

Analyse des Replikationszyklus von nicht-melanozytären Hautkrebs-assoziierten beta-humanen Papillomviren in humanen Keratinozyten

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
M.Sc. Tina Melanie Rehm
aus Kempten

Tübingen
2022

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

03.04.2023

Dekan:

Prof. Dr. Thilo Stehle

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Samuel Wagner

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Frank Stubenrauch

3. Berichterstatter:

Prof. Dr. Mario Schelhaas

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Summary	2
3	Einleitung	3
3.1	Klinische Bedeutsamkeit von Humanen Papillomaviren.....	3
3.2	Das Genus beta-HPV.....	4
3.2.1	HPV49	4
3.2.2	HPV8 und 38.....	5
3.3	Genomorganisation	5
3.4	Virale Proteine	6
3.4.1	Die regulatorischen E1 und E2 Proteine	6
3.4.2	Der virale Repressor E8 ^{E2}	7
3.4.3	Das E4 Protein	7
3.4.4	Die Onkoproteine E6 und E7	7
3.4.5	Die Kapsid Proteine L1 und L2.....	8
3.4.6	Der virale Lebenszyklus	8
4	Methoden	10
4.1	Mikrobiologische Methoden	10
4.1.1	Transformation von DNA in kompetente Bakterien	10
4.1.2	Kultivierung von Bakterien zur Plasmidisolierung	10
4.2	Zellkulturtechniken.....	10
4.2.1	Kultivierung von Zellen.....	10
4.2.2	Mitomycin-Behandlung von NIH3T3-J2 Fibroblasten	11
4.2.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	11
4.2.4	DNA Transfektion durch Lipofektion.....	11
4.2.5	Erzeugung von HPV-haltigen Zelllinien	11
4.2.6	Organotypische Zellkultur (3D)	12
4.2.7	Retrovirale Infektion	12
4.3	DNA-Methoden.....	12
4.3.1	Standardmethoden	12

Inhaltsverzeichnis

4.3.2	Präparative Plasmidisolierung aus Bakterienzellen	13
4.3.3	DNA-Fragment-Elution aus Agarosegelen.....	13
4.3.4	Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA Ligase	13
4.3.5	Sequenzierung.....	13
4.3.6	ExonukleaseV-Resistenz qPCR-Assay	13
4.3.7	Luziferase-Assay	13
4.4	RNA-Methoden.....	14
4.4.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zellen	14
4.4.2	Synthese von cDNA	14
4.4.3	Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)	14
4.4.4	SiRNA Transfektion.....	15
4.4.5	RNA-Sequenzierung und Probenvorbereitung.....	15
4.5	Analyse der RNA-Sequenzierungs Daten.....	16
4.6	Proteinmethoden	17
4.6.1	Western-Blot	17
5	Zielsetzung	18
6	Ergebnisse	19
6.1	Die Restriktion der viralen Genexpression und Replikation verhindert eine Immortalisierung von humanen Keratinozyten durch beta-HPV49 (Rehm et al., 2022)	19
6.1.1	Das HPV49 WT Genom immortalisiert keine NHK	19
6.1.2	Das HPV49 Wild-typ Genom wird in NHK transkribiert und dies wird durch frühe Gene moduliert	20
6.1.3	HPV49 <i>E8</i> - Genome immortalisieren NHK	24
6.1.4	Die Immortalisierungskapazität des HPV49 <i>E8</i> - Genoms ist von den <i>E1</i> , <i>E2</i> , <i>E6</i> und <i>E7</i> Genen abhängig	28
6.2	Globale Transkriptomanalyse der HPV49 <i>E8</i> - positiven Zelllinien	30
6.3	Ein Spleißdonor im HPV49 <i>E6</i> Gen beeinflusst die <i>E6</i> Proteinmenge.....	37
6.4	HPV49 <i>E6</i> kann die Transkriptionsaktivierung durch MAML1 beeinflussen.....	40
6.5	Die Immortalisierung durch das HPV49 Genom wird nicht nur durch $E8^{\wedge}E2$, sondern auch durch den Spleißdonor in <i>E6</i> beeinflusst.....	42
6.6	Retroviral exprimierte HPV49 <i>E6</i> , <i>E7</i> und <i>E6</i> -Spleißdonor-Mutanten Kombinationen immortalisieren NHKs.....	43
6.7	Transkriptionseigenschaften von beta-HPV8 und 38 Genomen in humanen Keratinozyten (Rehm et al., 2022b, eingereicht)	45

Inhaltsverzeichnis

6.7.1	HPV8 und HPV38 WT und <i>E8</i> - Genome immortalisieren NHKs nicht	45
6.7.2	HPV8 und HPV38 exprimieren mehrere gespleißte mRNAs in transfizierten NHK für mehrere Tage	46
6.7.3	Die Inaktivierung von E1, E2 oder $E8^{\wedge}E2$ beeinflusst die Genexpression von HPV8 und HPV38.....	48
6.7.4	Die HPV8 und 38 WT und <i>E8</i> - Genome exprimieren <i>E6</i> und <i>E7</i> Transkripte	51
6.7.5	Beta-HPV Transkription in organotypischer Zellkultur	53
7	Diskussion	57
8	Literaturverzeichnis	65
9	Material.....	74
9.1	Chemikalien	74
9.2	Enzyme.....	74
9.3	Kits und komplette Reaktionssysteme	74
9.4	Zellen und Zelllinien.....	75
9.4.1	Bakterienstämme	75
9.4.2	Eukaryotische Zellen und Zelllinien.....	75
9.5	Primäre Antikörper	76
9.6	Sekundäre Antikörper.....	76
9.7	Puffer und Medien.....	76
9.7.1	Allgemeine Puffer und Lösungen	76
9.7.2	Medien für die Bakterienkultur.....	77
9.7.3	Medien, Medienzusätze und Lösungen für die Zellkultur	78
9.8	Oligonukleotide	79
9.9	siRNA.....	80
9.10	Plasmide und Vektoren	80
9.11	Geräte	83
9.12	Verbrauchsmaterialien	84
10	Anhang	85
10.1	Publikationen.....	85
10.2	Danksagung	86
10.4	Abbildungsverzeichnis	88
10.5	Tabellenverzeichnis	89

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serum-Albumin
CAPS	N-cyclohexyl-3-aminopropansulfon Säure
CIN	<i>Cervical intraepithelial neoplasia</i>
co	Kodon-optimiert, <i>codon optimised</i>
Co-IP	Co-Immunpräzipitation
CS	Kälberserum, <i>Calf Serum</i>
ddH ₂ O	doppelt deionisiertes Wasser
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagles minimal essentielles Medium (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
DTT	Dithiothreitol
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor</i>)
EV	<i>Epidermodysplasia verruciformis</i>
F	<i>Forward</i> für Primer in einer PCR
FKS	Fötale Kälberserum
GST	<i>Glutathion stimulation test</i>
(H)PV	(Humanes) Papillomvirus
HR	<i>High Risk</i>
KRT10	Keratin10, Cytokeratin10
KSFM	Keratinozyten-serumfreies Medium
LB	Komplexes Medium zur Bakterienkultur (<i>lysogeny broth</i>)
LR	<i>Low Risk</i>
MAML1	<i>Mastermind-like protein 1</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
NHK	Normale humane Keratinozyten
nt	Nukleotid, <i>nucleotide</i>
Orf	<i>Open reading frame</i> , Leserahmen
Ori	<i>Origin of replication</i> , Replikationsursprung

Abkürzungsverzeichnis

OTR	<i>Organ transplant recipient</i> , Organtransplantatempfänger
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PGK1	Phosphoglycerat-Kinase 1
pRb	Retinoblastom-Protein
qRT-PCR	<i>Quantitative Real-Time PCR</i>
R	<i>Reverse</i> Primer in einer PCR
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNA-Seq	RNA-Sequenzierung
SA	Spleißakzeptor
SD	Spleißdonor
SDS-PAGE	Sodium Dodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese
URR	<i>Upstream regulatory region</i>
WT	Wildtyp

Weiterhin wurden allgemein gebräuchliche Abkürzungen, SI-Einheiten und Präfixe verwendet.

1 Zusammenfassung

Humane Papillomviren (HPV) infizieren Keratinozyten der Haut- und Schleimhaut. Die Hochrisiko-Typen (HR) der alpha-Gattung verursachen dadurch anogenitalen- und oropharyngealen-Krebs. Vorherrschend dabei ist das Zervixkarzinom, welches zu 70 % von HPV16 und HPV18 ausgelöst wird. Im Gegensatz dazu sind die onkogenen Eigenschaften der beta-HPV Gattung weniger gut erforscht. Bei Patienten mit der seltenen Erbkrankheit *Epidermodysplasia Verruciformis* (EV) und Organtransplantatempfängern (OTRs) wird ein Zusammenhang zwischen beta-HPV-Infektionen und der Entstehung von kutanen Plattenepithelkarzinomen vermutet. Bisher wurden die Eigenschaften von beta-HPV vor allem durch retrovirale Expression der *E6* und *E7* Onkogene in Keratinozyten, durch Transfektion der Osteosarkomzelllinie U2OS mit beta-HPV Genomen und in transgenen Mausmodellen untersucht, aber nicht mit vollständigen viralen Genomen in normalen humanen Keratinozyten (NHK), den natürlichen Zielzellen. Im Rahmen meiner Dissertation konnte ich zeigen, dass HPV8-, 38- und 49-Genome in humanen Keratinozyten mindestens neun Tage lang transkriptionell aktiv sind und replizieren. Durch Inaktivierung des viralen $E8^E2$ Repressors (*E8/E8^{E2}*-) erhält das HPV49 Genom die Fähigkeit NHK zu immortalisieren. Die immortalisierten HPV49 *E8*- Zelllinien enthalten große Mengen an episomalen Virusgenomen und viralen Transkripten und behalten diese in Kultur über einen langen Zeitraum. Nicht nur der Verlust der *E6* und *E7* Onkogene, sondern auch eine Inaktivierung der *E1* oder *E2* Replikationsgene verhindern die Immortalisierung. Die *E8/E1*- und *E8/E2*- Genome zeigen deutlich niedrigere *E6* und *E7* Transkriptmengen in transienten Experimenten. Dies legt nahe, dass für die Immortalisierung eine starke *E6* und *E7* Expression von extrachromosomalen Virusgenomen erforderlich ist. Die Notwendigkeit für eine Inaktivierung von *E8* im Kontext von intakten *E1* und *E2* Genen für die Immortalisierung von NHK zeigt, dass $E8^E2$ eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Onkogenität von beta-HPV spielen könnte, und weist auf grundlegende Unterschiede zwischen HPV49 und HR-HPV Genomen hin.

Durch RNA-Sequenzierung der HPV49 *E8*- positiven Zelllinien konnten bekannte Spleißverknüpfungen bestätigt, das frühe Polyadenylierungssignal lokalisiert und Hinweise auf unterschiedliche virale Promotoren erhalten werden. Außerdem wurden neue Spleißverbindungen kartiert und ein neuer Spleißdonor im *E6* Gen funktionell untersucht. Dieser beeinflusst die Menge an *E6* Protein und vermutlich dadurch die Immortalisierung durch das HPV49 *E8*- Genom.

Bei HPV8 und 38 konnten auch durch Inaktivierung von $E8^E2$ keine immortalisierten Zelllinien erzeugt werden, obwohl ähnliche Mengen an Transkripten für die *E6* und *E7* Onkogene wie bei HPV49 *E8*-Genomen transkribiert wurden. Dies legt nahe, dass beta-HPV Genome unterschiedliche onkogene Eigenschaften besitzen. Die Inaktivierung der Replikationsgene *E1* und *E2* reduzierte die Transkription aller untersuchten beta-HPV in NHK, was nahelegt, dass auch WT Genome aktiv replizieren. Die Kultivierung von HPV8- oder 38-transfizierten NHKs in organotypischen Modellen, die die Analyse des produktiven Replikationszyklus von HR-HPV ermöglichen, induziert Transkripte für das *L1* Kapsidgen, was nahelegt, dass der produktive Lebenszyklus eingeleitet wurde. Außerdem ähnelt das HPV8-Transkriptionsmuster in organotypischen Kulturen dem einer HPV8-positiven EV-Läsion.

Zusammengefasst bedeutet dies, dass NHK ein physiologisch relevantes System sind, um die Replikation und onkogenen Eigenschaften von beta-HPV zu untersuchen.

2 Summary

Human papillomaviruses (HPV) infect keratinocytes of the skin and mucosal membranes. The high-risk types (HR) of the alpha genus thus cause anogenital and oropharyngeal cancers. Predominant among these is cervical carcinoma, 70% of which is caused by HPV16 and HPV18. In contrast, the oncogenic properties of the beta-HPV genus are less well understood. In patients with the rare hereditary disease *epidermodysplasia verruciformis* (EV) and organ transplant recipients (OTRs), a link between beta-HPV infections and the development of cutaneous squamous cell carcinoma is suspected.

So far, the properties of beta-HPV have been investigated mainly by retroviral expression of the E6 and E7 oncogenes in keratinocytes, by transfection of the osteosarcoma cell line U2OS with beta-HPV genomes and in transgenic mouse models, but not with complete viral genomes in normal human keratinocytes (NHK), the natural target cells. As part of my dissertation, I was able to show that HPV8, 38 and 49 genomes are transcriptionally active and replicate in human keratinocytes for at least nine days. By inactivating the viral E8^{E2} repressor (*E8-/E8^{E2}-*), the HPV49 genome acquires the ability to immortalise NHK. The immortalised HPV49 *E8-* cell lines contain large amounts of episomal viral genomes and viral transcripts and retain them in culture for a long time period. Not only the loss of the *E6* and *E7* oncogenes, but also inactivation of the *E1* or *E2* replication genes prevent immortalisation. The *E8-/E1-* and *E8-/E2-* genomes show significantly lower *E6* and *E7* transcript levels in transient experiments. This suggests that strong E6 and E7 expression of extrachromosomal viral genomes is required for immortalisation. The requirement for *E8* inactivation in the context of intact *E1* and *E2* genes for NHK immortalisation indicates that E8^{E2} may play an important role in controlling the oncogenicity of beta-HPV, and points to fundamental differences between HPV49 and HR-HPV genomes.

RNA sequencing of HPV49 E8-positive cell lines confirmed known splice junctions, localised the early polyadenylation signal and provided evidence for distinct viral promoters. In addition, new splice junctions were mapped and a new splice donor in the *E6* gene was functionally investigated. This influences the amount of E6 protein and presumably thereby the immortalisation by the HPV49 *E8-* genome.

For HPV8 and 38, immortalised cell lines could not be generated even by inactivating E8^{E2}, although similar amounts of transcripts for the *E6* and *E7* oncogenes were transcribed as in HPV49 *E8-* genomes. This suggests that beta-HPV genomes have different oncogenic properties. Inactivation of the replication genes *E1* and *E2* reduced transcription of all beta-HPVs examined in NHK, suggesting that wildtype genomes also actively replicate. Culturing HPV8- or 38-transfected NHKs in organotypic models that allow analysis of the productive replication cycle of HR-HPV induces transcripts for the *L1* capsid gene, suggesting that the productive life cycle has been initiated. Furthermore, the HPV8 transcriptional pattern in organotypic cultures resembles that of an HPV8-positive EV-lesion.

In summary, this means that NHK are a physiologically relevant system to study the replication and oncogenic properties of beta-HPV.

3 Einleitung

3.1 Klinische Bedeutsamkeit von Humanen Papillomaviren

Papillomviren (PV) sind unbehüllte DNA-Tumor-Viren. Es sind momentan über 400 verschiedene Papillomavirus-Typen bekannt (<https://pave.niaid.nih.gov>), davon sind über 200 human-pathogen (HPV; <https://ki.se/en/labmed/international-hpv-reference-center>). Ihr dsDNA-Genom ist ca. 8 kb groß und wird in einem 55 nm großen ikosaedrischen Partikel aus 72 Kapsomeren verpackt. Ca. 4,5 % aller Krebsfälle weltweit sind mit HPV assoziiert, dies sind jährlich ca. 630.000 neue Fälle (de Martel et al., 2017). Dabei machen Zervixkarzinome etwa 83 % aus, wovon zwei-drittel in weniger entwickelten Ländern auftreten. Es werden auch Karzinome in Vulva, Vagina und Anus durch HPV verursacht. Außerdem löst HPV auch Kopf-Hals-Tumore aus, die aber vorwiegend in industriellen Ländern auftreten (de Martel et al., 2017). Hierfür sind vor allem die Hochrisiko-Typen des alpha-HPV Genus wie z.B. HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 58 und 59 verantwortlich (de Martel et al., 2017).

Aus diesem Grund wurden prophylaktische Vakzine eingeführt gegen die häufigsten HR-HPV Typen, die gegen das L1-Protein immunisieren (Schiller und Lowy, 2012; Zhai und Tumban, 2016). Das Risiko ein Zervix-Karzinom zu entwickeln sinkt signifikant durch die Impfung (Lei et al., 2020). Neben der Tatsache, dass die Impfungen nur wirksam sind, wenn es keinen vorhergehenden Kontakt zum jeweiligen HPV-Typ gab und der erste Impfstoff (Cervarix, enthält nur HPV16- und 18-L1) erst 2007 zugelassen wurde und bislang so ein Großteil der Bevölkerung noch nicht ausreichend geschützt ist, gibt es weitere Krebsarten, deren Auslöser nicht in der Impfung inkludierte HPV-Typen sind, und dementsprechend weiterhin ein Risiko darstellen. Auch gibt es bis heute keine spezifische Behandlung für bereits existierende HPV-Infektionen (White, 2019).

Außerdem werden Typen aus der beta-HPV Gattung mit der Entwicklung von Plattenepithelkarzinomen (cSCC, *cutaneous squamous cell cancer*) in Patienten mit der seltenen Erbkrankheit *Epidermodysplasia verruciformis* (EV) und in Organtransplantat-Rezipienten (OTR) mit Immunsuppression in Verbindung gebracht (Bandolin et al., 2020; Howley und Pfister, 2015; Orth, 2006; Quint et al., 2015). EV-Patienten haben Defekte in den *TMC6*, *TMC8* oder *CIB1*-Genen, und es wird vermutet, dass die entsprechenden Proteine einen Komplex bilden, der beta-HPV Replikation in Keratinozyten einschränkt. Bei beiden Gruppen bilden sich Hautwarzen, die sich zu cSCC weiterentwickeln können, vor allem in Bereichen, die der Sonne ausgesetzt sind (Bandolin et al., 2020; Howley und Pfister, 2015; Orth, 2006; Quint et al., 2015). Allerdings gibt es trotzdem Unterschiede in den cSCCs von EV-Patienten und OTRs. Die cSCCs in EV-Patienten behalten hohe Mengen replizierender Genome bei und exprimieren virale Proteine, während bei OTRs weniger als eine Kopie des viralen Genoms pro Zelle in den cSCCs vorhanden ist und nur selten virale Proteine exprimiert werden (Orth, 2006; Borgogna et al., 2014a; Borgogna et al., 2014b; Borgogna et al., 2012; Weissenborn et al., 2005; Arroyo Mühr et al., 2021). Dies lässt vermuten, dass beta-HPVs zur Aufrechterhaltung der Karzinome in EV-Patienten, aber nicht unbedingt in OTRs beitragen.

Beta-HPV wurden ebenfalls an anderen Körperstellen nachgewiesen, wie in der Nasenschleimhaut, dem Analkanal, der Mundhöhle, in Genitalkondylomen und in anderen äußeren Genitalveränderungen (Bottalico et al., 2011; Dona et al., 2016; Hampras et al., 2017; Nunes et al., 2018; Pierce Campbell et al., 2013). Meist verlaufen die beta-HPV Infektionen jedoch asymptomatisch in der Normalbevölkerung (de Koning et al., 2009).

Eine neuere Studie hat beta-HPV DNA in einem hohen Anteil an Plattenepithelkarzinomen der Bindehaut nachgewiesen, was die Möglichkeit, dass beta-HPV zur Krebsentstehung beitragen, immer wahrscheinlicher macht (Galati et al., 2020).

3.2 Das Genus beta-HPV

Insgesamt enthalten alle fünf HPV-Genera über 400 verschiedene HPV Typen (https://pave.niaid.nih.gov/explore/reference_genomes/human_genomes). Anhand ihrer DNA-Sequenz werden die HPV in die Genera unterteilt (alpha, beta, gamma, mu, nu), denen eine unterschiedliche Anzahl Typen zugeordnet werden (**Abbildung 1**). Dabei sind die alpha-HPV die größte und prävalenteste Gattung. Aber auch die beta-HPV bilden ein großes Genus, welches mit der Entstehung einiger Krebsarten assoziiert wird. Die mu und nu Genera hingegen enthalten nur wenige Typen (Egawa und Doorbar, 2017).

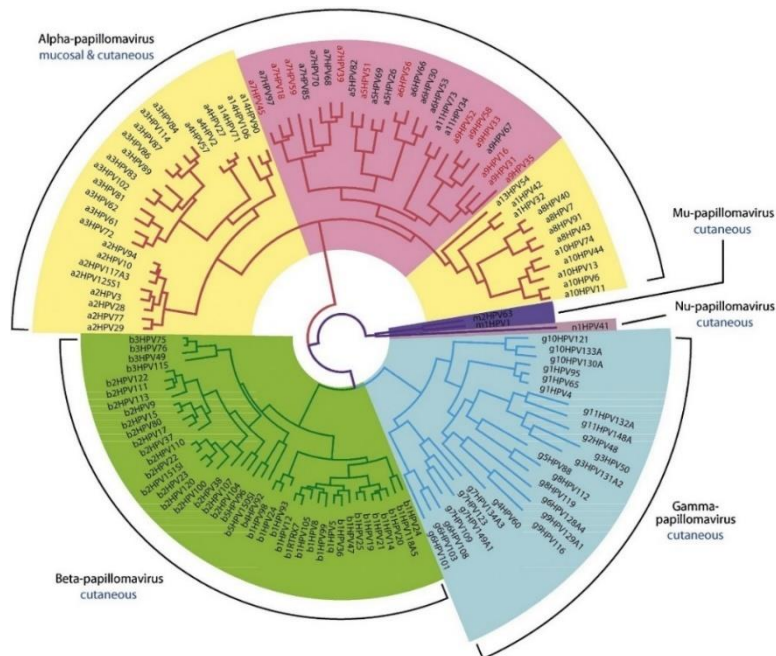


Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum der Humanen Papillomviren (HPV).

Die cancerogenen alpha-HR-HPV sind in rot markiert. Abbildung angepasst aus (Egawa und Doorbar, 2017).

3.2.1 HPV49

HPV49 gehört zu den beta-HPV. Dieser HPV-Typ wurde das erste Mal aus einer Hautwarze eines Nieren-transplantierten Patienten isoliert (Favre et al., 1989). Es wird eine Verbindung von HV49 zu cSCCs vermutet, was konsistent damit ist, dass dieser HPV-Typ prädominant in mukosalem Gewebe vorkommt (Berkhout et al., 1995; Hampras et al., 2017). Kürzlich wurde HPV49 außerdem in einer EV-typischen Läsion eines immunsupprimierten Patienten gefunden (Bartley et al., 2022).

3.2.2 HPV8 und 38

HPV8 ist ein beta1-HPV-Typ, der ähnlich wie HPV5 stark mit EV-assoziiert ist, und das Risiko für Karzinome in OTRs deutlich erhöht (Dell'Oste et al., 2009; Stockfleth et al., 2004).

HPV38 ist ebenfalls prävalent in OTRs zu finden (Hampras et al., 2017). Dieser Typ ist außerdem auch bei immunkompetenten Individuen häufiger in cSCCs, Basalzellkarzinomen und Aktinischen Keratosen zu finden, als in gesunder Haut (Caldeira et al., 2003).

3.3 Genomorganisation

Humane Papillomviren besitzen ein ca. 8 kb großes zirkulär-doppelsträngiges Genom. Es enthält Leserahmen für frühe (E1, E2, E4, E5, E6, E7) und späte Proteine (L1, L2), aber auch einen nicht-kodierenden Bereich von ca. 1 kb (*upstream regulatory region*, URR). Viele Papillomviren kodieren den hochkonservierten E8 Leserahmen, der vermutlich nur als gespleißte E8^E2 mRNA transkribiert wird (Kuehner und Stubenrauch, 2022). Die Expression der Leserahmen wird durch mehrere Promotoren reguliert. Die verschiedenen Bereiche werden über ein frühes (zwischen frühen und späten Leserahmen) und ein spätes Polyadenylierungssignal (zwischen den späten Leserahmen und der URR) getrennt.

Exemplarisch ist hier das HPV16 Genom (HR-HPV) dargestellt (**Abbildung 2**), und HPV49 (**Abbildung 3**), eines der beta-HPV Genome, das im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde.

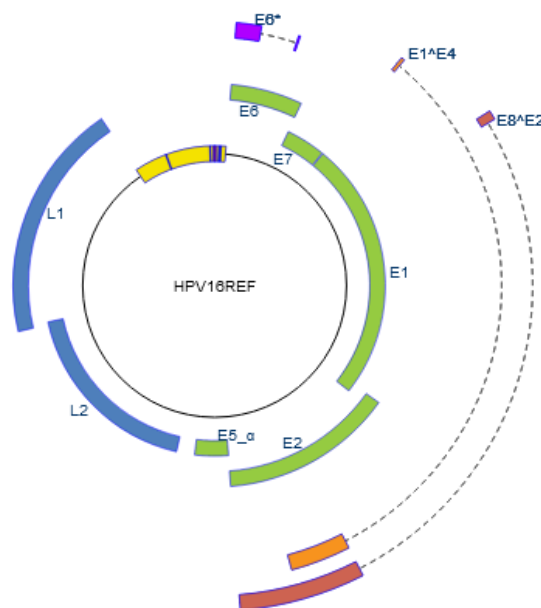


Abbildung 2: Schematisch Darstellung der Genomorganisation von HPV16.

Abgebildet sind alle frühen und späten Gene, und die gespleißten Transkripte E6*, E1^E4 und E8^E2. Es sind sechs Leserahmen für die frühen Gene (E1, E2, E4, E5, E6, E7) und zwei für die späten Transkripte (L1 und L2) vorhanden (<https://pave.niaid.nih.gov>).

Die prinzipielle Genomorganisation ist sehr ähnlich. Bei alpha-HR-HPV ist ein zusätzlicher E5 Leserahmen vorhanden.

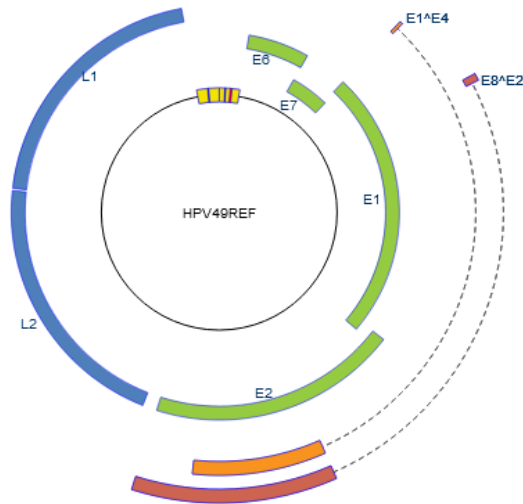


Abbildung 3: Schematisch Darstellung der Genomorganisation vom HPV49 Referenzgenom.

Abgebildet sind alle frühen und späten Gene, und die gespleißten Transkripte $E1^E4$ und $E8^E2$. Es sind fünf Leserahmen für die frühen Gene ($E1$, $E2$, $E4$, $E6$, $E7$) und zwei für die späten Transkripte ($L1$ und $L2$) vorhanden (<https://pave.niaid.nih.gov>).

3.4 Virale Proteine

3.4.1 Die regulatorischen E1 und E2 Proteine

Die E1 und E2 Proteine sind für die virale Replikation, transkriptionelle Regulation und für die Partitionierung der viralen Genome bei der Zellteilung verantwortlich. Das virale E1 Protein ist das einzige Enzym, welches durch das Virus kodiert wird. Es ist eine hochkonservierte ATP-abhängige DNA-Helikase. Sie bindet an den viralen *ori* („origin of replication“, Replikationsursprung), entwindet die DNA und rekrutiert verschiedene zelluläre Replikationsproteine (Bergvall et al., 2013). Es besteht aus einem N-terminalen regulatorischen Bereich, einer DNA-Bindedomäne (DBD), die auch für Dimerisierung verantwortlich ist und einer C-terminalen Oligomerisierungsdomäne (Bergvall et al., 2013). E1 ist außerdem für die vegetative Genomamplifikation notwendig (Ozbun und Meyers, 1998). Die E2 Proteine sind sequenzspezifische DNA-Bindeproteine, die an bestimmte Motive der viralen DNA binden. E2 besteht aus drei Domänen, die Transaktivierungsdomäne (TAD), eine DNA-Bindungs- und -Dimerisierungsdomäne (DBD) am C-Terminus und in der Mitte der unstrukturierten *Hinge*-Domäne, die die beiden anderen verbindet. E2 wird während der frühen und intermediären Phase des viralen Lebenszyklus exprimiert, und verstärkt die Bindung von E1 an die DNA. Eine primäre Funktion ist außerdem die Rekrutierung von zellulären Faktoren zum viralen Genom. Dadurch aktivieren oder reprimieren sie z.B. transkriptionelle Prozesse (McBride, 2013).

3.4.2 Der virale Repressor E8^{E2}

Neben dem Voll-Längen E2 Protein exprimieren HPV ein weiteres verkürztes und hoch konserviertes Transkript, das E8^{E2}. Dabei wird der C-terminale Teil von E2 über einen Spleiß-Donor im E1-Leserahmen mit der DNA-Binde und -Dimerisierungsdomäne durch eine Spleißakzeptorstelle im E1-Leserahmen fusioniert (McBride, 2013). Das E8^{E2} Protein fungiert als Repressor der viralen Transkription und Replikation, dessen Inaktivierung führt zu stark erhöhter Genexpression und Genomreplikation in undifferenzierten Keratinozyten (Kuehner und Stubenrauch, 2022). Mechanistisch bestehen jedoch Unterschiede zwischen unterschiedlichen HPV-Typen. So integrieren HPV31 Genome ohne E8^{E2} (E8⁻), wohingegen HPV16 E8⁻ Genome episomal in den Zellen über längere Zeit erhalten bleiben (Stubenrauch et al., 2000; Lace et al., 2008; Straub et al., 2014). Für MmuPV1 wurde in einem Mausmodell gezeigt, dass E8^{E2} notwendig ist für die Warzenbildung (Stubenrauch et al., 2021).

3.4.3 Das E4 Protein

Die häufigste Form des E4 Proteins wird von der gespleißten mRNA E1^{E4} translatiert. Dabei werden einige Aminosäuren am Anfang von E1 mit dem E4 Leserahmen verbunden. Dieses Transkript ist in hohen Mengen in produktiven Läsionen in mittleren und oberen Schichten der Haut vorhanden. Eine Funktion während der frühen Lebenszyklusphase von HPV ist nicht bekannt, aber verschiedene Studien legen nahe, dass E4 an der produktiven Genom-Amplifikation, dem Virus-Assembly und der Freisetzung beteiligt sind (Doorbar, 2013).

3.4.4 Die Onkoproteine E6 und E7

Bei HR-HPV sind die E6 und E7 Onkoproteine für die Karzinogenese verantwortlich. Sie interagieren mit verschiedenen zellulären Faktoren um z.B. den Zellzyklus zu deregulieren, dem Immunsystem zu entgehen, und Apoptose oder Seneszenz zu verhindern.

HR-HPV E6 interagieren unter anderem mit der E3 Ubiquitin-Ligase E6AP (*E6-associated Protein*), was den Abbau von p53 vermittelt und Telomerase induziert. Dadurch wird z.B. Apoptose verhindert und die Lebensspanne der Zellen verlängert (Vande Pol und Klingelhutz, 2013).

Auch für beta-HPV49, 75 und 76 E6 wurde berichtet, dass sie einige der Funktionen von HR-E6 besitzen, wie die Bindung an E6AP und p53, um den proteasomalen Abbau von p53 zu induzieren (Cornet et al., 2012; Minoni et al., 2020). Beta-HPV38 E6 interagiert mit p53, verändert aber, anstatt den Abbau zu induzieren, dessen transkriptionelle Aktivität (Caldeira et al., 2003; Cornet et al., 2012; Accardi und Gheit, 2014; Muench et al., 2010). Trotz manch ähnlicher Interaktionspartner haben Interaktionsstudien gezeigt, dass wesentliche Unterschiede zwischen HR- und beta-HPV E6 Proteinen existieren (Rozenblatt-Rosen et al., 2012; White et al., 2012a).

Eine hoch-konservierte Funktion von beta-HPV E6 Proteinen, die so nicht bei HR-HPV E6 vorkommt, ist ihre Fähigkeit, mit MAML1 zu interagieren und es zu inaktivieren (White, 2019). MAML1 ist ein transkriptioneller Co-Aktivator im NOTCH-Signalweg, dessen Inaktivierung vermutlich dazu führt, dass in der vegetativen Phase die Differenzierung in Keratinozyten verhindert wird (Brimer et al., 2017; Meyers et al., 2013; Tan et al., 2012b). Eine weitere konservierte Funktion von beta-HPV E6 ist die

Vermeidung von UV-induzierter Apoptose (Jackson et al., 2000; O'Shaughnessy et al., 2007; Underbrink et al., 2008; Tomlins und Storey, 2010).

HR-HPV E7 Proteine können auch ohne E6 Zellen immortalisieren *in-vitro* (Moody und Laimins, 2010). E7 kann viele zelluläre Prozesse deregulieren: so interagiert es mit Mitgliedern der Retinoblastom-Proteinfamilie (pRB), die an Zellzykluskontrollpunkten beteiligt sind und dort den Eintritt in die S-Phase kontrollieren (Roman und Munger, 2013). Neben den HR-E7 binden z.B. auch beta-HPV49, 75 und 76 E7 an pRB, fördern allerdings nicht den Abbau, sondern dessen Hyperphosphorylierung (Cornet et al., 2012; White et al., 2012b; Minoni et al., 2020). Auch für beta-HPV5 und 38 E7 wurde gezeigt, dass sie die Menge an pRB-Protein reduzieren, wie bei HPV16, aber der zugrundeliegende Mechanismus ist unbekannt (Caldeira et al., 2003; Schmitt et al., 1994; Buitrago-Perez et al., 2012).

Insgesamt führen die viralen E6 und E7 Proteine also zu einer Deregulation des Zellzyklus, zu DNA Replikation in differenzierenden Zellen, und zur Aktivierung von DNA-Schäden Reparatursignalwegen (*DNA damage response*, DDR) (Moody und Laimins, 2010; Spriggs und Laimins, 2017).

3.4.5 Die Kapsid Proteine L1 und L2

Das virale Genom wird in den obersten Hauschichten in Kapside verpackt, welche aus dem Haupt-Kapsidprotein L1 und dem L2 Protein bestehen. L1 interagiert mit Heparansulfat-Proteoglykanen der Basalmembran, und ist für den Eintritt in die Zielzelle zwingend notwendig (Buck et al., 2013). L2 allein formt keine Kapside, ist aber an der Verpackung, dem Kapsidaufbau und der endosomalen Freisetzung des Virus beteiligt (Wang und Roden, 2013).

3.4.6 Der virale Lebenszyklus

Der Lebenszyklus der Papillomviren ist stark an die Differenzierung in Keratinozyten gekoppelt. HPV infizieren undifferenzierte Zellen in der basalen Epithelschicht durch Mikroläsionen in der menschlichen Haut (**Abbildung 4**). Dort werden frühe virale Gene exprimiert, das Genom liegt dabei episomal vor. Beginnt die Zelle zu differenzieren und entfernt sich dabei von der Basalschicht in Richtung der verhornten Hautschicht, wird die produktive Phase des viralen Lebenszyklus eingeleitet. Die Differenzierung der Keratinozyten ist notwendig, um bei HR-HPV den späten Promotor im E7 Gen zu aktivieren, und auch für die virale Genomamplifikation (Moody und Laimins, 2010). Dies führt zur Expression von gespleißten Transkripten die E4 enthalten, wie E1^{E4}, oder L1 enthaltenden Transkripten, und kann so zur Expression von Proteinen wie E4 und L1 in den obersten Schichten des infizierten Epitheliums führen. Final werden dann die amplifizierte Genome in die L1/L2 Kapside verpackt und die infektiösen Partikel freigesetzt (Spriggs und Laimins, 2017).

Einleitung

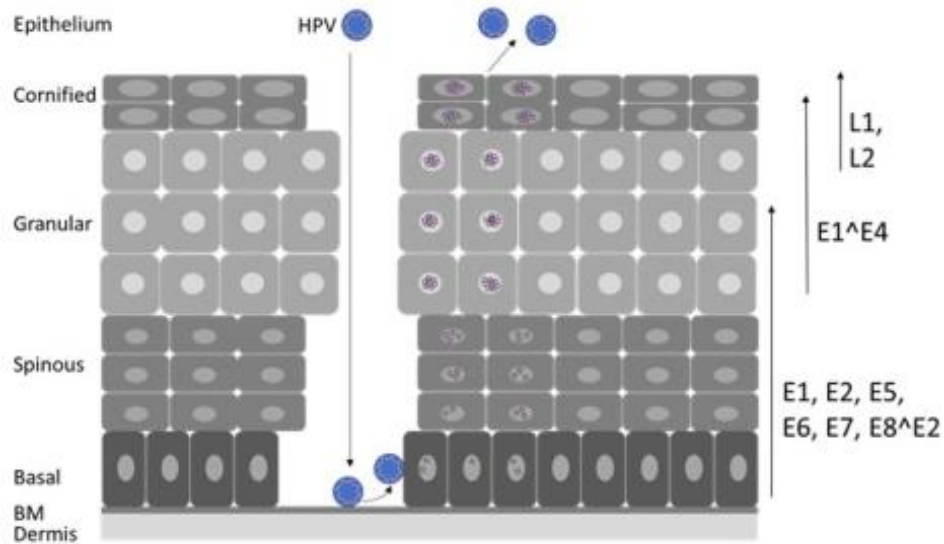


Abbildung 4: Schematische Darstellung des viralen Lebenszyklus

HPV Partikel infizieren die basalen Zellen durch Mikroläsionen in der Haut. Der virale Lebenszyklus ist an die Differenzierung gekoppelt und endet mit der Produktion von infektiösen Viruspartikeln und deren Freisetzung in den oberen Zellschichten. Die Pfeile zeigen die differenzierungsabhängige Expression viraler Proteine. Abbildung angepasst aus: (Kuehner und Stubenrauch, 2022)

Bei beta-HPV ist ebenfalls ein differenzierungsabhängiger Replikationszyklus vorhanden, was bereits durch *in-situ*-RNA Hybridisierung für eine gutartige HPV5-positive Läsion eines EV-Patienten gezeigt wurde (Haller et al., 1995). Auch virale vegetative DNA-Amplifikation und E4-Proteine wurden in den oberen Schichten von cSCCs in EV-Patienten nachgewiesen (Borgogna et al., 2012).

4 Methoden

4.1 Mikrobiologische Methoden

4.1.1 Transformation von DNA in kompetente Bakterien

Zur Vermehrung rekombinanter Plasmid-DNA wurde zunächst die entsprechende DNA in *E. coli* Dh5alpha transformiert. Dazu wurden 100 µl chemisch kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut, die entsprechende Menge DNA zugegeben und weitere 10-15 min auf Eis inkubiert. Dann wurde für 1 min ein Hitzeschock bei 42 °C durchgeführt und anschließend nach kurzem Abkühlen auf Eis 900 µl SOC-Medium zugegeben. Nach 1 h leichtem Schütteln bei 37° C wurden die Bakterien auf LB-Platten mit entsprechender Selektion für die transformierte DNA ausgestrichen. Nach Kultivierung bei 37° C ü.N. können Einzelklone zur Inokulation einer Flüssigkultur verwendet werden.

4.1.2 Kultivierung von Bakterien zur Plasmidisolierung

Es wurden *E. coli* Bakterien in 10-200 ml LB-Medium mit dem der Plasmid-DNA entsprechenden Antibiotikum ü.N. schüttelnd kultiviert.

4.2 Zellkulturtechniken

4.2.1 Kultivierung von Zellen

Die in dieser Arbeit eingesetzten adhärenenten Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ und in humider Atmosphäre kultiviert. Sie wurden in Kunststoff-Zellkulturschalen oder *well*-Platten kultiviert. Alle entsprechenden Arbeiten wurden an einer Sterilwerkbank durchgeführt. Die Volumina sind, wenn nicht anders angegeben auf eine 100 mm Zellkulturschale bezogen.

Zum Passagieren wurden die Zellen mit 10 ml 1x PBS gewaschen und 2 ml Trypsin zugegeben. Anschließend wurden die Zellen ca. 3-5 min im Brutschrank bei 37 °C abgelöst.

Bei J2-Fibroblasten und anderen Zellen, die im Weiteren in Serum-haltigem Medium kultiviert wurden, wurden die Zellen direkt mit einer sterilen Einmalpipette in 8 ml Medium resuspendiert und auf mehrere Zellschalen aufgeteilt. Um Zellen wie z.B. primäre humane Keratinozyten zu passagieren, oder wenn eine spezifische Zellzahl notwendig war, wurden die Zellen in serumhaltigem Medium aufgenommen und abzentrifugiert (250xg, 5 min), und anschließend in z.B. 10 ml Medium resuspendiert und ausgesät.

C33A wurden in DMEM-FKS (10 % FKS, 50 mg/l Gentamycin) kultiviert und im Verhältnis 1:8-1:10 gesplittet.

Primäre normale humane Keratinozyten (NHK, aus Präputium isoliert) wurden in KSFM (mit EGF, BPE und 50 mg/l Gentamycin) kultiviert oder in E-Medium zusammen mit teilungsunfähigen J2-Fibroblasten co-kultiviert nach Transfektion mit viralen Genomen oder retroviraler Infektion.

NIH3T3-J2 und J2 NHP Maus-Fibroblasten wurden mit DMEM-CS (10 % CS, 50 mg/l Gentamycin) kultiviert und im Verhältnis 1:3-1:5 beim Passagieren aufgeteilt.

Phoenix Zellen wurden in DMEM-FKS kultiviert.

4.2.2 Mitomycin-Behandlung von NIH3T3-J2 Fibroblasten

Fibroblasten werden eingesetzt zu Kokultivierung mit humanen Keratinozyten.

Die Fibroblasten wurden für die Kokultivierung mit MitomycinC vorbehandelt um ein Überwachsen der Keratinozyten zu vermeiden. Die Zellen sind weiterhin lebendig und unterstützen das Wachstum der Keratinozyten (Blacker et al., 1987). Dazu wurde das Medium einer 100 mm Zellkulturschale abgenommen, durch 5 ml frisches DMEM-CS ersetzt und 10 µl MitomycinC-Lösung (400 µg/ml in PBS, sterilfiltriert) zugegeben. Dann wurden die Zellen 1-2 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Vor Verwendung als *Feeder*-Zellen wurden sie dreimal mit 10 ml PBS gewaschen.

4.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden zum Einfrieren wie beim Passagieren zunächst je 100 mm Schale mit 10 ml PBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin-EDTA abgelöst. Das Ablösen wurde mit serumhaltigem Medium abgestoppt und die Zellen in einem 15- oder 50 ml-Gefäß abzentrifugiert (250xg, 5 min). Das Zellpellet wurde in je 2 ml Einfriermedium (Medium mit 10 % Serum und 20 % Glycerin bzw. 10 % DMSO) resuspendiert und auf zwei beschriftete Einfriereröhrchen aufgeteilt. Diese wurden dann schnell in eine Einfrierbox überführt und im -80 °C Gefrierschrank eingefroren (-1°C/min). Zur Langzeitlagerung wurden die Röhrchen nach ca. 24 h in einen Stickstofftank überführt.

Um Zellen aufzutauen wurden 10 ml PBS in einem 15 ml Röhrchen vorgelegt, die Zellen zügig bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und die Zellsuspension mit dem PBS abzentrifugiert (250xg, 5 min). Dann wurden die Zellen in 5 ml Medium resuspendiert und zu 5 ml vorgelegtem Medium in eine Zellkulturschale gegeben.

4.2.4 DNA Transfektion durch Lipofektion

Für die Transfektion von DNA in humane Zellen wurde der Komplexbildner FuGeneHD (Promega) nach Herstellerangaben eingesetzt. Dafür wurde Opti-MEM in einem Polystyrol-Röhrchen vorgelegt, je 6 *well* 1 µg Virus-DNA und je 2,5 µl FuGene-Reagenz zugegeben. Anschließend wurde jeder Ansatz gevortext und für 15 min bei RT inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurde das Medium der zu transfizierenden Zellen gewechselt. Der Transfektionsansatz wurde tropfenweise behutsam zugegeben. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt.

Diese Versuche wurden für verschiedene HPV Typen durchgeführt, mit den jeweiligen religierten Genomen.

4.2.5 Erzeugung von HPV-haltigen Zelllinien

Primäre Keratinozyten (NHK) wurden mit religierten HPV-Genomen (4 µg) und dem Neomycin-Selektionsplasmid (1 µg) mit der entsprechenden Menge FuGene (1 µg DNA pro 5 µl) kotransfiziert.

Die Zellen wurden mittels G418 (150 µg/ml) für 8-10 Tage bis zum Tod untransfizierter Kontroll-Zellen selektioniert. Resistente Kolonien wurden vereinigt und expandiert. Die stabilen Zelllinien wurden für mindestens 300 Tage passagiert, um festzustellen ob die Zellen eine verlängerte Lebensspanne besitzen, oder tatsächlich immortalisiert sind. Die Methode wurde adaptiert aus (Frattini et al., 1996), und wurde so in (Rehm et al., 2022) bereits beschrieben und eingesetzt.

4.2.6 Organotypische Zellkultur (3D)

Zur Erstellung von organotypischen Kulturen wurden 100.000-120.000 NHKs in einer 6 well-Platte ausgesät und nach 1-2 Tagen mit je 1 µg religierter viraler DNA mit 5 µl FuGeneHD (Promega) transfiziert. Nach weiteren 2 Tagen werden die Zellen auf ein 200.000 J2-NIH-3T3 Zellen enthaltendes Kollagen Typ1-Plug gesplittet (Zellkultureinsatz: Polycarbonat, 3 µm Porengröße, 0,47 cm²; Thermo Fisher). Nach weiteren 3-4 Tagen werden die Modelle der Luft ausgesetzt, indem das E-Medium abgesaugt wird, und E-Medium ohne *EGF* zugegeben wird, ohne die Oberfläche zu bedecken. Dadurch wird die Differenzierung der Keratinozyten initiiert. Nach 16 Tagen Differenzierung werden die Modelle geerntet und analysiert.

4.2.7 Retrovirale Infektion

Es wurden Phoenix-Zellen genutzt zur Verpackung der Expressionsplasmide für HPV49 E6 (pLXSN-Neomycin) und E7 (pMSCV-Puromycin). Es wurden $2,5 \cdot 10^6$ Zellen je Ansatz in eine 60 mm Zellkulturschale ausgesät. Nach 24 h werden die Zellen transfiziert. Dazu werden 250 µl OptiMEM (Thermo Fisher), 6 µg DNA und 15 µl FuGeneHD (Promega) gemischt, gevortext und nach 15 min Inkubation bei RT auf die mit frischem Medium versorgten Zellen getropft. Am nächsten Tag wird das Medium der Phoenix-Zellen gewechselt. Außerdem werden die NHKs im Verhältnis 1:6 auf 60 mm Schalen gesplittet. Dafür wird pro Ansatz eine Platte benötigt, und zusätzlich eine Platte, die als Selektionskontrolle nicht transfiziert wird. Am nächsten Tag, 48 h nach Transfektion wird der infektiöse Überstand der Phoenix-Zellen sterilfiltriert (Millipore, 0,45 µm Porengröße), 5 mg/ml (1:1000) Polybrene zugegeben, und das Medium der NHKs durch den infektiösen Überstand ausgetauscht. Nach weiteren 24 h werden die Zielzellen in eine 100 mm Zellkulturschale gesplittet. 3 Tage später wird mit der Selektion begonnen (Puromycin 0,5 µg/ml oder G418 150 µg/ml), bis die nicht infizierte Kontrolle tot ist (ca. 2-4 Tage).

4.3 DNA-Methoden

4.3.1 Standardmethoden

- Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen
- Gelelektrophorese von Nukleinsäuren (Agarosegele)
- Amplifikation von Gensequenzen mittels PCR (Pyrobest, Takara Biotech)

4.3.2 Präparative Plasmidisolierung aus Bakterienzellen

Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen erfolgte mittels der Qiagen Kits: QIAprep® Spin Miniprep Kit, QIAgen® Plasmid Plus Midi Kit oder QIAgen® Plasmid Plus Maxi Kit. Die DNA wurde in 50-400 µl Elution Buffer eluiert und die Konzentration und Reinheit der Präparation mittels eines Spektralphotometers ND-1000 (Nanodrop®) bestimmt.

4.3.3 DNA-Fragment-Elution aus Agarosegelen

Die DNA-Fragmente wurden im Agarosegel aufgetrennt und unter ultraviolettem Licht mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Dann wurden sie mittels des QIAquick® Gel Extraction Kit von Qiagen aufgereinigt. Die DNA wurde in 30-50 µl Elutionspuffer aufgenommen.

4.3.4 Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA Ligase

Ligation von DNA die aus einem Gel aufgereinigt wurde, wurde mit dem der T4-DNA-Ligase und zugehörigem Puffer (Thermo Fisher) durchgeführt. Nach dem enzymatischen Herausschneiden viraler DNA aus einem Vektor wurde ebenfalls die T4-DNA-Ligase mit Puffer (1 µl Ligase/1 µg DNA, 16 °C, ü.N.) eingesetzt.

4.3.5 Sequenzierung

Sequenzierungen wurden von der Firma Eurofins Genomics (SupremeRUN-Tube) durchgeführt und mittels SnapGene (Version 4.1.9) analysiert.

4.3.6 ExonukleaseV-Resistenz qPCR-Assay

Der Assay wurde von (Myers et al., 2019) übernommen und leicht adaptiert. Es wurden 100 ng der gesamt-zellulären DNA mit oder ohne 5 U ExonukleaseV (NEB M0345S) in 1x NEBuffer 4 inkubiert, mit zusätzlich 1 mM ATP für 60 min bei 37 °C. Dann wurde das Enzym bei 95 °C für 10 min inaktiviert, und 10 ng der eingesetzten DNA in der qPCR mit HPV49-spezifischen und ACTB-spezifischen Primern gemessen.

4.3.7 Luziferase-Assay

Der hier genutzte Reporterassay basiert auf dem Luziferase-Gen des Glühwürmchens *Photinus pyralis*. Bei Zugabe des Substrats, D-Luziferin, zum Zelllysate welches das Reporter-gen enthält, wird das Substrat vom Enzym umgesetzt, und beginnt Licht auszustrahlen. Die Menge an Licht steigt linear mit der Menge an Enzym. Das Luminometer (BertholdTech TriStar2S, Driver Version: 1.00 (1.0.0.11), S/N: 50-1009, Embedded Version: 2.05) nimmt das Licht als relative Lumineszenz Einheit (RLU) auf, und kann zur Quantifizierung der Genexpression genutzt werden (Programm: ICE, Version 1.0.9.8). Im vorliegenden Assay wurde ein indirekter Nachweis getätigt. Dabei wurde ein Gal4-sensitiver Promotor

am Luziferase-Gen angebracht, welcher durch das Vorhandensein von Gal4-fusioniertem MAML1 induziert wird. Zusätzlich wurden jeweils verschiedene E6 kodierende Konstrukte in C33A-Zellen transfiziert. Interagiert mit und reprimiert das E6 MAML1, wird der Gal4-Reporter nicht aktiviert, und die Menge an Luziferase-Enzym, also auch die emittierte Lichtmenge sinkt. Zur Kontrolle einer erfolgreichen Transfektion und der Zellzahl, wurde in alle Ansätze zusätzlich ein Renilla-Luziferase kodierender Vektor transfiziert, auf den die gemessenen Aktivitäten normalisiert werden. Das Renilla-Enzym setzt dabei das Substrat Coelenterazin (CTZ) um, welches zu fertigem *Gussia Juice* (PJK) gegeben wird (20 µl/ml). Zur Lyse der Zellen wurden diese zweimal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend 15 min bei 4 °C auf Eis unter Schütteln mit 150 µl Luziferase-Lysepuffer lysiert. Die Aktivität wurde ca. 20 h nach Transfektion in 50 µl Lysat der Zellen gemessen. Für die Messung im Gerät wurde 50 µl Lysat je für die Messung der Firefly- und der Renilla-Luziferase in eine weiße 96 well Platte vorgelegt, und je 50 µl des entsprechenden Puffer-Substrat Gemisches vom Gerät für die Messung zugegeben. Ohne Verzögerungszeit wurde die Lichtmenge über 5 s gemessen („Endpunktmessung“).

4.4 RNA-Methoden

4.4.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zellen

Die Isolierung erfolgte mittels des RNeasy® Mini Kit (Qiagen) nach Anleitung. Bei Isolation aus 2D-Zellkultur wurde das Medium entfernt und je 6 well 350 µl Lysepuffer RLT mit 10 µl/ml 2-Mercaptoethanol zugegeben. Das Lysat wurde über das QIAshredder® Kit (Qiagen) homogenisiert und die RNA in 50 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Die Konzentration und Reinheit wurde wie bei DNA-Aufreinigungen über das Spektralphotometer ND-1000 (Nanodrop®) bestimmt. Die isolierte RNA wurde zunächst bei -20 °C und zur Langzeitlagerung bei -80 °C gelagert.

4.4.2 Synthese von cDNA

Die isolierte Gesamt-RNA wurde mit dem QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Qiagen) nach den Herstellerangaben zu cDNA umgeschrieben. Je Ansatz wurde 1 µg RNA in die Reaktion eingesetzt. Nach der Reaktion wurde je 80 µl Wasser zu 20 µl Reaktionsansatz zugegeben. Die Endkonzentration betrug somit immer 10 ng/µl.

4.4.3 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Die Analyse der viralen Transkripte wurde mit dem LightCycler® 480 (Roche) und entsprechenden LightCycler® 480 Multiwell Platten 96 well (Roche) und SyberGreen-MasterMix (Roche) durchgeführt. Dabei wurde der Mastermix mit den Primern in jedes benötigte well der Multiwellplatte vorgelegt und die jeweilige Probe zugegeben.

Methoden

Mastermix für Standardwerte:

4 µl DEPC-Wasser
2 µl *forward* Primer
2 µl *reverse* Primer
10 µl SYBR Green Master I
->je 18 µl vorlegen + 2 µl Standard

Mastermix für cDNA-Proben:

1 µl DEPC-Wasser
2 µl *forward* Primer
2 µl *reverse* Primer
10 µl SYBR Green Master I
->je 15µl vorlegen + 5 µl cDNA

Nach dem Pipettieren wurde die Platte abzentrifugiert (250xg, 3 min) um sicherzustellen, dass sich alle Flüssigkeit auch unten im *well* befindet und gemessen werden kann.

Die Analyse wurde mit folgenden Einstellungen vorgenommen:

Initiale Denaturierung	95 °C, 10 min	
Denaturierung	95 °C, 10 s	} 45 Zyklen
Primerbindung	55 °C/ 60 °C, 15 s	
Amplifikation	72 °C, 15 s	
Schmelzkurve	95 °C, 10 s	
	65 °C, 30 s	
	95 °C	
Ende	∞, 4 °C	

Die Software gibt einen Cp-Wert (*Crossing-Point*) für jeden Reaktionsansatz aus. Dabei entspricht dieser Wert dem Zyklus, in dem die Fluoreszenz signifikant höher als die Hintergrundfluoreszenz ist. Für die viralen Transkripte wurden Standardverdünnungsreihen als Doppelwert gemessen und damit die Konzentration des jeweiligen Transkripts bestimmt. Außerdem wurde ein konstitutiv exprimiertes Referenzgen (PGK1) zu jeder Probe gemessen.

Die Expression des Zieltranskriptes wurde jeweils auf die Expression von PGK1 normalisiert. Bei Transkripten ohne ein vorhandenes Standardplasmid wurde die Pfaffl-Formel angewendet (z.B. KRT10, beta-Aktin).

4.4.4 SiRNA Transfektion

SiRNA wurde mit RNAimax (Thermo Fisher) in die Zielzellen transfiziert. Pro 12 well wurden 60 pmol siRNA und 3 µl RNAimax, und pro 24 well 30 pmol siRNA und 1,5 µl RNAimax mit OptiMEM-Medium laut Anleitung gemischt, für 5 min inkubiert, währenddessen frisches Medium auf die Zellen gegeben und die Mischung auf die Zellen geträufelt. Nach 24 h wird das Medium ausgetauscht.

4.4.5 RNA-Sequenzierung und Probenvorbereitung

Es wurde RNA aus HPV49 *E8-* haltigen Zelllinien und den entsprechenden NHKs isoliert, mit einem optionalen DNase Verdau auf den Säulen (RNeasy Kit und RNase-freie DNase, Qiagen). Die RNA-

Sequenzierung und die Datenaufbereitung wurde dann vom NCCT (NGS Competence Center Tübingen, Institut für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik (IMGAG)) durchgeführt.

Dort wurde die RNA-Konzentration mit dem *Qubit Fluorometric Quantitation* und *RNA Broad-Range Assay* (Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Die RNA-Integritäts Nummer (RIN) wurde mit dem Fragment Analyzer 5300 und dem Fragment Analyzer RNA Kit (Agilent Technologies) untersucht, und als gut befunden (RIN>8).

Zur Vorbereitung der Bibliothek wurde mRNA angereichert mit einer PolyA-Aufreinigung aus 200 ng gesamt-RNA mit dem NEBNext Poly(A) mRNA *Magnetic Isolation Module* (NEB). Zur Erstellung der Bibliothek wurde das *NEBNext Ultra II Directional RNA-Library-Prep* Kit für Illumina (NEB) nach den Herstellerangaben eingesetzt. Um die Molarität zu bestimmen wurde die Größe der Bibliothek mit dem Fragment Analyzer 5300 und dem Fragment Analyzer DNA HS NGS Fragment Kit (Agilent Technologies) bestimmt (ca. 400 bp), und deren Konzentration (>5 ng/μl) mittels dem *Qubit Fluorometric Quantitation* und dem *dsDNA High sensitivity assay* (Thermo Fisher Scientific). Die Bibliotheken wurden denaturiert laut Herstellerangaben, verdünnt auf 270 pM und paarweise sequenziert als *paired-end* 100 bp *Reads*. Die Sequenzierungs-Plattform ist eine Illumina *NovaSeq 6000* mit einer Sequenzierungs-Tiefe >25 Millionen Cluster pro Probe.

Die Lesequalität der RNA-Seq Daten in den fastq-Dateien wurde mittels *ngs-bits* untersucht (v.2021_03-101), um Sequenzierungszyklen mit niedriger Durchschnittsqualität, Adaptor-Kontamination, oder repetitiven Sequenzen aus PCR-Amplifikationen zu identifizieren. Die Reads wurden mit STAR v2.7.3a *aligned* (Dobin et al., 2013) zu GRCh37, und die Qualität des Sequenzvergleichs wurde mittels *ngs-bits* analysiert und visuell kontrolliert im *Integrative Genome Viewer* (v2.7.2). Die normalisierten *Read-Zahlen* für alle Gene wurden mittels *Subread* (v2.0.0) und *edgeR* (v3.32.1) erhalten.

Die rohen Expressionsdaten sind für 63.677 Gene in den sechs Proben vorhanden. Die Rohdaten wurden durch Festlegung eines minimalen Expressionwertes von 1 cpm (*counts per million*) in mindestens 2 der Proben gefiltert. Die gefilterten Daten enthalten Expressionswerte für 15.099 Gene. Die Verteilung von logarithmierten cpm-normalisierten Expressionswerten zeigen ähnliche Charakteristika über alle Proben hinweg. Basierend auf dem gefilterten Datenset wurden die Proben mit Berücksichtigung ihrer paarweisen Ähnlichkeit untersucht. Spearman's Rangkorrelationskoeffizient wurde für jedes Proben-Paar berechnet. Hierarchisches Gruppieren wurde anhand der Ähnlichkeitswerte durchgeführt. Die Analyse der differentiellen Genexpression wurde anhand der gefilterten Genexpressionsdaten durchgeführt. Ein statistisches Modell, welches die Gruppen-Eigenschaften einschließt, wurde getestet, durch Anpassung einer negativen Binomialverteilung mit einem linearen Modellansatz (GLM). Für jedes Gen wurden Genexpression Veränderungen (log₂-fache Veränderung) berechnet und ein statistischer Test durchgeführt, um die Signifikanz zu bestimmen. Diese ist als roher p-Wert und anpassbarer p-Wert (FDR) angegeben.

4.5 Analyse der RNA-Sequenzierungs Daten

Für die Analyse der RNA-Seq Daten in Bezug auf virale Genexpression, wurden die vom NCCT erhaltenen Daten der HPV49 E8- positiven Zelllinien gegen das annotierte HPV49 Genom *aligned*.

Dazu wurden die fastq-Dateien und das annotierte HPV49 Genom auf die GALAXY-Webseite (<https://usegalaxy.eu/>) hochgeladen, und diese mit HISAT2 („paired-end“) verglichen. Zur einfacheren Visualisierung wurden die entstandenen *Alignment*-Dateien der Läufe und der drei Zelllinien

zusammengeführt (*Merge*). Mit dem *igv* (*integrated genomics viewer*, © 2013-2021 Broad Institute; (Robinson et al., 2011)) wurden die Dateien geöffnet und als Sashimi-Plot des HPV49 Genoms dargestellt. Zur besseren Übersicht wurden hier nur Verbindungen mit einer Abundanz von mindestens 38 in die Abbildung eingeschlossen, damit alle bisher bekannte Spleiß-Verbindungen und alle vom neu detektierten Spleiß-Donor an Position 217 ausgehenden Verbindungen enthalten sind. Aufgrund der etwas übersichtlicheren Darstellung wurde für die Visualisierung der *Read*-Abdeckung das Programm Geneious Prime (Version 2022.0.2, *build*: 2022-01-26 14:24) genutzt.

4.6 Proteinmethoden

4.6.1 Western-Blot

Um Proteinextrakte zu erhalten wurden die jeweiligen Zellen mit kaltem PBS gewaschen und in 2 ml kaltem PBS mechanisch abgeschabt. Pelletiert wurden die Zellen in einer Zentrifuge (4 °C, 1 min, 14.000 rpm), und der Überstand abgenommen. Bei Bedarf wurde das Zellpellet bei -20 °C gelagert, oder direkt die Proteine aufgereinigt. Dazu wurde ein RIPA-Extrakt hergestellt. Dafür wurde das Zellpellet in 100-600 µl RIPA-Puffer resuspendiert und für 20 min auf Eis (4 °C) schüttelnd inkubiert. Danach wurde die entsprechende Menge RotiLoad zugegeben, aufgekocht (5 min, 95 °C) und die Proben anschließend mit einem SonoPuls Sonifier UW 2200 (Bandelin, 15 s, 40 %). Um feste Partikel zu entfernen wurden die Proben erneut zentrifugiert und der Überstand auf ein SDS-PAGE Gel aufgetragen. Als Größen-Marker wurde ein Protein-Standard auf das Gel mit aufgetragen. Die Proteine wurden für 45-60 min bei 180 V in 1 % SDS-Laufpuffer auf dem Gel aufgetrennt. Danach wurden sie mittels eines Nass-Blottings mit CAPS-Puffer für 90 min bei 90 V auf eine Nitrozellulosemembran (0,22 µm Porengröße, Amersham) übertragen. Unspezifische Bindung wurde blockiert, indem die Membran für 45-60 min in einer 3 % BSA-Lösung schüttelnd inkubiert wurde. Um die Blockierungslösung zu entfernen, wurde die Membran einmal mit PBS-T abgewaschen. Die primären Antikörper wurden in PBS verdünnt (1:500-1:2.000 bei HSP90) und die Membran ü.N. bei 4 °C unter Schwenken im verdünnten primären Antikörper inkubiert. Am nächsten Tag wird die Membran 3x mit PBS-T für 5 min schüttelnd gewaschen, und für 45-60 min bei RT mit dem sekundären Antikörper (800 nm-„grün“; 650 nm-„rot“; 1:15000 in PBS; LI-COR Biosciences) inkubiert. Anschließend wird erneut 3x mit PBS-T gewaschen und die Western-Blot Membran detektiert.

5 Zielsetzung

Derzeit wird vermutet, dass beta-HPV zusammen mit UV-Strahlung an der Entwicklung von cSCCs (*cutaneous squamous cell carcinoma*) beteiligt sind (Rollison et al., 2019). Vor allem in EV-Patienten, aber auch bei immunsupprimierten Patienten wie OTRs (Organtransplantatempfängern) wurde diese Korrelation beschrieben (Accardi und Gheit, 2014; Rollison et al., 2019). Auch bei immunkompetenten Individuen nimmt die Evidenz zu, dass beta-HPV zur Krebsentstehung beitragen könnten (Accardi und Gheit, 2014; Rollison et al., 2019). Die zugrundeliegenden Mechanismen sind derzeit nicht gut verstanden. Bisherige mechanistische Studien wurden meist mittels retroviral erzeugten E6/E7-Keratinozytenlinien, in U2OS (eine Osteosarkom-Zelllinie) oder in transgenen Mausmodellen durchgeführt. Im Gegensatz zu HR-HPV gibt es bislang kein geeignetes physiologisch relevantes Modellsystem für komplette, replizierende Virusgenome.

Ziel der Arbeit war es, die virale Transkription und Replikation sowie die onkogenen Potenziale unterschiedlicher beta-HPV Genome in NHK zu untersuchen.

6 Ergebnisse

6.1 Die Restriktion der viralen Genexpression und Replikation verhindert eine Immortalisierung von humanen Keratinozyten durch beta-HPV49 (Rehm et al., 2022)

6.1.1 Das HPV49 WT Genom immortalisiert keine NHK

Ziel der Arbeit war es, auf normalen humanen Keratinozyten (NHK) basierende Zellkulturmodelle für beta-HPV zu entwickeln, um die Immortalisierungseigenschaften und den kompletten viralen Replikationszyklus untersuchen zu können. Untersuchungen von HR-HPV nutzen aus, dass diese immortalisierende E6 und E7 Onkoproteine kodieren und es so möglich ist, nach Transfektion kompletter Genome immortalisierte Zelllinien zu erhalten. Die rezirkularisierten HPV Genome werden mit einem Selektionsplasmid in NHK kotransfiziert, 8-10 Tage selektioniert und entstehende Kolonien vereinigt (**Abbildung 5**). Es entstehen Zelllinien, in denen das entsprechende HPV Genom als extrachromosomales Element stabil repliziert oder in das Wirtsgenom integriert wird (Frattini et al., 1996). Da publizierte Daten zeigen, dass die retrovirale Expression von HPV49 E6 und E7 NHK immortalisieren kann (Minoni et al., 2020; Cornet et al., 2012), wurde als Erstes versucht mit dem HPV49 Referenzgenom immortalisierte NHK zu erhalten.

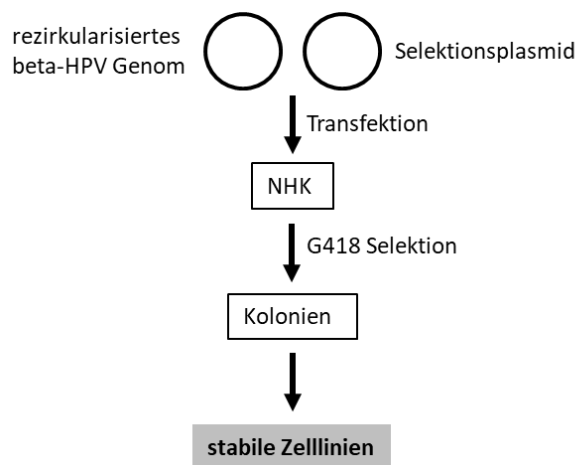


Abbildung 5: Immortalisierungsassay normaler humaner Keratinozyten (NHK).

Dabei wird rezirkularisierte virale DNA mit einem Selektionsplasmid kotransfiziert in NHKs. Nach Selektion bilden sich Kolonien, die zu stabilen Zelllinien vereinigt werden. Prinzip verändert nach (Frattini et al., 1996).

Überraschenderweise, entstanden nach Kotransfektion des rezirkularisierten HPV49 WT Genoms mit einem Selektionsplasmid keine Kolonien.

6.1.2 Das HPV49 Wild-typ Genom wird in NHK transkribiert und dies wird durch frühe Gene moduliert

Nachdem das HPV49 WT Genom die NHK nicht immortalisieren konnte, sollte dessen Aktivität analysiert werden. Da keine Antikörper für HPV49 Proteine existieren, wurde stattdessen die virale Genexpression analysiert. Das Virus nutzt vermutlich mehrere Promotoren um polycistronische Transkripte herzustellen, die dann alternativ gespleißt werden. Es war keine Transkriptkarte von HPV49 vorhanden, aber auf Grund der hohen Konservierung mancher Spleißsignale bei Papillomviren wurden konservierte Spleißdonoren (D) und Akzeptoren (A) entweder durch Sequenzalignments oder mithilfe der PAVE-Datenbank (<https://pave.niaid.nih.gov/>) vorhergesagt.

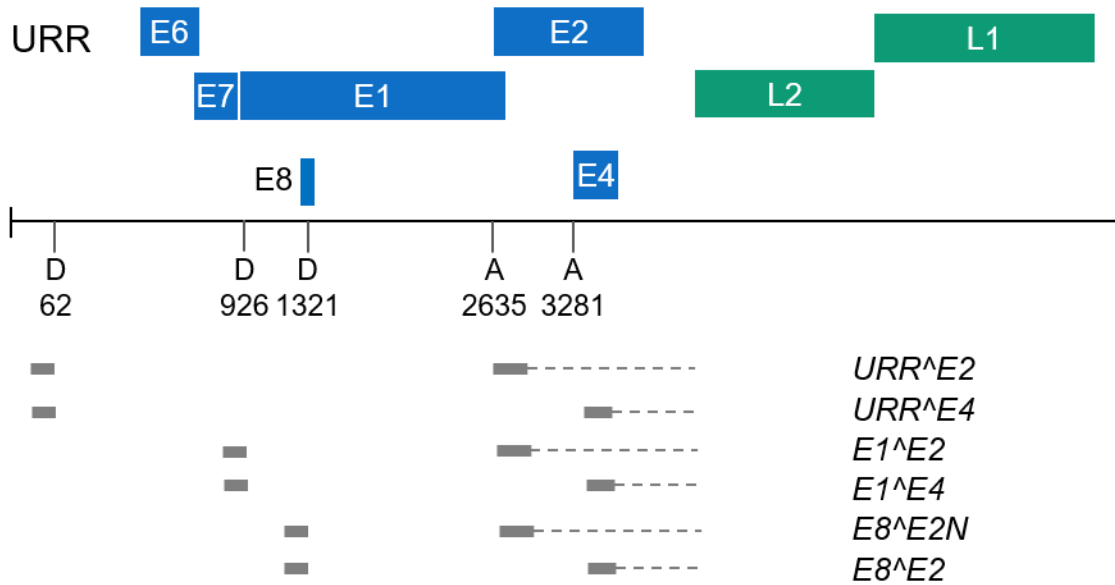
Unter Anderem sind am Anfang von *E1*, in *E8* und in der URR Donoren, während sich vor *E2* und in der *E2/E4*-Region Akzeptoren befinden. Dies führt zu sechs möglichen Donor-Akzeptor Kombinationen: Der URR-Donor mit dem Akzeptor vor *E2* ($URR^A E2$) oder dem Akzeptor in *E2/E4* ($URR^A E4$). Der Spleißdonor am Anfang von *E1* entweder mit dem Akzeptor vor *E2* ($E1^A E2$) oder mit dem *E2/E4* Akzeptor ($E1^A E4$). Zuletzt gibt es noch einen Spleißdonor in *E8* in Kombination mit dem Akzeptor vor *E2* ($E8^A E2N$) oder dem in *E8* mit dem in *E2/E4* ($E8^A E2$) (**Abbildung 6 (A)**). Die entsprechenden cDNAs wurden synthetisiert, in Plasmid-Vektoren inseriert und dazu genutzt spezifische und sensitive Primerpaare für die qPCR zu entwickeln. Dann wurden NHKs mit rezirkularisierten HPV49 Genomen transfiziert, nach sechs Tagen deren RNA isoliert und mittels qPCR gemessen. Durch Schmelzkurvenanalyse und direkte Sequenzierung der qPCR-Produkte konnte festgestellt werden, dass alle vorhergesagten Transkripte tatsächlich so produziert werden (**Abbildung 6 (A)**).

Für die weitere Analyse wurden NHKs mit HPV49 WT Genomen transfiziert und nach drei, sechs oder neun Tagen eine RNA-Isolation durchgeführt und die viralen gespleißten Transkripte mittels qPCR gemessen. Dabei konnten alle Transkripte an den drei Zeitpunkten nachgewiesen werden, wenn auch in unterschiedlicher Menge (**Abbildung 6 (B)**).

$E1^A E4$ war zu jedem Zeitpunkt das abundanteste Transkript. Es steigt 9,5-fach von Tag drei auf Tag sechs an, und sinkt dann wieder leicht bis zu Tag neun. Die Menge an $E1^A E2$ ist an Tag drei vergleichbar mit $E1^A E4$, sinkt aber bis Tag sechs und neun. Das $URR^A E4$ Transkript ist deutlich niedriger wie $E1^A E4$, und bleibt stabil über die Zeit. $E8^A E2$ ist ebenfalls niedriger, fällt aber weiter ab von Tag drei auf neun ca. zwei-fach. Das $URR^A E2$ Niveau ist etwa 20-fach unter dem Niveau von $E1^A E4$ an Tag drei, und steigt etwa dreifach auf Tag neun. $E8^A E2N$ wird ca. 70-fach weniger exprimiert wie $E1^A E4$ an Tag drei, und bleibt relativ konstant.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass das HPV49 WT Genom eine Vielfalt gespleißter Transkripte exprimiert. Diese werden in unterschiedlichen Mengen für mindestens neun Tage hergestellt, was nahelegt, dass das Fehlen der Immortalisierung nicht an einer Blockade der Genexpression liegt.

A



B

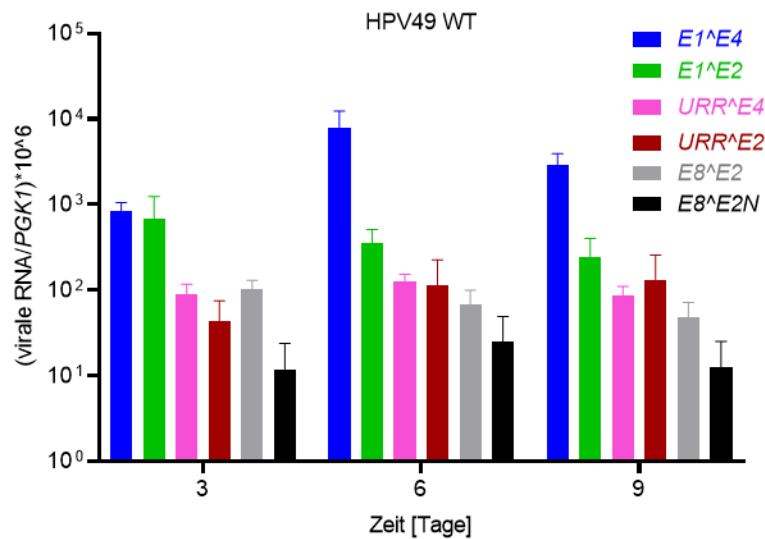


Abbildung 6: Transkriptkarte und transientes Expressionsprofil von HPV49

(A) Lineare Darstellung des HPV49 Genoms. Die upstream regulatory region (URR), die frühen Gene (E1-E8) und die späten Gene (L1, L2) sind dargestellt. Die Nukleotidpositionen der identifizierten Donoren (D) und Akzeptoren (A) sind angegeben. Durch qPCR identifizierte Spleiß-Transkripte sind als grauen Balken dargestellt, deren vermutete Verlängerung der Transkripte zur frühen Polyadenylierungsstelle sind als unterbrochene Balken zu sehen.

(B) QPCR Messung der gespleißten viralen HPV49 Transkripte in transfizierten NHK nach drei, sechs und neun Tagen. PGK1 wurde als Referenz verwendet. Die Daten stammen aus vier unabhängigen Experimenten mit Zellen unterschiedlicher Spender.

Abbildung 6 und die entsprechende Beschriftung wurde aus einer Veröffentlichung der Autorin übernommen und angepasst (Rehm et al., 2022).

Ergebnisse

Dies lieferte also keine Erklärung für den beobachteten Phänotyp. Es könnte auch eine translationale Blockade der viralen Proteinexpression vorliegen. Deshalb wurde eine genetische Analyse in NHK durchgeführt. Dazu wurden HPV49 *E1*-, *E2*-, *E6*-, *E7*- und *E8*- Genome durch Inaktivierung der entsprechenden Startkodons hergestellt, wobei Wert darauf gelegt wurde, dass die Mutationen in den überlappenden Leserahmen stumm sind. Diese Genome wurden in NHKs vier verschiedener Spender transfiziert und das Transkriptionsmuster mit dem WT verglichen (**Abbildung 7 (A)**).

Der stärkste Effekt ist für das *E8*- Genom zu beobachten. Die $E1^{E4}$ Menge ist 170-677-fach höher als beim WT. Auch die $E1^{E2}$ (23-267-fach), URR^{E4} (82-219-fach) und $E8^{E2}$ -Transkripte (24-297-fach) waren signifikant höher zu allen Zeitpunkten exprimiert.

Bemühungen die *E6* und *E7* Transkripte in Gesamt-RNA zu quantifizieren waren erfolglos, vermutlich aufgrund hohen Hintergrunds an transfizierter DNA, die nur unzureichend durch den DNase-Verdau vor der cDNA-Synthese verringert wurde. Um dies zu umgehen, wurde die mRNA aus Gesamt-RNA angereichert über einen oligo-dT-Selektions-Schritt. Dabei konnte gezeigt werden, dass in WT-transfizierten Zellen sowohl *E6* als auch *E7* Transkripte enthalten sind (**Abbildung 7 (B)**). *E7* war dabei höher exprimiert als *E6* und beide Transkripte nehmen über die Zeit von Tag drei auf Tag sechs zu.

Des Weiteren sind die *E6* und *E7* Mengen in *E8*- transfizierten NHK signifikant höher. HPV49 *E8*- Genome zeigen sechs Tage nach Transfektion im Gegensatz zu WT Genomen ein robustes Signal replizierter viraler Genome, was konsistent mit Ergebnissen anderer HPV-Typen ist (Lace et al., 2008; Straub et al., 2014; Stubenrauch et al., 2000; Dreer et al., 2016; Sankovski et al., 2014). (**Abbildung 7 (C)**).

Zusammengefasst bestätigen diese Ergebnisse, dass das HPV49 *E8* Gen, was vermutlich hauptsächlich als $E8^{E2}$ Fusionsprotein exprimiert wird, virale Genexpression und Replikation hemmt vergleichbar mit anderen HPV Typen (Lace et al., 2008; Stubenrauch et al., 2000; Dreer et al., 2016).

Dahingegen zeigt das *E1*- Genom signifikant geringere $E1^{E4}$ und $E8^{E2}$ Werte, und das *E2*- Genom geringere $E1^{E4}$, $E1^{E2}$ und URR^{E4} Transkript-Level. Geringere $E1^{E4}$ Werte bei den *E1*- und *E2*- Genomen sind im Einklang mit der konservierten Interaktion von *E1* und *E2*, und deren Funktion die virale Genomreplikation einzuleiten. Vermutlich stammt die reduzierte Expression von der geringeren Replikationskapazität dieser beiden Genome. Diese Hypothese kann jedoch aufgrund der nicht nachweisbaren Replikation vom WT Genom in Southern-Blot Analysen nicht überprüft werden (**Abbildung 7 (C)**). Im Gegensatz zum *E2*- Genom hat das *E1*- Genom keine reduzierten $E1^{E2}$ und URR^{E4} Mengen, was vermuten lässt, dass diese von der konservierten Transkriptions-Aktivierungsfunktion von *E2* kommen könnten. Die virale Genexpression des *E6*- Genoms entspricht in etwa der vom WT Genom. Dahingegen zeigt das *E7*- Genom signifikant höhere $E1^{E4}$, $E1^{E2}$ und URR^{E4} Werte an Tag drei. Dies deutet darauf hin, dass *E7* als Inhibitor der viralen Genexpression an frühen Zeitpunkten dienen könnte.

Insgesamt weisen die Änderungen der viralen Transkriptmengen der *E1*-, *E2*-, *E7*- und *E8*- Genome darauf hin, dass virale Proteine funktional exprimiert werden. Die fehlende Immortalisierung des HPV49 WT Genoms in NHK scheint also nicht an einer Blockade der gesamten viralen Proteinexpression zu liegen.

Ergebnisse

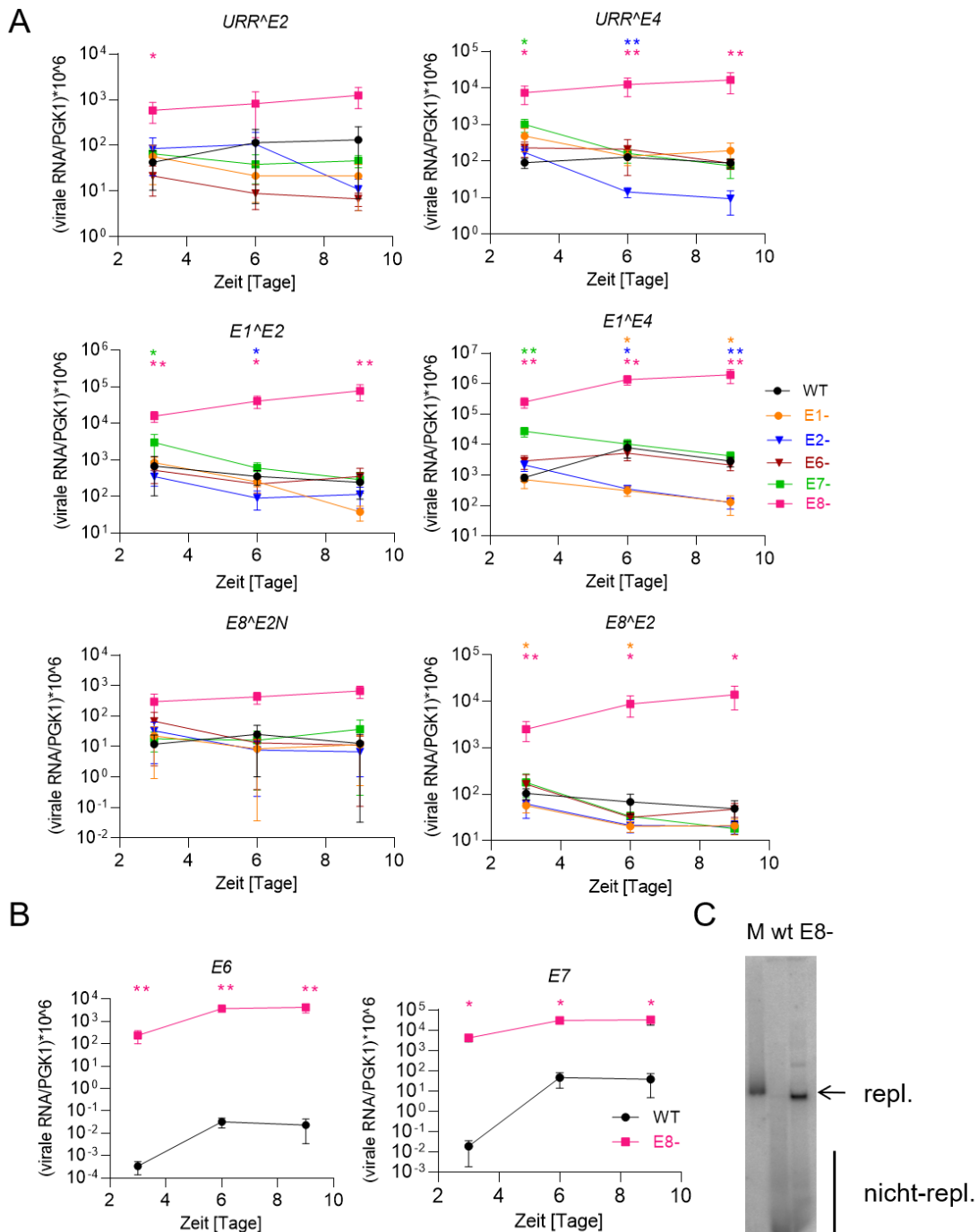


Abbildung 7: Genetische Analyse von HPV49 Genomen, Southern-Blot und E6/E7-mRNA

- (A) QPCR Analyse von gespleißten HPV49 Transkripten. Messung nach drei, sechs und neun Tagen nach Transfektion in NHK. Transfiziert wurden HPV49 WT, E1-, E2-, E6-, E7- und E8- Genome. PGK1 dient als Referenz Transkript. Die Daten stammen aus vier unabhängigen Experimenten mit NHKs verschiedener Spender.
- (B) QPCR Analyse von E6 und E7 Transkripten in PolyA-angereicherter RNA aus NHKs, die mit WT oder E8- Genomen transfiziert wurden.
- (C) Southern Blot Analyse von niedermolekularer DNA, isoliert sechs Tage nach Transfektion von HPV49 WT und E8- Genomen in NHKs. Die DNA wurde mit DpnI verdaut, um nicht replizierte transfizierte DNA abzubauen. EheI wurde genutzt um die Genome zu linearisieren. Als Marker (M) wurde 100 pg linearisiertes HPV49 Genom eingesetzt.

Abbildung 7 Fortsetzung: (A), (B): Die Fehlerbalken stellen den SEM dar. Es wurde ein Differenzen-T-Test mit dem WT als Referenz genutzt, um die statistische Signifikanz zu überprüfen (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). **Abbildung 7** und die entsprechende Beschriftung wurde aus einer Veröffentlichung der Autorin übernommen (Rehm et al., 2022).

6.1.3 HPV49 E8- Genome immortalisieren NHK

Möglicherweise ist HPV49 trotz seiner Transkriptionsaktivität nicht in der Lage, virale Proteine in einer für die Immortalisierung ausreichenden Menge zu exprimieren. Daher wiederholte ich die Immortalisierungsversuche mit dem E8- Genom, aufgrund seiner stark erhöhten Transkription und Genomreplikation in transienten Versuchen, und dem WT Genom als Kontrolle in NHK dreier unterschiedlicher Spender. Erstaunlicherweise bildeten mit HPV49 E8- transfizierte NHK resistente Kolonien, die zu stabilen Zelllinien expandiert werden konnten (**Tabelle 1**).

Tabelle 1: Immortalisierungssassay mit HPV49 WT und E8- Genomen in NHK (Rehm et al., 2022).

HPV49 Genom:	Donor #1	Donor #2	Donor #3
Wildtyp (WT)	-	-	-
E8-	+	+	+

Für die Charakterisierung der HPV49 E8- haltigen Zelllinien, wurden Wachstumskurven über die Zeit erstellt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Zellen 300 Tage kontinuierlich mit einer Verdopplungsrate von ca. 4,3 Tagen proliferierten und kein Anzeichen einer Krise zu beobachten war (**Abbildung 8**). Dies legt nahe, dass die Inaktivierung von HPV49 E8 zur Immortalisierung von NHKs befähigt.

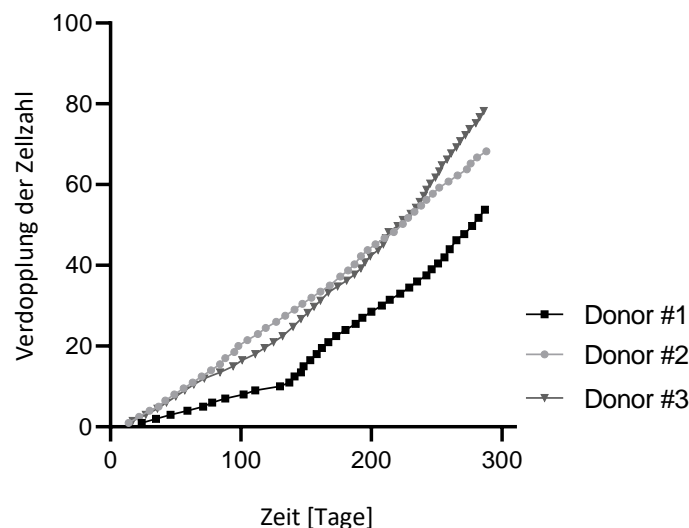


Abbildung 8: Wachstumskurve von HPV49 E8- positiven humanen Keratinozyten-Zelllinien.

Die drei Zelllinien wurden kontinuierlich für 300 Tage kultiviert und das Wachstum aufgezeichnet.

Abbildung 8 und die entsprechende Beschriftung wurden aus einer Veröffentlichung der Autorin übernommen und angepasst (Rehm et al., 2022).

Ergebnisse

Da HR-HPV Typen in immortalisierten Keratinozyten entweder als autonom-replizierende extrachromosomale Elemente oder als Integrate vorliegen können (Moody und Laimins, 2010), wurde der physikalische Zustand der HPV49 *E8*- Zelllinien untersucht. Dabei wurde genomische DNA von frühen (P4-7) und späten (P36) Passagen im Southern Blot untersucht. Dazu wurde die DNA mit einem Restriktionsenzym ohne Schnittstelle, oder mit einer Schnittstelle im HPV49 Genom, behandelt. Ersteres liefert mehrere DNA-Spezies, die der offen zirkulären (*open circular, oc*), kovalent geschlossen zirkulären (*closed covalent circle, ccc*) und der integrierten/verketteten (*concatenated/integrated, c/i*) Spezies der viralen DNA bei HR-HPV entsprechen (Frattini et al., 1996). Bei Verdau mit einem Enzym, welches eine einzelne Schnittstelle im HPV49 Genom besitzt, entsteht eine linearisierte DNA-Form, und die anderen Formen verschwinden fast vollständig. Also liegt die virale DNA hauptsächlich als extrachromosomales Plasmid in den Zellen vor (**Abbildung 9 (A)**). Diese Schlussfolgerung wird durch einen ExonukleaseV-qPCR Assay (Myers et al., 2019) bestätigt, der zeigt, dass die virale DNA fast vollständig ExonukleaseV-resistent ist, also extrachromosomal. Dahingegen wird das zelluläre *ACTB*-Gen zu mehr als 94 % abgebaut (**Abbildung 9 (B)**). Mittels qPCR wurde die virale Kopienzahl bestimmt. Diese lag bei durchschnittlich 5820, 2975 und 4525 Kopien/Zelle (**Abbildung 9 (C)**). Diese Kopienzahlen sind deutlich höher als die 300-400 Kopien pro Zelle, die in einem ähnlichen Versuchsansatz für HPV16 *E8*- immortalisierte Zellen bestimmt wurden (Straub et al., 2014).

Ergebnisse

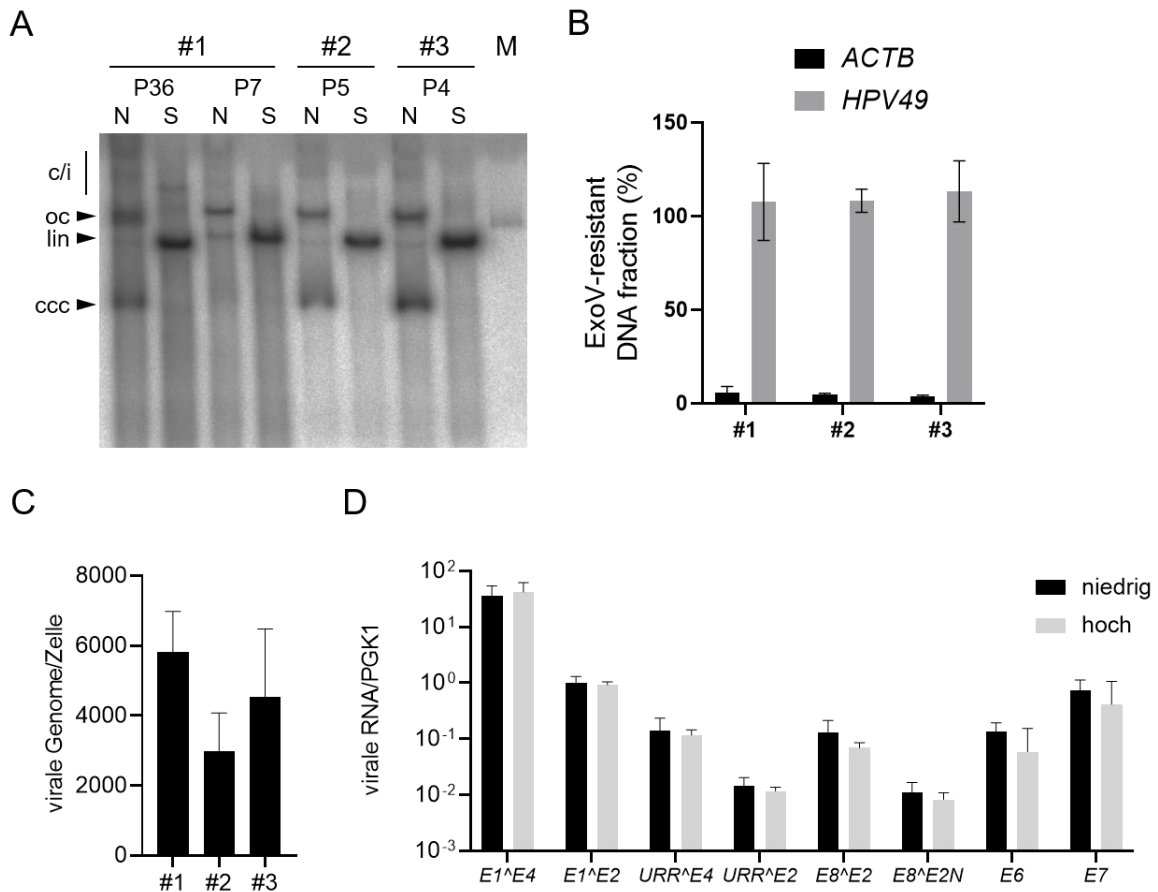


Abbildung 9: Analyse des physiologischen Zustands der HPV49 E8- Genome und Zeitstabilität der viralen Transkripte.

- (A) Southern Blot Analyse von aus stabilen HPV49 E8- Zelllinien (#1-3) isolierter zellulärer DNA mittels ^{32}P -markierter HPV49 Genome. Die DNA wurde mithilfe von NotI verdaut, das nicht im HPV49 Genom schneidet, oder Sall, welches einmal im Genom schneidet. Die Banden der integrierten (c/i), offen zirkulären (oc), linearisierten (lin) und kovalent geschlossen zirkulären (ccc) viralen DNA sind markiert. Als Marker (M) wurden 100 pg linearisiertes HPV49 Genom genutzt.
- (B) Gesamtzelluläre DNA wurde mit oder ohne ExonukleaseV inkubiert, und ACTB (Aktin-beta) und HPV49 in der qPCR gemessen. Dargestellt ist der Anteil an ExonukleaseV resistenter DNA. Die Daten stammen aus drei bis vier unabhängigen DNA Präparationen.
- (C) Die Kopienzahl der HPV49 Genome in den Zelllinien #1-3 wurde durch qPCR in gesamt-zellulärer DNA mit Primern für HPV49 und ACTB bestimmt, für die eine Standardreihe je vorliegt. Die Kopienzahl wird pro Zellen angegeben, dazu wurde angenommen, dass je zwei ACTB Kopien pro Zelle vorhanden sind.
- (D) QPCR Analyse verschiedener gespleißter HPV49 Transkripte in Zelllinien hoher und niedriger Passage. PGK1 wurde als Referenztranskript eingesetzt.

Fehlerbalken (B)-(D): SEM. **Abbildung 9** und die entsprechende Beschriftung wurden aus einer Veröffentlichung der Autorin übernommen und angepasst (Rehm et al., 2022).

Zusätzlich wurde überprüft, dass die viralen gespleißten Transkripte, die in transient mit HPV49 WT und *E8*- Genomen transfizierten Zellen vorhanden sind, auch in den Zelllinien exprimiert werden. Dazu wurden Proben in früher und später Passage untersucht, und festgestellt, dass alle Transkripte auch in den Zelllinien exprimiert werden, und dass auch in Zellen sehr hoher Passage (**Abbildung 9 (D)**). Wie in transienten Experimenten ist das *E1^{E4}* Transkript das Abundanteste, gefolgt von *E1^{E2}*, *URR^{E4}*, *E8^{E2}*, *URR^{E2}* und *E8^{E2N}*. Das *E6* Transkript wurde ebenfalls exprimiert, das *E7* Transkript ca. fünf Mal häufiger, was in etwa der Menge an *E1^{E2}* entspricht. Die Mengen variieren kaum von Zellen der frühen zu Zellen der späten Passage.

Insgesamt zeigt dies, dass die HPV49 *E8*- Genome extrachromosomal in sehr hohen Kopienzahlen vorliegen, und mehrere virale Transkripte für einen längeren Zeitraum exprimiert werden. Dies legt nahe, dass die Immortalisierung von NHKs durch das HPV49 *E8*- Genom von der kontinuierlichen Expression des Virus abhängig ist.

Um zu bestätigen, dass das kontinuierliche Wachstum von der Anwesenheit von *E6* und *E7* abhängig ist, wurden die Zellen mit siRNA, die gegen HPV49 *E6* gerichtet ist, oder einer Kontroll-siRNA behandelt. Zwei verschiedene siRNAs, si49E6-1 und si49E6-2 reduzierten die *E6* und *E7* Transkript-Mengen signifikant (**Abbildung 10 (A)**). Beide siRNAs verringern die Zellzahl drei Tage nach Transfektion im Vergleich zur Kontroll-siRNA. Si49E6-1 liefert dabei eine signifikante Reduktion, während si49E6-2 einen Trend zeigt ($p=0,069$) (**Abbildung 10 (B)**). Diese Daten zeigen insgesamt, dass das Wachstum der HPV49 *E8*- Zelllinien durch die Menge an *E6* und *E7* beeinflusst werden.

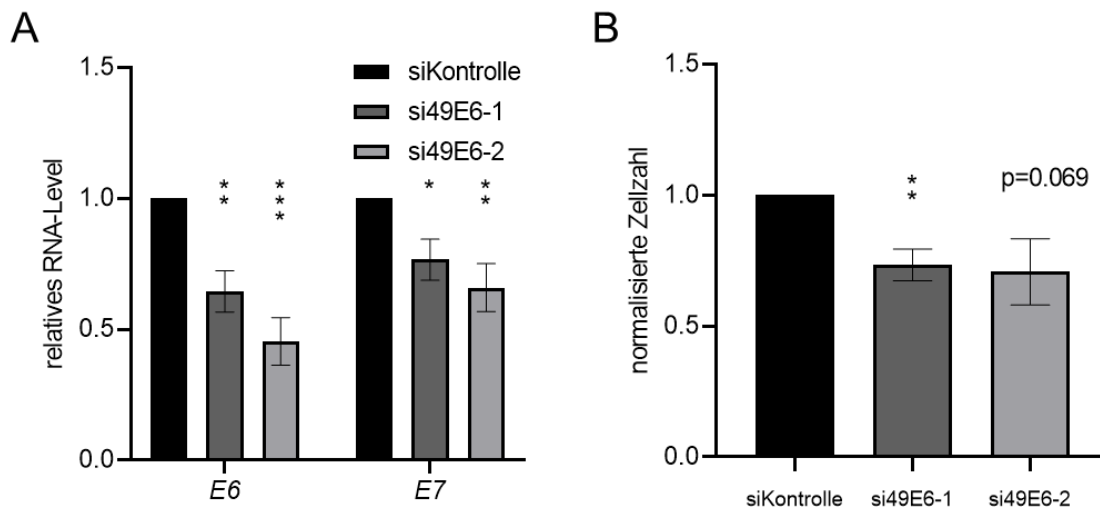


Abbildung 10: SiRNA Knockdown von HPV49 E6/E7 in HPV49 E8- haltigen Zelllinien.

Die HPV49 E8- haltigen Zellen wurden mit verschiedenen siRNAs (siKontrolle, si49E6-1 oder si49E6-2) transfiziert.

(A) Die Menge an *E6* und *E7* Transkripten wurde in Gesamt-RNA gemessen mittels qPCR. *PGK1* dient als Referenztranskript.

(B) Die Zellzahl wurde drei Tage nach Behandlung bestimmt. Fehlerbalken: SEM. Die statistische Signifikanz wurde mittels eines Ein-Proben-T-Tests bestimmt, bei dem die siKontrolle-Probe als Referenz dient (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Abbildung 10 und die entsprechende Beschriftung wurden aus einer Veröffentlichung der Autorin übernommen und angepasst (Rehm et al., 2022).

6.1.4 Die Immortalisierungskapazität des HPV49 *E8*- Genoms ist von den *E1*, *E2*, *E6* und *E7* Genen abhängig

Um herauszufinden, welche viralen Gene für die Immortalisierung von HPV49 notwendig sind, wurde jeweils die *E8*- Mutation mit den *E1*-, *E2*-, *E6*- und *E7*- Mutationen kombiniert. Diese Genome wurden ebenfalls auf Immortalisierung mit NHKs drei verschiedener Spender und dem HPV49 *E8*- Genom als Positivkontrolle getestet (**Tabelle 2**).

Tabelle 2: *Immortalisierungs-Assay mit mutierten HPV49 Genomen.* Die Abbildung wurde aus einer Veröffentlichung der Autorin übernommen (Rehm et al., 2022).

HPV49 Genom:	Donor #4	Donor #5	Donor #6
<i>E8</i> -	+	+	+
<i>E8</i> -/ <i>E1</i> -	-	-	-
<i>E8</i> -/ <i>E2</i> -	-	-	-
<i>E8</i> -/ <i>E6</i> -	-	-	-
<i>E8</i> -/ <i>E7</i> -	-	-	-

Erstaunlicherweise waren nicht nur *E6* und *E7*, sondern auch *E1* und *E2* notwendig für die Immortalisierung, denn keine der kombinierten Mutanten lieferte stabile Zelllinien (**Tabelle 2**). Dies ist im Einklang mit der Abnahme der viralen Genexpression transient transfizierter HPV49 *E1*- und *E2*- Genome (**Abbildung 7 (A)**). Dass sowohl *E6*, als auch *E7* für die Immortalisierung notwendig waren, ist im Einklang mit der Idee, dass diese als Onkoproteine fungieren, und deutet darauf hin, dass beide zur Immortalisierung beitragen. Die Notwendigkeit auch *E1* und *E2* exprimieren zu können legt nahe, dass ihr Effekt indirekt über geringere Replikation und virale Genexpression die Immortalisierung beeinflusst.

Um diese Schlussfolgerungen weiter zu untermauern, wurden die *E8*-/*E1*-, *E8*-/*E2*-, *E8*-/*E6*- und *E8*-/*E7*- Genome in NHKs transfiziert und ihre Genexpression mittels qPCR analysiert (**Abbildung 11**).

Ergebnisse

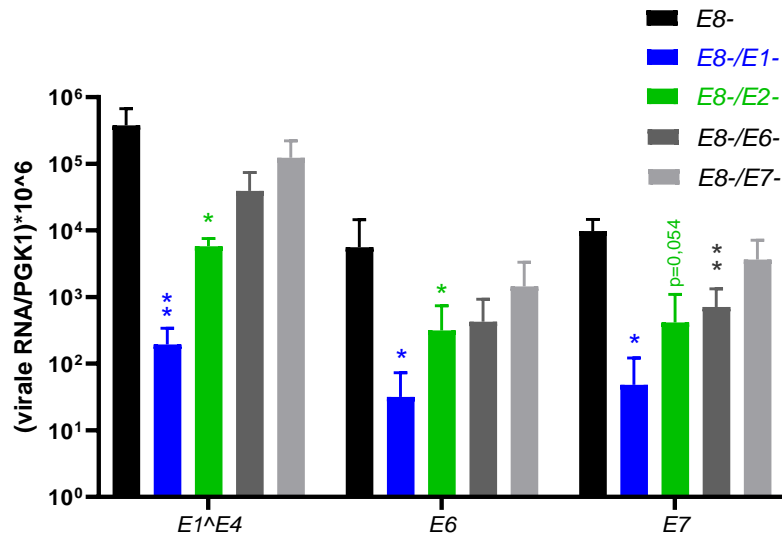


Abbildung 11: QPCR Analyse von HPV49 Transkripten in NHK transfiziert mit verschiedenen HPV49 E8- Genomen

Die Analyse wurde sechs Tage nach Transfektion mit HPV49 E8-, E8-/E1-, E8-/E2-, E8-/E6-, oder E8-/E7- Genomen durchgeführt. PGK1 dient als Referenztranskript. Die Daten stammen aus vier unabhängigen Experimenten mit NHK verschiedener Spender. Fehlerbalken: SEM. Es wurde zur Überprüfung der statistischen Signifikanz ein Differenzen T-Test mit HPV49 E8- als Referenz eingesetzt ($p < 0.05$; $**p < 0.01$). **Abbildung 11** und die entsprechende Beschriftung wurden aus einer Veröffentlichung der Autorin übernommen und die Beschriftung angepasst (Rehm et al., 2022)

Auch in transient transfizierten NHK zeigen die E8-/E1- und E8-/E2- Genome im Vergleich zum E8- Genom niedrigere E1^E4, E6 und E7 Transkriptmengen. Im Gegensatz dazu verhalten sich E8-/E6- und E8-/E7- Genome auf transkriptioneller Ebene sehr ähnlich wie das E8- Genom. Die geringere Menge an E7 Transkript bei E8-/E7- Genomen bildet die einzige Ausnahme (**Abbildung 11**).

6.2 Globale Transkriptomanalyse der HPV49 E8- positiven Zelllinien

Um zu verstehen, wie HPV49 das zelluläre Transkriptom beeinflusst und wie HPV49 E8- transkribiert wird, wurde ein RNA-Sequenzierungsexperiment von drei verschiedenen HPV49 E8- haltigen Zelllinien mit passenden NHKs durchgeführt. Die Auswertung der differentiellen Genexpression durch das Institut für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik (IMGAG) ergab 50 differentiell regulierte Gene (FDR < 0,05). Davon werden 28 herunterreguliert (log₂-fache-Änderung: -1,59 bis -11,27), und 22 hochreguliert (log₂-fache-Änderung: 1,48 bis 6,81). Herunterreguliert sind vor allem interferon-regulierte Gene wie SLFN11 (schlafen family member 11), APOBEC3G (apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic subunit 3G), IFITM1 (interferon induced transmembrane protein 1), HLA-B (major histocompatibility complex, class I, B) und APOBEC3C (apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic subunit 3C). Andererseits werden vor allem Keratinozyten-Differenzierungsmarker hochreguliert, wie z.B. CDSN (Corneodesmosin), SBSN (Suprabasin), KRTDAP (keratinocyte differentiation associated protein), KRT10 (Keratin10) und KRT1 (Keratin1) (**Abbildung 12, Tabelle 3, Tabelle 4**). Darüber hinaus wurde eine starke Erhöhung der Expression von CDKN2A (cyclin dependent kinase inhibitor 2A, entspricht: P16INK4A) beobachtet.

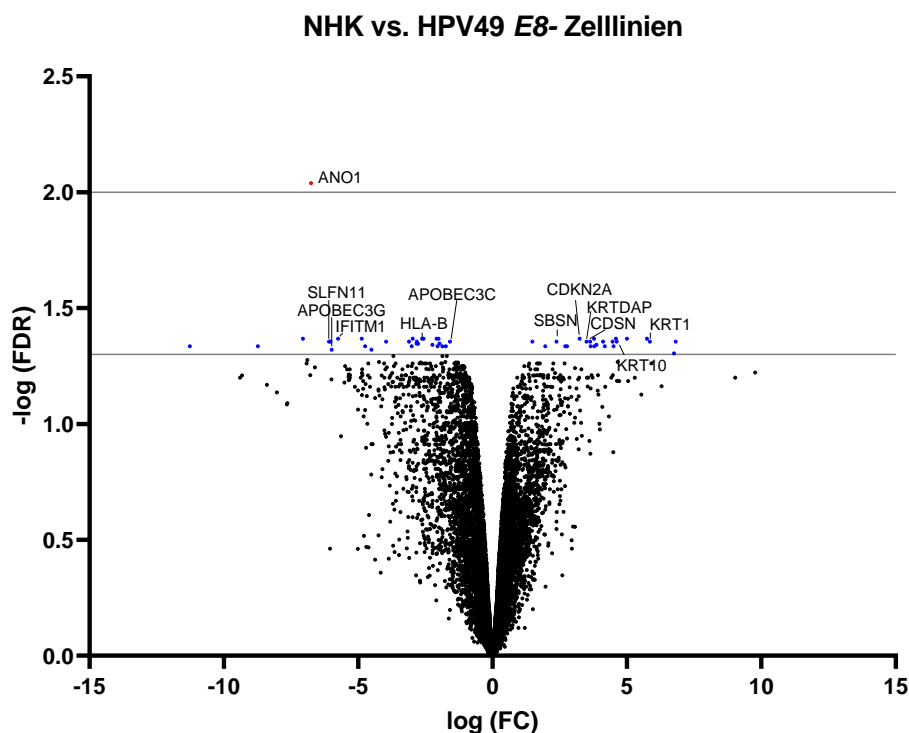


Abbildung 12: Volcano-Plot der differentiell regulierten Gene aus RNA-Seq Daten: NHK vs. HPV49 E8- haltige Zelllinien.

Beispielhaft wurden einige Gene mit einem FDR<0,05 beschriftet.

Das einzige herunterregulierte Gen mit einem FDR < 0,01 ist ANO1 (Anoctamin-1), welches für einen Calcium-aktivierten Chlorid-Kanal kodiert, dessen Funktion in Keratinozyten unbekannt ist (<https://www.uniprot.org/>). Eine vollständige Liste der differentiell regulierten Gene mit einem FDR < 0,05 ist als **Tabelle 3** und **Tabelle 4** zusammengefasst.

Ergebnisse

Tabelle 3: Liste der reprimierten Gene aus den RNA-Sequenzierungs-Daten: NHK vs. HPV49 E8- positive Zelllinien mit einem FDR<0,05.

Gen-ID	Symbol	Beschreibung	log2(FC)	p-Wert	FDR	Effekt
ENSG00000102271	KLHL4	<i>kelch-like family member 4</i>	6,81	0,0001	0,0442	hoch
ENSG00000182578	CSF1R	<i>colony stimulating factor 1 receptor</i>	6,75	0,0002	0,0497	hoch
ENSG00000167768	KRT1	<i>keratin 1</i>	5,85	0,0001	0,0442	hoch
ENSG00000215853	RPTN	<i>repetin</i>	5,74	0,0000	0,0429	hoch
ENSG00000165124	SVEP1	<i>sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain containing 1</i>	5,00	0,0000	0,0429	hoch
ENSG00000186395	KRT10	<i>keratin 10</i>	4,62	0,0001	0,0442	hoch
ENSG00000126233	SLURP1	<i>secreted LY6/PLAUR domain containing 1</i>	4,59	0,0000	0,0429	hoch
ENSG00000103056	SMPD3	<i>sphingomyelin phosphodiesterase 3, neutral membrane (neutral sphingomyelinase II)</i>	4,50	0,0001	0,0462	hoch
ENSG00000244617	ASPRV1	<i>aspartic peptidase, retroviral-like 1</i>	4,46	0,0001	0,0442	hoch
ENSG00000166741	NNMT	<i>nicotinamide N-methyltransferase</i>	4,17	0,0001	0,0462	hoch
ENSG00000171954	CYP4F22	<i>cytochrome P450, family 4, subfamily F, polypeptide 22</i>	4,11	0,0001	0,0442	hoch
ENSG00000138696	BMPR1B	<i>bone morphogenetic protein receptor, type IB</i>	3,86	0,0001	0,0455	hoch
ENSG00000170426	SDR9C7	<i>short chain dehydrogenase/reductase family 9C, member 7</i>	3,78	0,0001	0,0462	hoch
ENSG00000066629	EML1	<i>echinoderm microtubule associated protein like 1</i>	3,77	0,0000	0,0429	hoch
ENSG00000004799	PK4	<i>pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4</i>	3,65	0,0001	0,0462	hoch
ENSG00000204539	CDSN	<i>corneodesmosin</i>	3,63	0,0001	0,0442	hoch
ENSG00000188508	KRTDAP	<i>keratinocyte differentiation-associated protein</i>	3,49	0,0001	0,0442	hoch
ENSG00000147889	CDKN2A	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>	3,24	0,0000	0,0429	hoch
ENSG00000143546	S100A8	<i>S100 calcium binding protein A8</i>	2,77	0,0001	0,0462	hoch
ENSG00000134760	DSG1	<i>desmoglein 1</i>	2,70	0,0001	0,0462	hoch
ENSG00000189001	SBSN	<i>suprabasin</i>	2,38	0,0001	0,0442	hoch
ENSG00000221968	FADS3	<i>fatty acid desaturase 3</i>	1,96	0,0001	0,0462	hoch
ENSG00000049323	LTBP1	<i>latent transforming growth factor beta binding protein 1</i>	1,48	0,0001	0,0442	hoch

Ergebnisse

Tabelle 4: Liste der aktivierten Gene aus den RNA-Sequenzierungs-Daten: NHK vs. HPV49 E8- positive Zelllinien mit einem FDR<0,05.

Gen-ID	Symbol	Beschreibung	log2(FC)	p-Wert	FDR	Effekt
ENSG00000244509	APOBEC3C	<i>apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3C</i>	-1,59	0,0001	0,0442	runter
ENSG00000100065	CARD10	<i>caspase recruitment domain family, member 10</i>	-1,74	0,0001	0,0462	runter
ENSG00000165959	CLMN	<i>calmin (calponin-like, transmembrane)</i>	-1,87	0,0001	0,0462	runter
ENSG00000177706	FAM20C	<i>family with sequence similarity 20, member C</i>	-1,98	0,0001	0,0450	runter
ENSG00000120708	TGFBI	<i>transforming growth factor, beta-induced, 68kDa</i>	-2,01	0,0000	0,0429	runter
ENSG00000179403	VWA1	<i>von Willebrand factor A domain containing 1</i>	-2,05	0,0001	0,0462	runter
ENSG00000100092	SH3BP1	<i>SH3-domain binding protein 1</i>	-2,09	0,0000	0,0429	runter
ENSG00000129455	KLK8	<i>kallikrein-related peptidase 8</i>	-2,24	0,0001	0,0455	runter
ENSG00000135919	SERPINE2	<i>serpin peptidase inhibitor, clade E, member 2</i>	-2,57	0,0000	0,0429	runter
ENSG00000234745	HLA-B	<i>major histocompatibility complex, class I, B</i>	-2,62	0,0000	0,0429	runter
ENSG00000137440	FGFBP1	<i>fibroblast growth factor binding protein 1</i>	-2,78	0,0001	0,0451	runter
ENSG00000140853	NLR5	<i>NLR family, CARD domain containing 5</i>	-2,82	0,0001	0,0442	runter
ENSG00000064300	NGFR	<i>nerve growth factor receptor</i>	-2,83	0,0001	0,0450	runter
ENSG00000165092	ALDH1A1	<i>aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1</i>	-2,98	0,0000	0,0429	runter
ENSG00000075673	ATP12A	<i>ATPase, H+/K+ transporting, nongastric, alpha polypeptide</i>	-3,01	0,0001	0,0462	runter
ENSG00000156587	UBE2L6	<i>ubiquitin-conjugating enzyme E2L 6</i>	-3,11	0,0001	0,0442	runter
ENSG00000100985	MMP9	<i>matrix metalloproteinase 9</i>	-3,96	0,0001	0,0442	runter
ENSG00000113657	DPYSL3	<i>dihydropyrimidinase-like 3</i>	-4,51	0,0002	0,0479	runter
ENSG00000198934	MAGEE1	<i>melanoma antigen family E, 1</i>	-4,74	0,0001	0,0462	runter
ENSG00000087303	NID2	<i>nidogen 2 (osteonidogen)</i>	-4,87	0,0000	0,0429	runter
ENSG00000185885	IFITM1	<i>interferon induced transmembrane protein 1</i>	-5,75	0,0000	0,0429	runter
ENSG00000239713	APOBEC3G	<i>apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G</i>	-5,99	0,0002	0,0478	runter
ENSG00000168490	PHYHIP	<i>phytanoyl-CoA 2-hydroxylase interacting protein</i>	-6,03	0,0001	0,0442	runter
ENSG00000172716	SLFN11	<i>schlafen family member 11</i>	-6,09	0,0001	0,0442	runter
ENSG00000131620	ANO1	<i>anoctamin 1, calcium activated chloride channel</i>	-6,76	0,0000	0,0091	runter
ENSG00000198542	ITGBL1	<i>integrin, beta-like 1 (with EGF-like repeat domains)</i>	-7,06	0,0000	0,0429	runter
ENSG00000080166	DCT	<i>dopachrome tautomerase</i>	-8,74	0,0001	0,0462	runter
ENSG00000161281	COX7A1	<i>cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 1 (muscle)</i>	-11,27	0,0001	0,0462	runter

Ergebnisse

Die weitere Analyse der zellulären Gene wurde von stud. M.Sc. Meret Beyer im Rahmen Ihrer von mir ko-betreuten Masterarbeit durchgeführt.

Da keinerlei virale Transkriptomdaten von replizierenden beta-HPV Genomen in humanen Keratinozyten vorliegen, wurden diese in den RNA-Seq Datensätzen analysiert. Dazu wurden die Daten der RNA-Sequenzierung der HPV49 E8- positiven Zelllinien gegen das virale annotierte HPV49 Genom *aligned*.

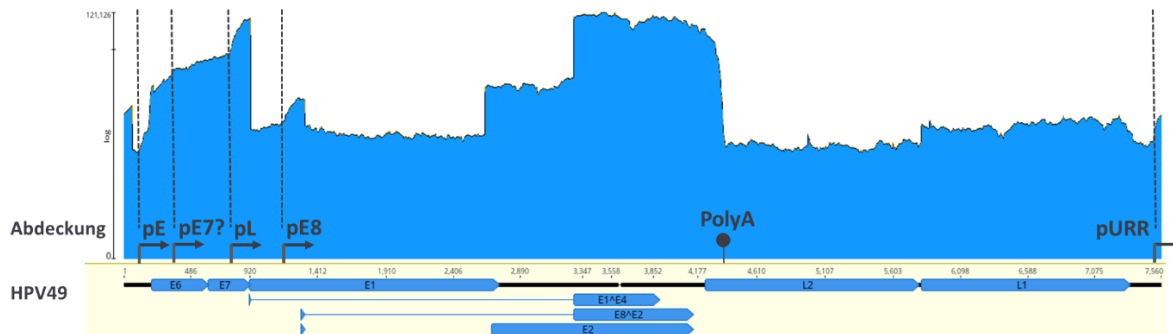


Abbildung 13: Logarithmierte Darstellung der Abdeckung der Daten auf dem annotierten HPV49 Referenzgenom.

Dargestellt sind die Ergebnisse dreier HPV49 E8- haltiger Zelllinien in der RNA-Sequenzierung. Die Darstellung wurde mit Geneious Prime (Version 2022.0.2, build: 2022-01-26 14:24) erstellt und um die potenziellen Promotoren (gewinkelte Pfeile) und die frühe Polyadenylierungsstelle (Strich mit Kreis) ergänzt.

Die Abdeckung mit viralen Transkripten zeigt quantitativ eine deutliche Bevorzugung einiger Teile des Genoms (**Abbildung 13**). Diese sind präferentiell von der URR über E6 und am Ende von E7, bis zum Spleißdonor in E1 (nt 926), und vom Spleißakzeptor in E4 (nt 3280) bis zum frühen PolyA in L2. Eine stärkere Abdeckung ist auch oberhalb und in E8 und am Anfang von E4 zu sehen (**Abbildung 13**). Außerdem kann die Identität der E8- Mutante bestätigt werden, da alle gemessenen Transkripte das mutierte Startkodon aufweisen. Die Startstelle des frühen Promotors (pE, *Early*) kann bei ca. nt. 167/186 lokalisiert werden, während ein möglicher separater Promotor für E7 bei ca. nt 350 liegen könnte. Die Transkriptmengen steigen ab ca. nt 786 in E7 steil an, was auf einen Promotor in diesem Bereich hindeutet (pL, *Late*). Der E8 Promotor (pE8) konnte im Bereich von nt 1178 lokalisiert werden, während ein Promotor, der für die Expression des URR-Exons verantwortlich ist, im Bereich von nt 7514 zu erkennen ist (pURR). Die Position des frühen PolyA-Signals kann ebenfalls durch die Analyse der Abdeckung genauer bestimmt werden. Die Mehrheit der Transkripte wird um die nt-Position 4330 am Anfang von L2 terminiert (**Abbildung 13**). Ein Sequenzvergleich mit HPV5 (<https://pave.niaid.nih.gov/index>), bei dem das PolyA-Signal an Position 4438 bereits lokalisiert wurde (Sankovski et al., 2014), lässt vermuten, dass das frühe PolyA-Signal von HPV49 um Nukleotid-Position 4323 liegt. Zusätzlich zu den bereits bekannten Spleiß-Verknüpfungen, ist auch ein häufig genutzter, neu detektierter Spleißdonor an nt-Position 217 am Anfang von E6 zu erkennen (**Tabelle 5, Abbildung 13, Abbildung 14**).

Um einen Überblick über die häufigsten gespleißten Transkripte zu erhalten wurde mit dem igv-Programm ein separater Sashimi-Plot aller insgesamt in allen drei Zelllinien detektierten Verbindungen erstellt. Zur besseren Übersicht wurden nur Verbindungen mit einer Abundanz von mindestens 39 in

Ergebnisse

die Abbildung eingeschlossen, was alle bisher bekannten Spleißverbindungen und alle vom neu detektierten Spleißdonor an Position 217 ausgehenden Verbindungen einschließt (**Abbildung 14**).

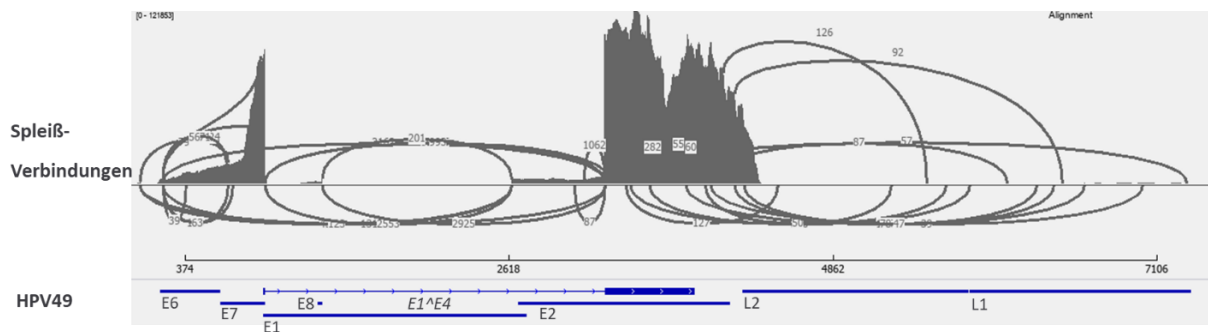


Abbildung 14: Sashimi-Plot (Spleißverbindungen und Transkriptabdeckung) aus RNA-Sequenzierungs-Daten dreier HPV49 E8- haltiger Zelllinien gegen das annotierte HPV49 Referenzgenom.

Die Darstellung wurde mit dem igv-Programm (*Inegrative Genomics Viewer*, Version 2.8.0 01/06/2020) ausgeführt. Die Beschriftung der viralen Gene und der annotierten Spleißverbindung ($E1^E4$) wurde ergänzt.

In meiner Analyse ist die $E1^E4$ Spleiß-Verbindung wie in früheren Analysen die Abundanteste (**Tabelle 5**). $E8^E2$ ist deutlich abundanter als $E1^E2$, welches an dritter Stelle auftaucht. An vierter Stelle wird ein $E6^E4$ Transkript detektiert, welches den neuen Spleißdonor an Position 217 nutzt. Dieser wird nicht nur in Verbindung mit dem abundantesten Spleißakzeptor in $E4$, sondern auch mit weiteren Akzeptoren in $E7$ und einem Akzeptor in $E1$ ($E6^E1$) genutzt. Die $E8^E2N$ Kombination kommt wie erwartet vor, und ist weniger abundant als die meisten anderen bisher bekannten Verbindungen. Die URR^E2 Kombination ist ebenfalls nachweisbar, ist hier aber noch weniger abundant als in den qPCR-Analysen (**Abbildung 6**, **Abbildung 7**, **Abbildung 9**). Zusätzlich sind weitere Verbindungen zu sehen, wie z.B. drei Verbindungen von $E4$ in den $L1$ Leserahmen ($E4^L1$, $E4b^L1b$, $E4c^L1c$). Außerdem eine abundante Verbindung in $E2$, die auf den Akzeptor in $E4$ spleißt, der auch für $E1^E4$ verwendet wird. Aus den hier gewonnenen Daten werden die Häufigkeiten für bereits bekannte und neue gespleißte Transkripte zusammengefasst (**Tabelle 5**).

Ergebnisse

Tabelle 5: Übersicht einiger Spleißverbindungen aus Daten der RNA-Sequenzierung von HPV49 E8-positiven Zelllinien nach absteigender Abundanz angeordnet. Die Tabelle wurde bis zu einer Abundanz von über 30 geführt. In früheren Experimenten gemessene und mit dem Spleißdonor in E6 genutzte Verbindungen sind markiert.

Transkript	Donor (nt)	Akzeptor (nt)	Abundanz
E1^E4	926	3281	89045
E8^E2	1321	3281	2925
E1^E2	926	2634	2553
E6^E4	217	3281	2162
URR^E4	62	3281	1317
E2^E4	3132	3281	1062
E1^E4b	926	3326	993
E4^L1	3460	5811	320
E4^E4	3603	3624	280
E8^E2N	1321	2634	201
E6^E7	217	669	183
E4b^L1b	3843	6603	155
E4^L2	3427	4479	127
E2^L2	4104	5508	126
E6^E7b	217	891	124
E6^E1	217	2634	123
L2^L1	4180	6447	92
E2b^E4	3068	3281	87
E2^L1	4017	6069	86
URR^E7	62	669	79
L2^L1b	4181	6268	78
E4b^L2b	3591	5641	72
E6^E7c	217	803	71
E6^E7d	217	703	63
E4^E4	3863	3840	59
E6^E7e	217	658	56
E4c^L1c	3432	7310	55
E4^E2	3517	4069	54
E2b^L2b	3974	5266	50
L2b^L1c	4246	6391	47
URR^E2	62	2634	43
E6^E6	217	377	39
E2^L1b	4015	7005	36
E1^L1	926	5811	33
E2c^E4	2708	3281	32
E4c^L2c	3489	5653	32

Um einen besseren Überblick über die neuen Spleißdonoren, Akzeptoren und die PolyA-Stelle zu erhalten wurde die Transkriptkarte für HPV49 aktualisiert (**Abbildung 6, Abbildung 15**). Darin ist der neue Spleißdonor an Position 217, und die Spleißdonor und Spleißakzeptor Kombination für das

Ergebnisse

häufigste $E4^{\wedge}L1$ Transkript, welches in etwa den bekannten Spleißverbindungen anderer beta-HPV entspricht (https://pave.niaid.nih.gov/explore/transcript_maps), die vier lokalisierten Promotoren (pURR, pEarly, pLate, pE8), der potenzielle E7 Promotor (pE7), sowie das frühe PolyA-Signal ergänzt.

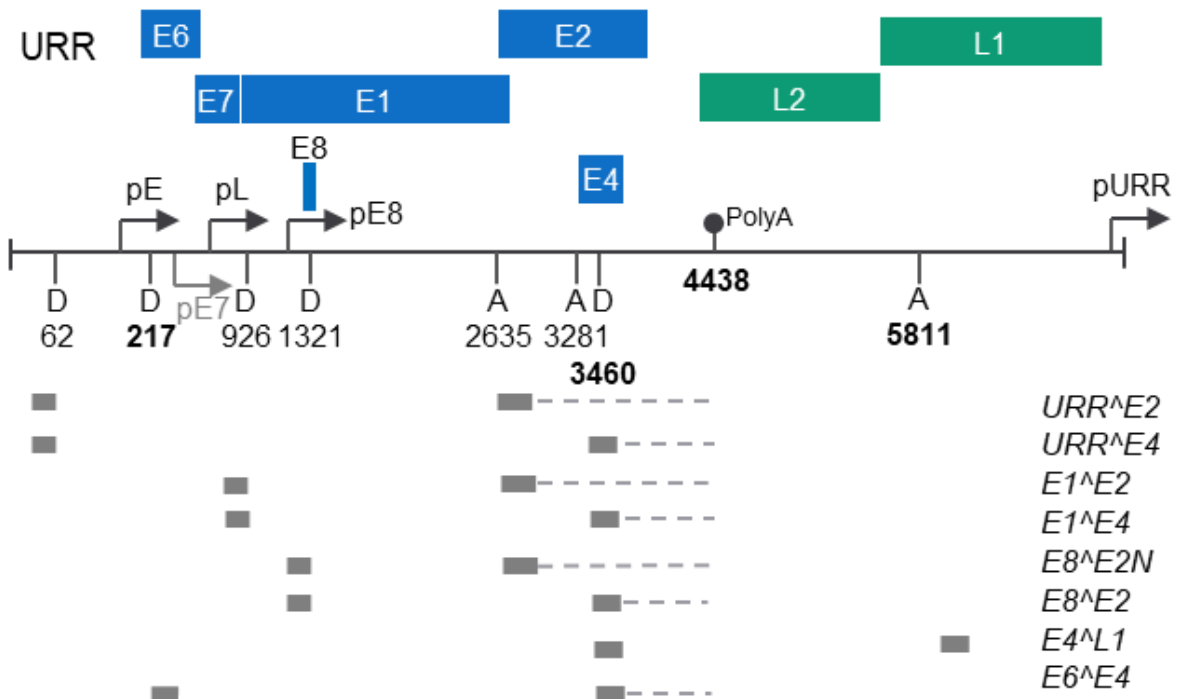


Abbildung 15: Erweiterte Transkriptkarte von HPV49.

Lineare Darstellung des HPV49 Genom. Die upstream regulatory region (URR), die frühen Gene (E1-E8) und die späten Gene (L1, L2) sind dargestellt. Die Positionen der neu identifizierten Donoren (D) und Akzeptoren (A) sind hervorgehoben. Exons sind als grauen Balken dargestellt, deren vermutete Verlängerung zur frühen Polyadenylierungsstelle (PolyA) sind als unterbrochene Balken zu sehen. Die neu lokalisierten Promotoren sind als gewinkelte Pfeile dargestellt. Der potenzielle E7 Promotor ist als grauer Pfeil eingezeichnet. Die neue Polyadenylierungsstelle ist als Kreis mit Strich auf dem linearen Genom dargestellt. **Abbildung 15** erweitert aus (Rehm et al., 2022)

6.3 Ein Spleißdonor im HPV49 E6 Gen beeinflusst die E6 Proteinmenge

In den RNA-Sequenzierungsdaten konnten alle in Kapitel 6.1 durch qPCR nachgewiesenen Spleiß-Verbindungen gefunden werden. Zusätzlich konnten ein neuer Spleißdonor am Anfang von *E6* (nt 217) kartiert werden, der überwiegend mit dem bereits bekannten Spleiß-Akzeptor in *E2/E4* (nt 3281) verknüpft wird (*E6^{ΔE4}*). Um die Expression des *E6^{ΔE4}* Transkriptes zu bestätigen, wurde ein passendes Primerpaar für qPCR-Analysen etabliert (HPV49 149 F und HPV49 3502R) und dann die Menge in Gesamt-RNA aus stabilen HPV49 *E8*- Zelllinien, oder in PolyA⁺-RNA aus transient HPV49 WT oder *E8*-transfizierten Zellen bestimmt (**Abbildung 16**). Dabei konnte bestätigt werden, dass das HPV49 WT Genom dieses Transkript in geringer Menge exprimiert. Das *E8*- Genom steigert die Expression auf das 372-fache an Tag drei bis zum 2493-fachen an Tag neun. Diese Steigerung kommt von einem stärkeren Anstieg bei *E8*-, und gleichbleibend hoher Menge, während das WT Genom auf Tag neun nach einem Anstieg auf Tag sechs bereits wieder leicht sinkt (**Abbildung 16 (B)**). Im Vergleich dazu exprimieren die immortalisierten HPV49 *E8*- Zelllinien noch höhere Mengen des gespleißten Transkriptes, was mit der hohen Kopienzahl und der Positivitätsrate konsistent ist.

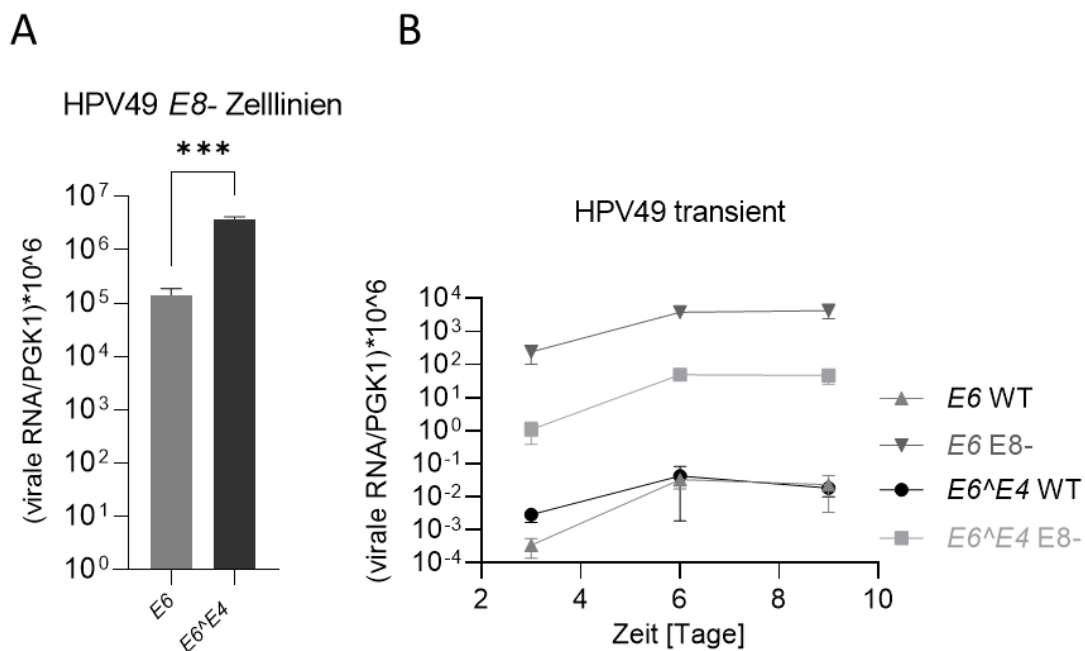


Abbildung 16: Quantifizierung des neuen HPV49 *E6^{ΔE4}* Transkriptes.

(A) In HPV49 *E8*- positiven Zelllinien. Die statistische Signifikanz wurde mittels eines Ein-Differenzen T-Test mit HPV49 WT als Referenz bestimmt (***) ($p < 0.001$).

(B) In PolyA-angereicherter RNA isoliert aus transient mit HPV49 WT oder *E8*- Genomen transfizierten NHKs drei, sechs und neun Tage nach Transfektion.

Die Fehlerbalken stellen den SEM dar.

Im Vergleich zur transienten Expression von *E6* Transkripten wird beim WT an Tag drei etwas mehr (8,55-fach) *E6^{ΔE4}* als *E6* exprimiert, wobei beide Mengen sehr gering sind, und Tag sechs und neun in

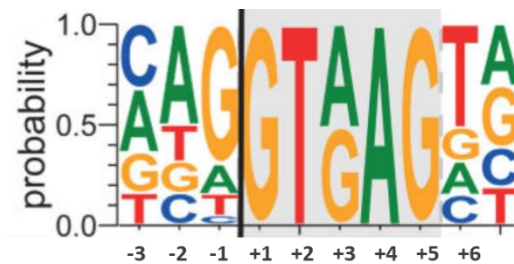
Ergebnisse

sehr ähnlichen Mengen. Bei dem *E8*- Genom ist an Tag drei ca. 224-mal, an Tag sechs 77,6-mal mehr, und an Tag neun ca. 92,9-mal mehr *E6* als *E6^{E4}* vorhanden (**Abbildung 7 (B)**, **Abbildung 16**).

Dies zeigt, dass *E6^{E4}* beim WT stärker als *E6* exprimiert, während es beim *E8*- Genom umgekehrt ist. Interessanterweise weisen die stabilen Zelllinien wiederum ein höheres Verhältnis von *E6^{E4}* zu *E6* auf (**Abbildung 16**).

Um herauszufinden, ob der Spleißdonor einen Einfluss auf die Expression des HPV49 E6 Proteins hat, wurde ein pSG5-3xHA-HPV49-*E6* Expressionsvektor erstellt, und die Spleißdonor Sequenz (Konsensussequenz G (-1) zu A und A (+3) zu T) mutiert, sodass es in der E6 Proteinsequenz stumm ist. Da aus Vorexperimenten bekannt war, dass WT E6 Protein nur sehr schlecht exprimiert wird (L. Brosch, Bachelorarbeit) wurde als Positivkontrolle für die Expression ein kodonoptimiertes E6 Expressionskonstrukt verwendet. Die Expressionskonstrukte wurden in der C33A Zelllinie und NHK nach Transfektion durch Western Blot-Analysen untersucht (**Abbildung 17**).

Tabelle 6: Vergleich der HPV49 E6 WT und mutierten Spleißdonorsequenzen mit der Konsensussequenz. Abbildung Konsensussequenz: (Sibley et al., 2016).



HPV49 E6 Variante	Sequenz
WT	AAG GTA TGT GAG
Kodon optimiert (co)	AAG GTG TGT GAA
Spleiß-Donor mt (SD217mt)	AAA GTT TGT GAG

Ergebnisse

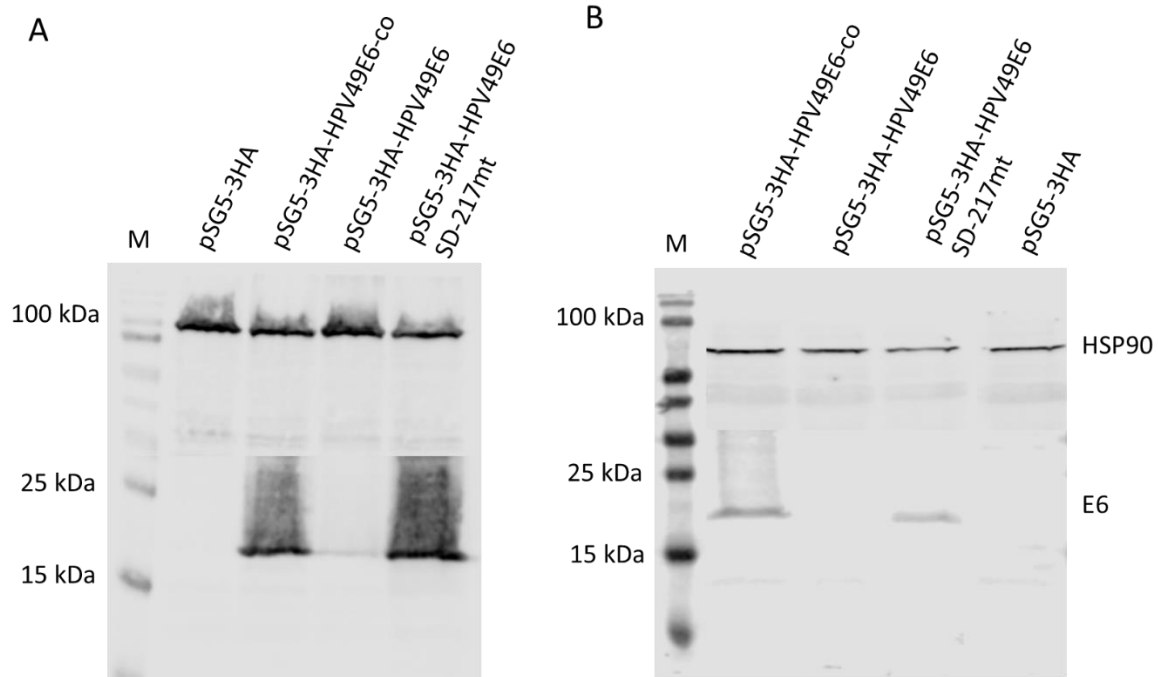


Abbildung 17: Expression von HA-markierten HPV49 E6 Mutanten.

Western-Blot von RIPA-Extrakten aus HA-markierten HPV49 E6 transfizierten Zellen. Der primäre Antikörper detektiert den HA-Tag. Die Beladung und Zellextraktion wurden mit einem HSP90-Antikörper kontrolliert (anti-HSP90-Maus, Santa Cruz).

(A) Transfektion von je 3 µg DNA (mit 7,5 µl FuGene) auf eine 60 mm Zellkulturschale C33A Zellen.

(B) Transfektion von je 5 µg Plasmid-DNA auf eine 60 mm Zellkulturschale NHKs.

Die Western-Blot Analysen zeigen deutlich, dass das HA-markierte HPV49 E6 in etwa die berechnete Größe von 19,9 kDa hat. Die Mutation des Spleißdonors an Position 217 (**Tabelle 6; Abbildung 17**) erhöht die Menge im Verhältnis zum WT E6 um ca. das 11-fache in C33A und das 262-fache in NHKs. Ebenso erhöht die Kodonoptimierung des HPV49 E6 Leserahmens die Menge an detektierbarem E6 deutlich um ca. das 12-fache in C33A und das 375-fache in NHKs (**Abbildung 17**). Dies zeigt, dass der Spleiß-Donor in E6 die Menge an E6 Protein reguliert. Die Kodonoptimierung führt zu einer ähnlichen Steigerung der Menge wie die Mutation des Donors. Da die Kodonoptimierung an Position +3 mutiert ist, könnte die erhöhte Menge nicht nur auf die Kodonoptimierung, sondern ebenfalls auf verändertes Spleißen zurückzuführen sein.

6.4 HPV49 E6 kann die Transkriptionsaktivierung durch MAML1 beeinflussen

Alle bisher untersuchten beta-HPV E6 Proteine, einschließlich HPV49 E6, interagieren mit dem zellulären MAML1-Protein. Zusätzlich wurde für HPV8 und HPV38 E6 beschrieben, dass dies die Transkriptionsaktivierungsfunktion von MAML1 beeinträchtigt (Tan et al., 2012b). Um zu untersuchen, ob die erhöhte E6 Proteinmenge durch Mutation des SD an nt 217 mit einer verstärkten Inaktivierung von MAML1 korreliert, wurde ein Reporterassay genutzt, in dem ein Gal4-MAML1 Fusionsprotein einen Luziferase-kodierenden Reporter über Bindung an Gal4-DNA Bindungsstellen aktiviert (Brimer et al., 2017). Durch den Einfluss der E6 Proteine auf MAML1 kann die Aktivierung und somit das Luziferasesignal reduziert werden (**Abbildung 18**).

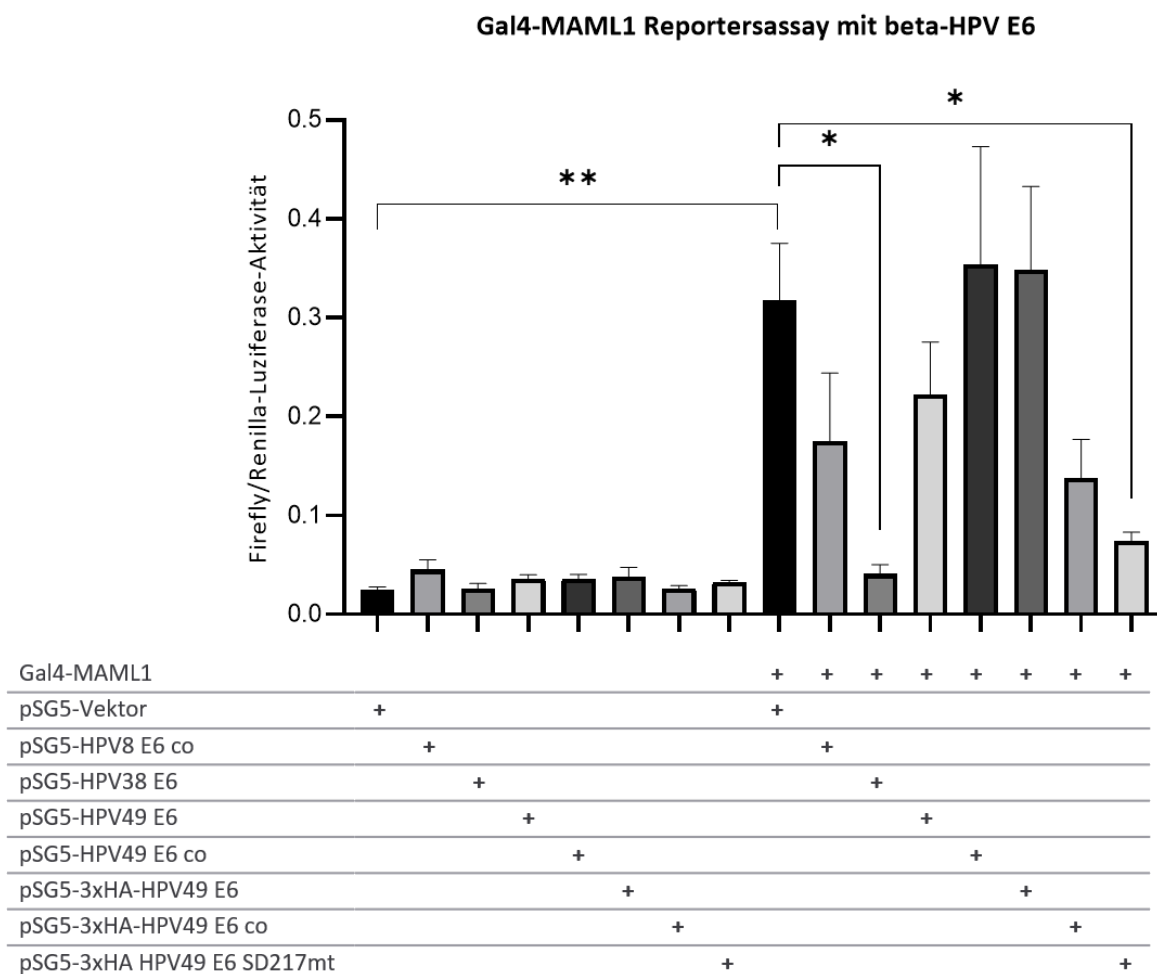


Abbildung 18: Reporterassay zur Analyse des Einflusses unterschiedlicher beta-HPV E6 auf die Transkriptionsaktivierung durch MAML1.

Luziferaseassay in C33A-Zellen mit je 400 ng Vektor oder E6-Expressionskonstrukt, 10 ng Renilla-Expressionsplasmid, 100 ng Gal4-Luziferase-Reporter (pC18-SP1-4xGal4-BS-Luziferase). Alle Bedingungen wurden je mit und ohne 200 ng Gal4-MAML1-Expressionskonstrukt transfiziert. Es wurde zur Überprüfung der statistischen Signifikanz ein Differenzen-T-Test mit dem pSG5-Vektor in Kombination mit Gal4-MAML1 je als Referenz bestimmt (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). Die Fehlerbalken entsprechen dem SEM. Wiederholungen: $n=5$ für HPV8, 49 E6-3xHA und 49 E6 SD217mt-3xHA, $n=6$ für 38, 49 E6; $n=7$ für 49 E6 co und 49 E6 co-3xHA.

Ergebnisse

Als Positivkontrollen wurden pSG5-basierte Expressionsplasmide für HPV8 und 38 verwendet (**Abbildung 18**). Die Induktion des Reporterplasmids durch Gal4-MAML1 wird durch HPV8 und 38 E6 deutlich verringert. Dabei ist für HPV8 ein Trend zu sehen ($p=0,16$), während die Repression durch HPV38 E6 signifikant ist. Im Gegensatz dazu zeigt HPV49 E6 nur einen schwachen Trend ($p=0,38$), 49 E6co keine Veränderung, ebenso wie das HA-markierte HPV49 E6. Das HA-markierte 49 E6co zeigt im Vergleich zum Vektor eine Abnahme, die zwar nicht signifikant ist, aber einen Trend aufweist ($p=0,15$). Die HA-markierte HPV49 E6SD-Mutante zeigt eine signifikante Inhibition von MAML1. Die Unterschiede der HA-markierten E6 Proteine korrelieren mit einer verbesserten Expression und unterstützen die Idee, dass der *E6 SD* die Menge an E6 Protein reguliert (**Abbildung 17, Abbildung 18**). Die Abwesenheit eines Effekts bei E6co könnte darauf zurückzuführen sein, dass dieser Vektor weniger E6 Protein als die HA-markierte-E6co Variante produziert. Da unmarkiertes HPV49 E6 derzeit nicht nachgewiesen werden kann und keine weiteren funktionellen Assays für HPV49 E6 existieren, kann keine abschließende Aussage getroffen werden, ob der *E6 SD* die Menge an E6 Protein beeinflusst.

6.5 Die Immortalisierung durch das HPV49 Genom wird nicht nur durch E8^{E2}, sondern auch durch den Spleißdonor in E6 beeinflusst

Als nächstes wurde die HPV49 E6 SD217 Mutation in das HPV49 WT und E8- Genom eingefügt, um herauszufinden, ob dies die Immortalisierungskompetenz verändert. Anschließend wurden HPV49 WT, E8-, SD217mt und E8-/SD217mt Genome in zwei unabhängigen Immortalisierungsassays getestet (Frattini et al., 1996). Wie bereits beschrieben kann nur das E8-, aber nicht das WT Genom immortalisieren. Interessanterweise immortalisiert auch das SD217mt Genom nicht, führt aber in Kombination mit der E8- Mutation zu einem Verlust der Immortalisierung (**Tabelle 7**).

Tabelle 7: Immortalisierungsassay mit HPV49 WT, E8- und Genomen mit SD-Mutation.

HPV Genom:	Donor #1	Donor #2
HPV49 WT	-	-
HPV49 E8-	+	+
HPV49 WT SD217mt	-	-
HPV49 E8- SD217mt	-	-

Dies deutet darauf hin, dass die erhöhte Menge an E6, die durch diese Variante hergestellt werden könnte, allein nicht ausreicht für die Immortalisierung (**Abbildung 17**). Dass auch die HPV49 E8-/SD217mt Kombination die Zellen nicht mehr immortalisiert, könnte bedeuten, dass eine weitere Erhöhung der Menge an E6 die Immortalisierung behindert.

6.6 Retroviral exprimierte HPV49 E6, E7 und E6-Spleißdonor-Mutanten Kombinationen immortalisieren NHKs

Da die HPV49 WT und auch SD217mt Genome keine Immortalisierungsaktivität zeigten, wurde versucht den Einfluss des SD217 mit Hilfe von retroviralen Vektoren zu untersuchen, da bekannt war, dass retrovirale Expression von HPV49 WT E6/E7 NHKs immortalisieren kann (Minoni et al., 2020). Um verschiedene HPV49 E6 mit HPV49 E7 kombinieren zu können, wurden getrennte Vektoren für beide Proteine eingesetzt.

Die Transduktion von NHK mit den rekombinanten Retroviren und Antibiotikumsselektion ergab, dass die Kombination von HPV49 E7 mit HPV49 E6, E6co oder E6-SD217mt NHKs immortalisiert (**Tabelle 8**). HPV49 E7 allein verlängert die Lebensspanne in zwei unabhängigen Experimenten, aber führt nicht zur Immortalisierung.

Tabelle 8: Immortalisierungsassay nach retroviraler Infektion von HPV49 E6 und E7.

+: Immortalisierung, -: keine Immortalisierung. (n=2).

Retrovirale Expressionsvektoren		Donor#1	Donor#2
HPV49 E6	HPV49 E7	+	+
HPV49 E6co	HPV49 E7	+	+
HPV49 E6 SD217mt	HPV49 E7	+	+
-	HPV49 E7	-	-

Um herauszufinden, ob eine erhöhte Expression von E6 das Wachstumsverhalten verändert, wurden Wachstumskurven der entstandenen Zelllinien, bzw. der Zellen mit längerer Lebensspanne erstellt (**Abbildung 19**).

Wachstumskurven

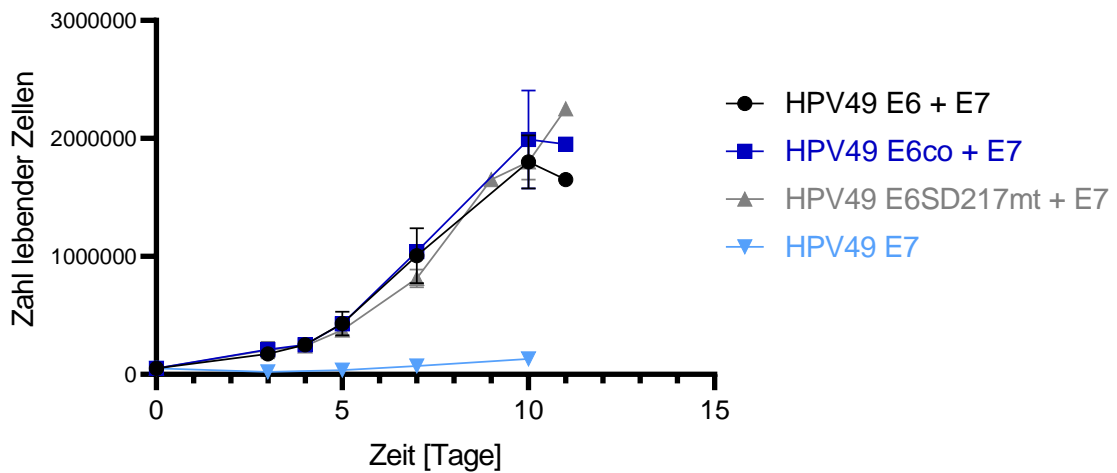


Abbildung 19: Wachstumskurven von HPV49 E6 und E7 exprimierenden Keratinozyten.

Es wurden drei technische Replikate der Zelllinien von Donor#1 für alle *E6/E7*-Kombinationen; bzw. eine Wachstumskurve für *E7* allein durchgeführt (da keine Immortalisierung stattgefunden hat). Die Fehlerbalken entsprechen dem SEM.

Wie deutlich zu sehen ist, führt die Anwesenheit von *E6* zu einem schnellerem Zellwachstum. Erstaunlicherweise zeigen die unterschiedlichen HPV49 *E6* Konstrukte in Kombination mit *E7* sehr ähnliche Wachstumsgeschwindigkeiten. Dies legt nahe, dass unterschiedliche *E6* Mengen in diesem System weder einen Einfluss auf Immortalisierung noch Zellproliferation haben.

Eine alternative Erklärung für den Verlust der Immortalisierungsaktivität des *E8/SD217mt* Genoms wäre, dass das *E6^{E4}* Transkript zur Expression eines bisher unbekanntes viralen Proteins führt, welches Immortalisierung beeinflusst. Durch die neue Spleißverbindung kann potenziell ein bisher nicht beschriebenes 55 Aminosäuren langes Peptid, welches aus dem Anfang von *E6* (AS 1-6) und dem mit den *E2* und *E4* Genen überlappendem Leserahmen besteht, produziert werden, welches im Folgenden *E6^{E9}* genannt wird (**Abbildung 20**). Eine BLAST-Suche identifizierte keine bekannten Proteindomänen oder Ähnlichkeiten zu anderen Proteinen (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

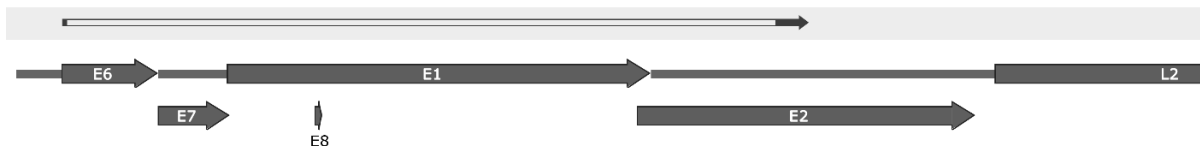


Abbildung 20: Alignment des HPV49 E6^{E9} Peptids mit dem annotierten HPV49 Referenzgenom.

Abbildung generiert mit SnapGene (Version 4.1.9).

6.7 Transkriptionseigenschaften von beta-HPV8 und 38 Genomen in humanen Keratinozyten (Rehm et al., eingereicht)

6.7.1 HPV8 und HPV38 WT und *E8*- Genome immortalisieren NHKs nicht

Da gezeigt werden konnte, dass die Inaktivierung des E8^{E2} Repressors (*E8*-) im HPV49 Genom zur Immortalisierung von NHK führt, wurde untersucht, ob dies ein unter beta-HPV konservierter Phänotyp ist. Es wurde der bereits beschriebene Immortalisierungsassay verwendet (Rehm et al., 2022). Darin wurden der beta1-Typ HPV8, da dieser weit verbreitet in EV-Patienten vorkommt, und dafür als Modell-HPV genutzt wird (Bzhalava et al., 2013; Borgogna et al., 2014b; Lutzner et al., 1984), und der beta2-Typ HPV38, da dieser immortalisierende E6 und E7 Proteine kodiert, getestet (Caldeira et al., 2003; Muench et al., 2010). Dazu wurde durch Mutation des Startkodons von ATG zu ACG ein HPV38 *E8*- Genom konstruiert, was stumm im überlappenden *E1* Leserahmen ist. Außerdem wurde das HPV8 *E8*- Genom eingesetzt, welches in NHK überrepliziert (Dreer et al., 2016). Die religierten HPV8 und 38 WT und *E8*- Genome wurden mit einem Selektionsplasmid in NHKs dreier verschiedener Spender kotransfiziert und selektioniert. Das HPV49 *E8*- Genom wurde als Positivkontrolle genutzt, und resultierte in resistenten Kolonien, die zu stabilen Zelllinien expandiert werden konnten. Interessanterweise führten weder HPV8 noch HPV38 WT oder *E8*- Genome zu resistenten Kolonien, die weiter passagiert werden konnten (**Tabelle 9**). Für HPV8 sind die Ergebnisse konsistent mit dem Mangel an immortalisierungskompetenten E6 und E7 Proteinen (Schmitt et al., 1994). Das Ergebnis für HPV38 ist hingegen überraschend, da die retrovirale Expression der E6 und E7 Proteine NHK immortalisieren kann (Caldeira et al., 2003; Muench et al., 2010).

Tabelle 9: *NHK Immortalisierungsassay mit verschiedenen HPV Genomen.* Die Tabelle und Beschriftung wurden angepasst aus einer Publikation der Autorin (Rehm et al., 2022b).

HPV Genom:	Donor #1	Donor #2	Donor #3
HPV49 <i>E8</i> -	+	+	+
HPV8 WT	-	-	-
HPV8 <i>E8</i> -	-	-	-
HPV38 WT	-	-	-
HPV38 <i>E8</i> -	-	-	-

6.7.2 HPV8 und HPV38 exprimieren mehrere gespleißte mRNAs in transfizierten NHK für mehrere Tage

Um zu überprüfen, ob HPV8 und 38 in NHKs *in-vitro* transkriptionell aktiv sind, wurde ein qPCR-Assay für sechs vorhergesagte oder experimentell validierte Spleißverbindungen etabliert (URR^E2 , URR^E4 , $E1^E2$, $E1^E4$, $E8^E2N$, $E8^E2$) (**Abbildung 21**). RNA wurde aus Zellen isoliert drei, sechs, oder neun Tage nach Transfektion mit WT Genomen und mittels RT-qPCR-Analyse untersucht (**Abbildung 21 (A)**). Sequenzierung der Amplifikate bestätigte die vorhergesagten Spleißübergänge (**Abbildung 21 (B)**). Quantifizierung der unterschiedlichen Spleißverbindungen zeigte, dass an allen Zeitpunkten $E1^E4$ das abundanteste Transkript. Das HPV8 URR^E2 Transkript hingegen war an Tag drei das zweit-abundanteste, und an Tag sechs und neun das am wenigsten vorhandene. Das URR^E4 Transkript bei HPV8 war das dritt-abundanteste zu Beginn, und ist im weiteren Verlauf das zweit-abundanteste. HPV8 $E1^E2$ war das viert-häufigste Transkript an Tag drei und sechs, während es an Tag acht auf Platz drei ist. Das HPV8 $E8^E2$ Transkript ist das fünft-abundanteste an Tag drei, und an Tag sechs und neun das dritt-abundanteste. Bei HPV38 ändern sich hingegen die relativen Mengen nur geringfügig. Das häufigste Transkript ist auch hier $E1^E4$, gefolgt von URR^E4 , $E1^E2$, URR^E2 , $E8^E2$ und $E8^E2N$. Nur URR^E4 und $E1^E4$ ändern ihre Positionen. Diese sind an Tag drei auf Positionen eins und zwei, und tauschen dies auf Tag sechs. Insgesamt legen diese Daten nahe, dass HPV8 und HPV38 transkriptionell aktiv sind und über mehrere Tage mehrere gespleißte Transkripte in NHKs exprimieren.

Ergebnisse

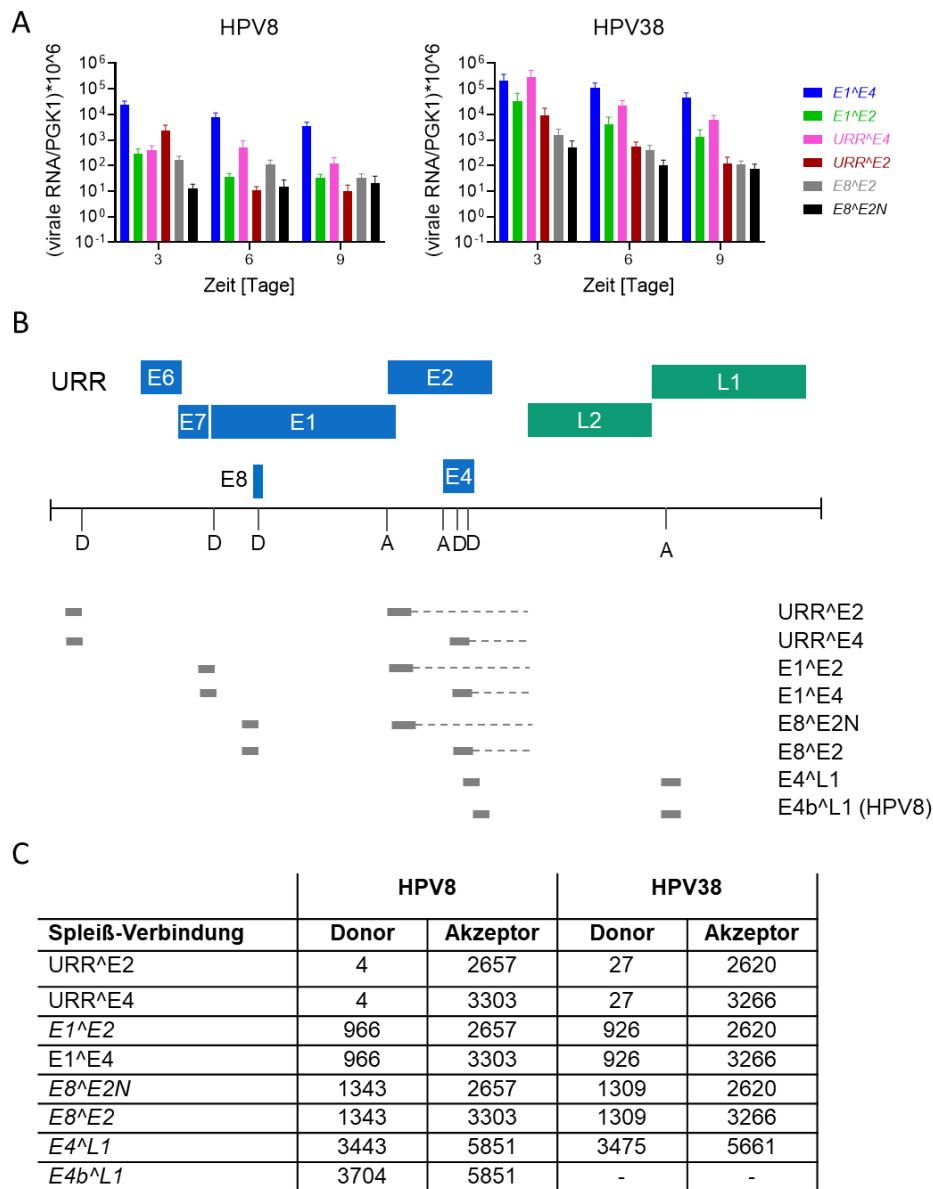


Abbildung 21: qPCR Analyse transient mit HPV8 oder 38 Genomen transfizierten NHKs mit Transkriptkarte und annotierten Spleißdonoren und Akzeptoren.

- (A) Religierte HPV8 oder 38 Genome wurden unabhängig in vier NHKs unterschiedlicher Spender transfiziert, nach drei, sechs und neun Tagen geerntet und Transkripte mittels qPCR gemessen. PGK1 wurde als Referenztranskript genutzt.
- (B) Transkriptkarten von HPV8 und 38. Das Genom ist linear dargestellt. Die URR (upstream regulatory region), die frühen Gene (E1-E8) und die späten Gene L1 und L2 sind zu sehen. Die durch qPCR und Sequenzierung bestimmten Transkripte sind als graue Balken abgebildet, während die vermutlichen Verlängerungen dieser Transkripte bis zur frühen Polyadenylierungsstelle durch unterbrochene Linien dargestellt sind. Die potenziellen Donor (D) und Akzeptor (A) Positionen sind ebenfalls eingezeichnet.
- (C) Die Nukleotid-Positionen der Spleißdonoren und Akzeptoren für HPV8 und 38 sind tabellarisch zusammengefasst. Dabei wird beim Donor die letzte Position, beim Akzeptor die erste Position des Exons benannt.

Abbildung 21 und die entsprechende Beschriftung wurde angepasst aus einer Publikation der Autorin (Rehm et al., 2022b).

6.7.3 Die Inaktivierung von E1, E2 oder E8^E2 beeinflusst die Genexpression von HPV8 und HPV38

Zusätzlich zu E8^E2 (*E8-*) wurden das E1 (*E1-*), das E2 (*E2-*), E6 (*E6-*) und E7 (*E7-*) Gen jeweils inaktiviert durch Mutation der entsprechenden Startkodons, ohne dadurch die Aminosäuresequenz in überlappenden Leserahmen zu verändern. Die HPV8 WT und mutierten Genome wurden unabhängig in NHKs vier verschiedener Donoren transfiziert und drei, sechs, und neun Tage danach mittels qPCR gespleißte Transkripte gemessen (**Abbildung 22**). Die *E8-* Genome zeigten an mindestens einem Zeitpunkt signifikant höhere Expressionsmengen bei allen Transkripten, außer bei *E8^E2N*. Dieser Phänotyp ist konsistent mit der höheren Replikation und Transkription in HPV49 *E8-* in NHK (Rehm et al., 2022). So wurden bei *E8-* fünf-fach höhere *E1^E4* Werte als beim WT drei Tage nach Transfektion, 27-fach höhere nach sechs Tagen und 103-fach höhere nach neun Tagen gemessen. Dieser Anstieg resultiert aus einem Anstieg bei *E8-* und einem Abfall beim WT über die Zeit. Dahingegen zeigen die *E1-* und *E2-* Genome signifikant geringere *E1^E4* Transkriptmengen und die *E2-* zusätzlich manchmal geringere *E1^E2* und *E8^E2* Mengen. E1 und E2 sind konservierte PV Proteine. Aufgrund der bekannten Funktionen ist der verringerte *E1^E4* Phänotyp vermutlich auf geringere Replikation der mutierten Genome zurückzuführen. Daraus kann indirekt geschlossen werden, dass das HPV8 WT Genom in NHKs repliziert. Interessanterweise zeigen die *E7-* Genome signifikant geringere Expressionsmengen nur an Tag drei, von *URR^E4*, *E1^E4* und *E1^E2* Transkripten. Im Gegensatz dazu zeigt das *E6-* Genom keinen transkriptionellen Phänotyp.

Für HPV38 wurde zunächst der Replikationsphänotyp des *E8-* Genoms mittels Southern Blot-Analyse nach Transfektion in NHKs untersucht. Dazu wurde die DNA mit DpnI behandelt. Der Blot zeigt für HPV38 *E8-*, vergleichbar mit HPV8 und HPV49 *E8-* (Dreer et al., 2016; Rehm et al., 2022), eine prominente Bande replizierter DNA sechs Tage nach Transfektion, die beim WT nicht zu sehen ist (**Abbildung 23 (A)**). Damit konnte bestätigt werden, dass HPV38 *E8-* Genome deutlich stärker replizieren als der WT, was konsistent mit der höheren Expression der meisten viralen Transkripte ist (**Abbildung 23 (B)**). Der relative Anstieg der *E1^E4* Transkripte bei *E8-* gegenüber dem WT war jedoch weniger drastisch als bei HPV8 (fünf-fach an Tag sechs und 25-fach an Tag neun), was für einen funktionellen Unterschied zwischen diesen HPV Typen spricht. Ähnlich wie bei HPV8 war jedoch, dass *E1-* und *E2-* Genome signifikant reduzierte Expressionslevel mehrerer viraler Transkripte zeigen, was vermuten lässt, dass auch die WT Genome bis zu einer gewissen Menge replizieren, die aber unterhalb der Detektionsgrenze des Southern Blots liegt. Ähnlich wie bei HPV8 zeigen auch hier die *E6-* Genome keinen transkriptionellen Phänotyp. Die *E7-* Genome zeigen nur bei *E1^E2* eine signifikante Reduktion der Menge an Transkript drei Tage nach Transfektion.

Ergebnisse

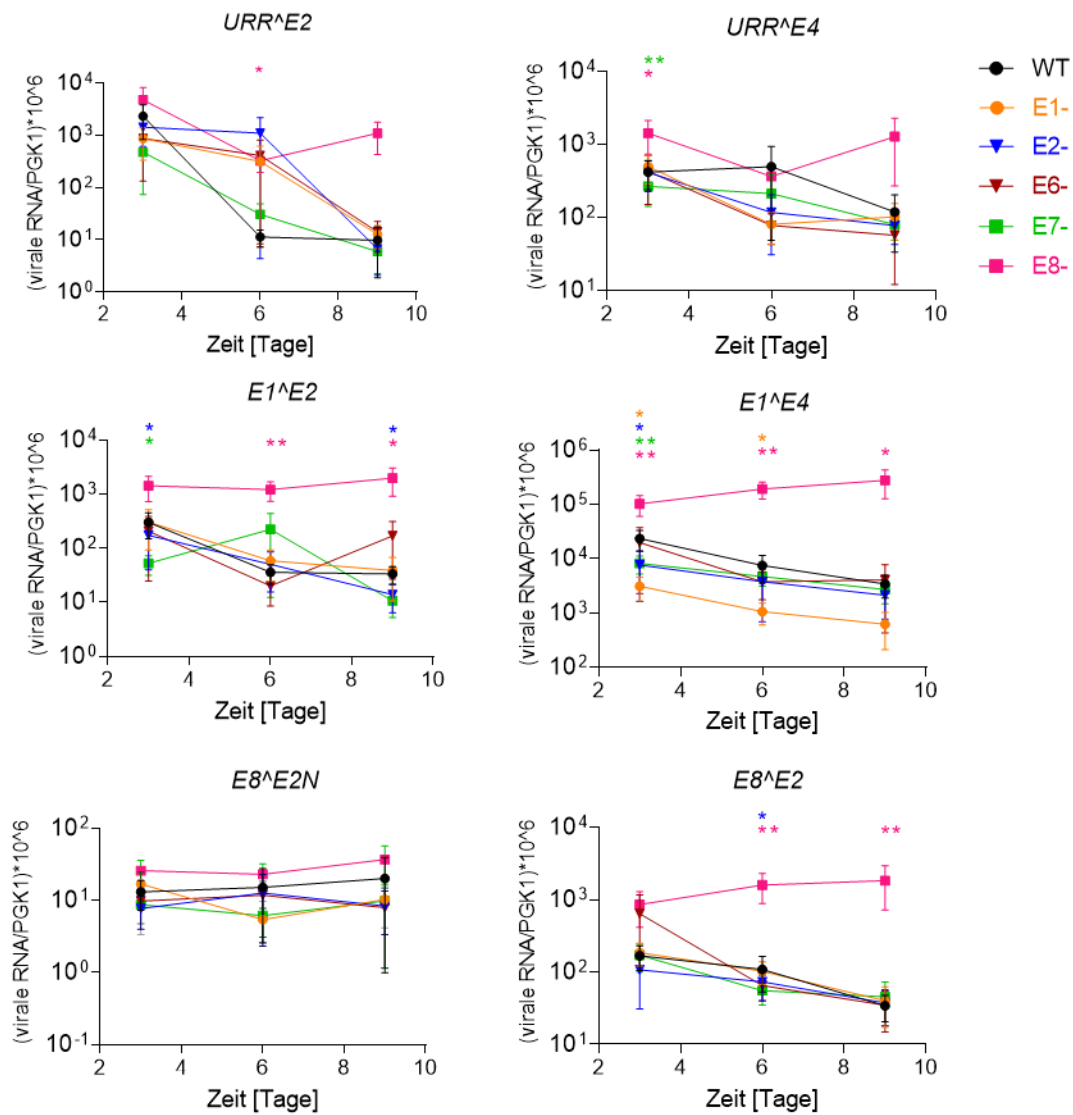


Abbildung 22: QPCR-Analyse von gespleißten HPV8 Transkripten in NHK.

Die Transkripte wurden drei, sechs und neun Tage nach Transfektion mit HPV8 WT, E1-, E2-, E6-, E7- und E8- Genomen gemessen. PGK1 wurde als Referenztranskript verwendet. Das Experiment wurde viermal unabhängig mit NHKs verschiedener Spender durchgeführt. Die Fehlerbalken entsprechen dem SEM. Die statistische Signifikanz wurde mittels eines Differenzen T-Test mit HPV49 E8- als Referenz bestimmt (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). **Abbildung 22** und die entsprechende Beschriftung wurde aus einer Publikation der Autorin übernommen und angepasst (Rehm et al., 2022b).

Ergebnisse

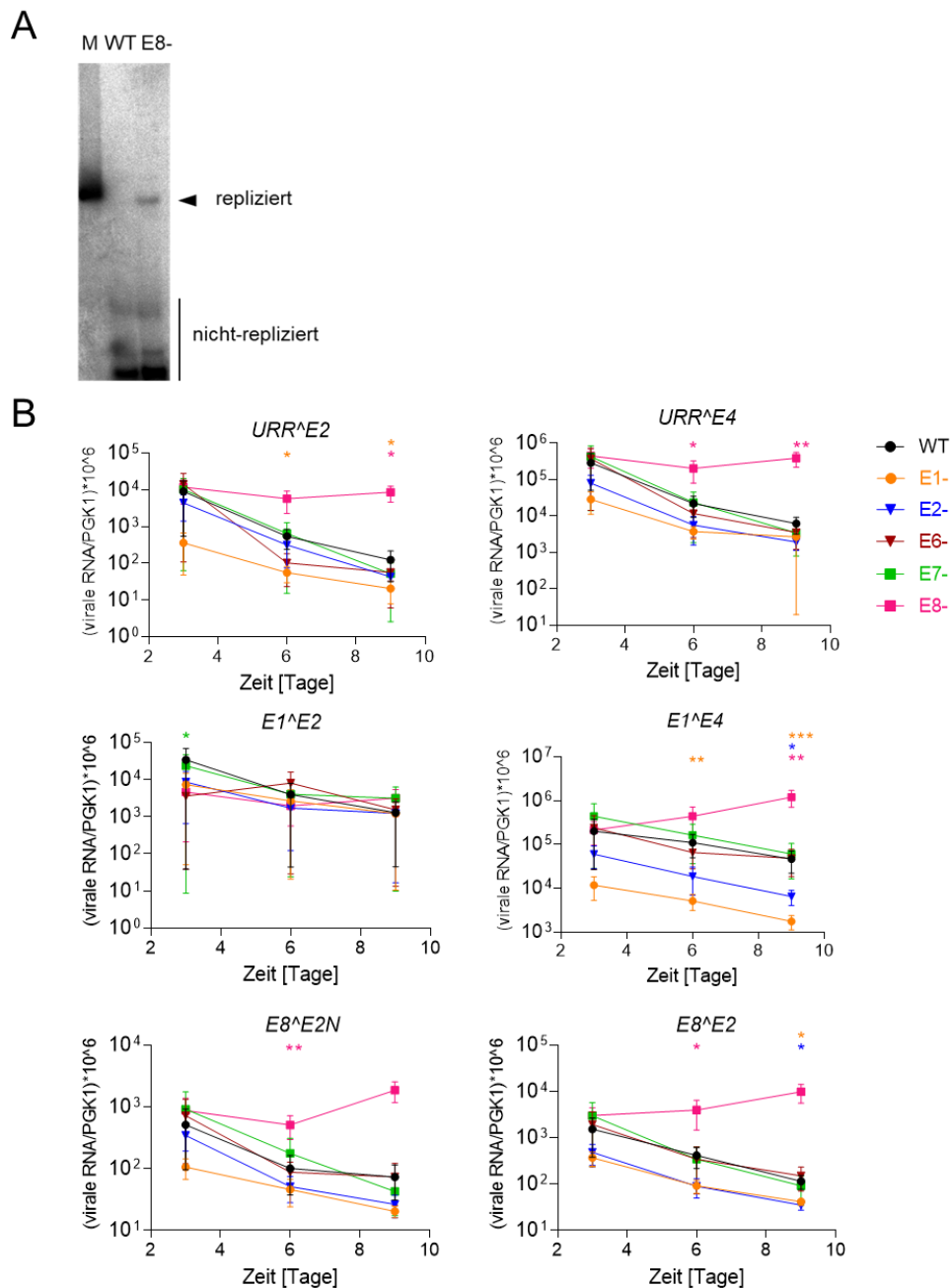


Abbildung 23: HPV38 Southern-Blot und qPCR-Analyse von gespleißten Transkripten in NHK.

(A) Southern-Blot Analyse von niedermolekularer DNA. Die DNA wurde sechs Tage nach Transfektion von HPV38 WT und E8- Genomen in NHKs isoliert, mit DpnI verdaut, um nicht replizierte transfizierte DNA abzubauen, und mit Eco105I linearisiert. Als Marker (M) wurde 100 µg linearisiertes HPV38 Genome eingesetzt. Der Pfeil zeigt die Position replizierter Genome an, während die nicht replizierte DNA sich am unteren Rand befindet.

(B) Die Transkripte wurden drei, sechs und neun Tage nach Transfektion mit HPV38 WT, E1-, E2-, E6-, E7- und E8- Genomen gemessen. PGK1 wurde als Referenztranskript verwendet.

Das Experiment wurde viermal unabhängig mit NHKs verschiedener Spender durchgeführt. Die Fehlerbalken entsprechen dem SEM. Die statistische Signifikanz wurde mittels eines Differenzen T-Test mit HPV49 E8- als Referenz bestimmt ($p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$). **Abbildung 23** und die entsprechende Beschriftung wurde aus einer Publikation der Autorin übernommen und angepasst (Rehm et al., 2022b).

6.7.4 Die HPV8 und 38 WT und E8- Genome exprimieren E6 und E7 Transkripte

Zur Immortalisierung von NHKs müssen E6 und E7 Proteine exprimiert werden. Aus diesem Grund wurden E6 und E7 Transkripte von HPV8 und 38 WT und E8- Genomen analysiert. Die RNA wurde PolyA-aufgereinigt, um den Hintergrund transfizierter DNA zu verringern, und mittels RT-qPCR gemessen (**Abbildung 24 (A)**). HPV8 und 38 Genome exprimieren E6 in ähnlichen Mengen. Diese sinken leicht von Tag drei auf Tag neun. HPV8 E8- exprimiert dabei immer etwas mehr E6 (3,5 bis 12,2-fach mehr), als der WT. Die Expression steigt von Tag drei auf Tag sechs, und bleibt konstant im Gegensatz zum WT. HPV38 E8- Genome exprimieren an Tag sechs und neun mehr E6 wie der WT, dies ist jedoch nicht statistisch signifikant. Ähnlich wie bei HPV8 E8-, sinken die E6 Mengen nicht über die Zeit. HPV8 und 38 WT Genome exprimieren E7 Transkripte. Die Menge sinkt drei- bis vier-fach von Tag drei auf Tag neun. Im Vergleich zu E6 exprimieren HPV38 WT Genome zwei- bis drei-mal mehr E7 als HPV8 WT. Die HPV8 E8- Genome haben signifikant mehr E7 Transkripte als der WT (4,3 bis 20,1-fach). Die Expression ist stabil über die Zeit, ähnlich zu anderen viralen Transkripten (**Abbildung 24 (A)**). Die E7 Mengen von HPV38 E8- Genomen steigen über die Zeit, sind aber nur an Tag neun signifikant höher als der WT (**Abbildung 24 (A)**). Insgesamt gesehen sind die Menge an E6 Transkripten immer niedriger als die der E7 Transkripte. Um zu verstehen, ob die Transkripte mit der Immortalisierung von NHK korrelieren, wurden die E6 und E7 Mengen der E8- Genome mit denen von HPV49 E8- verglichen (**Abbildung 24 (B)**). Dieser Vergleich legt nahe, dass HPV8 E8- an jedem Zeitpunkt die höchste Anzahl an E6 Transkripten exprimiert, während HPV38 und 49 E8- ähnliche Mengen an Tag sechs und neun nach Transfektion enthalten. Das E7 Transkript verhält sich anders. Drei Tage nach Transfektion sind die Mengen verschieden, während sie an Tag neun sehr ähnlich sind. Zusammengefasst bedeutet dies, dass die fehlende Immortalisierung von HPV38 WT und E8- Genomen nicht an mangelnder Expression von E6 und E7 Transkripten liegen kann. Der Vergleich zeigt auch, dass die Menge an E6 und E7 zwischen HPV38 und 49 E8- ähnlich ist. Dies legt nahe, dass die fehlende Immortalisierung nicht durch unterschiedliche Mengen an E6 und E7 Transkripten zu erklären ist.

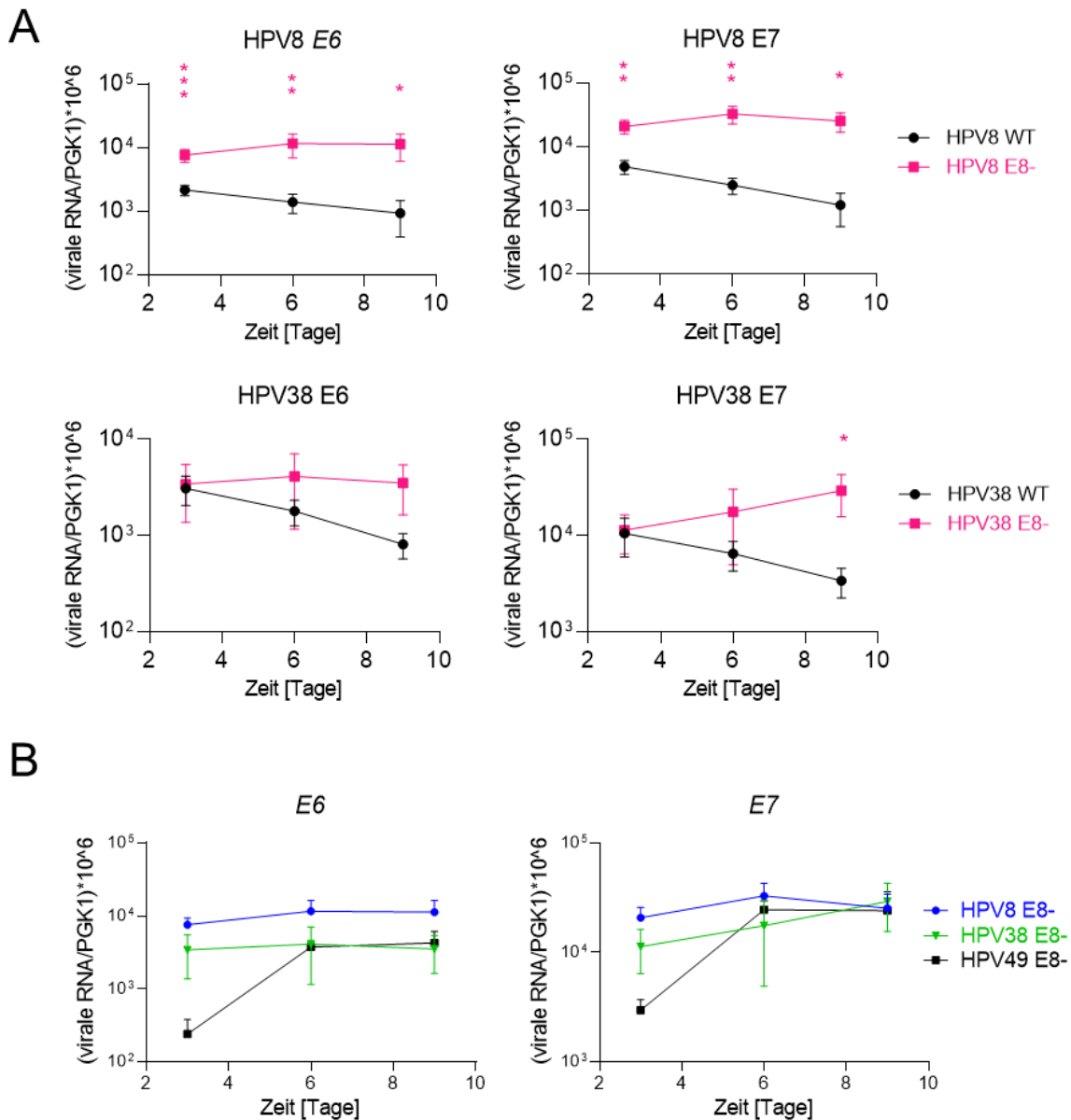


Abbildung 24: qPCR-Analyse von HPV8 und 38 E6 und E7 Transkripten.

(A) Die RNA wurde nach drei, sechs, und neun Tagen nach Transfektion von HPV8 und 38 WT und E8- Genomen in NHK isoliert und PolyA-angereichert. Die Fehlerbalken entsprechen dem SEM. Die statistische Signifikanz wurde mittels eines Differenzen T-Test mit HPV49 E8- als Referenz bestimmt ($p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$).

(B) Vergleich der qPCR-Analyse von HPV8, 38 und 49 E6 und E7 Transkripten in PolyA-angereicherter RNA von NHKs, die mit E8- Genomen transfiziert wurden.

PGK1 wurde als Referenztranskript verwendet. Die Fehlerbalken entsprechen dem SEM. **Abbildung 24** und die entsprechende Beschriftung wurde aus einer Publikation der Autorin übernommen und angepasst (Rehm et al., 2022b).

6.7.5 Beta-HPV Transkription in organotypischer Zellkultur

Bei HR-HPV kann der Replikationszyklus durch Wachstum stabiler Zelllinien mit extrachromosomalen viralen Genomen in organotypischen Kulturen induziert werden (Myers et al., 2019). Aktuelle Studien zeigen, dass auch späte virale Proteine in organotypischen Kulturen in HPV16 Quasivirus-infizierten NHKs induziert werden (Bienkowska-Haba et al., 2018). Dies legt nahe, dass es nicht zwingend notwendig ist, stabile Zelllinien mit replizierenden HPV Genomen zu verwenden, um den produktiven Replikationszyklus untersuchen zu können. Aus diesem Grund wurden NHKs mit rezirkularisierten HPV16 Genomen transfiziert und auf die Induktion später viraler Transkripte ($E1^E4$ und $E4^L1$) in organotypischer Kultur getestet. Die transfizierten NHKs wurden entweder für vier bis fünf Tage nach Transfektion als *Monolayer* gehalten und als undifferenzierte Kontrolle geerntet, oder in organotypischer Kultur gehalten und nach 16 Tagen geerntet. Die Analyse der aufgereinigten RNA zeigte eine 322-fache Induktion des Keratinozyten-Differenzierungsmarkers *KRT10*, eine signifikante Induktion (275-fach) von $E1^E4$ Transkripten und eine über 1000-fache Induktion des $E4^L1$ Transkripts, das einen Trend zeigt ($p=0,17$) (**Abbildung 25**). Damit konnte bestätigt werden, dass der produktive HPV16 Replikationszyklus in organotypischen Kulturen transient transfizierter NHKs induziert werden kann.

Die Transkriptanalyse einer HPV8-positiven Biopsie eines EV-Patienten legt nahe, dass zwei verschiedene Spleißdonoren in *E4* genutzt werden können, um $E4^L1$ Transkripte herzustellen ($E4^L1$ und $E4b^L1$) (**Abbildung 22**, **Abbildung 26**) (Stubenrauch et al., 1992).

Die entsprechenden klonierten cDNAs wurden durch Gensynthese hergestellt und qPCR-Primer etabliert. RNA wurde aus NHKs isoliert, die mit HPV8 WT Genomen transfiziert wurden, und entweder als *Monolayer* oder als organotypische Kultur für 16 Tage kultiviert wurden, und diese analysiert. Dabei wurde eine 650-fache Induktion von *KRT10* gemessen, was vergleichbar zu HPV16 ist (**Abbildung 25**). Außerdem wurden alle im *Monolayer* detektierten Transkripte ebenfalls in den organotypischen Kulturen nachgewiesen. Zusätzlich konnten $E4^L1$ und $E4b^L1$ in undifferenzierten und differenzierten Kulturen detektiert werden, wobei $E4b^L1$ abundanter war. Beide Transkripte steigen durch Differenzierung (14-fach und sieben-fach), aber nur bei $E4^L1$ ist dieser Unterschied signifikant (**Abbildung 25**). URR^E2 Transkripte stiegen ebenfalls zehnfach, was aber nicht signifikant ist. Die $E1^E4$, $E1^E2$, URR^E4 , $E8^E2$ und $E8^E2N$ Transkripte veränderten sich nicht merklich.

Bei HPV38 organotypischen Kulturen stieg das *KRT10* Niveau 530-fach an, was einem vergleichbaren Differenzierungsgrad der NHKs wie bei HPV8 und HPV16 entspricht (**Abbildung 25**).

Bei HPV38 konnte mit Primern in *E4* und *L1* in undifferenzierten und organotypischen Kulturen eine einzelne gespleißte RNA-Spezies detektiert werden. Klonierung und Sequenzierung des Amplikons identifizierte das 3'-Ende des *E4*-Exons an nt 3475 und das 5'-Ende des *L1* Exons bei nt 5661 (**Abbildung 21 (C)**). Überraschenderweise sanken die $E1^E4$, $E1^E2$, URR^E4 und URR^E2 Transkriptmengen in organotypischen Kulturen. Der Effekt war für $E1^E4$ und URR^E4 sogar statistisch signifikant. Im Gegensatz dazu stieg die $E4^L1$ Menge 5,1-fach an, der Anstieg war nicht statistisch signifikant, zeigt aber mit einem p-Wert von 0,19 einen Trend. Die Menge an $E8^E2N$ und $E8^E2$ fällt leicht ab (**Abbildung 25**).

Zusammengefasst deuten diese Daten darauf hin, dass $E4^L1$ Transkripte in HPV8 und HPV38-transfizierten NHKs, die in organotypischen Kulturen kultiviert werden, induziert werden, während anders als bei HPV16 die HPV8 und 38 $E1^E4$ Transkripte unverändert bleiben oder sinken.

Ergebnisse

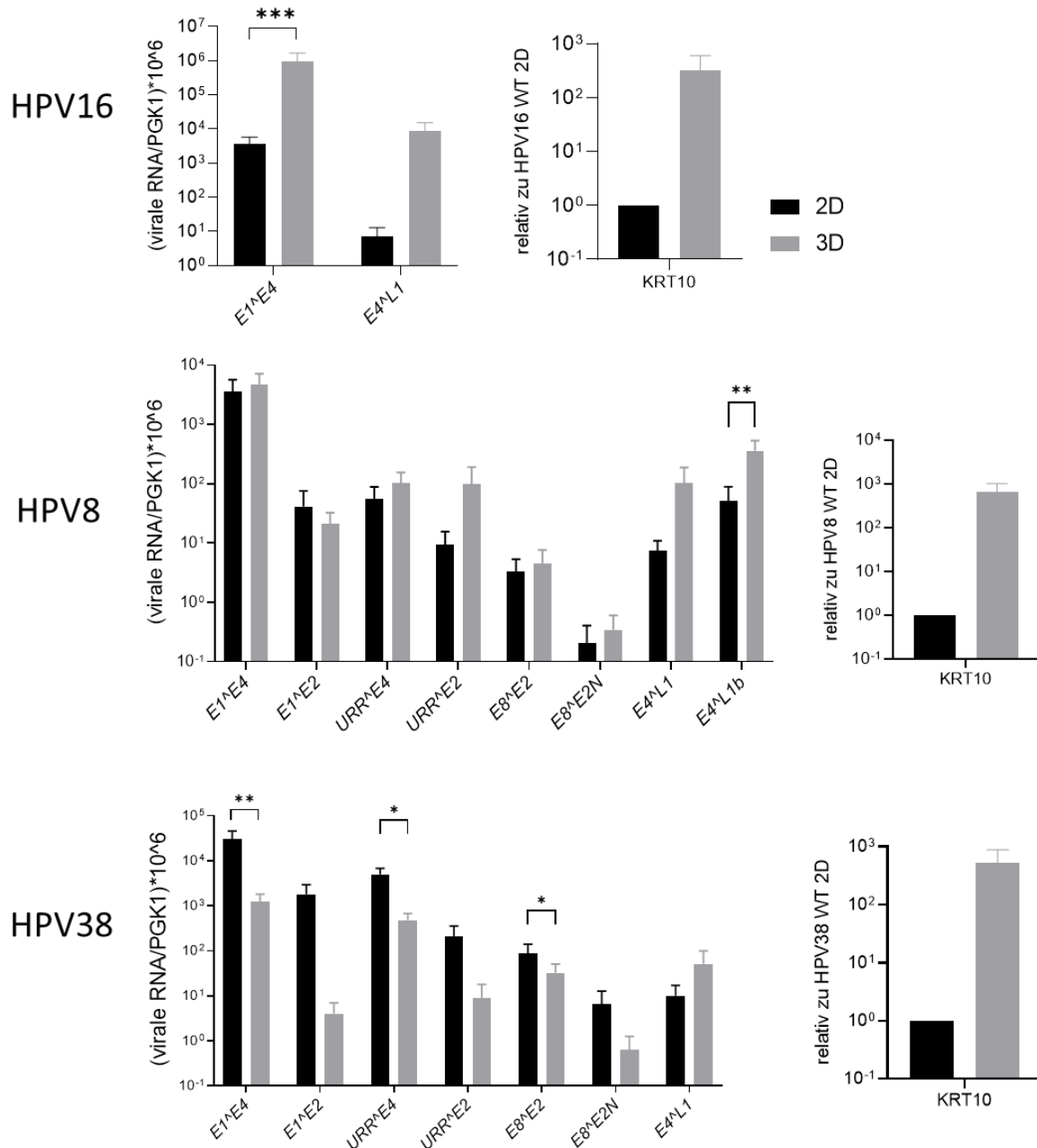


Abbildung 25: QPCR-Analyse von organotypischen Kulturen von transient transfizierten NHKs.

Die NHKs wurden transient mit HPV16, 8 oder 38 WT Genomen transfiziert und entweder als Monolayer (2D) oder als organotypische Raft-Kultur (3D) analysiert. Die Daten stammen aus vier (HPV16) oder sechs (HPV8, HPV38) unabhängigen Transfektionen mit NHKs verschiedener Spender. PGK1 wurde als Referenztranskript eingesetzt. Zusätzlich zu viralen Transkripten wurde der Keratinozyten-Differenzierungsmarker KRT10 (Keratin10) bestimmt und relativ zu den als Monolayer (2D) kultivierten Zellen dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mittels eines Differenzen T-Test mit HPV49 E8- als Referenz bestimmt (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). **Abbildung 25** und die entsprechende Beschriftung wurde aus einer Publikation der Autorin übernommen und angepasst (Rehm et al., 2022b).

Ergebnisse

In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Ulrike Leiter (Universitäts-Hautklinik Tübingen, Universitätsklinikum Tübingen) und Dr. Stephan Forchhammer (Universitäts-Hautklinik Tübingen, Universitätsklinikum Tübingen) wurden Transkripte einer HPV8-positiven flächigen *Verruca* Läsion eines EV-Patienten analysiert. Eine H&E Färbung zeigte plump akanthotische Epidermis mit diskreter Papillomatose und aufgelagerter ortho-Hyperkeratose (**Abbildung 26 (A)**). Im vergrößerten Bildausschnitt sind EV-typische zytopathische vergrößerte Keratinozyten des apikalen *Stratum spinosum* sowie *Stratum granulosum* zu erkennen (**Abbildung 26 (A)**), siehe Pfeil). Die Zellen zeigen blass-bläuliches bis graues ausgedehntes Zytoplasma mit Keratohyalin granula unterschiedlicher Größe.

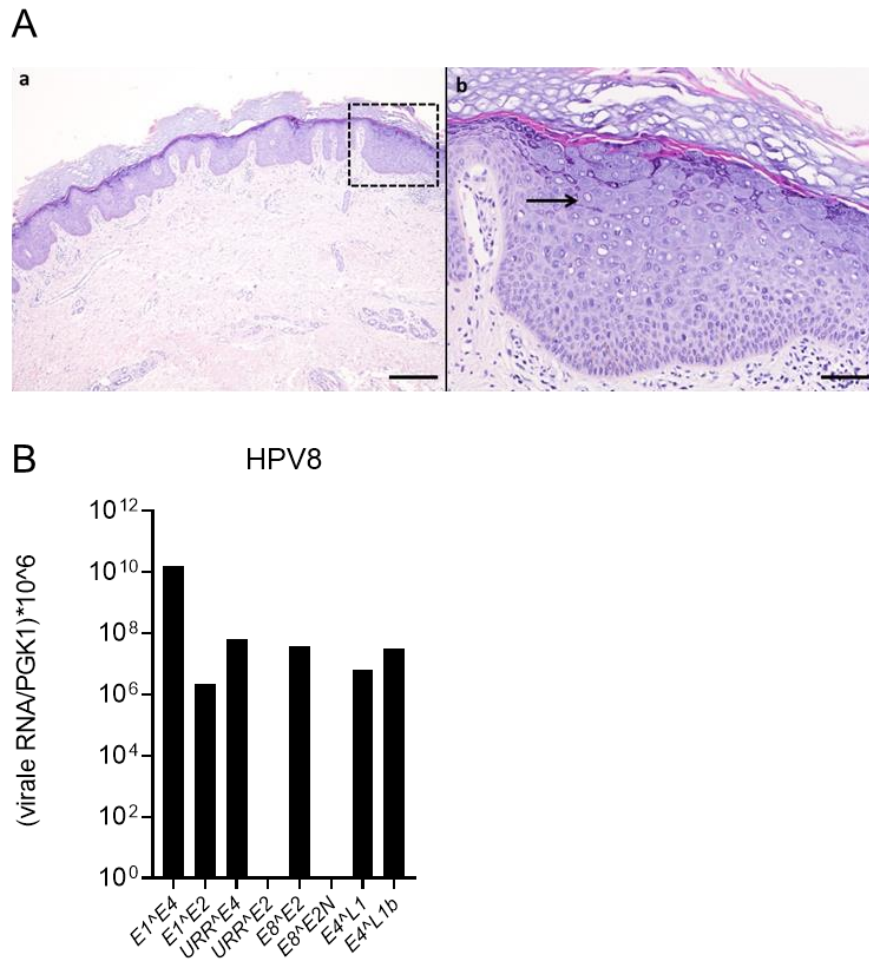


Abbildung 26: Charakterisierung einer HPV8-positiven EV-Läsion.

(A) H&E-Färbung der in Paraffin-eingebetteten HPV8-positiven Verruca flächigen-Läsion eines Epidermodysplasia verruciformis Patienten. (b) ist eine Vergrößerung aus (a).

(B) QPCR-Analyse von RNA isoliert aus der Paraffin-eingebetteten HPV8-positiven Läsion des EV-Patienten. Pfeil: Zelle in apikalem Stratum spinosum mit zytopathischem Effekt. PGK1 wurde als Referenztranskript eingesetzt.

Abbildung 26 und die entsprechende Beschriftung entstand mit Unterstützung von Dr. Stephan Forchhammer und Prof. Dr. Ulrike Leiter und wurde aus einer Publikation der Autorin angepasst und übernommen (Rehm et al., 2022b).

Ergebnisse

Die RNA wurde aus der Läsion isoliert und von mir mittels qPCR analysiert. Es wurden *E1^{A4}*, *E1^{A2}*, *URR^{A2}*, *E8^{A2}*, *E4^{L1}* und *E4b^{L1}* Transkripte detektiert, aber nicht *URR^{A2}* und *E8^{A2N}* (**Abbildung 26**). Die relative Expression der hier detektierten viralen Transkripte ist ähnlich zwischen der *in-vivo* Situation und den organotypischen Kulturen. Das *URR^{A2}* Transkript hingegen ist stark exprimiert in organotypischen Kulturen, aber nicht nachweisbar *in-vivo*, und *E8^{A2}* ist in der Läsion exprimiert, aber nur sehr schwach in organotypischen Kulturen.

Insgesamt zeigen diese Daten, dass das HPV8 Expressionsmuster in transfizierten organotypischen Kulturen zumindest teilweise dem Muster bei einem EV-Patienten entspricht.

7 Diskussion

Immortalisierung und Karzinogenität bei HPV

Infektionen mit beta-HPV stehen im Verdacht an der Entwicklung von cSCCs (*cutaneous squamous cell carcinoma*) bei EV-Patienten und OTR beteiligt zu sein. (Caldeira et al., 2003; Cornet et al., 2012). Zusätzlich ist HPV38 auch bei immunkompetenten Individuen mit cSCCs assoziiert (Chahoud et al., 2016). Allgemein etabliert ist die ursächliche Beteiligung von HR-HPV an anogenitalen und oropharyngealen Karzinomen (Tommasino, 2014; Viarisio et al., 2017; de Martel et al., 2017).

Konsistent mit der Karzinogenität *in-vivo* konnte für HR-HPV Genome gezeigt werden, dass diese effizient NHKs immortalisieren können. Im Gegensatz dazu, wurde dies bisher nicht für beta-HPV gezeigt. Die Immortalisierung bei HR-HPV benötigt nur die Onkoproteine E6 und E7 und ist damit unabhängig von den anderen viralen Genprodukten. Die Inaktivierung der Replikationsproteine E1 und E2 führt zu replikationsdefizienten Genomen, die ins Wirtsgenom integrieren. Die Immortalisierung ist damit unabhängig vom physikalischen Zustand der HR-HPV Genome und benötigt keine aktive Virusreplikation (Dürst et al., 1987; Frattini et al., 1996; Romanczuk und Howley, 1992; Karstensen et al., 2006). Andererseits steigert die Inaktivierung des viralen Repressors $E8^E2$ bei HR-HPV16 die virale Replikation und Genexpression, hat aber keinen Einfluss auf die Immortalisierung von Keratinozyten, Wachstum und Differenzierungsfähigkeit (Straub et al., 2014; Lace et al., 2008; Kuehner und Stubenrauch, 2022). Zusammengefasst bedeutet dies, dass bei HR-HPV die Fähigkeit zu immortalisieren unabhängig von der Replikationsfähigkeit ist.

Immortalisierung bei beta-HPV und die Rolle von E6 und E7 Proteinen

Im Gegensatz zu HR-HPV wurde die virale Replikation, der virale Lebenszyklus und die Untersuchung von Risikofaktoren der Krebsentstehung bei beta-HPV bisher nicht in humanen Keratinozyten untersucht. Frühere Studien ergaben, dass HPV5 und HPV8 stabil als extrachromosomale Elemente in U2OS (eine Osteosarkom-Zelllinie) über mehrere Zellpassagen replizieren (Geimanen et al., 2011). Untersuchungen der Transkripte in U2OS zeigten, dass HPV5 fünf verschiedene Promotoren und mehrere konservierte Spleißdonoren und Spleißakzeptoren nutzt, was konsistent mit anderen PV ist (Sankovski et al., 2014). In diesem System waren allerdings keine gespleißten Transkripte von der *URR* (URR^E2 und URR^E4) zu finden, die in HPV5- und 8-positiven Läsionen von EV-Patienten beschrieben wurden (Stubenrauch et al., 1992; Haller et al., 1995). Dies deutet darauf hin, dass die bereits immortalisierten U2OS-Zellen nicht alle Aspekte der viralen Replikation abdecken. Im Einklang damit unterstützen sie nicht den differenzierungsabhängigen viralen Lebenszyklus (Geimanen et al., 2011; Sankovski et al., 2014).

Meine Daten zeigen, dass das HPV49 Genom, aber auch HPV8 und HPV38 Genome, gespleißte URR^E2 und URR^E4 Transkripte in transient transfizierten und immortalisierten Keratinozyten exprimieren. Dies entspricht eher der Situation in der *in-vivo* EV-Läsion, als dem U2OS-Modellsystem (Stubenrauch et al., 1992; Haller et al., 1995).

Die Funktionen von beta-HPV E6 und E7 Proteinen wurden bisher hauptsächlich nach Expression mittels retroviraler Vektoren, ohne die Beteiligung anderer viraler Proteine untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass nur manche beta-HPV E6 und E7 Proteine immortalisieren, und Apoptose, DNA-Reparatur, Immunantwort und Keratinozyten-Differenzierung modulieren können (Tommasino, 2017).

Speziell für HPV49 E6 und E7 wurde bereits gezeigt, dass diese nach retroviraler Expression effizient Keratinozyten immortalisieren können (Minoni et al., 2020; Cornet et al., 2012). Überraschenderweise konnte ich beobachten, dass das HPV49 WT Referenzgenom kein längeres Zellwachstum oder Immortalisierung in NHK induziert, was im Gegensatz zu HR-HPV16, 18 und 31 Genomen steht (Straub et al., 2014; Stubenrauch et al., 2000; Karstensen et al., 2006).

Für HPV38 (beta2), aber nicht für HPV8 (beta1), konnte ebenfalls früher gezeigt werden, dass E6 und E7 allein Keratinozyten immortalisieren können, allerdings weniger effizient als HPV49. Erstaunlicherweise waren weder HPV8 noch HPV38 Genome in der Lage, NHK zu immortalisieren.

Beta-HPV sind in NHK aktiv

Die Folgeexperimente zeigten, dass sowohl HPV49 Genome, als auch HPV8 und HPV38 Genome, über mehrere Tage in NHK gespleißte, virale Transkripte exprimieren, und die Inaktivierung der *E1*, *E2* oder *E8* Gene die virale Genexpression moduliert (**Abbildung 6; Abbildung 7; Abbildung 22; Abbildung 23**). Dabei lässt die Beeinträchtigung von *E1* und *E2* die Mengen sinken, während bei *E8* die Menge an viralen Transkripten stark ansteigt. Dies ist konsistent mit der konservierten Replikationsfunktion von *E1*, *E2* und *E8^{E2}* bei anderen Papillomviren (Bergvall et al., 2013; McBride, 2013; Kuehner und Stubenrauch, 2022). Außerdem legen diese Ergebnisse nahe, dass die fehlende Immortalisierung bei HPV49, 8 und 38 Genomen nicht an einem Mangel an viraler Genexpression oder an einer Blockade der viralen Proteinexpression liegt.

***E8^{E2}* als kritischer Regulator der viralen Genexpression und Replikation**

Überraschenderweise erlaubt die Inaktivierung von *E8* (*E8*-, *E8^{E2}*-) reproduzierbar die Immortalisierung durch HPV49 (**Tabelle 1, Abbildung 8**). Im Vergleich zum WT zeigt das HPV49 *E8*-Genom nach Transfektion eine deutlich erhöhte Replikations- und Transkriptionsaktivität und dies gilt auch für *E6* und *E7* Transkripte (**Abbildung 7**). Die Inaktivierung von *E8^{E2}* führt bei HPV8 und 38 Genomen ebenfalls zu erhöhter Replikation und Transkriptionsaktivität einschließlich der *E6* und *E7* Transkripte. Dies zeigt, dass das *E8^{E2}* Protein ein kritischer Regulator von *E6* und *E7* ist, eine Veränderung der *E8^{E2}* Aktivität könnte daher zur Onkogenität von beta-HPV *in-vivo* beitragen. Interessanterweise führt aber die Inaktivierung von *E8^{E2}* weder bei HPV8 noch bei HPV38 zur Immortalisierung von Keratinozyten trotz erhöhter *E6* und *E7* Expression. Der Vergleich mit HPV49 *E8*-transfizierten Zellen zeigt, dass die *E6* und *E7* Transkriptmengen sehr ähnlich sind (**Abbildung 24**). Somit kann dieser Unterschied in der Immortalisierungsfähigkeit nicht simplistisch an der Menge an *E6* und *E7* Transkripten liegen. Es ist jedoch immer noch möglich, dass trotz der ähnlichen RNA Mengen weniger *E6* und *E7* Proteine vorhanden sind als bei HPV49, was aber aufgrund fehlender Antikörper nicht überprüft werden kann.

E8^{E2} könnte unabhängig von seiner Aktivität als Repressor der viralen Replikation und Transkription als Tumor-Suppressor wirken. Aber der Verlust der Immortalisierungsfähigkeit bei HPV49 *E8*-/*E1*- und *E8*-/*E2*- Genomen deutet eher darauf hin, dass der Hauptgrund für diese Fähigkeit bei den *E8*-Genomen die höhere Expression von *E6* und *E7* Transkripten ist. Allerdings wurde gezeigt, dass HPV8 *E2* onkogene Eigenschaften besitzt, wenn es allein in der Haut von transgenen Mäusen exprimiert wird (Pfefferle et al., 2008). Aus diesem Grund wäre es möglich, dass *E2* nicht nur für die Immortalisierung als viraler Replikationsfaktor notwendig ist, sondern auch als Onkoprotein wirken könnte. Diese Annahme ist allerdings eher unwahrscheinlich, da die HPV49, HPV8 und 38 WT und *E8*- Genome mehrere, potenziell *E2* kodierende Transkripte exprimieren (*E1^{E2}*, *URR^{E2}* und *E8^{E2N}*), aber dennoch keine Immortalisierung von Keratinozyten stattfindet.

Die Notwendigkeit für eine Inaktivierung von *E8* im Kontext von intakten *E1* und *E2* Genen für die Immortalisierung von NHK weist auf grundlegende Unterschiede zwischen HPV49 und HR-HPV Genomen hin. Da die *E8*- Mutation bei HPV 38 nicht zum gleichen Effekt führt, scheinen auch hier grundlegende Unterschiede zu existieren.

E8^{E2} in-vivo

Meine Daten legen nahe, dass *E8^{E2}* ein wesentlicher Regulator der Immortalisierungsaktivität darstellt. Eine Modulation von *E8^{E2}* könnte also die karzinogene Aktivität *in-vivo* deutlich verstärken. Im Gegensatz zu HR-HPV wurden von beta-HPV bisher keine vollständigen und systematischen Analysen von Genomsequenzen in Biopsiematerial durchgeführt. Daher kann über eine potenzielle Inaktivierung von *E8^{E2}* durch Mutationen *in-vivo* und deren Einfluss auf die Krebsentwicklung keine Aussage getroffen werden.

Die HPV16 *E8^{E2}* Transkription wird durch einen separaten Promotor gesteuert, und Studien mit HPV5 in U2OS sowie die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung von HPV49 Transkripten (pE8, **Abbildung 13**, **Abbildung 15**) unterstützen die Idee, dass auch beta-HPV einen separaten Promotor für die *E8^{E2}* Expression nutzen (Sankovski et al., 2014; Straub et al., 2015). Allerdings ist derzeit unklar, welche zelluläre Faktoren die Promotoraktivität kontrollieren. *E8^{E2}* Proteine rekrutieren NCoR/SMRT-HDAC3 Korepressor-Komplexe über den konservierten E8-Anteil, um virale Replikation zu hemmen (Dreer et al., 2016; Powell et al., 2010; Kuehner und Stubenrauch, 2022). Aufgrund der hohen Sequenzkonservierung des E8-Anteils ist wahrscheinlich, dass das HPV49 *E8^{E2}* Protein ähnliche Mechanismen benutzt. Es sollte untersucht werden, wie die Genexpression und Proteinaktivität von beta-HPV *E8^{E2}* reguliert wird, um potenzielle Interferenzen *in-vivo* verstehen zu können.

HPV49 *E8*- Zelllinien enthalten extrachromosomale Virusgenome in hoher Kopienzahl

Bei genauerer Untersuchung der immortalisierten HPV49 *E8*- Zelllinien zeigt sich, dass sie sehr hohe extrachromosomale Kopienzahlen enthalten und hohe Mengen an viralen Transkripten exprimieren (**Abbildung 9**). Der immortalisierte Phänotyp scheint nur durch die kontinuierliche virale Genexpression und die hohe Kopienzahl erhalten zu werden, da diese auch in sehr hohen Passagen vorzufinden sind und eine Reduktion der viralen Transkription durch siRNA das Wachstum verringert (**Abbildung 9**). Konsistent mit dieser Schlussfolgerung sind auch *E8-/E1*- und *E8-/E2*- Genome nicht zur Immortalisierung fähig und zeigen nach transienter Transfektion deutlich verringerte *E6* und *E7* Level (**Tabelle 2; Abbildung 11**). Im Gegensatz zu HPV49 können HPV31 *E8*- Genome nicht episomal erhalten werden. Es ist allerdings nicht verstanden, warum dies so ist (Lace et al., 2008; Stubenrauch et al., 2000). Prinzipiell wäre es also möglich, dass ein ähnlicher Mechanismus die Immortalisierung durch HPV38 *E8*- verhindert.

Die Rolle der viralen *E6* und *E7* Proteine

Unklar bleibt, warum die zu geringen Mengen an *E6* und *E7* vom HPV49 WT Genom nicht durch eine Integration von Genomen in Wirtschromosomen erreicht werden kann, was bei HR-HPV oft beobachtet wird. Eine Möglichkeit wäre, dass selbst so nicht die Mengen erreicht werden können, die von mehreren Tausend Viruskopien pro Zelle exprimiert werden. Zusätzlich lassen die Analyse der HPV49 *E6* Spleißdonor Mutante vermuten, dass die Menge an *E6* kritisch ist, um Immortalisierung zu ermöglichen, was eventuell durch zufällige Integration nicht erreicht werden kann. Prinzipiell ist auch möglich, dass der Mechanismus, der die Integration begünstigt und die Expression hoher Mengen an *E6* und *E7* ermöglichen würde, zwischen beta-HPV und HR-HPV fundamental unterschiedlich ist.

Interessanterweise enthalten cSCCs von EV-Patienten hohe extrachromosomale beta-HPV Kopienzahlen (Orth, 2006; Adachi et al., 1996; Yabe et al., 1989). Dies legt nahe, dass hier eine robuste virale Genexpression notwendig ist, um den Tumor zu erhalten. Unterstützt wird diese These durch den Befund, dass UV-Strahlung in transgenen Mausmodellen die HPV8 Genexpression, und dadurch die *in-vivo* Karzinogenität erhöht (Hufbauer et al., 2010). Deregulierte Genexpression kann also zu beta-HPV Onkogenität *in-vivo* beitragen. Bei cSCCs in OTRs werden weniger als eine Viruskopie pro Zelle nachgewiesen, was dafür spricht, dass hier keine Abhängigkeit von HPV vorliegt. Trotzdem ist ein Teil der HPV-positiven Präkanzerosen wie Aktinische Keratosen (AK) auch positiv für späte virale Proteine, was die Möglichkeit eröffnet, dass eine Interferenz mit E8^{E2} die E6 und E7 Menge und das Risiko eines bösartigen Verlaufs erhöht (Borgogna et al., 2014b).

Die Bedeutung des *URR* Exons

RNA-Analysen von HPV8-, 38- und 49-transfizierten *Monolayer*-NHK-Kulturen zeigen, dass konservierte Spleißdonorstellen in der *URR*, am Anfang von E1 und am Ende der E8-Genregion verwendet werden, die mit konservierten Spleißakzeptorstellen am Anfang von E2 und innerhalb der E2/E4-Region verbunden sind. Mit Ausnahme des *URR* Exons sind die anderen Exon-Intron-Grenzen hoch konserviert zwischen allen bisher untersuchten PV (<https://pave.niaid.nih.gov/>). Ein vergleichbares *URR*-Exon wird in HPV5- und 8-positiven Biopsien *in-vivo* und in Warzen von Tierviren, wie das Rinder PV1, *Cottontail Rabbit* PV (CRPV) und Maus (Mmu) PV1, aber nicht von HR-HPV oder anderen HPV aus dem alpha-Genus exprimiert (Haller et al., 1995; Stubenrauch et al., 1992; Baker und Howley, 1987; Wettstein et al., 1987; Xue et al., 2017). Meine Daten belegen, dass das *URR*^{E4}-Transkript in undifferenzierten NHK relativ häufig vorkommt (**Abbildung 7, Abbildung 22, Abbildung 23**), was auf eine wichtige Rolle in frühen Stadien des viralen Lebenszyklus hindeutet. Unter der Annahme, dass sich dieses Transkript in undifferenzierten NHK bis zur konservierten, frühen Polyadenylierungsstelle in L2 erstreckt, bleibt dessen Kodierungspotenzial und Funktion unklar, da das *URR*-Exon keine *in-Frame*-Startkodons für E4 oder E2 bereitstellt und beta-HPV kein E5 Gen zwischen E4 und der frühen Polyadenylierungsstelle kodieren. Dies könnte bedeuten, dass *URR*^{E4} Transkripte nicht als Protein-exprimierende mRNA sondern als regulatorische, *non-coding* RNA fungieren.

Analyse des viralen HPV49 Transkriptom: Identifizierung neuer Spleißsignale

Die zwischen NHK und HPV49 E8- positiven Zelllinien differenziell exprimierten Wirtsgene wurden von stud. M.Sc. Meret Beyer im Rahmen ihrer Masterarbeit weiter untersucht (**Abbildung 12, Tabelle 3, Tabelle 4**). Diese Analyse kann wichtige Erkenntnisse bezüglich zellulärer Zielgene und beteiligter Signaltransduktionskaskaden liefern. Interessant sind aber nicht nur die zellulären Gene, sondern auch die viralen Transkripte und Spleißverknüpfungen, da durch die RNA-Sequenzierung ein komplettes Bild erhalten werden kann. Ein Instrument um dies darzustellen ist der Sashimi-Plot (**Abbildung 14**). Die Transkriptabdeckung des HPV49 Genoms ist sehr ähnlich wie in MmuPV1-positiven Warzen, CRPV-positiven Papillomen und Karzinomen, HPV16-positiven CIN unterschiedlichen Schweregrads und HPV6b-positiven Kondylomen (Xue et al., 2017; Probst-Hunczek et al., 2015; Chen et al., 2014). Dabei ist vor allem in E6 und E7 bis zum Spleißdonor in E1 eine hohe Abdeckung vorhanden, was auch bei HPV16 in CIN2 und SCC beobachtet wurde (Chen et al., 2014). Vergleichbar mit HPV16 gibt es einen konstanten Anstieg der Abdeckung bis ca. nt 770 in E7 (Chen et al., 2014). Es konnten neue Verknüpfungen, wie einige E4^{L1} Verbindungen, durch die unter anderem L1 kodierende mRNAs entstehen können beobachtet werden. Interessant ist auch die Spleißverbindung E2^{E4}, durch die potenziell ein E2^{E4} Fusionsprotein mit unklarer Funktion produziert werden könnte, wie es schon für HPV18 beschrieben wurde (Tan et al., 2012a). Die Transkript-Abdeckung wird sehr viel geringer im

Bereich nach dem frühen PolyA (**Abbildung 13, Abbildung 15**). Einige Transkripte sind auch in *L1* nachweisbar, aber die Menge ist eher gering. Dies ist schwer einzuordnen, da vergleichbare Analysen meist nicht in *Monolayer*-Kulturen vorgenommen werden (Xue et al., 2017; Probst-Hunczek et al., 2015; Chen et al., 2014).

Interessanterweise konnte ein Spleißdonor an Nukleotidposition 217 am Anfang von *E6* detektiert werden, der relativ häufig in den stabilen Zelllinien verwendet wird (**Tabelle 5, Abbildung 14**). *E6^{ΔE4}* Transkripte werden auch in HPV49 WT und *E8*-transfizierten Zellen exprimiert, was bestätigt, dass der Spleißdonor auch vom WT genutzt wird und nicht nur in immortalisierten *E8*-Zelllinien vorkommt (**Abbildung 16**). Dabei ist die Menge in den *E8*-haltigen Zellen deutlich höher als in den WT Zellen, was angesichts der generell erhöhten Expression zu erwarten war (**Abbildung 16, Abbildung 7**). Bei dem transient transfizierten WT Genom ist mehr *E6^{ΔE4}* als *E6* vorhanden, während beim *E8*-Genom deutlich mehr *E6* als *E6^{ΔE4}* vorhanden ist. Stabile *E8*-Zelllinien wiederum weisen mehr *E6^{ΔE4}* als *E6* Transkripte auf, was nahelegt, dass das Verhältnis von ungespleißten zu gespleißten Transkripten im Verlauf der Immortalisierung reguliert wird. SD217 wird mit unterschiedlichen Spleißakzeptoren verknüpft (**Tabelle 5**), und könnte so neuartige Proteine erzeugen, die möglicherweise regulatorische Funktionen haben. Die große Anzahl unterschiedlicher gekoppelter Akzeptoren spricht jedoch gegen dieses Modell, genauso wie eine BLAST-Analyse des *E6^{ΔE9}* Peptids, die keinerlei Homologien zu bekannten Proteinen ergab. Dies legt nahe, dass die hauptsächliche Funktion des SD217 in der Regulation der Mengen an *E6* Protein liegen könnte. Dies erinnert an HR-HPV, bei denen *E6* und *E7* von einer gemeinsamen polycistronischen prä-mRNA codiert werden. Die ungespleißte *E6/E7*-RNA exprimiert v.a. *E6*, während das Entfernen eines fakultativen Introns in *E6* zur gespleißten *E6^{*}/E7*-RNA führt, die v.a. *E7* produziert und wesentlich abundanter als das ungespleißte Transkript ist (Tang et al., 2006; Brant et al., 2019). Vergleichbar mit anderen HPV-Typen, aber im Gegensatz zu HR-HPV, könnte ein separater Promotor für *E7* bei ca. nt 350 lokalisiert sein, der für den leichten Anstieg in der Transkriptabdeckung sorgen könnte (Sankovski et al., 2014; Iftner et al., 1990). Die Signalzunahme ist aber im Vergleich mit den anderen Startstellen nur sehr gering, von daher bleibt unklar, ob ein Promotor in *E6* existiert. Alternativ zu einem separaten *E7* Promotor könnte auch die Prozessierung an SD217 die unterschiedlichen Transkriptmengen von *E6* und *E7* (**Abbildung 9**) erklären, da hier ungespleißtes *E6* Transkript detektiert wurde.

Es wäre möglich, dass die Nutzung von SD217 die Menge an Vollängen-*E6* beim WT reduziert, und damit die Immortalisierung verhindert. Das transiente *E8*-produziert im Verhältnis insgesamt mehr von allen Transkripten, was ausreichende Mengen an *E6* Protein produzieren könnte. Dies könnte vor allem in frühen Phasen der Etablierung wichtig sein, da in der Zelllinie das Verhältnis eher dem des WT Genoms entspricht. Das Virus hat hier möglicherweise bereits einen Gleichgewichtszustand erreicht, der ausreicht für die Erhaltung des immortalen Phänotyps.

Prinzipiell muss beachtet werden, dass die Analyse mit HPV49 *E8*-positiven Zellen, und nicht mit WT, durchgeführt wurde. Durch die erhöhte Transkription der *E8*-positiven Zellen könnten einige der Spleißverbindungen Artefakte sein, die nur bei sehr hohen Transkriptmengen entstehen. Allerdings konnte am Beispiel des SD217 gezeigt werden, dass dieser auch vom HPV49 WT genutzt wird (**Abbildung 16**). Darüber hinaus sind viele der neuen Spleißdonor- und Akzeptor-Verbindungen bereits bei anderen HPV beschrieben, was ihr Vorkommen auch bei HPV49 WT nahelegt.

Der Spleißdonor in *E6* reguliert die *E6* Proteinmenge und beeinflusst die Immortalisierung durch das *E8*-Genom, aber nicht durch retrovirale Expression

Im Einklang mit dem Modell, dass SD217 die Menge an *E6* Protein reguliert, konnte eine deutlich erhöhte *E6*-Expression nach Mutation von SD217 in *E6* Expressionsvektoren in C33A und NHK

beobachtet werden (**Abbildung 17**). Die Menge wird durch die Punktmutation in einem ähnlichen Maße erhöht, wie durch Kodonoptimierung des gesamten Leserahmens für die Expression in Säugetierzellen. Für die E6 Proteine von HPV8, 49, 75, 76 und MmuPV1 ist bekannt, dass sie an MAML1 binden (White et al., 2012a; Minoni et al., 2020; Meyers et al., 2017).

Außerdem binden MmuPV1 E6 und HPV8 E6 an intrazellulär gespaltenes NOTCH1 (ICN1), was den NOTCH-Signalweg als funktionelles Ziel der Interaktion nahelegt (Meyers et al., 2017; White, 2019).

Für HPV8 E6 wurde bereits gezeigt, dass es die Transkriptionsaktivierungsfunktion von MAML1 inhibieren kann (Brimer et al., 2017). Die Bindung von MAML1 an HPV49 E6 konnte durch stud. B.Sc. Leonie Brosch in ihrer Bachelorarbeit durch Co-Immunpräzipitationsanalysen bestätigt werden. Daher wurde untersucht, ob HPV49 E6 eine MAML1-abhängige Stimulation eines Transkriptionsreporters beeinflusst. Es konnte bestätigt werden, dass HPV8 und HPV38 E6 MAML1 reprimieren können, wenn auch die Effekte durch Schwankungen in der Aktivierung des Reporters nicht für beide E6 statistisch signifikant werden. Für HPV49 E6 und 3xHA-HPV49 E6co konnte nur eine schwache Inhibition von MAML1 beobachtet werden und HPV49 E6co oder HA-markiertes E6 wiesen keine Effekte auf. Nur 3xHA-HPV49 E6 SD217 mt zeigt eine signifikante Reduktion der MAML1 Aktivität. Bei den HA-markierten E6 Proteinen korreliert die Inhibition der MAML1-Aktivität partiell mit der Menge des exprimierten E6 Proteins, was das Modell unterstützt, dass E6 SD217 die Menge an E6 Protein kontrolliert. Die geringe Inhibition durch HPV49 E6co legt jedoch nahe, dass die Inaktivierung von MAML1 durch HPV49 E6 trotz Bindung eher schwach ist. Zur genauen Abklärung sind weitere funktionelle Analysen, wie den Einsatz von MAML1-spezifischer siRNA oder MAML1-bindungsdefizienten E6 Mutanten, notwendig. Für die nicht markierten HPV49 Proteine kann keine gesicherte Aussage getroffen werden, da deren Expression nicht im Western Blot überprüft werden kann.

SD217 mt Genome konnten ebenso wie der WT NHK nicht immortalisieren, was vermuten lässt, dass eine Erhöhung der E6 Proteinmenge bei niedriger Genexpression nicht ausreicht, um eine Immortalisierung herbeizuführen. Überraschenderweise führte die Kombination von SD217 mt mit E8- zum Verlust der Immortalisierung (**Tabelle 7**). Dies könnte bedeuten, dass eine weitere Steigerung der Menge an E6 Immortalisierung verhindern kann. Im Einklang damit verändert sich das Verhältnis von E6 zu E6^{E4} Transkripten von transient transfizierten HPV49 E8- zu den immortalisierten Zelllinien, so dass mehr gespleißtes E6^{E4} als E6 vorhanden ist, und somit vermutlich die Menge an E6 Protein reduziert wird (**Tabelle 7**).

Prinzipiell könnte auch die Expression anderer viraler Proteine außer E6 und E7 über SD217 reguliert werden. Ein mögliches Beispiel hierfür ist die E6^{E1} Spleißverbindung, durch die E2 Protein produziert werden könnte. Eine Verringerung der E2 Proteinmenge könnte zu reduzierter Genomreplikation und somit niedriger Expression von E6 und E7 führen und Immortalisierung verhindern, konsistent mit der fehlenden Immortalisierung durch das E8-/E2- Genom. Eine quantitative Analyse der Proteinmenge von verschiedenen viralen Genomen kann leider nicht durchgeführt werden, da keine spezifischen Antikörper existieren.

Schlussendlich wurde der Einfluss von SD217 auf die Immortalisierung und Wachstumsraten von NHK nach heterologer, retroviraler Expression von E6 und E7 untersucht. Es konnte bestätigt werden, dass HPV49 WT E6 mit E7 NHK immortalisieren kann (Minoni et al., 2020; Cornet et al., 2012) (**Tabelle 8**). Es zeigte sich auch, dass die Kombination von E6 mit E7 deutlich effizienter das Wachstum primärer Zellen anregt als E7 allein. Im Einklang damit stellen die Zellen, die nur mit E7 infiziert wurden, das Wachstum nach wenigen Passagen ein, was zeigt, dass E7 die Lebensspanne der Zellen verlängert, diese aber nicht immortalisiert und dass sowohl E6 als auch E7 zur Immortalisierung beitragen. Im Einklang damit können HPV49 E8-/E6- und E8-/E7- Genome NHK nicht immortalisieren (**Tabelle 2**).

Dies ist vergleichbar mit HPV38, wo nur die Kombination von E6 und E7 effizient NHK immortalisiert (Caldeira et al., 2003). Interessanterweise führt auch die Kombination HPV49 E6 SD217 mt oder E6co zur Immortalisierung (**Tabelle 8**) und auch die Wachstumsgeschwindigkeiten der verschiedenen E6/E7-Kombinationen sind sehr ähnlich. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass einerseits retrovirale Expressionsvektoren sehr stark exprimieren, was erklärt, warum E7 mit E6 WT effizient immortalisiert, und auf der anderen Seite im Rahmen des natürlichen Vermehrungszyklus an unterschiedlichen Loci in das Wirtschromosom integrieren, wodurch möglicherweise eine niedrigere Expression erreicht werden kann, und so E6 SD217 mt oder E6co toleriert werden könnten. Allerdings könnten diese Befunde auch bedeuten, dass SD217, wie oben beschrieben, für die Expression viraler Replikationsproteine wie E2 notwendig ist, um Genomreplikation zu ermöglichen. Auf der anderen Seite sprechen diese Befunde gegen eine Beteiligung des potenziellen E6^{E9} und anderen Peptiden an der Immortalisierung.

NHK als Modell für den differenzierungsabhängigen viralen Lebenszyklus

Bei HR-HPV ist die Differenzierung der Keratinozyten erforderlich um den Replikationszyklus abzuschließen (siehe 3.4.6). Immunfluoreszenz und RNA-*In-situ*-Hybridisierungsanalysen belegen, dass beta-HPV in Hautläsionen von EV-Patienten und OTR einen differenzierungsabhängigen viralen Lebenszyklus zeigen (Borgogna et al., 2014a; Borgogna et al., 2014b; Borgogna et al., 2012; Haller et al., 1995). Ein präzises Verständnis dieser Prozesse fehlt aber bislang.

Da es nicht möglich war, stabile HPV8 oder 38 Zelllinien zu etablieren, wurde untersucht, ob der produktive Zyklus nach transienter Transfektion von HPV Genomen in organotypischen Kulturen induziert wird. Als Machbarkeitsstudie wurden mit HPV16 Genomen transfizierte NHKs verwendet. Dabei konnte gezeigt werden, dass in organotypischer Kultur gespleißte $E1^{E4}$ und $E4^{L1}$ Transkripte stark induziert werden (**Abbildung 25**). Dies ist konsistent mit der Aktivierung des differenzierungsabhängigen, viralen späten Promotor p670 im *E7* Gen, was als Nachweis eines produktiven Replikationszyklus und Infektionsexperiments mit HPV16 Quasivirionen angesehen wird (Moody und Laimins, 2010; Bienkowska-Haba et al., 2018). Unerwarteterweise, trotz einer ähnlich starken Induktion des Keratinozyten-Differenzierungsmarkers *KRT10*, steigen die $E1^{E4}$ Transkripte in transienten HPV8 organotypischen Kulturen nicht weiter an und bei HPV38 sinken sie sogar signifikant (**Abbildung 25**). Der $E1^{E4}$ Spleiß wird benötigt, um das Startkodon von E1 für die Translation des E4 Proteins bereitzustellen, und somit hängt die differenzierungsabhängige Expression von E4 vermutlich von der transkriptionellen Induktion der $E1^{E4}$ mRNA ab. Dabei kann das Transkript entsprechend entweder am frühen PolyA-Signal, oder am späten PolyA-Signal terminiert werden. Möglich wäre allerdings auch, dass die beta-HPV E4 Proteinexpression zusätzlich durch post-transkriptionelle Regulationsmechanismen wie Translationskontrolle oder Proteinstabilität beeinflusst wird. Auch URR^{E4} Transkripte sind nur schwach induziert oder reduziert in transienten HPV8 und 38 organotypischen Kulturen. Dies ist konsistent mit *in-situ* RNA Hybridisierungsmustern einer HPV5-positiven Läsion eines EV-Patienten, und legt nahe, dass der verantwortliche Promotor in der *URR* nicht stark durch Differenzierung reguliert wird (Haller et al., 1995). Dies unterstreicht, dass NHKs ein valides Modellsystem sind, um beta-HPV Replikation zu untersuchen.

Konsistent mit den Ergebnissen für HR-HPV werden gespleißte $E4^{L1}$ Transkripte bei transienten HPV8 und 38 organotypischen Kulturen induziert, was für eine Initiation des produktiven Lebenszyklus spricht, auch wenn die beobachtete Induktion schwächer ist als bei HPV16. Die HPV8-positiven organotypischen Kulturen ähneln einer HPV8-positiven planaren *Verruca*-ähnlichen Läsion eines EV-Patienten mit Bezug auf die relativen Mengen an $E1^{E4}$, $E1^{E2}$, URR^{E4} , $E4^{L1}$ und $E4b^{L1}$ Transkripten (**Abbildung 26**).

Allerdings bestehen auch Unterschiede zwischen der EV-Läsion und der Zellkultur. Die relative Menge an *URR^{E2}* war deutlich höher, und die von *E8^{E2}* deutlich niedriger in organotypischen Kulturen als in der Läsion. Diese Unterschiede einzuordnen ist nur schwer möglich, da produktive beta-HPV Läsionen bisher nur bei EV-Patienten und OTR, aber nicht in der Normalbevölkerung beschrieben wurden. Zusätzlich basiert meine Interpretation auch aufgrund der extremen Seltenheit von EV nur auf einer einzelnen Läsion.

NHK als Modellsystem für beta-HPV

Trotz mancher Limitation ist es jetzt erstmals möglich, mit transienten Assays für HPV8, 38 und 49 WT und den stabilen HPV49 *E8*- Zelllinien die virale Replikation in undifferenzierten und differenzierten NHK und deren Immortalisierung zu untersuchen. Es kann nun der Einfluss von zellulären Interaktionspartnern von E6 und E7, der EV-Suszeptibilitäts-Gene *CIB1*, *TMC6*, *TMC8* und UV-Licht, dem Hauptrisikofaktor für cSCC in OTR und EV-Patienten, auf die beta-HPV Replikation in physiologisch relevanten Keratinozyten untersucht werden (Orth, 2006; de Jong et al., 2018).

Die transiente Transfektion hat den Nachteil, dass Analysen der Veränderung des Wirtszell-Transkriptoms oder Proteoms nicht möglich sind, da nur ein kleiner Teil der Zellen die rezirkularisierten viralen Genome aufnehmen. Allerdings können diese Nachteile durch neue Techniken wie die Einzelzell-RNA-Sequenzierung oder Quasivirus-Infektionen mit Infektionsraten von 20-50 % in NHKs für z.B. HPV16 (Bienkowska-Haba et al., 2018) überkommen werden, indem sie an beta-HPV angepasst werden. Allerdings reflektiert die geringe Positivitätsrate die Situation *in-vivo* besser als stabile Zelllinien, da in Läsionen und cSCC in OTR auch nicht jede Zelle HPV-positiv ist, sondern nur ein kleiner Teil des Gewebes (Borgogna et al., 2014b; Borgogna et al., 2018). Die weitere Untersuchung der HPV49 *E8*- Zelllinien ist dennoch gut geeignet, um die Interaktionen von beta-HPV mit humanen Zellen aufzuklären. Außerdem weisen die Daten darauf hin, dass die Suche nach HPV49 und verwandten HPV in Präkanzerosen und Karzinomen intensiviert werden sollte und dass *E8^{E2}* eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Onkogenität von beta-HPV spielen könnte.

8 Literaturverzeichnis

- Accardi, R. & Gheit, T. 2014. Cutaneous HPV and skin cancer. *Presse Med*, 43(12 Pt 2), pp e435-43.
- Adachi, A., Kiyono, T., Hayashi, Y., Ohashi, M. & Ishibashi, M. 1996. Detection of Human Papillomavirus (HPV) Type 47 DNA in Malignant Lesions from Epidermodysplasia Verruciformis by Protocols for Precise Typing of Related HPV DNAs. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(2), pp 369–375.
- Ahmad, S. S., Glatzle, J., Bajaeifer, K., Buhler, S., Lehmann, T., Konigsrainer, I., Vollmer, J. P., Sipos, B., Ahmad, S. S., Northoff, H., Konigsrainer, A. & Zieker, D. 2013. Phosphoglycerate kinase 1 as a promoter of metastasis in colon cancer. *Int J Oncol*, 43(2), pp 586-90.
- Arroyo Mühr, L. S., Hultin, E. & Dillner, J. 2021. Transcription of human papillomaviruses in nonmelanoma skin cancers of the immunosuppressed. *Int J Cancer*, 149(6), pp 1341-1347.
- Auersperg, N. 1964. Long term cultivation of hypodiploid human tumor cells. *J Natl Cancer Inst*, 32(135-63).
- Baker, C. & Howley, M. 1987. Differential promoter utilization by the bovine papillomavirus in transformed cells and productively infected wart tissues. *The EMBO Journal*, 6(4), pp 1027 - 1035.
- Bandolin, L., Borsetto, D., Fussey, J., Da Mosto, M. C., Nicolai, P., Menegaldo, A., Calabrese, L., Tommasino, M. & Boscolo-Rizzo, P. 2020. Beta human papillomaviruses infection and skin carcinogenesis. *Rev Med Virol*, 30(4), pp e2104.
- Bartley, B. R., Huen, A., Rady, P. L., Tying, S. K., Nagarajan, P., Aung, P. P., Curry, J. L., Ivan, D., Torres-Cabala, C. A., Prieto, V. G. & Cho, W. C. 2022. Eosinophilic homogeneous intracytoplasmic inclusion bodies: Unique viral cytopathic changes associated with epidermodysplasia verruciformis and human papillomavirus type 49. *J Cutan Pathol*, 49(7), pp 658-662.
- Bergvall, M., Melendy, T. & Archambault, J. 2013. The E1 proteins. *Virology*, 445(1-2), pp 35-56.
- Berkhout, R., Tieben, L. M., Smits, H. I., Bouwes Bavinck, J. N., Vermeer, B. J. & Scheeget, J. 1995. Nested PCR Approach for Detection and Typing of Epidermodysplasia Verruciformis-Associated Human Papillomavirus Types in Cutaneous Cancers from Renal Transplant Recipients. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(3), pp 690-695.
- Bienkowska-Haba, M., Luszczek, W., Myers, J. E., Keiffer, T. R., DiGiuseppe, S., Polk, P., Bodily, J. M., Scott, R. S. & Sapp, M. 2018. A new cell culture model to genetically dissect the complete human papillomavirus life cycle. *PLoS Pathog*, 14(3), pp e1006846.
- Blacker, K. L., Williams, M. L. & Goldyne, M. 1987. Mitomycin C-treated 3T3 fibroblasts used as feeder layers for human keratinocyte culture retain the capacity to generate eicosanoids. *J Invest Dermatol*, 89(6), pp 536-9.
- Borgogna, C., Landini, M. M., Lanfredini, S., Doorbar, J., Bouwes Bavinck, J. N., Quint, K. D., de Koning, M. N., Genders, R. E. & Gariglio, M. 2014a. Characterization of skin lesions induced by skin-

- tropic alpha- and beta-papillomaviruses in a patient with epidermodysplasia verruciformis. *Br J Dermatol*, 171(6), pp 1550-4.
- Borgogna, C., Lanfredini, S., Peretti, A., De Andrea, M., Zavattaro, E., Colombo, E., Quaglia, M., Boldorini, R., Miglio, U., Doorbar, J., Bavinck, J. N., Quint, K. D., de Koning, M. N., Landolfo, S. & Gariglio, M. 2014b. Improved detection reveals active beta-papillomavirus infection in skin lesions from kidney transplant recipients. *Mod Pathol*, 27(8), pp 1101-15.
- Borgogna, C., Olivero, C., Lanfredini, S., Calati, F., De Andrea, M., Zavattaro, E., Savoia, P., Trisolini, E., Boldorini, R., Patel, G. K. & Gariglio, M. 2018. beta-HPV Infection Correlates with Early Stages of Carcinogenesis in Skin Tumors and Patient-Derived Xenografts from a Kidney Transplant Recipient Cohort. *Front Microbiol*, 9(117).
- Borgogna, C., Zavattaro, E., De Andrea, M., Griffin, H. M., Dell'Oste, V., Azzimonti, B., Landini, M. M., Peh, W. L., Pfister, H., Doorbar, J., Landolfo, S. & Gariglio, M. 2012. Characterization of beta papillomavirus E4 expression in tumours from Epidermodysplasia Verruciformis patients and in experimental models. *Virology*, 423(2), pp 195-204.
- Bottalico, D., Chen, Z., Dunne, A., Ostolozza, J., McKinney, S., Sun, C., Schlecht, N. F., Fatahzadeh, M., Herrero, R., Schiffman, M. & Burk, R. D. 2011. The oral cavity contains abundant known and novel human papillomaviruses from the Betapapillomavirus and Gammapapillomavirus genera. *J Infect Dis*, 204(5), pp 787-92.
- Brant, A. C., Majerciak, V., Moreira, M. A. M. & Zheng, Z. M. 2019. HPV18 Utilizes Two Alternative Branch Sites for E6*I Splicing to Produce E7 Protein. *Virology*, 34(2), pp 211-221.
- Brimer, N., Drews, C. M. & Vande Pol, S. B. 2017. Association of papillomavirus E6 proteins with either MAML1 or E6AP clusters E6 proteins by structure, function, and evolutionary relatedness. *PLoS Pathog*, 13(12), pp e1006781.
- Buck, C. B., Day, P. M. & Trus, B. L. 2013. The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology*, 445(1-2), pp 169-74.
- Buitrago-Perez, A., Hachimi, M., Duenas, M., Lloveras, B., Santos, A., Holguin, A., Duarte, B., Santiago, J. L., Akgul, B., Rodriguez-Peralto, J. L., Storey, A., Ribas, C., Larcher, F., del Rio, M., Paramio, J. M. & Garcia-Escudero, R. 2012. A humanized mouse model of HPV-associated pathology driven by E7 expression. *PLoS One*, 7(7), pp e41743.
- Bzhalava, D., Guan, P., Franceschi, S., Dillner, J. & Clifford, G. 2013. A systematic review of the prevalence of mucosal and cutaneous human papillomavirus types. *Virology*, 445(1-2), pp 224-31.
- Caldeira, S., Zehbe, I., Accardi, R., Malanchi, I., Dong, W., Giarre, M., de Villiers, E. M., Filotico, R., Boukamp, P. & Tommasino, M. 2003. The E6 and E7 proteins of the cutaneous human papillomavirus type 38 display transforming properties. *J Virol*, 77(3), pp 2195-206.
- Chahoud, J., Semaan, A., Chen, Y., Cao, M., Rieber, A. G., Rady, P. & Tyring, S. K. 2016. Association Between β -Genus Human Papillomavirus and Cutaneous Squamous Cell Carcinoma in Immunocompetent Individuals—A Meta-analysis. *JAMA Dermatology*, 152(12), pp 1354-1364.

Literaturverzeichnis

- Chen, J., Xue, Y., Poidinger, M., Lim, T., Chew, S. H., Pang, C. L., Abastado, J. P. & Thierry, F. 2014. Mapping of HPV transcripts in four human cervical lesions using RNAseq suggests quantitative rearrangements during carcinogenic progression. *Virology*, 462-463(14-24).
- Cornet, I., Bouvard, V., Campo, M. S., Thomas, M., Banks, L., Gissmann, L., Lamartine, J., Sylla, B. S., Accardi, R. & Tommasino, M. 2012. Comparative analysis of transforming properties of E6 and E7 from different beta human papillomavirus types. *J Virol*, 86(4), pp 2366-70.
- de Jong, S. J., Crequer, A., Matos, I., Hum, D., Gunasekharan, V., Lorenzo, L., Jabot-Hanin, F., Imahorn, E., Arias, A. A., Vahidnezhad, H., Youssefian, L., Markle, J. G., Patin, E., D'Amico, A., Wang, C. Q. F., Full, F., Ensser, A., Leisner, T. M., Parise, L. V., Bouaziz, M., Maya, N. P., Cadena, X. R., Saka, B., Saeidian, A. H., Aghazadeh, N., Zeinali, S., Itin, P., Krueger, J. G., Laimins, L., Abel, L., Fuchs, E., Uitto, J., Franco, J. L., Burger, B., Orth, G., Jouanguy, E. & Casanova, J. L. 2018. The human CIB1-EVER1-EVER2 complex governs keratinocyte-intrinsic immunity to beta-papillomaviruses. *J Exp Med*, 215(9), pp 2289-2310.
- de Koning, M. N. C., Weissenborn, S. J., Abeni, D., Bouwes Bavinck, J. N., Euvrard, S., Green, A. C., Harwood, C. A., Naldi, L., Neale, R., Nindl, I., Proby, C. M., Quint, W. G. V., Sampogna, F., Ter Schegget, J., Struijk, L., Wieland, U., Pfister, H. J., Feltkamp, M. C. W. & The Epi-Hpv-Uv-Ca, G. 2009. Prevalence and associated factors of betapapillomavirus infections in individuals without cutaneous squamous cell carcinoma. *J Gen Virol*, 90(Pt 7), pp 1611-1621.
- de Martel, C., Plummer, M., Vignat, J. & Franceschi, S. 2017. Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type. *Int J Cancer*, 141(4), pp 664-670.
- Dell'Oste, V., Azzimonti, B., De Andrea, M., Mondini, M., Zavattaro, E., Leigheb, G., Weissenborn, S. J., Pfister, H., Michael, K. M., Waterboer, T., Pawlita, M., Amantea, A., Landolfo, S. & Gariglio, M. 2009. High beta-HPV DNA loads and strong seroreactivity are present in epidermodysplasia verruciformis. *J Invest Dermatol*, 129(4), pp 1026-34.
- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M. & Gingeras, T. R. 2013. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 29(1), pp 15-21.
- Dona, M. G., Gheit, T., Vescio, M. F., Latini, A., Moretto, D., Benevolo, M., Cristaudo, A., Tommasino, M. & Giuliani, M. 2016. Incidence, clearance and duration of cutaneous beta and gamma human papillomavirus anal infection. *J Infect*, 73(4), pp 380-3.
- Doorbar, J. 2013. The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology*, 445(1-2), pp 80-98.
- Dreer, M., Fertey, J., van de Poel, S., Straub, E., Madlung, J., Macek, B., Iftner, T. & Stubenrauch, F. 2016. Interaction of NCOR/SMRT Repressor Complexes with Papillomavirus E8^{E2C} Proteins Inhibits Viral Replication. *PLoS Pathog*, 12(4), pp e1005556.
- Dürst, M., Dzarlieva-Petrusevska, R. T., Boukamp, P., Fusenig, N. E. & Gissmann, L. 1987. Molecular and cytogenetic analysis of immortalized human primary keratinocytes obtained after transfection with human papillomavirus type 16 DNA. *Oncogene*, 1(3), pp 251-6.
- Egawa, N. & Doorbar, J. 2017. The low-risk papillomaviruses. *Virus Res*, 231(119-127).

Literaturverzeichnis

- Favre, M., Obalek, S., Jablonska, S. & Orth, G. 1989. Human Papillomavirus Type 49, a Type Isolated from Flat Warts of Renal Transplant Patients. *Journal of Virology*, 63(11), pp 4909.
- Frattini, M. G., Lim, H. B. & Laimins, L. A. 1996. In vitro synthesis of oncogenic human papillomaviruses requires episomal genomes for differentiation-dependent late expression. *PNAS*, 93(Microbiology), pp pp. 3062-3067.
- Galati, L., Combes, J. D., Gupta, P., Sen, R., Robitaille, A., Brancaccio, R. N., Atsou, K., Cuenin, C., McKay-Chopin, S., Tornesello, M. L., Buonaguro, F. M., Clifford, G., Gheit, T. & Tommasino, M. 2020. Detection of a large spectrum of viral infections in conjunctival premalignant and malignant lesions. *Int J Cancer*, 147(10), pp 2862-2870.
- Geimanen, J., Isok-Paas, H., Pipitch, R., Salk, K., Laos, T., Orav, M., Reinson, T., Ustav, M., Jr., Ustav, M. & Ustav, E. 2011. Development of a cellular assay system to study the genome replication of high- and low-risk mucosal and cutaneous human papillomaviruses. *J Virol*, 85(7), pp 3315-29.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. & Nairn, R. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, 36(1), pp 59-74.
- Haller, K., Stubenrauch, F. & Pfister, H. 1995. Differentiation-Dependent Transcription of the Epidermodysplasia Verruciformis-Associated Human Papillomavirus Type 5 in Benign Lesions. *Virology*, 214(245–255).
- Hampras, S. S., Rollison, D. E., Giuliano, A. R., McKay-Chopin, S., Minoni, L., SereDay, K., Gheit, T. & Tommasino, M. 2017. Prevalence and Concordance of Cutaneous Beta Human Papillomavirus Infection at Mucosal and Cutaneous Sites. *J Infect Dis*, 216(1), pp 92-96.
- Howley, P. M. & Pfister, H. J. 2015. Beta genus papillomaviruses and skin cancer. *Virology*, 479-480(290-6).
- Hufbauer, M., Lazic, D., Akgul, B., Brandsma, J. L., Pfister, H. & Weissenborn, S. J. 2010. Enhanced human papillomavirus type 8 oncogene expression levels are crucial for skin tumorigenesis in transgenic mice. *Virology*, 403(2), pp 128-36.
- Iftner, T., Sagner, G. & Wettstein, F. O. 1990. The E7 Protein of Human Papillomavirus 8 Is a Nonphosphorylated Protein of 17 kDa and Can Be Generated by Two Different Mechanisms. *Virology*, 179(428-436).
- Jackson, S., Harwood, C., Thomas, M., Banks, L. & Storey, A. 2000. Role of Bak in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins. *Genes Dev*, 14(23), pp 3065-73.
- Jainchill, J. L., Aaronson, S. A. & Todaro, G. J. 1969. Murine Sarcoma and Leukemia Viruses: Assay Using Clonal Lines of Contact-Inhibited Mouse Cells. *Journal of Virology*, 4(5), pp 549–553.
- Karstensen, B., Poppelreuther, S., Bonin, M., Walter, M., Iftner, T. & Stubenrauch, F. 2006. Gene expression profiles reveal an upregulation of E2F and downregulation of interferon targets by HPV18 but no changes between keratinocytes with integrated or episomal viral genomes. *Virology*, 353(1), pp 200-9.

Literaturverzeichnis

- Kirnbauer, R., Taub, J., Greenstone, H., Roden, R., Dürst, M., Gissman, L., Lowy, D. R. & Schiller, J. T. 1993. Efficient Self-Assembly of Human Papillomavirus Type 16 LI and L1-L2 into Virus-Like Particles. *Journal of Virology*, 67(12), pp 6929-6936.
- Kuehner, F. & Stubenrauch, F. 2022. Functions of Papillomavirus E8^{E2} Proteins in Tissue Culture and In Vivo. *Viruses*, 14(5), pp.
- Lace, M. J., Anson, J. R., Thomas, G. S., Turek, L. P. & Haugen, T. H. 2008. The E8--E2 gene product of human papillomavirus type 16 represses early transcription and replication but is dispensable for viral plasmid persistence in keratinocytes. *J Virol*, 82(21), pp 10841-53.
- Lei, J., Ploner, A., Elfstrom, K. M., Wang, J., Roth, A., Fang, F., Sundstrom, K., Dillner, J. & Sparen, P. 2020. HPV Vaccination and the Risk of Invasive Cervical Cancer. *N Engl J Med*, 383(14), pp 1340-1348.
- Lutzner, M. A., Blanchet-Bardon, C. & Orth, G. 1984. Clinical Observations, Virologic Studies, and Treatment Trials in Patients with Epidermodysplasia Verruciformis, a Disease Induced by Specific Human Papillomaviruses. *Journal of Investigative Dermatology*, 83(1), pp S18-S25.
- McBride, A. A. 2013. The papillomavirus E2 proteins. *Virology*, 445(1-2), pp 57-79.
- Meyers, J. M., Spangle, J. M. & Munger, K. 2013. The human papillomavirus type 8 E6 protein interferes with NOTCH activation during keratinocyte differentiation. *J Virol*, 87(8), pp 4762-7.
- Meyers, J. M., Uberoi, A., Grace, M., Lambert, P. F. & Munger, K. 2017. Cutaneous HPV8 and MmuPV1 E6 Proteins Target the NOTCH and TGF-beta Tumor Suppressors to Inhibit Differentiation and Sustain Keratinocyte Proliferation. *PLoS Pathog*, 13(1), pp e1006171.
- Minoni, L., Romero-Medina, M. C., Venuti, A., Sirand, C., Robitaille, A., Altamura, G., Le Calvez-Kelm, F., Viarisio, D., Zanier, K., Muller, M., Accardi, R. & Tommasino, M. 2020. Transforming Properties of Beta-3 Human Papillomavirus E6 and E7 Proteins. *mSphere*, 5(4), pp.
- Moody, C. A. & Laimins, L. A. 2010. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer*, 10(8), pp 550-60.
- Muench, P., Probst, S., Schuetz, J., Leiprecht, N., Busch, M., Wesselborg, S., Stubenrauch, F. & Iftner, T. 2010. Cutaneous papillomavirus E6 proteins must interact with p300 and block p53-mediated apoptosis for cellular immortalization and tumorigenesis. *Cancer Res*, 70(17), pp 6913-24.
- Myers, J. E., Guidry, J. T., Scott, M. L., Zwolinska, K., Raikhy, G., Prasai, K., Bienkowska-Haba, M., Bodily, J. M., Sapp, M. J. & Scott, R. S. 2019. Detecting episomal or integrated human papillomavirus 16 DNA using an exonuclease V-qPCR-based assay. *Virology*, 537(149-156).
- Nunes, E. M., Talpe-Nunes, V. & Slichero, L. 2018. Epidemiology and biology of cutaneous human papillomavirus. *Clinics (Sao Paulo)*, 73(suppl 1), pp e489s.
- O'Shaughnessy, R. F., Akgul, B., Storey, A., Pfister, H., Harwood, C. A. & Byrne, C. 2007. Cutaneous human papillomaviruses down-regulate AKT1, whereas AKT2 up-regulation and activation associates with tumors. *Cancer Res*, 67(17), pp 8207-15.

Literaturverzeichnis

- Orth, G. 2006. Genetics of epidermodysplasia verruciformis: Insights into host defense against papillomaviruses. *Semin Immunol*, 18(6), pp 362-74.
- Ozbun, M. A. & Meyers, C. 1998. Human Papillomavirus Type 31b E1 and E2 Transcript Expression Correlates with Vegetative Viral Genome Amplification. *Virology*, 248(2), pp 218-230.
- Pfefferle, R., Marcuzzi, G. P., Akgul, B., Kasper, H. U., Schulze, F., Haase, I., Wickenhauser, C. & Pfister, H. 2008. The human papillomavirus type 8 E2 protein induces skin tumors in transgenic mice. *J Invest Dermatol*, 128(9), pp 2310-5.
- Pierce Campbell, C. M., Messina, J. L., Stoler, M. H., Jukic, D. M., Tommasino, M., Gheit, T., Rollison, D. E., Slichero, L., Sirak, B. A., Ingles, D. J., Abrahamsen, M., Lu, B., Villa, L. L., Lazcano-Ponce, E. & Giuliano, A. R. 2013. Cutaneous human papillomavirus types detected on the surface of male external genital lesions: a case series within the HPV Infection in Men Study. *J Clin Virol*, 58(4), pp 652-9.
- Powell, M. L., Smith, J. A., Sowa, M. E., Harper, J. W., Iftner, T., Stubenrauch, F. & Howley, P. M. 2010. NCoR1 mediates papillomavirus E8;E2C transcriptional repression. *J Virol*, 84(9), pp 4451-60.
- Probst-Hunczek, S., Jager, G., Schneider, M., Notz, E., Stubenrauch, F. & Iftner, T. 2015. RNA sequencing analysis identifies novel spliced transcripts but does not indicate quantitative or qualitative changes of viral transcripts during progression of cottontail rabbit papillomavirus-induced tumours. *J Gen Virol*, 96(10), pp 3083-3089.
- Quint, K. D., Genders, R. E., de Koning, M. N., Borgogna, C., Gariglio, M., Bouwes Bavinck, J. N., Doorbar, J. & Feltkamp, M. C. 2015. Human Beta-papillomavirus infection and keratinocyte carcinomas. *J Pathol*, 235(2), pp 342-54.
- Rehm, T. M., Straub, E., Iftner, T. & Stubenrauch, F. 2022. Restriction of viral gene expression and replication prevents immortalization of human keratinocytes by a beta-human papillomavirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(11), pp e2118930119.
- Rehm, T. M., Straub, E., Forchhammer, S., Leiter, U., Iftner, T. & Stubenrauch, F. 2022. Transcription Properties of Beta-HPV8 and HPV38 Genomes in Human Keratinocytes, *J Virol*, 96(23), pp e0149822.
- Robinson, J. T., Thorvaldsdottir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E. S., Getz, G. & Mesirov, J. P. 2011. Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol*, 29(1), pp 24-6.
- Rollison, D. E., Viariso, D., Amorrortu, R. P., Gheit, T. & Tommasino, M. 2019. An Emerging Issue in Oncogenic Virology: the Role of Beta Human Papillomavirus Types in the Development of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *J Virol*, 93(7), pp.
- Roman, A. & Munger, K. 2013. The papillomavirus E7 proteins. *Virology*, 445(1-2), pp 138-68.
- Romanczuk, H. & Howley, P. 1992. Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(3159-3163).
- Rozenblatt-Rosen, O., Deo, R. C., Padi, M., Adelmant, G., Calderwood, M. A., Rolland, T., Grace, M., Dricot, A., Askenazi, M., Tavares, M., Pevzner, S. J., Abderazzaq, F., Byrdsong, D., Carvunis, A. R., Chen, A. A., Cheng, J., Correll, M., Duarte, M., Fan, C., Feltkamp, M. C., Ficarro, S. B.,

Literaturverzeichnis

- Franchi, R., Garg, B. K., Gulbahce, N., Hao, T., Holthaus, A. M., James, R., Korkhin, A., Litovchick, L., Mar, J. C., Pak, T. R., Rabello, S., Rubio, R., Shen, Y., Singh, S., Spangle, J. M., Tasan, M., Wanamaker, S., Webber, J. T., Roecklein-Canfield, J., Johannsen, E., Barabasi, A. L., Beroukhir, R., Kieff, E., Cusick, M. E., Hill, D. E., Munger, K., Marto, J. A., Quackenbush, J., Roth, F. P., DeCaprio, J. A. & Vidal, M. 2012. Interpreting cancer genomes using systematic host network perturbations by tumour virus proteins. *Nature*, 487(7408), pp 491-5.
- Sankovski, E., Mannik, A., Geimanen, J., Ustav, E. & Ustav, M. 2014. Mapping of betapapillomavirus human papillomavirus 5 transcription and characterization of viral-genome replication function. *J Virol*, 88(2), pp 961-73.
- Scheffner, M., Münger, K., Byrne, J. C. & Howley, P. M. 1991. The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(5523-5527).
- Schiller, J. T. & Lowy, D. R. 2012. Understanding and learning from the success of prophylactic human papillomavirus vaccines. *Nat Rev Microbiol*, 10(10), pp 681-92.
- Schmitt, A., Harry, J. B., Rapp, B., Wettstein, F. O. & Iftner, T. 1994. Comparison of the Properties of the E6 and E7 Genes of Low- and High-Risk Cutaneous Papillomaviruses Reveals Strongly Transforming and High Rb-Binding Activity for the E7 Protein of the Low-Risk Human Papillomavirus Type 1. *Journal of Virology*, 68(11), pp 7051-7059.
- Sibley, C. R., Blazquez, L. & Ule, J. 2016. Lessons from non-canonical splicing. *Nat Rev Genet*, 17(7), pp 407-421.
- Spriggs, C. C. & Laimins, L. A. 2017. Human Papillomavirus and the DNA Damage Response: Exploiting Host Repair Pathways for Viral Replication. *Viruses*, 9(8), pp.
- Stockfleth, E., Nindl, I., Sterry, W., Ulrich, C., Schmook, T. & Meyer, T. 2004. Human Papillomaviruses in Transplant Associated Skin Cancers. *Dermatologic Surgery*, 30(604-609).
- Straub, E., Dreer, M., Fertey, J., Iftner, T. & Stubenrauch, F. 2014. The viral E8^{E2C} repressor limits productive replication of human papillomavirus 16. *J Virol*, 88(2), pp 937-47.
- Straub, E., Fertey, J., Dreer, M., Iftner, T. & Stubenrauch, F. 2015. Characterization of the Human Papillomavirus 16 E8 Promoter. *J Virol*, 89(14), pp 7304-13.
- Stubenrauch, F., Hummel, M., Iftner, T. & Laimins, L. A. 2000. The E8^{E2C} Protein, a Negative Regulator of Viral Transcription and Replication, Is Required for Extrachromosomal Maintenance of Human Papillomavirus Type 31 in Keratinocytes. *Journal of Virology*, 74(3), pp 1178–1186.
- Stubenrauch, F., Malejczek, J., Fuchs, P. G. & Pfister, H. 1992. Late Promoter of Human Papillomavirus Type 8 and Its Regulation. *Journal of Virology*, 66(6), pp 3485-3493.
- Stubenrauch, F., Straub, E., Klein, K., Kramer, D., Iftner, T., Wong, M. & Roden, R. B. S. 2021. Expression of E8^{E2} Is Required for Wart Formation by Mouse Papillomavirus 1 In Vivo. *Journal of Virology*, 95(8), pp.

Literaturverzeichnis

- Tan, C. L., Gunaratne, J., Lai, D., Carthage, L., Wang, Q., Xue, Y. Z., Quek, L. S., Doorbar, J., Bachelier, F., Thierry, F. & Bellanger, S. 2012a. HPV-18 E2^{E4} chimera: 2 new spliced transcripts and proteins induced by keratinocyte differentiation. *Virology*, 429(1), pp 47-56.
- Tan, M. J., White, E. A., Sowa, M. E., Harper, J. W., Aster, J. C. & Howley, P. M. 2012b. Cutaneous beta-human papillomavirus E6 proteins bind Mastermind-like coactivators and repress Notch signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(23), pp E1473-80.
- Tang, S., Tao, M., McCoy, J. P., Jr. & Zheng, Z. M. 2006. The E7 oncoprotein is translated from spliced E6*1 transcripts in high-risk human papillomavirus type 16- or type 18-positive cervical cancer cell lines via translation reinitiation. *J Virol*, 80(9), pp 4249-63.
- Tomlins, C. & Storey, A. 2010. Cutaneous HPV5 E6 causes increased expression of Osteoprotegerin and Interleukin 6 which contribute to evasion of UV-induced apoptosis. *Carcinogenesis*, 31(12), pp 2155-64.
- Tommasino, M. 2014. The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis. *Semin Cancer Biol*, 26(13-21).
- Tommasino, M. 2017. The biology of beta human papillomaviruses. *Virus Res*, 231(128-138).
- Underbrink, M. P., Howie, H. L., Bedard, K. M., Koop, J. I. & Galloway, D. A. 2008. E6 proteins from multiple human betapapillomavirus types degrade Bak and protect keratinocytes from apoptosis after UVB irradiation. *J Virol*, 82(21), pp 10408-17.
- Vande Pol, S. B. & Klingelutz, A. J. 2013. Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology*, 445(1-2), pp 115-37.
- Viarisio, D., Gissmann, L. & Tommasino, M. 2017. Human papillomaviruses and carcinogenesis: well-established and novel models. *Curr Opin Virol*, 26(56-62).
- Wang, J. W. & Roden, R. B. 2013. L2, the minor capsid protein of papillomavirus. *Virology*, 445(1-2), pp 175-86.
- Weissenborn, S. J., Nindl, I., Purdie, K., Harwood, C., Proby, C., Breuer, J., Majewski, S., Pfister, H. & Wieland, U. 2005. Human papillomavirus-DNA loads in actinic keratoses exceed those in non-melanoma skin cancers. *J Invest Dermatol*, 125(1), pp 93-7.
- Wettstein, F. O., Barbosa, M. S. & Nasser, M. 1987. Identification of the major cottontail rabbit papillomavirus late RNA cap site and mapping and quantitation of an E2 and minor E6 coding mRNA in papillomas and carcinomas. *Virology*, 159(2), pp 321-8.
- White, E. A. 2019. Manipulation of Epithelial Differentiation by HPV Oncoproteins. *Viruses*, 11(4), pp.
- White, E. A., Kramer, R. E., Tan, M. J., Hayes, S. D., Harper, J. W. & Howley, P. M. 2012a. Comprehensive analysis of host cellular interactions with human papillomavirus E6 proteins identifies new E6 binding partners and reflects viral diversity. *J Virol*, 86(24), pp 13174-86.
- White, E. A., Sowa, M. E., Tan, M. J., Jeudy, S., Hayes, S. D., Santha, S., Munger, K., Harper, J. W. & Howley, P. M. 2012b. Systematic identification of interactions between host cell proteins and E7 oncoproteins from diverse human papillomaviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(5), pp E260-7.

Literaturverzeichnis

- Xue, X. Y., Majerciak, V., Uberoi, A., Kim, B. H., Gotte, D., Chen, X., Cam, M., Lambert, P. F. & Zheng, Z. M. 2017. The full transcription map of mouse papillomavirus type 1 (MmuPV1) in mouse wart tissues. *PLoS Pathog*, 13(11), pp e1006715.
- Yabe, Y., Tanimura, Y., Saka, A., Hitsumoto, T. & Nohara, N. 1989. Molecular characteristics and physical state of human Papillomavirus DNA change with progressing malignancy: studies in a patient with Epidermodysplasia verruciformis. *International Journal of Cancer*, 43(1022-1028).
- Yee, C., Krishnan-Hewlett, I., Baker, C. C., Schlegel, R. & Howley, P. M. 1985. Presence and Expression of Human Papillomavirus Sequences in Human Cervical Carcinoma Cell lines. *Rapid Communication*, 119(3), pp 361-366.
- Zhai, L. & Tumban, E. 2016. Gardasil-9: A global survey of projected efficacy. *Antiviral Res*, 130(101-9).

9 Material

9.1 Chemikalien

Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: BioRad, Fluka (Honeywell), Merck, Roche, Carl Roth und Sigma-Aldrich.

9.2 Enzyme

Die eingesetzten Restriktionsenzyme wurden von ThermoFisher Scientific oder New England Biolabs (NEB) bezogen.

Alle weiteren Enzyme sind im Folgenden aufgeführt.

Name	Hersteller	Verwendung
FastAP (Thermosensitive Alkaline Phosphatase)	Thermo Fisher	Verhindert Selbst-Ligation von DNA-Teilen bei Klonierungen
Pyrobest DNA-Polymerase	Takara	PCR
T4-DNA-Ligase	Thermo Fisher Scientific	Ligation von Virus-DNA nach dem Ausschneiden aus einem Vektor

9.3 Kits und komplette Reaktionssysteme

Name	Hersteller	Verwendung
FuGENE®HD Transfection Reagent	Promega	Transfektion von DNA-Plasmiden
Gaussia Juice Big Kit	PJK	Luziferase-Assay, Renilla-Luziferase-Aktivität
Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder	Thermo Fisher	Standard für DNA Elektrophorese
LightCycler 480 SYBR Green I Master Mix	Roche	Real-Time qPCR
Lipofectamin RNAiMAX	Invitrogen	siRNA Transfektion
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher	Standard für Proteinelektrophorese
QIAgen®Plasmid Maxi Kit	Qiagen	Isolation von Plasmid-DNA
QIAgen®Plasmid Midi Kit	Qiagen	Isolation von Plasmid-DNA
QIAprep®Spin Miniprep Kit	Qiagen	Isolation von Plasmid-DNA

Material

QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen	DNA-Gelextraktion
QIAshredder® Kit	Qiagen	Homogenisierung des Zelllysats zur RNA-Isolation
QuantiTect® Reverse Transcription Kit	Qiagen	Reverse Transkription und cDNA Synthese
RNeasy® Mini Kit; optional: RNase-freie DNase	Qiagen	RNA-isolation

9.4 Zellen und Zelllinien

9.4.1 Bakterienstämme

Eingesetzt wurden: Escherichia coli DH5α (Clontech, Heidelberg)

Genotyp: endA1 hsdR17 supE44 thi-1 recA1 gyrA (Naly) relA1 Δ(lacIZYA-argF)U169 deoR (φ80dlacΔ(lacZ)M15); Endonukleasen- und Rekombinase-defizienter Bakterienstamm zur DNA-Amplifikation

9.4.2 Eukaryotische Zellen und Zelllinien

Zellen	Beschreibung
C33A	HPV-negative Cervix-Karzinom Zelllinie, hat Mutationen in p53 und RB1 (Auersperg, 1964; Scheffner et al., 1991; Yee et al., 1985).
NHK	Normale humane Keratinozyten, NHK wurden aus menschlicher Vorhaut nach routinemäßiger Beschneidung (Hautklinik Tübingen) isoliert. Die Zustimmung der Patienten lag vor. Diese wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen (6199/2018BO2) erteilt und nach den Grundsätzen der Deklaration von Helsinki durchgeführt.
NIH3T3-J2	Maus Fibroblasten Zelllinie, wurden als <i>Feeder</i> -Zellen für transfizierte Keratinozyten eingesetzt. (Jainchill et al., 1969)
NIH3T3-J2 NHP	Maus Fibroblasten Zelllinie zusätzlich mit Selektionsplasmiden transfiziert
Phoenix-Zellen	Basieren auf 293T-Zellen (Embryo-Nieren Zelllinie mit Adenovirus E1A und SV-40 <i>Large-T</i> -Antigen; 293-T: (Graham et al., 1977); Phoenix: Nolan-Lab, Stanford University). Enthalten zusätzlich Plasmide zur Verpackung der transfizierten DNA (gag-, pol- und env-Protein).
HPV49 E8- Zelllinien	HPV49 E8- positive Zelllinien, generiert mittels Transfektion rezirkularisierter viraler Genome in NHK (Rehm et al., 2022).
HPV49 E6/E7 Zelllinien	NHKs retroviral transduziert mit einem pMSCV-Puromycin Plasmid welches HPV49 E7 enthält, und einem pLXSN-Neomycin Plasmid, welches HPV49 E6 enthält (nicht publiziert).

HPV49 E6co/E7 Zelllinien	NHKs retroviral transduziert mit einem pMSCV-Puromycin Plasmid welches HPV49 E7 enthält, und einem pLXSN-Neomycin Plasmid, welches kodonoptimiertes HPV49 E6 enthält (nicht publiziert).
HPV49 E6-SD/E7 Zelllinien	NHKs retroviral transduziert mit einem pMSCV-Puromycin Plasmid welches HPV49 E7 enthält, und einem pLXSN-Neomycin Plasmid, welches HPV49 E6-SD217-Mutante enthält (nicht publiziert).
HPV49 E7 Zelllinien	NHKs retroviral transduziert mit einem pMSCV-Puromycin Plasmid welches HPV49 E7 enthält.

9.5 Primäre Antikörper

Antikörper	Firma	Katalog-Nr.	Spezies	Verdünnung
aHSP90 (4F10)	Santa Cruz	sc-69703	Maus monoclonal	1:2.000
aHA	Cell Signalling	3724S	Kaninchen monoklonal	1:1.000

9.6 Sekundäre Antikörper

Ziel		Firma	Spezies	Verdünnung
Kaninchen	IRDye® 680RD		Ziege	1:15.000 (WB)
Maus	IRDye® 800CW		Ziege	1:15.000 (WB)

9.7 Puffer und Medien

9.7.1 Allgemeine Puffer und Lösungen

Name	Hersteller/Zusammensetzung	Verwendung
CAPS-Puffer	10 mM CAPS 10 % (v/v) Methanol pH 10,3	Western-Blot (Transfer)
10x DNA Ladepuffer	20 % (w/v) Ficoll 400 0,1 M Na ₂ EDTA (pH 8,0) 1 % (w/v) SDS 0,25 % (w/v) Bromphenolblau 0,25 % (w/v) Xylencyanol	
Ethidiumbromidlösung 0,025 %	Tropfflasche mit einer fertigen Lösung 0,025 % (250 µg/ml) (Carl Roth)	Agarosegele (DNA- Auftrennung)
Firefly-Luziferasepuffer	100 mM K-PO ₄ pH 7,8 15 mM MgSO ₄ 5 mM ATP 0,5x D-Luziferin (10 µl Luziferin/ml)	Nachweis der Firefly- Luziferase Aktivität im Luziferase-Assay

Material

Luziferase-Lysepuffer	100 mM K-PO ₄ pH 7,8 1 % Triton-X-100 1 mM DTT	Lysieren von Zellen für Luziferase-Assay
10x PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,5 mM KH ₂ PO ₄ (pH 7,2)	Waschpuffer
PBS-T	PBS-Puffer + 0,1 % (v/v) Tween®20 (Uniqema, St. Paterson, USA)	Waschpuffer
RIPA-Puffer	1 % (v/v) NP-40 1 % (v/v) Natrium Deoxycholate 0,1 % (v/v) SDS 150 mM NaCl 10 mM Natrium Phosphat pH 7,2 2 mM EDTA 50 mM Natrium Fluorid 1x Complete EDTA-freier Protease Inhibitor (Roche) 1x PhosStop (Roche)	Western-Blot Protein- Extrakte
Roti-Load 1 (4x)	Roth, fertige Lösung	Protein-Gelbeladung
Sammelgel-Puffer	1,5 M Tris-HCl pH 8,8	Western-Blot Gel
SDS-Ladepuffer (5x)	125 mM Tris-HCl 0,96 M Glycin 17,3 mM SDS	Proteingel-Lauf
50x TAE Puffer	2 M Tris 1 M Essigsäure 0,1 M EDTA	Agarosegele
Trenngel-Puffer	1,5 M Tris-HCl pH 6,8	Wester-Blot Gel

9.7.2 Medien für die Bakterienkultur

Bakterien-Einfriermedium	65 % (w/v) Glycerol 0,1 M MgSO ₄ 2,5 mM Tris (pH 8,0)
LB-Medium	25 g/l LB Medium (Carl Roth) Bei Bedarf: 100 µg/ml Ampicillin oder 30 µg/ml Kanamycin
LB-Agar (Luria-Bertani-Agar)	25 g/l LB Medium (Carl Roth) 12 g/l Select Agar (Invitrogen) Bei Bedarf: 100 µg/ml Ampicillin oder 30 µg/ml Kanamycin
SOC-Medium	2 % (w/v) Bacto-Trypton 0,5 % (w/v) Bacto-Yeast Extract 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glukose pH-Wert 7,0

9.7.3 Medien, Medienzusätze und Lösungen für die Zellkultur

Name	Hersteller	Zusammensetzung
Calf serum (CS)	PAA Laboratories	10 % Zugabe in Medien
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Thermo Fisher	Fertiglösung mit Zusatz von 50 mg/l Gentamycin
DMEM/F-12, GlutaMAX™ supplement (mix aus 1:1 DMEM und Ham's F-12)	Thermo Fisher	Fertiglösung mit Zusatz von 50 mg/l Gentamycin
DPBS 1x Dulbecco's PBS	gibco	Fertiglösung ohne Calcium, Magnesium und Natriumbicarbonat
E-Medium: DMEM /F12	-	Adenin (1,8 mM); Hydrocortison (417 µg/ml); Insulin (50 µg/ml); Transferrin (50 µg/ml); Trijodthyronin T3 (20 pM); Cholera toxin (10 nM); 5 ng/µl epidermale Wachstumsfaktoren (EGF); 50 % DMEM + 50 % DMEM/Ham's F12 1:1; 10µl/ml Penicillin/Streptomycin; mit 5 % definiertem fötalem Kälberserum (HC-FKS; Perbio)
Fetal calf serum (FCS)	Thermo Fisher	10 % Zugabe in Medien
HC (HyClone)	Cytiva	Zugabe in Medien
KollagenI (aus Rattenschwanz)	Corning (Thermo Fisher)	Organotypische Kultur
KSFM (Keratinocyten-serumfreies Medium)	Thermo Fisher	Serumfreies Medium für die Kultivierung von Keratinocyten mit Rinderhypophysenextrakt und EGF als Zusatz (13028-014/10450-013), sowie 50 mg/l Gentamycin
Mitomycin-C	Medac	Stammlösung: 0,4 mg/ml in PBS; Je 20 µl/ml Medium zur Wachstumsarretierung von <i>Feeder</i> -Zellen
OptiMEM	Thermo Fisher	Serumreduziertes Medium mit Glutamax-I (L-Alanyl-L-Glutamin)
P/S (Penicillin/Streptomycin)-Lösung	Thermo Fisher	Zusatz Zellkulturmedien
Trypsin-EDTA	Thermo Fisher	0,5 g Trypsin (1:250) und 0,2 g EDTA pro Liter modifizierter PUCK's Salzlösung A
Versen	-	PBS-Fertiglösung mit 0,5 mM EDTA

9.8 Oligonukleotide

Oligonukleotide für Klonierungen:

Bezeichnung	Sequenz	Richtung	Verwendungszweck
HPV38 3372 F EcoRI	ATATATGAATTCGATACGGGAGAAAA	F	Klonierung HPV38 E4 ^{L1} Expressionplasmid
HPV38 5785 R EcoRI	ATATATGAATTCGATCGCTAGTTGCA	R	
HPV49 3302 F EcoRI	ATATATGAATTCGCTACGAGAATCCTC	F	Klonierung HPV49 E4 ^{L1} Expressionplasmid
HPV49 5891 R EcoRI	ATATATGAATTCATCCGTGCTTTGTAC	R	
HPV49 149 F EcoRI	ATATATGAATTCGCTTGCCTGCTGTACTTT	F	Klonierung HPV49 E6 ^{E4} Standardplasmid.
HPV49 3505 R EcoRI	ATATATGAATTCGAGTTGGAGGCTGCTGTAGG	R	
HPV49 E6 SD217mt F	CCTGTAAAGTTTGTGAGCTAGCCACCACTTAA	F	Klonierung Spleiß- Donor Mutante HPV49 E6 an Position 217
HPV49 E6 SD217mt R	TAAGTGGTGGGCTAGCTCACAACTTAAACAGGT	R	

Oligonukleotide für die qPCR:

(Virales) Transkript	Detektionslimit (Plasmidkopien/Reaktion)	Vorwärts Primer	Rückwärts Primer
8 URR ^{E2}	20	TCTATTTTGGCAGCGCTTT	TCTATTTTGGCAGCGCTTTT
8 URR ^{E4}	20	TCTATTTTGGCAGCGCTTTT	CCTTTGGTTTCGGTTTGTG
8 E1 ^{E2}	2	TCAAAATTGTTGCACCGTGT	TCAAAATTGTTGCACCGTGT
8 E1 ^{E4}	2	CGGGTATCAGGACCTTTCAA	CGGTGTCTGTCTGCTTGT
8 E8 ^{E2N}	20	GACAGCGGAGTCGAGCTAAC	ATTGAAACGCTCGCTGAGAT
8 E8 ^{E2}	20	GACAGCGGAGTCGAGCTAAC	CGGTGTCTGTCTGCTTGT
8 E6	2	TGTAGCAACCGCAACGTTTG	ACTCCTTCCAGCCTCCTCT
8 E7	20	ACGAACAGGAAACGGAGGAG	CCGCCATGTTGCAGTTACC
8 E4 ^{L1}	20	TCAACCTCAAGATGGCAGTG	GCGAAAGACCCTGTGTTGAT
8 E4b ^{L1}	2	CCAGGACAAGCAGACACAGA	AACCTTACCGGTAGCCGATT
16 E1 ^{E4}	20	TGGCTGATCCTGCAGCAGC	AGGCGACGGCTTTGGTATG
16 E4 ^{L1}	20	CCCTGCCACACCACTAAGTT	CTGGGACAGGAGGCAAGTAG
38 URR ^{E2}	20	CAGACGAAGTGCACCGATAA	ACAGGTTGATAGCCCAATCG
38 URR ^{E4}	20	CAGACGAAGTGCACCGATAA	TGGTTGAAGGGCTAGATGCT
38 E1 ^{E2}	2	AGAGGAGGAGCCAGCATACA	TTTCATTGTCTCCCTCGTC

Material

38 E1^E4	2	CGATACGGAGAAAAGCATC	CGATCGCTAGTTGCATGGTA
38 E8^E2N	2	TTTGTGGAGCAAGACAGTGG	GTGCGCTGAGAGTTTCCATT
38 E8^E2	2	TTTGTGGAGCAAGACAGTGG	TGGTTGAAGGGCTAGATGCT
38 E6	20	TGTGCAGCAGCTCAGTGATA	TGTCTGTTGCTCCACCTGTT
38 E7	20	CCATTGACCTGCATTGCCAC	TGGGACACAGAAGCCTTACG
38 E4^L1	20	CGATACGGGAGAAAAGCATC	CGATCGCTAGTTGCATGGTA
49 URR^E2	200	GCAGCAACACCAGAACGATA	TTGAGTGCCTCCATTGTCTG
49 URR^E4	20	GCAGCAACACCAGAACGATA	GAGTTGGAGGCTGCTGTAGG
49 E1^E2	20	CTTCGTGTTAGCCACTGACG	TTGAGTGCCTCCATTGTCTG
49 E1^E4	2	CGTGAAGAAATTCGGAATGG	AGTCTTTTCGCCGTACCTT
49 E8^E2N	200	GGGCTCGAACAGTCTTTGAC	TGCTGTGTTTACGTGCAAAA
49 E8^E2	200	GGGCTCGAACAGTCTTTGAC	GAGTTGGAGGCTGCTGTAGG
49 E6	200	GGTATGTGAGCTAGCCCACC	CACAAGCTGCACAACAACCA
49 E7	200	CGCCAGCTGAACAAGAGTTG	TGCAGTTCCTCCAGAAGCAG
49 E6^E4	200	CGCTTGCGTGCTGTACTTT	GAGTTGGAGGCTGCTGTAGG
beta-Aktin	-	GGAAGGTCCGTGCGAGG	GAGACGGAGCAGGTCCCA
KRT10	-	CGCCTGGCTTCTACTTGG	CTGGCGCAGAGCTACCTCA
PGK1	2	CTGTGGGGGTATTTGAATGG	CTTCCAGGAGCTCCAAACTG

9.9 siRNA

Bezeichnung	Zielsequenz	Verwendungszweck
siAllstars (Qiagen)	Sequenz unbekannt da proprietär	Kontroll-siRNA
si49E6-1 (Dharmacon)	GGCUAAUUAUUGCUGAGUAUU	Knockdown HPV49 E6/E7
si49E6-2 (Dharmacon)	UGUCGUAGGCAUCGAAUAUU	Knockdown HPV49 E6/E7

9.10 Plasmide und Vektoren

Bezeichnung	Verwendungszweck/Herkunft
pBIND-Gal4-MAML1	Gal4-MAML1 exprimierendes Expressionskonstrukt für Luziferase-Assay (Vande Pol und Klingelhutz, 2013), ursprünglich: Annika Wallberg am Karolinska Institut.
pBS-HPV16:114b:1 WT	Zur Verfügung gestellt von: M. Dürst; (Kirnbauer et al., 1993); Religation viraler DNA.
pC18-SP1-4xGal4-BS	Firefly-Luziferase exprimierender Gal4-sensitiver Reporter, mit 4 Gal4-Bindungsstellen.

Material

pCI-Neo-Rluc	Renilla-Luziferase kodierender Reporter für Luziferase-Assay, kloniert in pGL4.72 Vektor (Promega). Kodon-optimiert für humane Zellen.
pEF-IRES-P-hPGK1	Kodiert cDNA der humanen Phosphoglycerat Kinase 1 (PGK1), zur Verfügung gestellt von D. Zieker (Ahmad et al., 2013)
pLXSN-Neo	Leervektor für retrovirale Infektion mit Neomycin Resistenz.
pLXSN-Neo HPV49 E6	Retrovirale Infektion von NHK zur Generierung von Zelllinien.
pLXSN-Neo HPV49 E6 co	Retrovirale Infektion von NHK zur Generierung von Zelllinien. Kodon-optimierte Version von HPV49 E6.
pLXSN-Neo HPV49 E6 SD217mt	Retrovirale Infektion von NHK zur Generierung von Zelllinien. Mutierter Spleißdonor an Position 217.
pGEM4-HPV49 E1-	Religation von viraler DNA für Transfektion humaner Zellen.
pGEM4-HPV49 E2-	
pGEM4-HPV49 E6-	
pGEM4-HPV49 E7-	
pGEM4-HPV49 E8-	
pGEM4-HPV49 WT (Referenz-Genom)	Religation von viraler DNA für Transfektion humaner Zellen, zur Verfügung gestellt von: International HPV Reference Center, Karolinska Institut, Schweden
pMSCV-Puro	Leervektor retrovirale Infektion, mit Puromycin-Resistenz.
pMSCV-Puro HPV49 E7	Retrovirale Infektion von NHK zur Generierung von Zelllinien.
pSG5-HPV8 E6 co	pSG5-Vektor mit E6 von HPV8 Kodon-optimiert, zur Expression im Luziferase-Assay.
pSG5-HPV38 E6	pSG5-Vektor mit E6 aus HPV38, zur Expression im Luziferase-Assay.
pSG5 HPV38 E4 ^{L1} (nt. 3372-4130/4131-5787)	Konzentrationsbestimmung (Standardreihen) qPCR HPV38; kloniert in pSG5-Vektor aus qPCR-Aufreinigung und PCR Re-Amplifikation mit Primern, die eine zusätzliche EcoRI-Schnittstelle an den Enden einfügen.
pSG5-3xHA-Vektor	Transfektion und Western-Blot gegen den HA-Taq zur Detektion von HPV49 E6, E6 kodonoptimiert (co) und E6 mit gezielter Spleißdonor-Mutation (E6 ^{E4-}), und Luziferase-Assay.
pSG5-3xHA-HPV49 E6	
pSG5-3xHA-HPV49 E6 co	
pSG5-3xHA-HPV49 E6-SD217mt	
pSG5-Vektor	Expressionsplasmide, im Luziferaseassay eingesetzt.
pSG5-HPV49 E6	
pSG5-HPV49 E6 co	
pSG5 HPV49 E4 ^{L1}	Konzentrationsbestimmung (Standardreihen) qPCR HPV49; kloniert in pSG5-Vektor aus qPCR-Aufreinigung und PCR Re-Amplifikation mit Primern, die eine zusätzliche EcoRI-Schnittstelle an den Enden einfügen.

Material

pSG5 HPV49 E6 ⁺ E4	Konzentrationsbestimmung (Standardreihe) qPCR HPV49, kloniert in pSG5-Vektor aus qPCR-Aufreinigung und PCR Re-Amplifikation mit Primern, die eine zusätzliche EcoRI-Schnittstelle an den Enden einfügen.
pSV2-Neo	Expressionsplasmid, kodiert Resistenz gegenüber G418 (Southern und Berg, 1982).
pUC9-HPV8 WT Klon 6	Religation von viraler DNA für Transfektion humaner Zellen.
pUC9-HPV8 E1-	
pUC9-HPV8 E2-	
pUC9-HPV8 E6-	
pUC9-HPV8 E7-	
pUC9-HPV8 E8-	
pUC19-HPV38 WT	Religation von viraler DNA für Transfektion humaner Zellen.
pUC19-HPV38 E1-	
pUC19-HPV38 E2-	
pUC19-HPV38 E6-	
pUC19-HPV38 E7-	
pUC19-HPV38 E8-	
pUC57 HPV8 E4 ⁺ L1 (nt. 3301-3443/5851-6500)	Konzentrationsbestimmung (Standardreihen) qPCR HPV8; bestellt bei Genscript (New Jersey, USA).
pUC57 HPV8 E4b ⁺ L1 (nt. 3457-3704/5851-6500)	
pUC57-HPV16 E1 ⁺ E4 ⁺ L1 (nt. 865-880/3358-3632/5639-5696)	Konzentrationsbestimmung (Standardreihen) qPCR HPV16; bestellt bei Genscript (New Jersey, USA).
pUC57 HPV38 E1 ⁺ E4 (nt. 841-926/3266-3419)	Konzentrationsbestimmung (Standardreihen) qPCR HPV38, bestellt bei Genscript (New Jersey, USA).
pUC57 HPV38 E1 ⁺ E2 (nt. 721-926/2620-2694)	
pUC57 HPV38 URR ⁺ E4 (7343-7400+0-31/3266-3600)	
pUC57 HPV38 URR ⁺ E2 (7343-7400+0-31/2620-2994)	
pUC57 HPV38 E8 ⁺ E2 (nt. 1209-1309/3266-3600)	
pUC57 HPV38 E8 ⁺ E2N (nt. 1205-1309/2619-2939)	
pUC57 HPV49 E1 ⁺ E4 (nt. 811-926/3281-3511)	Konzentrationsbestimmung (Standardreihen) qPCR HPV49; bestellt bei Genscript (New Jersey, USA).
pUC57 HPV E1 ⁺ E2 (nt. 811-926/2635-2790)	

Material

pUC57 HPV49 URR ^{E4} (nt. 7505-7560/1-62/3281-3600)	
pUC57 URR ^{E2} (nt. 7505-7560/1-62/2635-2938)	
pUC57 HPV49 E8 ^{E2} (nt. 1205-1321/3281-3600)	
pUC57 HPV49 E8 ^{E2N} (nt. 1205-1321/2635-2938)	

9.11 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Agarose-Gelelektrophorese-Kammern, Sub Cell GT Mini-Sub Cell GT Wide Mini-Sub C II GT	BioRad
CO ₂ Inkubator C200	Labotect
Einfrierbox, Mr Frosty	Nalgene
Einfrierbox, CoolCell LX	Biocision
Geldokumentationssystem Intas (Agarosegele)	Intas Pharamaceuticals
LiCore-Odyssey Fc	LiCore
pH-Meter, pH 526	WTW
PCR-Cycler	BioRad
Pipetten, Pipetman 10, 20, 200, 1000	Gilson
Pipettierhilfen Pipetus	Hirschmann Laborgeräte
Real-Time PCR Cycler, LightCycler 480II	Roche
Reinstwasseranlage: Milli-QUF Plus, PureLab-Elga	Millipore/PureLab
Schüttler: Thermomixer 5436 ThermoStat Plus	Eppendorf
Spektralphotometer, ND-1000	NanoDrop®
Sterilbank HERAsafe	Heraeus Instruments
Vakuum-Sauger VACUSAFE	Integra Bioscience
Vortexer, REAXTop	Heidolph
Wasserbad WB 10	Memmert
Zentrifugen	Eppendorf
Zählkammer, Neubauer 0,100 mm Tiefe, 0,0025 mm ²	Hecht Assistent

9.12 Verbrauchsmaterialien

Material/ Gerät /Bezeichnung	Hersteller
Einwegskalpell (surgical disposable scalpel)	B. Braun Biotech
Filter zum Schrauben (steril), 0,45 µm	Millipore
Kollagen I beschichtete Platten, 100 mm Schalen	Corning Incorporated
Kryoröhrchen, Cellstar Cryo.s	Greiner
Parafilm (PARAFILM®)	Pechiney, Plastic Packaging
PCR-Reaktionsgefäße, PCR-Softtubes (0,2 ml)	Biozym
Plastikpipette: 5, 10, 25, 50 ml	Thermo Fisher Scientific
Pipettenspitzen gestopft (10, 20, 200, 1000 µl), ART® Aerosol Resistant Tips	Molecular Bio Products
Pipettenspitzen: 0,5 – 10 µl (transparent) 10 – 200 µl (gelb) 200 – 1000 µl (blau)	Biozym® Greiner Greiner
Reaktionsgefäße: 1,5 ml und 2,0 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäße 15 ml und 50 ml	Greiner
Röhrchen für Bakterienkulturen, PP-Tube 14 ml steril	Greiner
Röhren für Bakterienstock, Cryotube 3,5 ml SI	Thermo Fisher
Transfektionsröhrchen 3,5 ml Polystyrol	Sarstedt
Zellkulturplatten: 96x6 mm, 24x10 mm, 12x22 mm, 6x35 mm	Thermo Fisher (Nunc)
Zellkulturschalen: 60 mm, 100 mm	Thermo Fisher (Nunc)
Zellkultureinsätze aus Polykarbonat	Thermo Fisher (Nunc)
Zellschaber	Corning

10 Anhang

10.1 Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden wie folgt veröffentlicht:

Rehm, T. M., Straub, E., Iftner, T. & Stubenrauch, F. 2022. Restriction of viral gene expression and replication prevents immortalization of human keratinocytes by a beta-human papillomavirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(11), pp e2118930119.

Rehm, T. M., Straub, E., Forchhammer, S., Leiter, U., Iftner, T. & Stubenrauch, F. 2022. Transcription Properties of Beta-HPV8 and HPV38 Genomes in Human Keratinocytes, *J Virol*, 96(23), e0149822.

Von dieser Arbeit unabhängige Publikationen:

Kleinow, T., Happle, A., Kober, S., Linzmeier, L., Rehm, T. M., Fritze, J., Buchholz, P. C. F., Kepp, G., Jeske, H. & Wege, C. 2020. Phosphorylations of the Abutilon Mosaic Virus Movement Protein Affect Its Self-Interaction, Symptom Development, Viral DNA Accumulation, and Host Range. *Front Plant Sci*, 11(1155).

10.2 Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei:

Prof. Dr. Frank Stubenrauch für die wissenschaftlichen Diskussionen, die aktive und unermüdliche Betreuung dieser Arbeit.

Prof. Dr. Thomas Iftner für die Möglichkeit diese Arbeit am Institut für Medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten anfertigen zu können.

Prof. Dr. Samuel Wagner für die Betreuung dieser Arbeit und die Übernahme der Tätigkeit als Erstgutachter.

Prof. Dr. Mario Schelhaas für die Begutachtung meiner Arbeit.

Meinen **Kolleginnen und Kollegen**, natürlich auch den ehemaligen, für ihre Hilfsbereitschaft, den regen Austausch und insgesamt die tolle Zeit miteinander.

Mein besonderer Dank gilt dabei **Elke Straub**, für ihr offenes Ohr und die vielen Ratschläge.

Meinem Mann **Florian**, der mich durchs Studium und meine Doktorandenzeit begleitet und mich immer emotional unterstützt hat.

Und zum Schluss natürlich auch bei meiner **Familie**, die mir bei alledem geholfen hat. Vor allem bei meiner **Mutter**, meinen **Großeltern** und auch meinem **Vater**, der den Abschluss dieser Arbeit leider nicht mehr miterleben konnte.

10.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum der Humanen Papillomviren (HPV).....	4
Abbildung 2: Schematisch Darstellung der Genomorganisation von HPV16.	5
Abbildung 3: Schematisch Darstellung der Genomorganisation vom HPV49 Referenzgenom.	6
Abbildung 4: Schematische Darstellung des viralen Lebenszyklus	9
Abbildung 5: Immortalisierungsassay normaler humaner Keratinozyten (NHK).....	19
Abbildung 6: Transkriptomkarte und transientes Expressionsprofil von HPV49	21
Abbildung 7: Genetische Analyse von HPV49 Genomen, Southern-Blot und E6/E7-mRNA.....	23
Abbildung 8: Wachstumskurve von HPV49 E8- positiven humanen Keratinozyten-Zelllinien.	24
Abbildung 9: Analyse des physiologischen Zustands der HPV49 E8- Genome und Zeitstabilität der viralen Transkripte.....	26
Abbildung 10: SiRNA Knockdown von HPV49 E6/E7 in HPV49 E8- haltigen Zelllinien.	27
Abbildung 11: QPCR Analyse von HPV49 Transkripten in NHK transfiziert mit verschiedenen HPV49 E8- Genomen.....	29
Abbildung 12: Volcano-Plot der differentiell regulierten Gene aus RNA-Seq Daten: NHK vs. HPV49 E8- haltige Zelllinien.	30
Abbildung 13: Logarithmierte Darstellung der Abdeckung der Daten auf dem annotierten HPV49 Referenzgenom.....	33
Abbildung 14: Sashimi-Plot (Spleißverbindungen und Transkriptabdeckung) aus RNA-Sequenzierungs-Daten dreier HPV49 E8- haltiger Zelllinien gegen das annotierte HPV49 Referenzgenom.....	34
Abbildung 15: Erweiterte Transkriptomkarte von HPV49.....	36
Abbildung 16: Quantifizierung des neuen HPV49 E6 ^{E4} Transkriptes.	37
Abbildung 17: Expression von HA-markierten HPV49 E6 Mutanten.	39
Abbildung 18: Reporterassay zur Analyse des Einflusses unterschiedlicher beta-HPV E6 auf die Transkriptionsaktivierung durch MAML1.	40
Abbildung 19: Wachstumskurven von HPV49 E6 und E7 exprimierenden Keratinozyten.....	44
Abbildung 20: Alignment des HPV49 E6 ^{E9} Peptids mit dem annotierten HPV49 Referenzgenom.	44
Abbildung 21: QPCR Analyse transient mit HPV8 oder 38 Genomen transfizierten NHKs mit Transkriptomkarte und annotierten Spleißdonoren und Akzeptoren.....	47
Abbildung 22: QPCR-Analyse von gespleißten HPV8 Transkripten in NHK.	49
Abbildung 23: HPV38 Southern-Blot und qPCR-Analyse von gespleißten Transkripten in NHK.	50
Abbildung 24: QPCR-Analyse von HPV8 und 38 E6 und E7 Transkripten.	52
Abbildung 25: QPCR-Analyse von organotypischen Kulturen von transient transfizierten NHKs.....	54
Abbildung 26: Charakterisierung einer HPV8-positiven EV-Läsion.....	55

10.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Immortalisierungsassay mit HPV49 WT und E8- Genomen in NHK (Rehm et al., 2022).....	24
Tabelle 2: Immortalisierungs-Assay mit mutierten HPV49 Genomen. Die Abbildung wurde aus einer Veröffentlichung der Autorin übernommen (Rehm et al., 2022).	28
Tabelle 3: Liste der reprimierten Gene aus den RNA-Sequenzierungs-Daten: NHK vs. HPV49 E8- positive Zelllinien mit einem FDR<0,05.	31
Tabelle 4: Liste der aktivierten Gene aus den RNA-Sequenzierungs-Daten: NHK vs. HPV49 E8- positive Zelllinien mit einem FDR<0,05.	32
Tabelle 5: Übersicht einiger Spleißverbindungen aus Daten der RNA-Sequenzierung von HPV49 E8- positiven Zelllinien nach absteigender Abundanz angeordnet. Die Tabelle wurde bis zu einer Abundanz von über 30 geführt. In früheren Experimenten gemessene und mit dem Spleißdondor in E6 genutzte Verbindungen sind markiert.	35
Tabelle 6: Vergleich der HPV49 E6 WT und mutierten Spleißdonorsequenzen mit der Konsensussequenz. Abbildung Konsensussequenz: (Sibley et al., 2016).....	38
Tabelle 7: Immortalisierungsassay mit HPV49 WT, E8- und Genomen mit SD-Mutation.	42
Tabelle 8: Immortalisierungsassay nach retroviraler Infektion von HPV49 E6 und E7. +: Immortalisierung, -: keine Immortalisierung. (n=2).	43
Tabelle 9: NHK Immortalisierungsassay mit verschiedenen HPV Genomen. Die Tabelle und Beschriftung wurden angepasst aus einem eingereichten Manuskript der Autorin (Rehm et al., eingereicht).	45