB/SF, are transcriptional activators in fibroblasts', *Molecular and Cellular Biology*, 11(11), pp. 5470–5478. doi: 10.1128/MCB.11.11.5470

Doorbar, J. *et al.* (2012) 'The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses', *Vaccine*, 30, F55-F70. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.06.083

Doorbar, J. (2013) 'The E4 protein; structure, function and patterns of expression', *Virology*, 445(1-2), pp. 80–98. doi: 10.1016/j.virol.2013.07.008

Doorbar, J. (2016) 'Model systems of human papillomavirus-associated disease', *The Journal of Pathology*, 238(2), pp. 166–179. doi: 10.1002/path.4656

Dyson, N. *et al.* (1989) 'The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product', *Science*, 243(4893), pp. 934–937. doi: 10.1126/science.2537532

Eferl, R. and Wagner, E.F. (2003) 'AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis', *Nature Reviews Cancer*, 3(11), pp. 859–868. doi: 10.1038/nrc1209

Ferlay, J. *et al.* (2019) 'Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods', *International Journal of Cancer*, 144(8), pp. 1941–1953. doi: 10.1002/ijc.31937

<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/gardasil-9> (2020), 3 May (Accessed: 3 May 2020).

Georges, E. *et al.* (1985) 'Two Shope papillomavirus-associated VX2 carcinoma cell lines with different levels of keratinocyte differentiation and transplantability', *Journal of Virology*, 55(1), pp. 246–250.

Graham, F.L. *et al.* (1977) 'Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5', *The Journal of General Virology*, 36(1), pp. 59–74. doi: 10.1099/0022-1317-36-1-59

Grigoriadis, A.E. *et al.* (1993) 'Osteoblasts are target cells for transformation in c-fos transgenic mice', *Journal of Cell Biology*, 122(3), pp. 685–701. doi: 10.1083/jcb.122.3.685

Harden, M.E. and Munger, K. (2017) 'Human papillomavirus molecular biology', *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 772, pp. 3–12. doi: 10.1016/j.mrrev.2016.07.002

Huber, E. *et al.* (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', *Journal of Virology*, 78(14), pp. 7478–7489. doi: 10.1128/JVI.78.14.7478-7489.2004

IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, volume 90, Human papillomaviruses: This publication represents the views and expert opinions of an IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, which met in Lyon, 15 - 22 February 2005 (2007). Lyon: IARC.

Jeckel, S. *et al.* (2002) 'A Transactivator Function of Cottontail Rabbit Papillomavirus E2 Is Essential for Tumor Induction in Rabbits', *Journal of Virology*, 76(22), pp. 11209–11215. doi: 10.1128/JVI.76.22.11209-11215.2002

- Jeckel, S. *et al.* (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', *Journal of Virology*, 77(16), pp. 8736–8744. doi: 10.1128/JVI.77.16.8736-8744.2003
- Kovary, K. *et al.* (1991) 'Constitutive expression of FosB and its short form, FosB/SF, induces malignant cell transformation in rat-1A cells', *The New Biologist*, 3(9), pp. 870–879.
- Leiprecht, N. *et al.* (2014) 'A novel recombinant papillomavirus genome enabling 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', *American Journal of Cancer Research*, 4(3), pp. 222–233.
- Mahata, S. *et al.* (2011) 'Berberine modulates AP-1 activity to suppress HPV transcription and downstream signaling to induce growth arrest and apoptosis in cervical cancer cells', *Molecular Cancer*, 10(1), p. 39. doi: 10.1186/1476-4598-10-39
- McBride, A.A. (2008) 'Chapter 4 Replication and Partitioning of Papillomavirus Genomes', in *Advances in Virus Research: Academic Press*, pp. 155–205.
- McBride, A.A. (2013) 'The papillomavirus E2 proteins', *Virology*, 445(1-2), pp. 57–79. doi: 10.1016/j.virol.2013.06.006
- McClung, C.A. and Nestler, E.J. (2003) 'Regulation of gene expression and cocaine reward by CREB and DeltaFosB', *Nature Neuroscience*, 6(11), pp. 1208–1215. doi: 10.1038/nn1143
- Mirzaei, H. *et al.* (2020) 'The AP-1 pathway; A key regulator of cellular transformation modulated by oncogenic viruses', *Reviews in Medical Virology*, 30(1), e2088. doi: 10.1002/rmv.2088
- Muench, P. *et al.* (2010) 'Cutaneous papillomavirus E6 proteins must interact with p300 and block p53-mediated apoptosis for cellular immortalization and tumorigenesis', *Cancer Research*, 70(17), pp. 6913–6924. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1307

- Mumberg, D. *et al.* (1991) 'Alternative splicing of fosB transcripts results in differentially expressed mRNAs encoding functionally antagonistic proteins', *Genes & Development*, 5(7), pp. 1212–1223. doi: 10.1101/gad.5.7.1212
- Münger, K. and Howley, P.M. (2002) 'Human papillomavirus immortalization and transformation functions', *Virus Research*, 89(2), pp. 213–228. doi: 10.1016/S0168-1702(02)00190-9
- Nakabeppu, Y. and Nathans, D. (1991) 'A naturally occurring truncated form of FosB that inhibits Fos/Jun transcriptional activity', *Cell*, 64(4), pp. 751–759.
- Nestler, E.J. (2012) 'Transcriptional mechanisms of drug addiction', *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*, 10(3), pp. 136–143. doi: 10.9758/cpn.2012.10.3.136
- Papadopoulos, J.S. and Agarwala, R. (2007) 'COBALT: constraint-based alignment tool for multiple protein sequences', *Bioinformatics (Oxford, England)*, 23(9), pp. 1073–1079. doi: 10.1093/bioinformatics/btm076
- Perrotti, L.I. *et al.* (2004) 'Induction of deltaFosB in reward-related brain structures after chronic stress', *Journal of Neuroscience*, 24(47), pp. 10594–10602. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2542-04.2004
- Pfaffl, M.W. (2001) 'A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR', *Nucleic Acids Research*, 29(9), 45e-45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45
- Prusty, B.K. and Das, B.C. (2005) 'Constitutive activation of transcription factor AP-1 in cervical cancer and suppression of human papillomavirus (HPV) transcription and AP-1 activity in HeLa cells by curcumin', *International Journal of Cancer*, 113(6), pp. 951–960. doi: 10.1002/ijc.20668
- Ramírez-Salazar, E. *et al.* (2011) 'HPV16 E2 could act as down-regulator in cellular genes implicated in apoptosis, proliferation and cell differentiation', *Virology Journal*, 8(1), p. 247. doi: 10.1186/1743-422X-8-247
- Rheinwald, J.G. (1975) 'Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes : the formation of keratinizing colonies from single cells', *Cell*, 6, pp. 331–343.

- Robert Koch-Institut (2016) `Mitteilung der Ständigen Impfkommission am RKI: Anwendung des neunvalenten Impfstoffs gegen Humane Papillomviren (HPV)`, *Epidemiologisches Bulletin* 16/2016, pp.137-138. doi: 10.17886/EpiBull-2016-027
- Roman, A. and Munger, K. (2013) 'The papillomavirus E7 proteins', *Virology*, 445(1-2), pp. 138–168. doi: 10.1016/j.virol.2013.04.013
- Saez, E. *et al.* (1995) 'c-fos is required for malignant progression of skin tumors', *Cell*, 82(5), pp. 721–732. doi: 10.1016/0092-8674(95)90469-7
- Schäfer, G., Blumenthal, M.J. and Katz, A.A. (2015) 'Interaction of human tumor viruses with host cell surface receptors and cell entry', *Viruses*, 7(5), pp. 2592–2617. doi: 10.3390/v7052592
- Schiller, J.T., Day, P.M. and Kines, R.C. (2010) 'Current understanding of the mechanism of HPV infection', *Gynecologic Oncology*, 118(1 Suppl), pp. 12-7. doi: 10.1016/j.ygyno.2010.04.004
- Sekhar, V., Reed, S.C. and McBride, A.A. (2010) 'Interaction of the betapapillomavirus E2 tethering protein with mitotic chromosomes', *Journal of Virology*, 84(1), pp. 543–557. doi: 10.1128/JVI.01908-09
- Shope, R.E. and Hurst, E.W. (1933) 'Infectious Papillomatosis of Rabbits : with a note on the Histopathologie', *The Journal of Experimental Medicine*, 58(5), pp. 607–624. doi: 10.1084/jem.58.5.607
- Soto, U. *et al.* (1999) 'Conversion of HPV 18 positive non-tumorigenic HeLa-fibroblast hybrids to invasive growth involves loss of TNF-alpha mediated repression of viral transcription and modification of the AP-1 transcription complex', *Oncogene*, 18(21), pp. 3187–3198. doi: 10.1038/sj.onc.1202765
- Ständige Impfkommission (2019) 'Empfehlungen der Ständigen Impfkommission beim Robert Koch-Institut – 2019/2020'. doi: 10.25646/6233.7
- Steinbach, A. and Riemer, A.B. (2018) 'Immune evasion mechanisms of human papillomavirus: An update', *International Journal of Cancer*, 142(2), pp. 224–229. doi: 10.1002/ijc.31027

- SYVERTON, J.T. (1952) 'The pathogenesis of the rabbit papilloma-to-carcinoma sequence', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 54(6), pp. 1126–1140. doi: 10.1111/j.1749-6632.1952.tb39983.x
- Thornton, B. and Basu, C. (2011) 'Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software', *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 39(2), pp. 145–154. doi: 10.1002/bmb.20461
- Vande Pol, S.B. and Klingelutz, A.J. (2013) 'Papillomavirus E6 oncoproteins', *Virology*, 445(1-2), pp. 115–137. doi: 10.1016/j.virol.2013.04.026
- Villiers, E.-M. de *et al.* (2004) 'Classification of papillomaviruses', *Virology*, 324(1), pp. 17–27. doi: 10.1016/j.virol.2004.03.033
- Villiers, E.-M. de (2013) 'Cross-roads in the classification of papillomaviruses', *Virology*, 445(1), pp. 2–10. doi: 10.1016/j.virol.2013.04.023
- Wang, H. *et al.* (2016) 'Chronic Stress Is Associated with Pain Precipitation and Elevation in DeltaFosb Expression', *Frontiers in Pharmacology*, 7, p. 138. doi: 10.3389/fphar.2016.00138
- Wang, W.-M. *et al.* (2011) 'Binding site specificity and factor redundancy in activator protein-1-driven human papillomavirus chromatin-dependent transcription', *The Journal of Biological Chemistry*, 286(47), pp. 40974–40986. doi: 10.1074/jbc.M111.290874
- Wilde, J. de *et al.* (2008) 'Alterations in AP-1 and AP-1 Regulatory Genes during HPV-Induced Carcinogenesis', *Analytical Cellular Pathology*, 30(1), pp. 77–87. doi: 10.1155/2008/279656
- Wisdom, R. and Verma, I.M. (1993) 'Proto-oncogene FosB: the amino terminus encodes a regulatory function required for transformation', *Molecular and Cellular Biology*, 13(5), pp. 2635–2643. doi: 10.1128/mcb.13.5.2635
- Wurdak, M. *et al.* (2018) 'The contribution of SP100 to cottontail rabbit papillomavirus transcription and replication', *The Journal of General Virology*. doi: 10.1099/jgv.0.001012

- Yen, J. *et al.* (1991) 'An alternative spliced form of FosB is a negative regulator of transcriptional activation and transformation by Fos proteins', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(12), pp. 5077–5081. doi: 10.1073/pnas.88.12.5077
- Zhang, Z. *et al.* (2000) 'A greedy algorithm for aligning DNA sequences', *Journal of Computational Biology : a Journal of Computational Molecular Cell Biology*, 7(1-2), pp. 203–214. doi: 10.1089/10665270050081478
- Zhao, K.N. *et al.* (2000) 'BPV1 E2 protein enhances packaging of full-length plasmid DNA in BPV1 pseudovirions', *Virology*, 272(2), pp. 382–393. doi: 10.1006/viro.2000.0348
- Zheng, Z.-M. and Baker, C.C. (2006) 'Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation', *Frontiers in Bioscience : a Journal and Virtual Library*, 11, pp. 2286–2302. doi: 10.2741/1971
- Zobel, T., Iftner, T. and Stubenrauch, F. (2003) 'The papillomavirus E8-E2C protein represses DNA replication from extrachromosomal origins', *Molecular and Cellular Biology*, 23(22), pp. 8352–8362. doi: 10.1128/mcb.23.22.8352-8362.2003

6. ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL DER DISSERTATIONSSCHRIFT

Die Arbeit wurde am Institut für Medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten unter Betreuung von Herr Prof. Dr. Thomas Iftner durchgeführt.

Die Konzeption der Zellkulturversuche erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Thomas Iftner und Prof. Dr. Frank Stubenrauch.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Dr. Aylin Yigitliler (Doktorandin) und Elke Straub (MTA) von mir selbstständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung und die Erstellung der Grafiken erfolgte nach Beratung durch das Institut für Biometrie eigenständig. Die Einordnung und Interpretation erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Thomas Iftner, Prof. Dr. Frank Stubenrauch und Dr. Aylin Yigitliler.

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

Tübingen, den 06.07.2022

Katrin Matt

7. DANKSAGUNG

Mein Dank geht an meinen Doktorvater Prof. Dr. Thomas Iftner für das sehr interessante Forschungsprojekt und die durchgehend hervorragende Betreuung.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Stubenrauch für sein offenes Ohr und seine Denkanstöße bedanken.

Danke an Dr. Aylin Yigitliler für die geduldige Einarbeitung und Beantwortung meiner vielen Fragen.

Ich danke Frau Doris Guenon vom Institut für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie für ihre Beratung.

Zuletzt möchte ich mich noch beim Deutschen Zentrum für Infektionsforschung (DZiF) bedanken ohne dessen Unterstützung das Projekt nicht in dieser Form möglich gewesen wäre.