

**„Physikalischer Status des HPV16 Genoms und die virale
Onkogenexpression –
Bedeutung für die Zervixkarzinogenese“**

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)**

**vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller- Universität Jena**

von: Diplom-Biochemiker Norman Häfner

geb. am: 31.08.1977 in: Jena

- 1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. F. Große, Jena**
- 2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. M. Dürst, Jena**
- 3. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. L. Gissmann, Heidelberg**

Tag der Disputation: 31.3.2008

*„Die verhängnisvolle Neigung der Menschen,
über etwas, was nicht mehr zweifelhaft ist,
nicht länger nachzudenken,
ist die Ursache der Hälfte aller Irrtümer.“*

John Stuart Mill

Zusammenfassung

Das Zervixkarzinom (CxCa) ist weltweit die zweithäufigste Tumorerkrankung bei Frauen. Der kausale Zusammenhang zwischen einer persistierenden Infektion mit Humanen Papillomaviren der Hochrisiko-Gruppe (HR-HPV) und dem CxCa ist erwiesen. Das CxCa entsteht aus prämaligen Vorstufen (zervikale intraepitheliale Neoplasien – CIN). Allerdings ist bisher keine Unterscheidung von regredierenden und progredierenden CIN möglich. Bekannt ist jedoch eine häufigere Integration des viralen Genoms in CxCa im Vergleich zu CIN. Des Weiteren deuten experimentelle Daten auf eine Überexpression der viralen Onkogene E6/E7 hin. Eine verstärkte E6/E7 Expression wird mit dem Verlust des E2 Repressors, bedingt durch die Integration, und einer erhöhten Stabilität viral-zellulärer Fusionstranskripte begründet. Jedoch fehlten *bis dato* quantitative Daten zur Korrelation von viraler Genexpression und physikalischem Genomstatus in CIN und CxCa.

Hauptziel dieser Dissertation war es daher, die Auswirkung des Genomstatus auf die virale Genexpression zu untersuchen. Dazu wurde die Genexpression mittels real-time PCR quantifiziert und der physikalische Status durch den APOT Assay ermittelt. Eine reproduzierbare und quantitative Transkriptanalyse wurde durch Validierungsanalysen und Normalisierungsprozeduren, welche die Housekeepinggenexpression, die RNA Qualität und die Gewebszusammensetzung berücksichtigten, ermöglicht.

Im Widerspruch zum verbreiteten Karzinogenesemodell konnte kein Einfluss des physikalischen Status auf die virale Genexpression festgestellt werden. So wurde zwar ein erhöhter Anteil an Integraten in CxCa, im Vergleich zu CIN, detektiert (79% vs. 18%), jedoch zeigte sich eine ähnliche E6/E7 Expression. Insbesondere exprimierten weder CIN noch CxCa mit episomalen Genomen weniger Onkogenetranskripte als CxCa mit integrierter HPV DNA (34470 Kopien, 31900 Kopien bzw. 22805 Kopien in 10ng RNA). Auch das Spleißmuster der viralen Transkripte wurde nicht durch das Integrationsereignis beeinflusst. Allerdings exprimieren CxCa, unabhängig vom Genomstatus, anteilig an der p97 Gesamtaktivität, signifikant weniger E6 Volllängentranskript als CIN, aufgrund eines verstärkten Spleißens im E6-ORF. Des Weiteren ergaben Zellkulturexperimente zur RNA-Stabilität (ActD Assay), dass (i) rein virale Transkripte eine ähnliche Stabilität aufweisen können wie viral-zelluläre Fusionstranskripte und dass (ii) die Stabilität der rein viralen Transkripte vermutlich von zellulären Faktoren reguliert wird.

Insgesamt ist anhand der gezeigten Daten zu vermuten, dass hoch variable E6/E7 Mengen sowohl für den Erwerb, als auch den Erhalt des tumorigenen Phänotyps ausreichend sind. Dabei trägt Integration zu einer konstitutiven Onkogenexpression in der Tumorzelle bei. Allerdings exprimieren CxCa weniger E2 codierende Transkripte, bedingt durch das Integrationsereignis bzw. durch ein verstärktes E1^{E4} Spleißereignis. Somit ist das Integrationsereignis nicht generell über eine verstärkte Onkogenexpression an der Karzinogenese beteiligt, könnte aber trotzdem durch den E2 Verlust in bisher nicht bekannter Weise einen direkten Einfluss auf die Karzinogenese ausüben.

Summary

Cervical carcinomas (CxCa) are the second most common malignancy in women worldwide. The causal relationship between persistent infections with high-risk human papilloma viruses (HR-HPV) and the development of carcinomas is already established. CxCa emerge from non-malignant precursor lesions (cervical intraepithelial lesion – CIN). Although it is not possible to predict the progression potential of high grade CIN an increased rate of HPV genome integration is detected in CxCa vs. CIN. Moreover, experimental data associate overexpression of the E6/E7 oncogenes with integrated HPV genomes. Deregulated oncogene expression could be caused by loss of the E2 repression or an increased stability of viral-cellular fusion transcripts. However, data showing a clear correlation between high levels of viral oncogene expression and HPV integration in CIN and CxCa are still lacking to date.

Therefore it was the primary objective of this dissertation to examine the influence of the physical state of the HPV genome on viral gene expression using clinical samples. The physical state was determined by the APOT assay, whereas gene expression was determined quantitatively by real-time RT-PCR. Validation assays and normalisation procedures included the expression of housekeeping genes, RNA quality and tissue complexity thereby facilitating reproducible transcript measurements.

Contradictory to the common model of carcinogenesis no influence of the physical state on viral oncogene expression could be determined using this approach. Although CxCa samples showed a higher proportion of integrated HPV genomes than CIN biopsies (79% vs. 18%) both sample groups exhibited a comparable range of E6/E7 expression. Neither CIN nor CxCa samples with episomal HPV genomes expressed fewer oncogene transcripts than CxCa with integrated HPV DNA (median values: 34470 copies, 31900 copies and 22805 copies in 10ng RNA, respectively). Furthermore, splicing events in the E6 ORF were not affected by the integration event. However, relative to all transcripts initiated at p97 CxCa express significant fewer E6 full-length transcripts than CIN due to increased splicing in E6. Cell culture experiments which determined RNA stability (ActD assay) revealed that (i) complete viral transcripts could exhibit a comparable stability to viral-cellular fusion transcripts and that (ii) viral transcript stability could be regulated by cellular factors.

Altogether these data suggest that highly variable amounts of E6/E7 suffice to both acquire and maintain the carcinogenic phenotype. In particular, the integration event as such is likely to ensure a constitutive oncogene expression in the dysplastic/tumour cell. It is of note, that CxCa express fewer E2 coding transcripts because of HPV genome integration and an increased E1^{E4} splicing event. Thus, although a general contribution of HPV integration to the carcinogenesis by enhancing oncogene expression is not supported by the presented data, integration could contribute in an unknown manner to cervical carcinogenesis by the loss of E2.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1 Humane Papillomaviren	7
1.1.1 Struktur und Klassifizierung	7
1.1.2 Viraler Lebenszyklus und virale Proteine	9
1.1.3 Die viralen Onkogene E6 und E7	11
1.2 HPV Infektion und das Zervixkarzinom	14
1.2.1 Modell der Zervixkarzinogenese	15
1.2.2 Integration des viralen Genoms	18
1.3 Nachweis von HPV Integration	19
1.4 Zielstellung	21
2. Material und Methoden	22
2.1 Material	22
2.1.1 Geräte	22
2.1.2 Chemikalien und Lösungen	22
2.1.3 Enzyme	24
2.1.4 DNA-Standards	24
2.1.5 Oligonukleotide	24
2.1.6 Plasmide	24
2.1.7 Zelllinien	25
2.1.8 Radioisotope	25
2.1.9 Sonstiges	25
2.2 Methoden	26
2.2.1 Arbeiten mit Prokaryoten	26
2.2.1.1 Kultivierung	26
2.2.1.2 Medien	27
2.2.1.3 Herstellung kompetenter Zellen	28
2.2.1.4 Transformation von <i>E.Coli</i>	28
2.2.2 Kultivierung adhärenter humaner Zelllinien	29
2.2.2.1 Medien	29
2.2.2.2 Kultivierung	29
2.2.2.3 Einfrieren und Auftauen	29

2.2.3	Allgemeine Molekularbiologische Methoden	30
2.2.3.1	Arbeiten mit RNA	30
2.2.3.1.1	Aufarbeitung aus Zelllinien und Biopsien	30
2.2.3.1.2	Konzentrationsbestimmung	31
2.2.3.1.3	Reverse Transkription	31
2.2.3.2	Arbeiten mit DNA	32
2.2.3.2.1	Aufreinigung aus Zelllinien	32
2.2.3.2.2	Klonierung von PCR-Produkten	32
2.2.3.2.3	Plasmidisolierung	33
2.2.3.2.4	Reinigung von DNA	33
2.2.3.2.5	Quantifizierung von dsDNA	34
2.2.3.2.6	Restriktionsverdau	34
2.2.3.2.7	Sequenzierung	35
2.2.3.3	Zweidimensionale Gelelektrophorese	36
2.2.3.4	Southern Blot	37
2.2.3.4.1	Random Priming	37
2.2.3.4.2	Hybridisierung von Oligonukleotiden	39
2.2.3.5	PCR	40
2.2.4	Real-time PCR	41
2.2.4.1	Normalisierung	45
2.2.4.1.1	„Housekeeping Gene“	46
2.2.4.1.2	RNA-Qualität – 5´-3´ GAPDH Ratio	47
2.2.4.1.3	Gewebzusammensetzung – Tumorzellanteil	47
2.2.5	Amplification of Papillomavirus Oncogene Transcripts – APOT Assay	47
2.2.6	RNA-Stabilität – ActinomycinD Assay	49
2.2.7	Statistik	50
3.	Ergebnisse	51
3.1	Charakterisierung der quantitativen Transkriptanalyse (qRT-PCR)	52
3.1.1	Sensitivität und dynamischer Bereich	52
3.1.2	Validierung der relativen Standardreihen Methode	53
3.1.3	Validierung der Reversen Transkription	54
3.1.4	Validierung der DNase-Behandlung von RNA	56
3.1.5	Reproduzierbarkeit	57
3.1.6	Normalisierung	58
3.1.7	Bestimmung der RNA-Qualität durch Ermittlung der 5´-3´ Ratio GAPDH	60
3.2	Einfluss des Genomstatus auf die virale Genexpression – Analyse HPV16 positiver CIN und CxCa	62
3.2.1	HPV16 Genomstatus	62
3.2.2	Expression der HPV16 Transkripte	63
3.2.3	HPV16 Spleißmuster in CIN und CxCa	66

3.3	Analyse von Lymphknoten	68
3.3.1	Quantifizierung von HPV16 Transkripten in histologisch positiven und negativen Lymphknoten	68
3.3.2	Spleißereignisse in Lymphknoten	70
3.3.3	HPV16 Genomstatus in Lymphknoten	71
3.4	Charakterisierung HPV16 positiver Zelllinien – Stabilität von HPV16 Transkripten	72
3.4.1	Viral Load	72
3.4.2	Genomstatus in Zelllinien	73
3.4.3	HPV16 Genexpression und Transkriptstruktur	76
3.4.4	RNA-Stabilität	78
4.	Diskussion	80
4.1	Bewertung real-time PCR	80
4.2	Virale Genexpression in CIN und CxCa	83
4.3	Virales Spleißmuster in CIN, CxCa und Lymphknotenmetastasen	84
4.4	Auswirkung der HPV16 Integration auf die virale Genexpression	85
4.5	Der Verlust des viralen E2 Proteins	89
4.6	HPV Transkriptsstruktur und RNA Stabilität	90
4.7	Integration und Zervixkarzinogenese	92
5.	Literaturverzeichnis	95
6.	Danksagung	102
7.	Selbstständigkeitserklärung	103
8.	Lebenslauf	104
9.	Anhang	
9.1	Primerübersicht	I
9.2	Plasmidübersicht	III
9.3	Übersicht der Medianwerte der viralen Genexpression	IV
9.4	Abkürzungsverzeichnis	V

1. Einleitung

Das Zervixkarzinom (CxCa) ist eine der häufigsten Krebsarten bei Frauen weltweit. Im Jahr 2002 erkrankten ca. 500 000 und starben ungefähr 275 000 Frauen (Parkin *et al.*, 2005). Jedoch zeigt sich ein Ungleichgewicht in den Inzidenzraten zwischen Industrienationen (Inzidenz <15/100000) und Entwicklungsländern (Inzidenz 25-45/100000) (Parkin *et al.*, 2005). Innerhalb Deutschlands sind ca. 6200 Frauen pro Jahr betroffen. Das sind 4% aller auftretenden Krebsfälle bei Frauen. Jedoch handelt es sich bei Frauen unter 50 Jahren in 12,5% der Krebsfälle um ein CxCa (Robert Koch Institut).

Eine Beteiligung von humanen Papillomaviren (HPV) an der Entstehung des CxCa wurde erstmals 1976 postuliert (zur Hausen, 1976). Seitdem gibt es eine Vielzahl von epidemiologischen und molekularbiologischen Hinweisen auf eine ursächliche Beteiligung von high-risk HPV (HR-HPV), so dass die Infektion als Hauptrisiko angesehen wird (Bosch *et al.*, 2002). Allerdings existieren auch Hinweise darauf, dass es weitere Risikofaktoren bzw. Bedingungen für die Entstehung von Zervixkarzinomen gibt. Vor allem die lange Persistenz von HPV vor einer Karzinomentstehung, die insgesamt niedrige Rate an CxCa im Vergleich zur Verbreitung von HPV (nur 1-2% der infizierten Frauen aus Ländern mit Vorsorgeprogrammen entwickeln ein CxCa) und die häufige Regredierung von Dysplasien deuten auf weitere Faktoren zur Tumorentstehung hin. Neben der Langzeiteinnahme von oralen Kontrazeptiva, die das Krebsrisiko bei HPV positiven Frauen steigert, wird auch die Bedeutung von Tabakkonsum, als Co-Karzinogen oder die Bedeutung von genetischen Einflüssen diskutiert (Bosch *et al.*, 2002; Moreno *et al.*, 2002). Andere Faktoren wie Bildung, Lebenssituation und sexuelles Verhalten scheinen allerdings mit der Akquirierung von HPV-Infektionen gekoppelt zu sein (Schiffman *et al.*, 1993). Als Folge dieser Risikofaktoren sind zelluläre Veränderungen (Mutationen) oder Änderungen der viralen Eigenschaften (physikalischer Status, Genexpression) ursächlich an der Progression von Neoplasien zum CxCa beteiligt. Ziel dieser Arbeit war es den Einfluss von viralen Veränderungen auf die Entstehung des CxCa zu untersuchen.

1.1. Humane Papillomaviren

1.1.1. Struktur und Klassifizierung

Bei den Papillomaviren handelt es sich um kleine DNA-Viren, deren doppelsträngiges, zirkuläres Genom (ca. 8kb) in ein ikosaedrisches Kapsid verpackt ist. Das Kapsid besteht aus 72 Kapsomeren, welche aus den Hüllproteinen L1 (major capsid protein) und L2 (minor capsid protein) aufgebaut sind (Modis *et al.*, 2002). In diesem Kapsid liegt das virale Genom an Histone gebunden vor. Die Genomstruktur der Papillomaviren ist konserviert und besteht aus drei Bereichen – (i) die Nicht-Codierende Region (NCR), (ii) der Bereich der frühen Gene (early genes E1-E7) und (iii) die Region der späten Gene (late genes L1 und L2) (Abb. 1.1.). Während die NCR regulatorische Funktionen für die virale Genexpression und Replikation besitzt, werden von den anderen Bereichen die entsprechenden Transkripte bzw. Proteine exprimiert. Dabei liegen alle open reading frames (ORF) auf einem DNA Strang und werden als polycistronische mRNAs exprimiert.

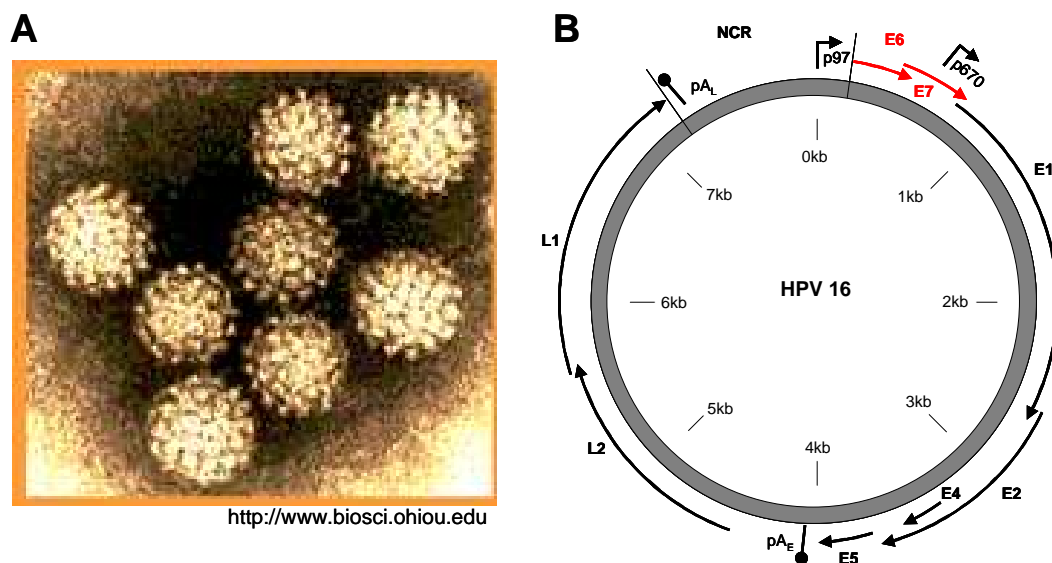


Abb. 1.1.: HPV16 Struktur. Elektronenmikroskopische Darstellung der HPV16 Kapsidstruktur (A) und Übersicht über die HPV16 Genomstruktur (B). Die frühen Gene E1-E7 werden vom Promotor p97 aus exprimiert. Dahingegen stehen die Kapsidproteine L1 und L2 unter Kontrolle des differenzierungsabhängigen Promotors p670. Die Nicht-Codierende Region (NCR) steuert neben der p97 Expression auch die Replikation des viralen Genoms.

Aufgrund der strengen Wirtsspezifität erfolgt die Benennung nach der Wirtsspezies (z.B. Humane Papillomaviren- HPV) und einer fortlaufenden Nummerierung. Nach Entdeckung und näherer Charakterisierung erster HPV-Typen (Favre *et al.*, 1975; Heilman *et al.*, 1980; Orth *et al.*, 1977), die cutane Epithelien befallen, erfolgte auch die Identifizierung von mucosalen HPV (Durst *et al.*, 1983; Gissmann *et al.*, 1983). Die auffallende Gruppierung der

generell streng epithelspezifischen HPV in eine cutane und eine mucosale Gruppe wurde zur ersten Klassifizierung der Humanen Papillomaviren genutzt. Nach früherer Zuordnung der Papilloma- und Polyomaviren zu der Familie der *Papovaviridae* bilden die *Papillomaviridae* heute eine eigenständige Familie (van Regenmortel *et al.*, 2000). Weiterhin werden die *Papillomaviridae* nach phylogenetischen Sequenzanalysen in Gattungen eingeteilt (Abb 1.2.) (de Villiers *et al.*, 2004). Die *alpha-Papillomaviridae* sind die bisher größte Gattung und bestehen aus human-pathogenen Viren, die mucosale und cutane Epithelien befallen. Innerhalb der alpha-Papillomaviren existieren 15 Gruppen, die eine verschiedene Anzahl an HPV Typen beinhalten. Auch die Unterteilung in Gruppen erfolgt anhand von phylogenetischen Analysen der L1 Sequenz. Als Kriterium für die Unterscheidung verschiedener HPV-Typen gilt ein Sequenzunterschied von >10% im L1-Gen (Deliuss *et al.*, 1998).

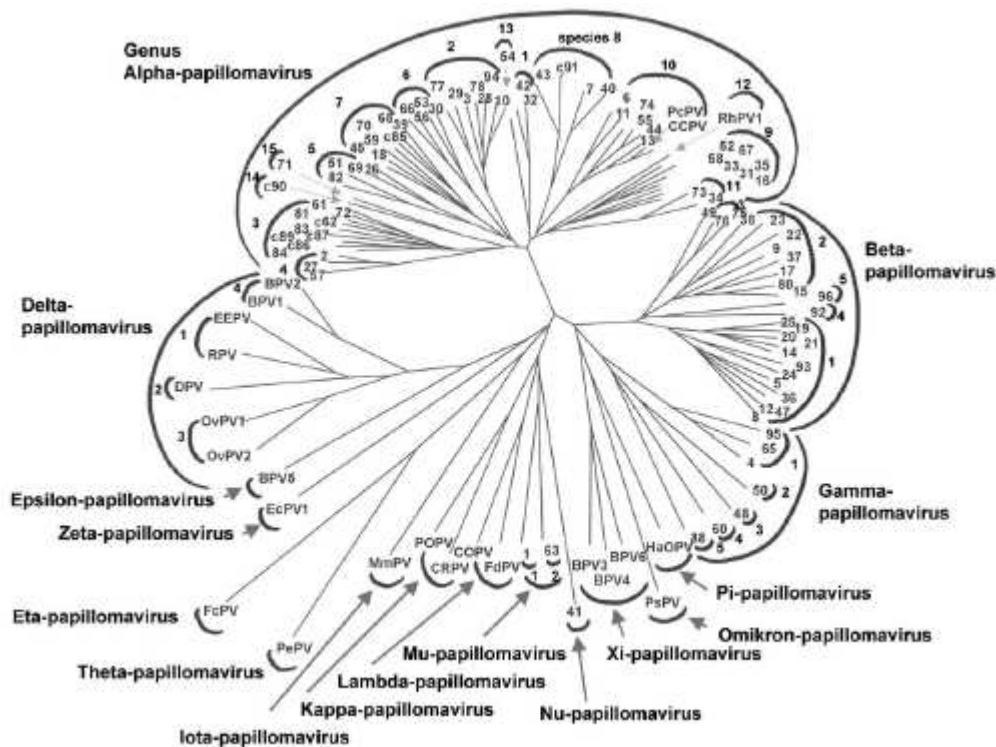


Abb. 1.2. Phylogenetische Einteilung der Papillomaviren. Mucosal-genitale HPV Typen gehören zu den *alpha-Papillomaviridae* (de Villiers *et al.*, 2004).

Die mucosal-genitalen HPV werden aufgrund ihres unterschiedlichen onkogenen Potentials, zusätzlich zur phylogenetischen Klassifizierung in low risk-(LR)- und high risk-(HR)-HPV unterteilt. Zu den LR-Typen gehören u.a. HPV 6 und 11. Als HR-HPV werden HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 und 59 gezählt, während HPV 26, 53, 66, 68, 73 und 82

vermutlich auch zu den HR-HPV gehören, aber aufgrund unzureichender Datenlage nicht endgültig klassifiziert wurden (Munoz *et al.*, 2006).

1.1.2. Viraler Lebenszyklus und virale Proteine

Humane Papillomaviren zeigen einen strengen Gewebstropismus für Epithelien und ihr Lebenszyklus ist eng an die zelluläre Differenzierung gekoppelt. Daher wird während einer produktiven Infektion die virale Genexpression strikt reguliert.

HPV infizieren bevorzugt die Basalzellen der Epidermis. Die Exposition der Basalzellen wird durch Mikroverletzungen begünstigt. Für das überwiegende Auftreten von zervikalen intraepithelialen Neoplasien (CIN) bzw. von Zervixkarzinomen innerhalb des anogenitalen Trakts scheint die bevorzugte Infektion der stark proliferierenden Transformationszone, am Übergang der Zylinderzellen der Endozervix zum squamösen Plattenepithel der Ektozervix verantwortlich zu sein. An ersten Virus-Wirtszellinteraktionen könnten $\alpha_6\beta_4$ -Integrin, Glucosaminoglycane oder Heparinsulfatproteoglycane beteiligt sein (Evander *et al.*, 1997; Giroglou *et al.*, 2001; Joyce *et al.*, 1999). Dies könnte zumindest teilweise die Epithelspezifität der Papillomaviren erklären. Der Übertritt in die Zelle wird, wahrscheinlich durch ein N-terminales Epitop des L2-Proteins ermöglicht (Kawana *et al.*, 2001).

In den infizierten Basalzellen kann die virale DNA episomal persistieren (Durst *et al.*, 1985) und zeigt nur geringe Replikationsraten, synchron zum Zellzyklus. Für die virale Replikation und die Genomsegregation sind die viralen Proteine E1 und E2 notwendig. Das E1-Protein ist konserviert und das einzige PV-Protein mit enzymatischer Funktion. Es weist ATPase- und Helicase-Aktivität auf (Lambert, 1991). E1 bindet als doppelter Hexamer-Ring an eine AT-reiche Sequenz im Replikationsursprung (Frattini and Laimins, 1994b; Ustav *et al.*, 1991). Diese Bindung an den Replikationsursprung in der NCR wird proteinvermittelt durch E2 begünstigt (Frattini and Laimins, 1994a). Neben der Helicase-Funktion bewirkt E1 eine Bindung von Proteinen des zellulären Replikationsapparates (replication protein A – RPA und DNA-Polymerase- α -Primase) am Replikationsursprung (Loo and Melendy, 2004; Masterson *et al.*, 1998). Somit wird eine Zellzyklus-synchrone Genomamplifikation in sich teilenden Basalzellen der Epidermis ermöglicht (Abb. 1.3.). Eine weitere Funktion von E2 ist die Verteilung der Virusgenome auf die Tochterzellen. E2 besitzt 4 Bindestellen in der NCR (ACCN₆GGT) und kann virale Genome an zelluläre Mitosechromosomen binden (Van Tine *et al.*, 2004a).

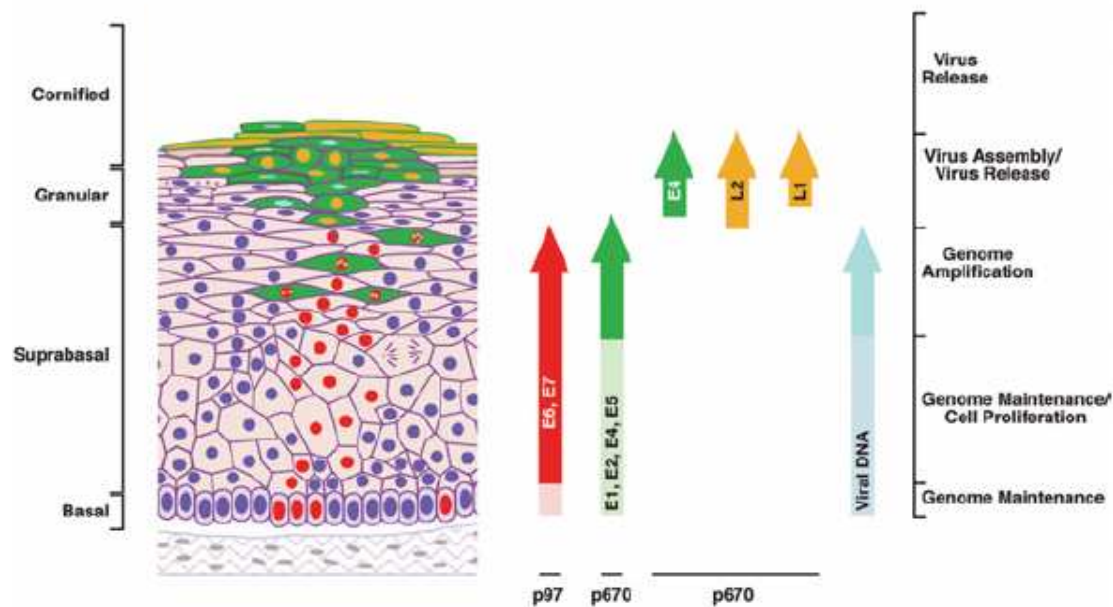


Abb. 1.3. Viraler Lebenszyklus und Expression viraler Proteine (Doorbar, 2006).

Die virale Genexpression in Basalzellen ist relativ gering. Erst in suprabasalen Epithelzellen kommt es zu einer erhöhten viralen Genexpression (Durst *et al.*, 1992). Die viralen Onkoproteine E6 und E7 ermöglichen in sich differenzierenden Zellen, durch Interaktion mit regulatorischen Wirtsproteinen (p53, pRb) eine DNA-Synthese unabhängig vom Zellzyklus und der Zelldifferenzierung (siehe Kapitel 1.1.3. und Abb. 1.3. und 1.4.). Des Weiteren wird die Apoptose der infizierten Zellen verhindert. Somit kann die virale Genomamplifikation in differenzierten, sich nicht mehr teilenden Keratinozyten stattfinden (Abb. 1.3.). Während der weiteren Differenzierung kommt es zur Aktivierung des späten, differenzierungsabhängigen Promotors p670 und zur Expression der Hüllproteine L1 und L2. Die Effizienz der Verpackung der viralen Genome kann durch E2 erhöht werden und findet im Zellkern statt (Buck *et al.*, 2004). Die Freisetzung der Viruspartikel in den terminal differenzierten Epithelschichten erfolgt unter Beteiligung des E4 Proteins, das mit dem Keratinnetzwerk wechselwirken kann (Doorbar *et al.*, 1991).

1.1.3. Die viralen Onkogene E6 und E7

Die Gene E6 und E7 codieren für virale Onkoproteine. Sie werden als polycistronische mRNA vom Promotor p97 aus transkribiert. Als strukturbildendes Motiv besitzt E6, wie E7, zwei Zink-Finger. Aufgrund dieser Übereinstimmung wird davon ausgegangen, dass es sich bei E6 und E7 um homologe Proteine handelt, die durch Duplikation aus einem gemeinsamen Vorläuferprotein hervorgegangen sind (Cole and Danos, 1987). Das E6-Gen codiert für ein kleines, ca. 150 Aminosäuren großes, multifunktionales Protein. Zusammen mit E7 ist E6 in der Lage humane Keratinozyten zu immortalisieren (Munger *et al.*, 1989). Wobei sich das E6-Protein von mucosal-genitalen HR- und LR-HPV funktionell unterscheidet. Das E6 Protein von LR-HPV kann bei der *in vitro* Transformation von humanen Keratinozyten das HR-HPV-Protein nicht komplementieren (Barbosa *et al.*, 1991). Die wichtigste E6-Funktion ist die Vermittlung der Degradation des Tumorsuppressorproteins p53 (Scheffner *et al.*, 1990). Während LR-HPV-E6 p53 *in vitro* nicht bzw. nur schwach bindet und nicht zur p53 Degradation fähig ist, zeigt HR-HPV-E6 eine starke p53-Bindung und Degradation (Scheffner *et al.*, 1990; Werness *et al.*, 1990).

Auch *in vivo* zeigt nur HR-HPV-E6 eine Vermittlung der p53 Degradation (Lechner *et al.*, 1992). Der ubiquitinabhängige proteasomale p53 Abbau wird durch die E6 gesteuerte Rekrutierung der intrazellulären Protein-Ubiquitin-Ligase E6AP (E6-assoziiertes Protein) vermittelt (Huibregtse *et al.*, 1991; Scheffner *et al.*, 1993). Dadurch ermöglicht E6 einen unregulierten p53-Abbau (Abb. 1.4.). Normalerweise ist die p53-Degradation stark reguliert und wird durch die Protein-Ubiquitin-Ligase Mdm2 vermittelt, wodurch in „unauffälligen“ Zellen ein niedriger p53-Spiegel vorliegt (Kubbutat *et al.*, 1997). Bei auftretenden DNA-Schäden, unregulierter DNA-Synthese oder Wachstumskonflikten wird Mdm2 gehemmt, es kommt zur p53 Akkumulation, zur Aktivierung p53-abhängiger Promotoren (z.B. p21^{CIP1}), zum Zellzyklusstop und zur DNA-Reparatur. Außerdem kann p53, durch Transkriptionsaktivierung der Gene *bax* und *noxa* die Apoptose einleiten (Miyashita and Reed, 1995; Oda *et al.*, 2000).

In HR-HPV positiven Zellen ist der Mdm2-Weg vollständig gehemmt und nur die E6-abhängige p53-Degradation aktiv (Hengstermann *et al.*, 2001). Dadurch wird ein p53-abhängiger Zellzyklusstopp oder die Einleitung der Apoptose verhindert. So zeigen zum Beispiel HPV-positive Zelllinien keinen Zellzyklusstopp bei induzierten DNA-Schäden (Kessis *et al.*, 1993; Slebos *et al.*, 1995). Des Weiteren gibt es p53-degradationsunabhängige Wechselwirkungen mit p53 bzw. anderen Wirtsproteinen. So verhindert E6 eine p53-

abhängige Transkriptionskontrolle (Lechner *et al.*, 1992; Mietz *et al.*, 1992), teilweise durch Interaktion mit CBP/p300 (Zimmermann *et al.*, 1999) und kann auch eigenständig transaktivierend wirken (Gius *et al.*, 1988). Dadurch kann auch bei fehlender p53-Degradation ein Zellzyklusstopp, z.B. durch Hemmung der p21^{CIP1} Expression, verhindert werden. E6 induziert weiterhin die Expression von hTERT, einer Untereinheit der Telomerase (Klingelhutz *et al.*, 1996) und könnte somit auch zur Überwindung der natürlichen Seneszenz beitragen. Des Weiteren kann E6 zusammen mit E6AP die Degradation des proapoptotischen Bak-Proteins verursachen (Thomas and Banks, 1999). Zellkulturexperimente zur Ca- und serumabhängigen Differenzierung humaner Keratinozyten unter E6 Expression zeigten eine verlangsamte Differenzierung und eine Hemmung der Zellstratifikation bzw. der Apoptose (Alfandari *et al.*, 1999). Aufgrund der p53-Degradation zeigen transformierte Keratinozyten eine erhöhte genomische Instabilität mit vermehrten Chromosomenmutationen (Reznikoff *et al.*, 1994; White *et al.*, 1994). Außerdem induziert HPV16 E6 eine anormale Anzahl von Centrosomen in multi-kernigen Zellen (Duensing and Munger, 2004). Insgesamt ermöglicht E6 vor allem eine ungehinderte, E7-geförderte virale DNA-Synthese (p53-Degradation), verursacht eine erhöhte genomische Instabilität und eine verlängerte Lebenspanne der humanen Keratinozyten (Apoptosehemmung und Telomeraseaktivierung).

Zellzyklus (ZZ) benötigt werden. Bei einer Zunahme der Differenzierung kommt es während der normalen Zellentwicklung zu einer Abnahme bzw. Beendigung der Proliferationsaktivität und einem „ZZ-Arrest“ in G₀. Die E7-abhängige Freisetzung von E2F verhindert diese gekoppelte Regulierung von Zellproliferation und -differenzierung und die Abhängigkeit der Zellteilung von mitogenen Signalen. Weiterhin ermöglicht E7 einen unkontrollierten Ablauf des ZZ durch Inaktivierung der Cyclin-abhängigen Kinase-(CDK)-Inhibitoren p21^{CIP1}/p27^{KIP1} (Funk *et al.*, 1997; Jones *et al.*, 1997; Zerfass-Thome *et al.*, 1996). Ein p53-abhängiger Zellzyklusstopp durch die E2F-gesteuerte Aktivierung von p14^{ARF} (Itoshima *et al.*, 2000) wird jedoch durch die E6-induzierte p53-Degradation verhindert. Insgesamt ermöglicht E7 demzufolge eine verstärkte Proliferation und eine Trennung von Zelldifferentiation und Proliferation, also eine virale DNA-Synthese auch in differenzierten Epithelzellen. Zusätzlich induziert E7 Fehler in der Centrosomenduplikation und kann somit zur Instabilisierung des Genoms beitragen (Duensing *et al.*, 2000). In Abbildung 1.4. sind die erläuterten Wechselwirkungen der Onkoproteine E6 und E7 mit regulatorischen Wirtsproteinen und mögliche Beeinflussungen zellulärer Regulationsmechanismen zur Förderung der Tumorentstehung graphisch dargestellt.

1.2. HPV Infektion und das Zervixkarzinom

Eine HPV-Infektion kann sowohl subklinisch und histologisch unauffällig verlaufen, als auch zu verschiedenen stark ausgeprägten Dysplasien führen. Diese werden nach histologischen und morphologischen Gesichtspunkten unterteilt (CIN I-III), scheinen aber auch ein unterschiedliches Potential hinsichtlich der Progression bzw. Regression zu haben (siehe Tab 1.1. und Abb. 1.5.).

Tab 1.1. Unterschiedliches Entwicklungspotential Zervikaler Intraepithelialer Neoplasien
(Ostor, 1993)

	Regression	Persistenz	Progression zu CIN III	Progression zu CxCa
CIN I	57%	32%	11%	1%
CIN II	43%	35%	22%	5%
CIN III	32%	56%	-	>12%

Während das CIN I Stadium, das nur wenige mitotisch aktive Zellen über der Basalmembran und ein, dem normalen Epithel ähnliches Differenzierungsbild zeigt, recht häufig regrediert und nur selten zum Karzinom progrediert, zeigen höhergradige Neoplasien ein eher persistierendes bzw. progredierendes Verhalten (Tab. 1.1.). Neoplasien der Stadien II und III

weisen eine hohe Anzahl an mitotisch aktiven Zellen und eine zum Großteil fehlende Differenzierung auf (Abb. 1.5.). Als ein Hauptfaktor für das unterschiedliche Potential von Neoplasien gilt der HPV-Status. HR-HPV Infektionen können zu hochgradigen Dysplasien oder CxCa progredieren, während LR-HPV Infektionen keine CxCa verursachen. Das CxCa unterscheidet sich histologisch von CIN III Läsionen durch den Durchbruch der Basalmembran. Allerdings können CxCa in Ausnahmefällen auch entstehen, ohne dass vorher alle neoplastischen Vorstufen durchlaufen werden müssen (Koutsky 1992).

1.2.1. Model der Zervixkarzinogenese

Für die Karzinogenese wird im Allgemeinen eine Mehrschritthypothese angenommen. Dabei werden folgende Schritte für die Tumorentstehung als essentiell angesehen (Evan and Vousden, 2001; Hanahan and Weinberg, 2000):

- (1) Unabhängigkeit von- bzw. autokrine Stimulation mit Wachstumsfaktoren
- (2) Unempfindlichkeit gegenüber anti-mitogenen Signalen
- (3) Apoptosehemmung
- (4) Unbegrenzt replikatives Potential
- (5) Steuerung der Angiogenese
- (6) Überwindung des Zell-Zell-Kontaktes zur Metastasierung

Ausgehend von einer initialen Mutation, die für die betroffene Zelle einen Wachstumsvorteil oder eine erhöhte Mutationshäufigkeit bedeutet, scheinen während der Tumorprogression die o.g. atypischen Zellzustände erworben zu werden. Die automatische Selektion einzelner Zellen hinsichtlich ihres Potentials zur Überwindung verschiedener Kontrollmechanismen und zum ungehinderten Wachstum führt in diesem evolutionären Prozess zur Entstehung von Tumoren klonalen Ursprungs.

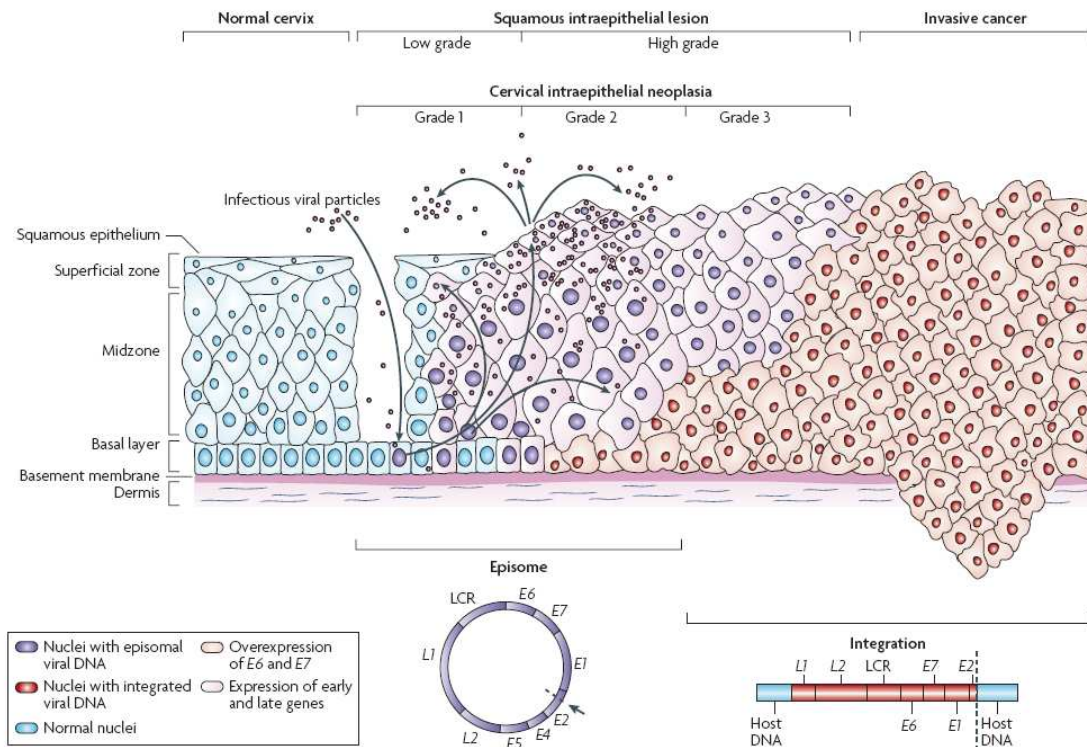


Abb. 1.5. Model der Zervixkarzinogenese. In Folge der HPV Genom-Integration werden die viralen Onkogene E6/E7 überexprimiert, es entsteht ein hyperproliferierender Zellklon und die epitheliale Differenzierung wird verhindert (Woodman *et al.*, 2007).

Der initiale Schritt bei der Zervixkarzinogenese ist die Infektion mit HR-HPV-Typen. Aufgrund der Expression der viralen Onkoproteine und deren Beeinflussung grundlegender zellulärer Regulationsmechanismen während der gesamten Infektion (siehe Kapitel 1.1.3., Abb. 1.4.), kann es zu einer Proliferationsderegulation und einem selektiven Wachstumsvorteil dieser Zellen kommen. Auf eine ursächliche Bedeutung der HPV-Infektion deuten eine Vielzahl von Gründen hin. So gibt es u.a. folgende Hinweise:

- (1) Epidemiologische Untersuchungen ergaben dass die präkanzerogenen Vorstufen (zervikale intraepitheliale Neoplasien CIN I-III) hauptsächlich durch HPV verursacht werden (Schiffman *et al.*, 1993)
- (2) Isolierung von HR-HPV-Genomen aus CxCa (Durst *et al.*, 1983) und Nachweis von HR-HPV-DNA in 99,7% aller CxCa in einer internationalen Studie (Walboomers *et al.*, 1999)
- (3) Nachweis von HPV-DNA auch in Metastasen (Lancaster *et al.*, 1986)
- (4) Immortalisierung von humanen primären Keratinozyten (HPK) durch Transformation mit HPV16 DNA (Durst *et al.*, 1987b).
- (5) Zum Erhalt des tumorigenen Phänotyps ist die E6 und E7 Expression notwendig (von Knebel Doeberitz *et al.*, 1992)

III) im Vergleich zu leichtgradigen Dysplasien (CIN I) (Durst *et al.*, 1992). Daher wird eine deregulierte E6/E7 Expression in den teilungsfähigen Zellen der Basalzellschicht als mögliche Ursache für die Entstehung von CxCa angesehen. Während die Onkogenexpression in differenzierten, teilungsunfähigen Zellen die virale Genomamplifikation ermöglicht und keine tumorigenen Auswirkungen hat (produktive Infektion), bewirkt die erhöhte E6/E7 Expression in teilungsfähigen Zellen die Entstehung eines hyperproliferierenden Zellklons, eine erhöhte genomische Instabilität bzw. die Ansammlung von Mutationen. Neben der Inaktivierung von zellulären Kontrollgenen (CIF – cellular inhibition factor) wird die Integration des viralen Genoms als Initiator für eine deregulierte Onkogenexpression bewertet (zur Hausen, 2002).

1.2.2. Integration des viralen Genoms

In produktiven Infektionen liegt das HPV Genom als zirkuläres DNA-Molekül (Episom) vor. Dahingegen werden in Dysplasien und CxCa auch trunkierte und in das menschliche Genom integrierte HPV Genome detektiert. Die Häufigkeit von Integraten hängt von HPV Typ, Krankheitsausprägung und Detektionsmethode ab. Es ist jedoch generell eine Korrelation von Dysplasiegrad und Anteil an Integraten festzustellen. So wurden mittels *in situ* Hybridisierung in 88% von mikroinvasiven CxCa integrierte Genome detektiert, während nur 29% der CIN II/III Integrate aufwiesen (Hopman *et al.*, 2005). Auch PCR-basierte Transkript- bzw. DNA-Analysen ergaben einen erhöhten Anteil an Integraten in CxCa im Vergleich zu schwergradigen Dysplasien (Arias-Pulido *et al.*, 2006; Klaes *et al.*, 1999). Direkte Auswirkungen der Integration sind die Öffnung des viralen Genoms, Deletion bzw. Unterbrechung von viralen Sequenzen und die Bildung von charakteristischen viral-zellulären Fusionstranskripten. Während das Integrationsereignis auf viraler Ebene hauptsächlich den E1/E2 Bereich betrifft, scheint es keine gerichtete Insertion in die zelluläre DNA zu geben (Kalantari *et al.*, 1998; Wentzensen *et al.*, 2004). Allerdings gibt es Bereiche im humanen Genom (hot-spots), in denen gehäuft Integrationsereignisse auftreten. Dies sind oftmals instabile Chromosomenbereiche die zur Gruppe der „common fragile sites“ (CFS) zählen (Thorland *et al.*, 2000). Trotz ungerichteter Integration existieren Beispiele von Integrationsmutagenese und veränderter Genexpression nach Integration in benachbarten Chromosomenabschnitten (Peter *et al.*, 2006; Reuter *et al.*, 1998). Eine allgemeine Aussage über mögliche Auswirkungen der Integration auf zellulärer Ebene kann jedoch nicht getroffen werden.

Dahingegen sind die Veränderungen der viralen Genomstruktur durch die Integration gut charakterisiert und die entsprechenden Auswirkungen im Zellkultursystem untersucht. Während der NCR-E6-E7 Bereich nach der Integration stets erhalten bleibt, ist häufig der E1/E2 Bereich vom Integrationsereignis betroffen (Durst *et al.*, 1985; Schwarz *et al.*, 1985). Dadurch kann es zur Deletion oder Unterbrechung der E1/E2 ORFs, zumindest aber zur Trennung vom Promotor p97 kommen. Da E2 neben der Replikationsregulation auch als Transkriptionsrepressor die p97 Expression modulieren kann (Dowhanick *et al.*, 1995) und Mutationen in E2 einen Wachstumsvorteil verursachen (Romanczuk and Howley, 1992), wird der Verlust von E2 als Ursache für eine Überexpression der viralen Onkogene angesehen. Dies bestätigen Untersuchungen des W12-Modellsystems. Diese Zelllinie wurde aus einer Dysplasie nach natürlicher HPV16 Infektion kultiviert (Stanley *et al.*, 1989). In frühen Passagen besitzen W12-Zellen Episome, die im Laufe der Kultivierung integrieren, so dass dadurch kein E2 Protein mehr exprimiert wird. Dabei korreliert die vollständige Integration des viralen Genoms mit einer maximalen E7 Expression (Alazawi *et al.*, 2002; Pett *et al.*, 2004) und mit einem Wachstumsvorteil (Jeon *et al.*, 1995). Die verstärkte Onkogenexpression ist dabei, zumindest teilweise auf eine erhöhte mRNA-Stabilität zurückzuführen (Jeon and Lambert, 1995). Durch die Integration kommt es zu einem Verlust der viralen 3' UTR, die AU-reiche Sequenzen (ARE- AU-rich elements) beinhaltet. Aufgrund einer instabilisierenden Wirkung dieser Sequenzen in artifiziellen Reporterkonstrukten, soll der Austausch der viralen 3' UTR gegen zelluläre Sequenzen eine Stabilisierung der Onkogentranskripte bewirken (Jeon and Lambert, 1995).

Aufgrund der Korrelation von Integrationsereignis und Schweregrad der Dysplasie und der W12-Ergebnisse wird eine deregulierte Onkogenexpression nach Integration als eine Hauptursache für die Entstehung des CxCa angesehen.

1.3. Nachweis der HPV Integration

Für den Nachweis von integrierten HPV Genomen existieren vielfältige Möglichkeiten. Generell sind DNA-basierte Methoden von Transkriptanalysen zu unterscheiden. Die Analyse der HPV Transkriptstruktur (APOT- Amplification of Papillomavirus Transcripts) unterscheidet rein virale, episomale Transkripte von integrat-abgeleiteten viral-zellulären Fusionstranskripten (Klaes *et al.*, 1999). Aufgrund der Öffnung des Virusgenoms im E1/E2 Bereich kommt es zur Trennung von viralem Promotor und viralem polyA-Signal. Stattdessen wird während der Transkription von viralen Sequenzen in zelluläre Bereiche hineingelesen

bzw. in zelluläre Sequenzen gespleißt und ein Fusionstranskript exprimiert (siehe auch 2.2.5.). Demzufolge beruht die Bestimmung des physikalischen Zustands mittels Transkriptanalysen nur auf transkriptionell aktiven Genomen.

Die DNA-basierte Detektion von integrierter HPV DNA kann mittels Southern Blot, 2D-Gelelektrophorese, *in-situ* Hybridisierung oder über PCR erfolgen. Während im Southern Blot unterschiedliche Restriktionsmuster von episomaler und integrierter DNA ausgenutzt werden, wird in der 2D-Gelelektrophorese das unterschiedliche Laufverhalten von zirkulärer und linearer DNA beim Übergang von niedrig- in hochprozentige Agarosegele genutzt (siehe 3.4.2.) (Wettstein and Stevens, 1982). PCR-basierte Analysen können durch Amplifikation der Vollängen-E2-Sequenz Daten zum physikalischen Zustand liefern. Ein fehlendes E2-PCR-Produkt bei gleichzeitigem E6 Nachweis, mit ähnlicher Produktgröße, würde auf integrierte DNA hinweisen. Jedoch ist eine Aussage nur bei vollständig integrierten Genomen möglich und keine Unterscheidung von rein episomalen und episomalen + integrierten HPV Genomen gewährleistet. Daher wurden quantitative PCR Assays entwickelt, um die E2-E6 ratio bestimmen und genaue Aussagen zum HPV Status treffen zu können. Während episomale Proben eine ratio von 1 aufweisen sollten, nimmt das Verhältnis mit der Integration ab, um bei rein integrierten Genomen einen Wert von 0 anzunehmen. Allerdings zeigten Validierungsversuche, dass integrierte Genome nur bei 100-fachem Überschuss im Vergleich zu den episomalen Genomen zu detektieren sind (Arias-Pulido *et al.*, 2006). Ein genereller Nachteil der genannten Methoden ist, dass die Analysen nicht auf zellulärer Ebene durchgeführt werden und somit nicht zwischen dem Vorliegen von multifokalen Läsionen mit unterschiedlichem Genomstatus und eventuell vorhandenen episomalen und integrierten Genomen in einer Zelle, unterschieden werden kann. Diese Unterscheidung ermöglicht die *in-situ* Hybridisierung (ISH). Nach Hybridisierung mit HPV DNA Sonden zeigen Zellen mit episomalen Genomen eine diffuse Färbung des gesamten Zellkerns. Im Vergleich dazu liefern Integrate ein oder mehrere punktförmige Signale (Cooper *et al.*, 1991). Episomale Färbungen, die vorhandene Signale von Integraten überlagern, können durch stringente Wasch- und Denaturierungsbedingungen entfernt werden (Hopman *et al.*, 2005). Ein generelles Problem des Nachweises von Integraten, ist die schwierige Detektion bei überwiegender Mehrheit von Episomen.

1.4. Zielstellung

Der ursächliche Zusammenhang zwischen HR-HPV Infektionen und der CxCa Entstehung und die Notwendigkeit der viralen Onkogenexpression ist nachgewiesen und anerkannt. Weiterhin ist eine Korrelation zwischen viraler Integration und der Zervixkarzinogenese zwar bekannt, aber unzureichend verstanden. Unklar ist, ob generelle- oder Integrationsbedingte Unterschiede in der viralen Genexpression existieren, die eine Progression der Läsion begünstigen. Während im Modellsystem und durch *in-vitro* Experimente eine Überexpression der viralen Onkogene E6/E7 nach der Integration gezeigt werden konnten, wurde dieser Zusammenhang bisher nicht an Biopsiematerial bestätigt.

Hauptziel dieser Arbeit war es daher, die Auswirkungen der Integration auf die virale Genexpression und das virale Spleißmuster anhand von Biopsiematerial (CIN+CxCa) zu untersuchen. Um eine vergleichende Aussage über Genomstatus und Transkriptlevel treffen zu können, sollte der physikalische Status mittels Transkript-basiertem APOT-Assay bestimmt und in derselben RNA die virale Genexpression durch qRT-PCR quantifiziert werden. Dazu sollten entsprechende real-time PCR Assays und notwendige Normalisierungsprozeduren entwickelt und umfangreiche Validierungen durchgeführt werden, um eine reproduzierbare Quantifizierung zu ermöglichen. Zusätzlich zur Bestimmung des E6/E7 Onkogenlevel sollte auch die E2 Expression quantifiziert werden, um (i) die Auswirkung der Integration zu bestätigen und (ii) auch die E2 Expression in episomalen Proben bestimmen zu können. Des Weiteren wurden zusätzlich zu CIN und CxCa auch metastasierte Lymphknoten analysiert um Kenntnisse über die virale Genexpression im Laufe der CxCa Progression zu ermittelt.

Durch diese Analysen kann allerdings nur der generelle Einfluss der Integration auf die virale Transkriptmenge bestimmt werden. Da jedoch auch eine Veränderung der E6/E7 mRNA-Stabilität aufgrund der veränderten Transkriptstruktur diskutiert wird, sollten weiterhin Stabilitätsanalysen in Zelllinien durchgeführt werden. Dazu wurde die Expression viral-zellulärer Fusionstranskripte bzw. rein viraler Transkripte in den entsprechenden Zelllinien bestimmt und mit der Transkriptstabilität korreliert.

Somit sollte durch die ermittelten Ergebnisse die Bedeutung der Integration sowohl auf transkriptioneller Ebene, als auch in Bezug auf die RNA Stabilität besser verstanden werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

CO ₂ -Brutschrank		FormaScientific, Marietta, USA
DNA-Crosslinker	GS Gene Linker™	BioRad, München, BRD
Elektrophorese-Netzgerät	Power Pack P25	Biometra, Göttingen, BRD
Elektrophorese-Kammer		Boehringer-Ingelheim, BRD
Geldokumentationsanlage	DH30/32	Biostep, Jahnsdorf, BRD
Hybridisierungssofen		Heraeus
PCR-Geräte	Touch Down TCS	MWG-Biotec, Teddington, UK
	Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg, BRD
	7300SDS	Applied Biosystems, Darmstadt, BRD
Mischgerät	Vortex-Genie2	Scientific Industries, USA
Mikroskope	Axioplan 2	Zeiss, Jena, BRD
pH-Meter	pH526	WTW, Weilheim, BRD
PhosphoImager	BAS Reader-2500	Raytest, BRD
Schüttelapparatur	Orbital-Shaker	Forma Scientific, Marietta, USA
Sequenziergerät	Li-cor Modell 4000	MWG-Biotec, Teddington, UK
Spektralphotometer	ND-1000 UV/VIS	NanoDrop Technologies, USA
Sterile Werkbank		FormaScientific, Marietta, USA
Temperaturschüttler	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, BRD
UV-Beleuchtungskammer	N90LW 366 nm	Konrad Bender, Wiesloch, BRD
Vakuumblotter	Vacuum Blotter 270 BR	BioRad, München, BRD
Vermessen radioaktiver Proben	Quick-Count™	Bioscan, Washington, USA
Zentrifugen	Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments, Hanau, BRD
	Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, BRD
	Optima XL-100	Beckmann, Palo Alto, USA
	Ultrazentrifuge	

2.1.2. Chemikalien und Lösungen

Acrylamidlösung (30% (w/v) 29:1 Acrylamid/bisacrylamid)	AppliChem, Darmstadt, BRD
Agarose	Boehringer Mannheim, Mannheim, BRD
Agarose	GIBCO BRL, Karlsruhe, BRD
Ammoniumsulfat	Sigma, Deisenhofen, BRD
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt, BRD
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt, BRD
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen, BRD
Bacto-Agar	Difco, Detroit, Michigan, USA
Bacto-Trypton	Difco, Detroit, Michigan, USA

Bacto-Hefeextrakt	Difco, Detroit, Michigan, USA
Borsäure	Merck, Darmstadt, BRD
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, BRD
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen, BRD
Calciumchlorid	Sigma, Deisenhofen, BRD
Chloroform	Merck, Darmstadt, BRD
5-Chlor-4-Brom-3-indolyl- β -D-Galactosid	Sigma, Deisenhofen, BRD
Desoxyribonukleotidphosphate (dNTP)	Boehringer Mannheim, BRD
Dimethylformamid	ICN Biomedicals Inc., Aurora, Ohio, USA
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, BRD
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, Deisenhofen, BRD
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen, BRD
Dulbecco's modified minimal essential medium	GIBCO BRL, Karlsruhe, BRD
Ethanol 100%	Baker, Deventer, Holland
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen, BRD
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt, BRD
Formamid	Merck, Darmstadt, BRD
Formaldehyd	Merck, Darmstadt, BRD
Fetales Kälberserum	GIBCO BRL, Karlsruhe, BRD
Glycerin (86%)	Sigma, Deisenhofen, BRD
Guanidiniumhydrochlorid	ICN, Aurora, USA
Harnstoff	Sigma, Deisenhofen, BRD
Isoamylalohol	Merck, Darmstadt, BRD
Isopropanol	Merck, Darmstadt, BRD
Isopropyl- β -Thiogalactopyranidose (IPTG)	Boehringer Mannheim, Mannheim, BRD
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, BRD
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, BRD
Kanamycin	Sigma, Deisenhofen, BRD
Magnesiumchlorid	Sigma, Deisenhofen, BRD
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt, BRD
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt, BRD
Methanol	Sigma, Deisenhofen, BRD
Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Roth, Karlsruhe, BRD
Natriumacetat	Merck, Darmstadt, BRD
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, BRD
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe, BRD
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, BRD
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Deisenhofen, BRD
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, BRD
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, BRD
Penicillin-Streptomycin	GIBCO BRL, Karlsruhe, BRD
Phenol, puffergesättigt	Invitrogene, Karlsruhe, BRD
Phosphate buffered saline (PBS)	GIBCO BRL, Karlsruhe, BRD
Salzsäure	Merck, Darmstadt, BRD
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma, Deisenhofen, BRD
Tris-Hydroxymethylaminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt, BRD
Triton X-100	Merck, Darmstadt, BRD
Trypsin-EDTA	GIBCO BRL, Karlsruhe, BRD
Tween 20	Sigma, Deisenhofen, BRD

2.1.3. Enzyme

AmpliTaq	AppliedBiosystems, Darmstadt, BRD
AmpliTaq Gold	AppliedBiosystems, Darmstadt, BRD
Polynukleotid Kinase	Roche, Mannheim, BRD
PowerSybrGreen MasterMix	AppliedBiosystems, Darmstadt, BRD
Random Primed DNA Labeling-Kit	Roche, Mannheim, BRD
Restriktionsendonukleasen	New England BioLabs, Beverly, USA
Superscript™II RNase H ⁻ Reverse Transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe, BRD
Thermo Sequenase™ Primer Cycle Sequencing	Amersham
TOPO TA-Cloning®	Invitrogen, Karlsruhe, BRD

2.1.4. DNA-Standards

λHindIII	New England BioLabs, Beverly, USA
100bp Leiter	New England BioLabs, Beverly, USA
100bp Leiter	PlasmidFactory, Bielefeld, BRD

2.1.5. Oligonukleotide

Die Sequenzen der Oligonukleotid-Primer wurden mit Hilfe des Programmes PrimerExpress Ver. 2.0 (AppliedBiosystems) ermittelt. Die Herstellung der Primer erfolgte durch die Firma Thermohybaid, Ulm, BRD. Die Sequenzen der Primer und Sonden sind im Anhang (9.1.) tabellarisch, entsprechend ihrer Verwendung aufgeführt.

2.1.6. Plasmide

In Vorarbeiten zur Sequenzierung von PCR-Produkten und zur Erstellung von Plasmidstandards wurde der ORF bzw. ausgewählte Teilbereiche von ORFs mittels PCR amplifiziert und in den pCR® II bzw. IV Vector kloniert (TOPO ® TA Cloning Kit, Invitrogen, Karlsruhe, BRD). Eine Übersicht ist im Anhang (9.2.) dargestellt.

2.1.7. Zelllinien

Bezeichnung	Ursprung	HPV-Status	Referenz
HPKIA p384+X	HPV-16- transfizierte Vorhautkeratinozyten	HPV-16	(Durst <i>et al.</i> , 1987b)
HPKII p332+X	HPV-16- transfizierte Vorhautkeratinozyten	HPV-16	(Durst <i>et al.</i> , 1987b)
HPKIII p72+X	HPV-16- transfizierte Vorhautkeratinozyten	HPV-16	
SiHa p7+X	Zervixkarzinom	HPV-16	(Friedl <i>et al.</i> , 1970)
CaSki p48+X	Zervixkarzinom	HPV-16	(Pattillo <i>et al.</i> , 1977)
MRI-H186 p3+X	Zervixkarzinom	HPV-16	(Baldus <i>et al.</i> , 2005)
HaCaT	Humane Keratinozyten	negativ	(Boukamp <i>et al.</i> , 1988)
COS-7	Cercopithecus aethiops (African green monkey) kidney; SV40 transformed T antigen	negativ	(Gluzman, 1981)

2.1.8. Radioisotope[γ -32P]-ATP

Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig, BRD

[α -32P]-ATP

Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig, BRD

2.1.9. Sonstiges

Filterpapier	Whatman 3MM	Schleicher & Schuell
Röntgenfilme	X-OMAT	Kodak
Filmkassetten	X-OMAT-Kassetten	Kodak
BioImager Platte	BAS SR Imaging Plate	Fujifilm
Materialien Zellkultur	10cm Schalen	Falcon
	25 und 75cm Flaschen	Becton Dickinson
	6, 12, 24-Loch-Platten	Falcon
	Pipetten 2, 5 und 10 ml	Greiner
	Einfriertubes	Greiner
Plasmid-Reinigung	QIAprep®Miniprep Kit	Qiagen
PCR-Produkt-Reinigung	QIAquick®Gel Extraction Kit	Qiagen
RNA Aufreinigung	RNA Blood Mini Kit	Qiagen
	NucleoSpin RNA-II Kit	Macherey-Nagel
Säulen	Quick Spin Columns	Roche
Nylonmembranen	positively charged	Roche

2.2. Methoden

2.2.1. Arbeiten mit Prokaryoten

2.2.1.1. Kultivierung

Folgende *Escherichia coli* Stämme wurden für die Klonierung von Plasmiden verwendet.

Tab. 2.1. Verwendete *E. coli*-Stämme

Stamm	Phänotyp	Verwendung
JM109	<i>F'</i> <i>traD36 proA</i> ⁺ <i>proB</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q <i>lacZΔM15/recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17</i> <i>supE44 relA1 Δ(lac-proAB) mcrA</i>	Klonierung, DNA-Gewinnung
DH5α	<i>F'</i> / <i>endA1 recA1 gyrA thi-1 hsdR17(r_K⁻m_K⁺)</i> <i>supE44 relA1 Δ(lacZYA-argF)_{U196} -(m80</i> <i>lacZΔM15)</i>	Klonierung, DNA-Gewinnung

E. coli wurde, je nach Anwendung unterschiedlich kultiviert. Eine Zusammenfassung der Kulturtechniken ist Tabelle 2.2. zu entnehmen.

Tab. 2.2. Häufig verwendete Bakterienkulturtechniken und deren Anwendung in dieser Arbeit

Kultur	Herstellung	Verwendung
Plattenkultur	Ausstreichen einer Zellsuspension auf LB-Agar-Platten und Inkubation bei 37°C	Vereinzelung, Selektion
Übernacht-Kultur	Steriles Animpfen von 5ml LB-Medium mit Einzelkolonien aus Plattenkultur oder mit Glycerinkulturen Schütteln bei 37°C für 15h	Zur Plasmidgewinnung im analytischen Maßstab, als Vorkultur für Großkulturen
Großkultur	Übertrag einer Vorkultur in warmes LB-Medium Wachstum bei 37°C bis die gewünschte Zelldichte (OD _{550nm}) erreicht ist	Herstellung von kompetenten Zellen, Plasmidgewinnung
Glycerinkultur	Versetzen eines Aliquots einer Flüssigkultur mit 50% Glycerin im Verhältnis 3:2, sorgfältiges Mischen und sofortige Lagerung bei -80°C	Längerfristige Aufbewahrung von <i>E. coli</i> -Stock-Kulturen

Nach der Transformation von *E. coli* mit den entsprechenden Plasmidkonstrukten (siehe 2.1.6.) erfolgte die Identifikation von plasmidtragenden Bakterien in Plattenkultur mit Selektionsmedium. Dazu wurde der Transformationsansatz in verschiedenen Verdünnungen

auf LB-Agar-Platten ausplattiert um später vereinzelte Kolonien isolieren zu können. Die Agar-Platten enthielten ein geeignetes Antibiotikum in folgenden Konzentrationen:

Ampicillin C=100µg/ml

Kanamycin C=25µg/ml

Die Identifikation von positiven *E. coli*-Kolonien erfolgte, sofern möglich durch den blau-weiß-Test. Bei Verwendung des blau-weiß-Test wurde auf den Platten 40µl X-Gal (40µg/µl in Dimethylformamid) sowie 40µl IPTG (100mM in *aq. bidest*), vor den *E. Coli* ausplattiert. Identifizierte positive Klone wurden steril am Bunsenbrenner gepickt und in ca. 5ml LB-Medium, welches auch ein entsprechendes Antibiotikum beinhaltete, überführt. Bei fehlendem blau-weiß-Test wurden mehrere Kolonien gepickt um nach späterer Plasmidisolation und Restriktionsspaltung positive Klone zu identifizieren.

Die Flüssigkulturen wurden bei 37°C über Nacht leicht geschüttelt. Aus den ÜN-Kulturen wurden Plasmide aufgearbeitet, durch Restriktion und Gelelektrophorese analysiert und falls es sich um richtige Klone handelte wurden Glycerinkulturen angelegt.

2.2.1.2. Medien

Luria-Broth-Medium (LB) 10 g Bacto-Trypton
5 g Bacto-Hefeextrakt
5 g Natriumchlorid
mit deionisiertem Wasser auf 1l auffüllen, mit 10 N NaOH-Lösung auf einen pH von 7,4 einstellen
Autoklavieren (20 min, 3 bar, 121°C), Lagerung bei 4°C

SOC-Medium 2 g Bacto-Trypton
0,5 g Bacto-Hefeextrakt
1 ml 1 M NaCl-Lösung (Endkonzentration 10 mM)
1 ml 1 M KCl (Endkonzentration 10 mM)
mit deionisiertem Wasser auf 1l auffüllen, mit 10 N NaOH-Lösung auf einen pH von 7 einstellen
Autoklavieren (20 min, 3 bar, 121°C), Lagerung bei 4°C
1 ml 2 M MgCl₂ (Endkonzentraion 20 mM)
1 ml 2 M Glucose (Endkonzentraion 20 mM)

Agarplatten LB-Medium unter Zusatz von 1,5 % (w/v) Bacto-Agar
Autoklavieren (20 min, 3 bar, 121°C),
Gießen der Platten nach Abkühlen der Lösung auf ca. 50°C und
Zufügen der zur Selektion notwendigen Antibiotika, Lagerung
bei 4°C

2.2.1.3. Herstellung kompetenter Zellen

Kompetente Zellen besitzen die Fähigkeit Fremd-DNA aufzunehmen. Diese Fähigkeit wird im Labor für die Transformation von Bakterien ausgenutzt. Es handelt sich um keine natürliche, sondern eine künstlich induzierte Kompetenz der Bakterien. In der vorliegenden Arbeit wurde die CaCl_2 -Methode (Mandel and Higa, 1970) angewandt. Diese Methode liefert chemisch kompetente Zellen, die in der Lage sind DNA-Moleküle aus dem umgebenden Medium aufzunehmen.

Zur Herstellung wird eine ÜN-Kultur des gewünschten Bakterienstammes angesetzt. Mit 200 μl dieser Vorkultur werden 200ml angewärmtes LB-Medium angeimpft und ca. 5h bei 37°C bis zu einer $\text{OD}_{550\text{nm}}=0,3$ geschüttelt. Alle folgenden Schritte werden auf Eis, unter Verwendung von eiskalten Lösungen bzw. einer auf 4°C-gekühlten Zentrifuge, durchgeführt. Nach dem Abzentrifugieren der Kultur (800g, 5min) wird das Pellet in 100ml der Lösung A resuspendiert, erneut zentrifugiert und in 100ml Lösung B resuspendiert. Die Zellen werden in dieser Lösung 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend erneut abzentrifugiert. Nach Aufnahme des Gesamtpellets in 2ml Lösung C werden die Zellen zu 100 μl aliquotiert und in vorgekühlten Tubes, zügig bei -80°C eingefroren. Diese Zellen können über einen Zeitraum von bis zu 6 Monaten für eine Transformation aufgetaut werden.

Lösung A (100 mM MgCl_2 , 5 mM Tris pH 7,4), eiskalt

Lösung B (100 mM CaCl_2 , 5 mM Tris pH 7,4), eiskalt

Lösung C (100 mM CaCl_2 , 5 mM Tris pH 7,4, 14% Glycerin), eiskalt

2.2.1.4. Transformation von *E. Coli*

Nach dem Auftauen von 100 μl kompetenten Zellen auf Eis, wurden 5 μl Ligationsansatz zu den Zellen gegeben und diese nach vorsichtigem Mischen für 45 Minuten auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock von 42°C für 2 Minuten. Anschließend wurden 400 μl vorgewärmtes SOC-Medium zu den Zellen gegeben, diese für eine Stunde bei 37°C leicht geschüttelt und anschließend auf LB-Platten mit Selektionsmarker ausgestrichen. Nach dem Übertrag einer Anzahl von Einzelkolonien in LB-Medium und der Anzucht von ÜN-Kulturen, erfolgte nach Plasmidaufarbeitung, die Identifikation von positiven Klonen durch Restriktionsspaltung.

2.2.2. Kultivierung adhärenter humaner Zelllinien

2.2.2.1. Medien

Die Zelllinie MRI-H186 wurde in RPMI-1080 Medium kultiviert, während für alle anderen Zelllinien DMEM Medium verwendet wurde. Dem entsprechenden Medium wurden 10% fetales Kälberserum (FKS) und 1% Penicillin/Streptomycin (Stock 10000U/ 10000µg/ml) zugegeben.

2.2.2.2. Kultivierung

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden als adhärent wachsende Monolayer-Kulturen bei 37°C und 5% CO₂ in Plastik-Gewebekulturflaschen (25cm², 75cm²) oder Plastik-Gewebekulturschalen (6cm² und 10cm² Schalen) kultiviert. Alle drei bis vier Tage wurde verbrauchtes Medium entfernt und frisches Medium zugegeben. Sobald die Zellen konfluent gewachsen waren wurden sie unterkultiviert. Nach Abgießen des Mediums und einmaligem Spülen mit 6ml PBS (75cm² Kulturflasche) wurden die Zellen mit 2ml Trypsin-ETDA-Lösung behandelt und die Zellen so lange im Brutschrank inkubiert, bis sie sich durch leichtes Klopfen vom Kulturflaschenboden lösten. Nach Neutralisieren der Trypsin-Aktivität durch Zugabe der 3-fachen Menge an Medium und Vereinzeln der Zellen durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 bis 1:16 in neue Kulturgefäße ausgesät.

Trypsin/ EDTA-Lösung:	Trypsin	0,5g
	EDTA 0,5M pH 8,0	4ml
	1x PBS	ad 1l

2.2.2.3. Einfrieren und Auftauen

Zellen, deren Kultur nicht fortgeführt werden sollte, wurden in eingefrorenem Zustand in flüssigem Stickstoff gelagert. Eine exponentiell wachsende Zelllinie (ca. 10⁷ Zellen) wurde trypsiniert, in Medium aufgenommen und durch Abzentrifugieren (200g, 5min, 4°C) sedimentiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 3ml Einfriermedium resuspendiert, Aliquots zu je 1ml in Einfriererörchen gegeben und diese, in Zellstoff verpackt, langsam auf -80°C abgekühlt. Die Zellen wurden anschließend in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Einfriermedium 30ml DMEM
 15ml FCS
 5ml DMSO
 10 ml Aliquots wurden bei -20°C aufbewahrt.

Bei Wiederaufnahme der Kultur wurden die Zellen sofort nach Entnahme aus dem Stickstofftank unter fließendem Wasser aufgetaut, in ein mit Medium vorbereitetes Gefäß überführt und vorsichtig resuspendiert. Danach wurde die Lösung zentrifugiert (200g, 5min, 4°C), das Pellet in frischem Medium aufgenommen und die Zellen auf einer entsprechenden Kulturflasche ausgesät.

2.2.3. Allgemeine Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1. Arbeiten mit RNA

2.2.3.1.1. Aufarbeitung aus Zelllinien und Gewebeproben

In der vorliegenden Arbeit wurde stets Gesamt-RNA isoliert. Je nach vorhandenem Ausgangsmaterial wurde unterschiedlich vorgegangen.

Zelllinien

RNA aus Zelllinien wurde mit dem NucleoSpin RNA-II Kit von Macherey-Nagel aufgearbeitet. Um eine effiziente und schnelle Zellyse und RNase-Inaktivierung zu erreichen wurden 350µl Lysepuffer mit β-Mercaptoethanol direkt in die 6cm-Zellkulturschalen gegeben und mit Hilfe eines Zellschabers verteilt. Anschließend wurde nach Herstellerangaben vorgegangen und ein DNase-Verdau durchgeführt. Nach der Elution wurde die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt und die RNA bei -80°C gelagert.

Gewebeproben

Gesamt-RNA aus Patientenproben wurde mit dem RNA Blood Mini Kit von Qiagen aufgearbeitet. Für die Analysen lagen tiefgefrorene Lymphknotenbiopsien bzw. Kryostatbiopsien von CIN und CxCa Geweben vor. Von den Lymphknotenbiopsien wurden ca. 30mg Gewebe in gefrorenem Zustand mit frischem Skalpell abgetrennt, in 800µl Lysepuffer aufgenommen und sofort mittels Stabhomogenisator zerkleinert.

Von CIN und CxCa Gefrierbiopsien wurden jeweils 20 Schnitte á 15µm angefertigt und über Nacht in 500µl RNAlater bei 4°C gelagert. Anschließend wurde 1ml DEPC-behandeltes *aq. bidest* zugegeben, die Schnitte bei 18000g 3min abzentrifugiert und in 400µl Lysepuffer aufgenommen. Durch mehrmaliges auf- und abpipettieren mit einer Tubulinspritze wurde eine gute Homogenisierung des Materials erreicht. Das vorliegende Lysat wurde nach Herstellerangaben weiter verarbeitet. Dabei wurde ein DNase-Verdau durchgeführt. Nach der Elution wurde die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt und die RNA bei -80°C gelagert.

2.2.3.1.2. Konzentrationsbestimmung und Qualitätskontrolle

Die extrahierte RNA wurde spektrophotometrisch vermessen (NanoDrop 1000). Aufgrund der Konstruktionsweise des NanoDrop, können kleinste Volumina (~1µl) und somit unverdünnte RNA Lösungen vermessen werden. Dabei wird die Lichtabsorption der RNA bei $\lambda=260\text{nm}$ ausgenutzt und die optische Dichte (O.D.) der RNA-Lösung bei dieser Wellenlänge bestimmt. Um eventuelle Verunreinigungen durch Proteine zu bestimmen wird zusätzlich die O.D. bei 280nm und der Quotient A_{260}/A_{280} bestimmt. Dieser liegt bei einer sauberen RNA-Lösung bei 1,8-2,1. Ein Wert von $A_{260}=1$ entspricht einer Konzentration an RNA von $c=40\text{ng}/\mu\text{l}$. Demnach berechnet sich die RNA-Konzentration:

$$c[\text{ng}/\mu\text{l}] = A_{260} \times 40$$

2.2.3.1.3. Reverse Transkription

Aufgrund der Verwendung von poly-dT Primern (CDS Primer bzw. Frohman Primer) wurde nur prozessierte und nicht degradierte mRNA mit polyA⁺ 3' Ende in cDNA umgeschrieben. Zu 200ng RNA (Zervixbiopsien) bzw. 1µg RNA (Lymphknoten und Zelllinien) wurden 2µl dNTPs (je 10mM) und 2µl poly-dT Primer (10µM) im Gesamtvolumen von 25µl gegeben, 10min bei 70°C erhitzt und anschließend in Eiswasser denaturiert. Eine auf 42°C vorgewärmte Lösung aus 8µl 5x Puffer, 4µl 0,1M DTT, 1µl RNaseOUT und 1µl H₂O wurde mit 1µl SuperscriptII (200U) versetzt und zur denaturierten RNA gegeben. Die Reverse Transkription wurde im Gesamtvolumen von 40µl 50min bei 42°C durchgeführt und anschließend durch Inkubation bei 70°C für 15min gestoppt.

2.2.3.2. Arbeiten mit DNA

2.2.3.2.1. Aufreinigung aus Zelllinien

Genomische DNA aus Zelllinien wurde mittels Qiagen DNA Mini Kit aufgereinigt. Die Zellen wurden trypsiniert, mit 1x PBS gewaschen und als Pellet bei -80°C bis zur Aufarbeitung eingefroren. Die Aufreinigung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Allerdings wurde der Zellaufschluss durch ProteinaseK Verdau von 2h auf über Nacht ausgedehnt. Nach der Extraktion wurde die genomische DNA spektrophotometrisch vermessen und im 0,7% Agarosegel aufgetrennt.

2.2.3.2.2. Klonierung von PCR-Produkten

Für die Klonierung von PCR Produkten wurde das TOPO-TA-Cloning-Kit (Invitrogen) verwendet. Diese Art der ungerichteten Klonierung beruht auf der template-unabhängigen Addition eines Desoxyadenosin-triphosphates (dATP) an das 3'-Ende von PCR-Fragmenten durch Polymerasen ohne 3'-5'-Exonucleaseaktivität (z.B. Taq-Polymerase). Dadurch wird ein Einbau der PCR-Fragmente in einen Vektor mit 3'-überhängenden Thymidin durch komplementäre Basenpaarung erleichtert. Der verwendete Kit benutzt für die Ligationsreaktion keine DNA-Ligase (z.B. T4-Ligase), sondern die intrinsische Ligase-Aktivität der Topoisomerase-I. Der verwendete Vektor pCRII_TOPO liegt linearisiert und durch kovalente Bindung der Topoisomerase-I an die freien Enden, aktiviert vor. Bei Zugabe des PCR-Produktes kommt es erst zu einer nicht-kovalenten Bindung der überhängenden Enden, anschließend zur Ligation, d.h. Bildung einer Phosphordiesterbindung zwischen beiden DNA-Molekülen. Die Topoisomerase-I liegt dann frei in Lösung vor.

Falls notwendig wurde das PCR-Produkt vor der Ligation über ein Agarosegel aufgereinigt (Quiagen Gel-Extraction Kit). Die Konzentration des spezifischen PCR Produktes wurde im Agarosegel abgeschätzt und ca. 20ng DNA in die Ligation eingesetzt. Folgender Ansatz wurde pipettiert:

4,5µl	DNA (ca. 20ng) in <i>aq. bidest</i>
1µl	Salzlösung (300mM NaCl; 15mM MgCl ₂)
0,5µl	TOPO-Vector (10ng/µl)

Anschließend wurden 5µl des Ansatzes für die Transformation eingesetzt (siehe 2.2.1.4.).

2.2.3.2.3. Plasmidisolierung

Für die Plasmidaufreinigung wurde der Plasmid-Mini-Kit (Qiagen) verwendet. Dabei wurde nach dem Handbuch vorgegangen. Es handelt sich dabei um eine Modifizierung der Plasmidisolierung mittels alkalischer Lyse nach Birnboim (Birnboim, 1983). Aufgereinigte, endonuklease-freie Plasmid-DNA wurde spektrophotometrisch vermessen und durch Restriktionsspaltung charakterisiert.

2.2.3.2.4. Reinigung von DNA

Verschiedene weiterführende Schritte erforderten die Reinigung der DNA, d.h. die Abtrennung von Primern, Enzymen oder Salzen bzw. die Aufnahme der DNA in ein anderes Lösungsmittel. Zwei verschiedene Reinigungsverfahren wurden in dieser Arbeit angewandt: Die Isolierung der DNA aus Agarosestücken und die Phenolisierung von DNA.

Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Dieser Reinigungsschritt empfiehlt sich, wenn DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge in einer Lösung vorliegen und die entsprechenden PCR-Produkte im Anschluß in einen Vektor ligiert werden sollen. Die Reaktionsansätze wurden im Agarosegel aufgetrennt und die Banden anschließend unter langwelligem UV-Licht (366 nm) mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die Extraktion der DNA aus dem Gelstück erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers.

Phenolisierung von DNA

Durch Phenolisierung können Proteine von DNA abgetrennt werden. Dazu wird die zu reinigende DNA-Lösung mit dem 1,5fachen Volumen eines puffergesättigten Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1) versetzt, gründlich gemischt und zur Beschleunigung der Phasentrennung 1min bei 14000rpm zentrifugiert. An der Grenzschicht zwischen beiden Phasen befinden sich nun die Proteine. Die obere wäßrige Phase wird vorsichtig in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und im Verhältnis 1:1 mit Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (24:1) versetzt, gemischt und zentrifugiert (s.o.). Die in der wäßrigen Phase befindliche DNA kann nun abgenommen, gefällt und konzentriert werden.

Ethanolfällung

Die zu präzipitierende DNA wird mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 4,8 versetzt und gemischt. Anschließend werden 2,5 Volumen kaltes Ethanol 100% zugegeben. Nach 30 minütiger Inkubation bei -20°C kann die DNA durch Zentrifugation (30min, 14000rpm, 4°C) pelletiert werden. Nach einem Waschschrift mit 70%igem Ethanol und Trocknen bei 37°C wird das Pellet in 1x TE-Puffer aufgenommen.

2.2.3.2.5. Quantifizierung von dsDNA

Die extrahierte DNA wurde spektrophotometrisch vermessen (NanoDrop 1000). Dabei wird die Lichtabsorption der DNA bei $\lambda=260\text{nm}$ ausgenutzt und die optische Dichte (O.D.) der DNA-Lösung bei dieser Wellenlänge bestimmt. Um eventuelle Verunreinigungen durch Proteine zu bestimmen wird zusätzlich die O.D. bei 280nm und der Quotient A_{260}/A_{280} bestimmt. Dieser liegt bei einer sauberen DNA-Lösung bei 1,8-2,1. Ein Wert von $A_{260}= 1$ entspricht einer Konzentration an dsDNA von $c= 50\text{ng}/\mu\text{l}$. Demnach berechnet sich die DNA-Konzentration der unverdünnten Lösung:

$$c[\text{ng}/\mu\text{l}] = A_{260} \times 50$$

2.2.3.2.6. Restriktionsverdau

DNA kann durch Spaltung mit Restriktionsendonukleasen analysiert werden. Außerdem kann eine Spaltung zur Fragmentierung und besseren Auftrennung von hochmolekularer genomischer DNA im Agarosegel dienen. Verwendet wurden Restriktionsenzyme der Firma New England Biolabs. Es wurden nach Herstellerangaben zusammenpipettiert:

DNA $\mu\text{g DNA} \times 10$ ergibt das Gesamtvolumen des Spaltungsansatzes in μl
Puffer 1/10 des Endvolumens (bei 10x Puffern)
Enzym max 1/20 Vol des Endvolumens, zu beachten sind Units/mg DNA
BSA (Rinderserumalbumin) in der vom Hersteller empfohlenen Endkonzentration
H₂O dient zum Auffüllen auf das Endvolumen

Anschließend wurde der Reaktionsansatz mindestens 3h (Plasmidverdau) bzw. über Nacht (gDNA) bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur inkubiert. Durch Agarosegelelektrophorese wurde die gespaltene DNA analysiert.

2.2.3.2.7. Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden mit dem MWG Licor4000-System durchgeführt. Die Sequenzierungsreaktion erfolgte als „Cycle-sequencing“. Dabei wird die Didesoxysequenzierung nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977) angewandt und um die Sensitivität zu erhöhen mit einer PCR-Amplifikation kombiniert. Es wird eine PCR mit linearer Amplifikation (nur ein Primer) durchgeführt. In vier getrennten Reaktionen wird jeweils ein Didesoxynukleotid zugesetzt, so dass im Laufe der PCR zufällig verteilte Abbrüche der Polymerasereaktion stattfinden. Als Resultat kommt es in jedem Ansatz zur Ansammlung verschieden langer DNA-Fragmente (ca. 10-1000 Basen) mit definierter endständiger Base. Nach Auftrennung der Fragmente in einem 6%-igen denaturierenden Harnstoff-PAA-Gel mit einer Trennleistung von einem Nukleotid Längenunterschied kann die Sequenz direkt aus dem Gel abgelesen werden. Um die Detektion der DNA-Fragmente zu ermöglichen, wurden fluoreszenzmarkierte Primer (IRD800) verwendet.

Für die Sequenzierreaktion wurde ein Mastermix mit 800ng Plasmid-DNA angesetzt.

Mastermix:	7,2µl	3,5x Puffer
	2µl	Primer (2pmol/µl), IRD800-labeled
	x	DNA-Template
	ad 16µl	aq.dest
	1µl	SequiTherm Polymerase (5U/µl)

Jeweils 4µl dieses Mixes wurden in 96-well-plates zu je 2µl Terminationsmix (mit den entsprechenden Didesoxynukleotiden) gegeben, mit Wachs überschichtet und folgendes PCR-Programm gestartet

I.	Initiale Denaturierung	5min	95°C
II	30 Zyklen:		
	Denaturierung	30sec	95°C
	Annealing	15sec	primerspezifisch
	Elongation	1min	70°C

Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 3µl Stopplösung beendet.

Vor dem Gießen des Sequenziergels wurden die entsprechenden Glasplatten (41cm Länge) gründlichst gereinigt und zusammengebaut. Für das Gel wurden zu 14g Harnstoff folgende Lösungen pipettiert:

5ml	RapidGelXL40%
3,4ml	10x TBE-Long-Run Puffer
18,7ml	aq. dest
333,4µl	DMSO
33,4µl	TEMED
233,4µl	10%APS

10xTBE-Long-Run-Buffer:	Tris	108g
	Borsäure	55g
	EDTA 0,5M pH 8,0	40ml
	H ₂ O	ad 1l

Vor der Zugabe von TEMED und APS wurde die Lösung sterilfiltriert. Nach zügigem und luftblasenfreiem Gießen des Gels, polymerisierte dieses für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur aus und wurde dann einem Vorlauf von ca. einer Stunden unterzogen.

Folgende Laufbedingungen wurden eingestellt:

Spannung:	1500V
Stromstärke:	35mA
Leistung:	40W
Geltemperatur:	45°C
Frames:	32

Der Vorlauf dient zur gleichmäßigen Erwärmung des Gels, zur Schaffung eines homogenen elektrischen Feldes im Gel und der Laserjustierung. Ein Aliquot von 1µl der Sequenzierreaktion wurde auf das Gel aufgetragen. Unter oben genannten Bedingungen betrug die Laufzeit ca. 15 Stunden, was zu einer Leseweite von 700-900bp führt.

2.2.3.3. 2D-Gelelektrophorese

Mittels zweidimensionaler Agarosegelelektrophorese können lineare und zirkuläre DNA Moleküle, die bei normaler Auftrennung im Gel dieselben Wanderungseigenschaften besitzen, getrennt werden (Johnson and Grossman, 1977). Beim Übergang von einem niedrigprozentigen Gel (0,4%) in ein dichteres Agarosegel (0,8%) wandert zirkuläre DNA langsamer als lineare DNA. Nach geeignetem Restriktionsverdau und DNA-Fällung wurde die genomische DNA doppelt im 0,4% Agarosegel aufgetrennt. Eine Spur der aufgetrennten DNA wurde ausgeschnitten, in ein 0,8% Agarosegel eingegossen und senkrecht zur ersten Laufrichtung aufgetrennt. Danach wurden die eindimensional aufgetrennte DNA, als Kontrolle und die zweidimensional aufgetrennte DNA, zusammen geblottet und durch Hybridisierung mit radioaktiv markierter HPV16 DNA analysiert.

2.2.3.4. Southern-Blot

Zum Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen wird der Southern-Blot verwendet (Southern, 1975). Dabei wird eine markierte DNA-Sonde, die komplementär zu der nachzuweisenden Sequenz ist, eingesetzt. Nach dem Blotten der DNA auf eine Nylonmembran und einer Vorhybridisierung, zur Absättigung unspezifischer Bindungen, wird die Membran mit der Sonde inkubiert. Unter Ausnutzung der Hybridisierung komplementärer Sequenzen wird, nach stringenter Waschen, eine spezifische Markierung der Zielsequenz erreicht. In der vorliegenden Arbeit wurden random-geprimte DNA-Sonden oder markierte Oligonukleotidsonden verwendet.

Bei der Vorbehandlung der Agarosegele, wurde die DNA durch 2x 10min Schwenken in 0,25N HCl und 3x 20min Schwenken in Blotpuffer depurinisiert und denaturiert. Anschließend wurden die Gele, mittels VakuumBlot (1h, 5Hg) geblottet und die DNA auf die Nylonmembran überführt. Die Membran wurde dann durch Waschen mit Waschpuffer 1 neutralisiert, die DNA mit der Membran vernetzt (UV-Crosslinker) und sofort vorhybridisiert oder bei -20°C eingefroren. Zur Vorhybridisierung wurde die Membran für mind. 3 Stunden bei 42°C mit der Vorhybridisierungslösung inkubiert.

2.2.3.4.1. Random priming

Bei der random-geprimten Sondensynthese wird $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP in die linear amplifizierte DNA eingebaut. Eine spezifische Hybridisierung von DNA Fragmenten unterschiedlicher Sequenz bei geeigneter Temperatur wird durch die Verwendung von Formaldehyd-haltigen Hybridisierungslösungen erreicht.

Die Membran wurde zunächst in 10ml Vorhybridisierungslösung über Nacht bei 42°C in einem Hybridisierungsofen vorinkubiert. Die beiden Teile A und B der Vorhybridisierungslösung wurden entsprechend der Tabelle 2.3. zusammenpipettiert, nach 5min Denaturierung der tRNA vereinigt und auf den Filter gegeben.

Tab. 2.3. Vorhybridisierungslösung

	<i>Lösung A</i>				<i>Lösung B</i>			
Volumen	100% Formamid	Yeast RNA 10mg/ml	5 min warten	10% SDS	20 x SSC	50 x Denhardts Reagenz	1 M NaPP pH 7,0	Wasser
10 ml	5 ml	100 μl		1 ml	2,5 ml	200 μl	500 μl	700 μl

Für die Sondenmarkierung wurde der Random Primed DNA Labeling Kit eingesetzt. Dabei wird bei der Synthese des, zum Template komplementären DNA-Strangs durch das Klenow-Enzym, das radioaktiv markierte Nukleotid eingebaut. Durch die Verwendung eines Primergemisches aus Hexanukleotiden, die jegliche mögliche Basensequenz beinhalten, kommt es zur „sequenzunspezifischen“ Markierung eines beliebigen Templates.

Die eingesetzte Template-DNA wurde durch 10-minütiges Erhitzen auf 98°C und anschließendes Abkühlen auf Eis, denaturiert und zu folgendem 20µl-Ansatz pipettiert.

11,5µl	DNA (50-100ng)
je 1µl	dCTP, dGTP, dTTP (0,5mM)
2µl	Hexanukleotid-Reaktionsgemisch
2,5µl	$\alpha^{32}\text{P}$ -dATP (10µCi/µl)
1µl	Klenow-Polymerase

Zur DNA-Synthese wurde der Ansatz 30 Minuten bei 37°C inkubiert und die Reaktion anschließend durch Zugabe von 2µl 0,2M EDTA (pH8,0) abgestoppt. Die Abtrennung von nichteingebautem ^{32}P -dATP erfolgte durch Chromatographie über eine Quick SpinColumn. Der Erfolg der radioaktiven Markierung wurde durch das Vermessen der Sonde mittels Quick-Counter überprüft.

Die Sonde wurde sofort für die Hybridisierung in folgender Hybridisierungslösung eingesetzt. Dabei wurde die Gesamtlösung wiederum durch sequentielles zusammenführen der Lösungen A und B gebildet (Tab. 2.4.).

Tab. 2.4. Hybridisierungslösung

Volumen	Lösung A					Lösung B			
	100 % Formamid	Yeast RNA 10 mg/ml	^{32}P -DNA	5 min warten	10% SDS	20 x SSC	50x Denharts Reagenz	1 M NaPP pH 7,0	Wasser
5 ml	2,5 ml	50 µl	X		0,5 ml	1,25 ml	100 µl	100 µl	500 µl-X

Die Hybridisierung der Membran mit der Sonde erfolgte über mindestens 15h. Danach wurde die Membran 3x 30min in Waschpuffer 2 (2xSSC/ 0,1%SDS) bei 68°C stringent gewaschen und bei -80°C auf Röntgenfilmen exponiert.

2.2.3.4.2. Hybridisierung mit markierten Oligonukleotiden

Um DNA Sequenzen mit ähnlicher Sequenz einfach nachzuweisen, können markierte, spezifische Oligonukleotide eingesetzt werden. Für die Sondensynthese wird dabei die endständige, radioaktive γ -Phosphatgruppe durch die Polynukleotidkinase (Roche) von $\gamma^{32}\text{P}$ -dATP auf das Oligonukleotid übertragen. Folgender 20 μl Ansatz wurde 30min bei 37°C inkubiert:

3 μl	Oligonukleotid (10pmol/ μl)
2 μl	10x Phosphorylierungspuffer (Roche)
5 μl	$\gamma^{32}\text{P}$ -dATP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$)
1 μl	Polynukleotidkinase (10U/ μl , Roche)
ad 20 μl	H ₂ O

Anschließend wurden nicht eingebaute Nukleotide durch Chromatographie über eine Quick SpinColumn abgetrennt und die Sonde nach Kontrolle der Markierungseffizienz bis zur Hybridisierung auf Eis aufbewahrt.

Die in dieser Arbeit verwendeten Hybridisierungslösungen für Oligos basieren auf 6x SSC Puffern. Folgende Lösung wurde für die Vorhybridisierung bei 37°C (>3h) verwendet (Tab. 2.5.).

Tab. 2.5. Vorhybridisierung für Oligo-Sonden

	<i>Vorhybridisierung</i>					
Volumen	20x SSC	Yeast RNA 10 mg/ml	NaPP	Wasser	10% SDS	50x Denhardt´s
10 ml	3 ml	100 μl	200 μl	5,2 ml	0,5 ml	1 ml

Nach der Vorhybridisierung wurde die Lösung gegen die Hybridisierungslösung (Tab. 2.6.) ausgetauscht und die Hybridisierung über Nacht bei $T = T_M(\text{Oligo}) - 5^\circ\text{C}$ durchgeführt. Anschließend wurde die Membran mit Waschpuffer 3 1x 10min bei 37°C und 2x 30min bei der Hybridisierungstemperatur gewaschen. Die Exposition der Membran erfolgte je nach Signalintensität über verschiedene Zeiträume bei -80°C.

Tab. 2.6. Hybridisierungslösung für Oligo-Sonden

	<i>Hybridisierung</i>					
Volumen	20x SSC	Yeast RNA 10 mg/ml	NaPP	Wasser	³² P DNA	50x Denhardt´s
10 ml	3 ml	100 μl	200 μl	6,5 ml-X	X	200 μl

Reagenzien für Southern-Blot:

Yeast RNA	10 mg/ml gelöst in TE-Puffer, pH 7,6
5x Blotpuffer	80g NaOH 175,5g NaCl ad 1l <i>aq. bidest</i>
50 x Denhardt	1 g Rinderserumalbumin 1 g Polyvinylpyrolidon 1 g Ficoll ad 100ml <i>aq. bidest.</i> , sterilfiltrieren
1M NaPP, pH 7,0	57,7 ml 1M Na ₂ HPO ₄ 42,3 ml 1M NaH ₂ PO ₄
Waschlösung 1	10ml 20xSSC 20ml 1MTris pH7,5 ad 100ml <i>aq. bidest</i>
Waschlösung 2	100ml 20x SSC 10ml 10 % SDS ad 1l <i>aq. bidest.</i>
Waschlösung 3	300ml 20xSSC 20ml 1M NaPP ad 1l <i>aq. bidest</i>

2.2.3.5. Polymerasekettenreaktion PCR (Saiki *et al.*, 1985)

Durch die Polymerasekettenreaktion wird ein DNA-Fragment zwischen zwei Primerbindestellen exponentiell amplifiziert. Die frei 3'-OH-Gruppe der Primer wird als Startpunkt der DNA-Neusynthese, der eigentlichen Polymerasereaktion genutzt. Während der PCR kommt es zur mehrmaligen Wiederholung eines dreistufigen Temperaturzyklus. Dadurch kommt es zu einer temperaturabhängigen Regulation der einzelnen Reaktionsschritte- Denaturierung, Annealing und Elongation. Im sich daran anschließenden neuen Zyklus liegt idealer Weise die doppelte DNA-Menge bzw. nach x Zyklen, von n Ausgangsmolekülen n^x -Kopien vor.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Prinzip der PCR für die Quantifizierung von DNA Molekülen (siehe 2.2.4.), für die Amplifikation von 3' cDNA Enden (siehe 2.2.5.) und für die Gewinnung von PCR-Produkten zur Klonierung oder Sondenherstellung (Standard-PCR) verwendet. Für die Standard-PCR wurde die AmpliTaq-Gold Polymerase (AppliedBiosystems) in folgendem optimiertem Ansatz verwendet.

dNTPs (je 2mM)	6µl
10x PufferII mit 15mM MgCl ₂	5µl
MgCl ₂ (25mM)	0,5µl
DMSO (99%)	2,5µl
Primer fw (10pmol/µl)	2,5µl
Primer rev (10pmol/µl)	2,5µl
AmpliTaq Gold	0,25µl
DNA	xµl
H ₂ O	ad 50µl

Der Reaktionsansatz wurde auf Eis pipettiert und folgendem Temperaturprotokoll (Produkt <500bp) unterzogen:

10min	95°C	
15sec	95°C	} 35x
20sec	Primer-spezifische T _A (siehe...)	
40sec	72°C	
4min	72°C	
∞	4°C	

Die Dauer der Elongationsphase richtete sich nach der zu erwartenden Produktgröße (<500bp 40sec; 500bp<>1,5kb 1min; >1,5kb je 1kb 1min). Nach der Analyse eines Aliquots der Reaktion im Agarosegel wurde das gewünschte PCR Produkt aufgereinigt (siehe 2.2.3.2.4.).

2.2.4. Real-time PCR

Die Grundlagen der real-time PCR wurden 1983 von Higuchi und Kollegen entwickelt (Higuchi *et al.*, 1993). Bei der qPCR wird während der Amplifikation ein Fluoreszenzsignal, proportional zur Menge an vorliegendem PCR Produkt generiert. Somit ist eine Quantifizierung des PCR-Produktes in Echtzeit bzw. während jedes PCR-Zyklus möglich. Als Ergebnis wird eine, in Abb. 2.1. dargestellte Fluoreszenzentwicklung aufgezeichnet. Im Unterschied zur Endpunktbestimmung, die aufgrund der exponentiellen Amplifikation und des Erreichens einer Plateauphase keine Aussage über die Ausgangsmenge an DNA-Template zulässt (siehe Abb. 2.1.), kann anhand des Kurvenverlaufes die Ausgangsmenge bestimmt werden.

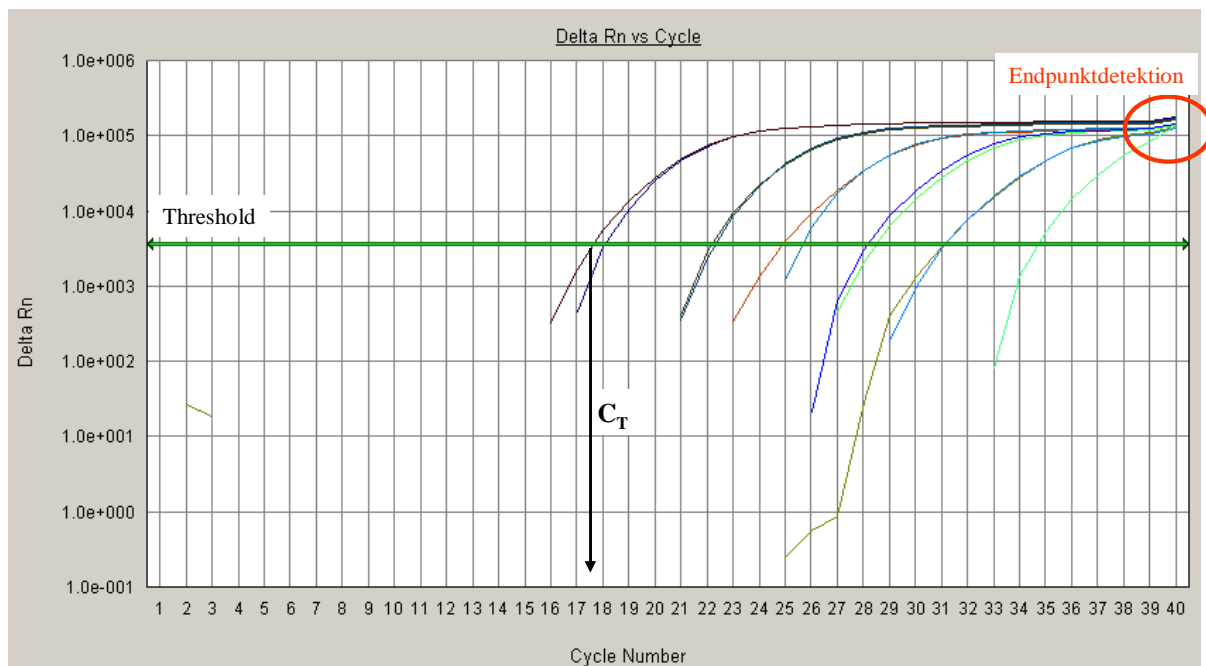


Abb. 2.1.: Amplifikation einer 10-fach seriellen Verdünnungsreihe (10^6 bis 10 Kopien HPV16 Plasmid) mit dem E6all Assay. Der Schnittpunkt der Fluoreszenzkurven mit dem Schwellenwert (Threshold) dient der Bestimmung des C_T Wertes. Im Vergleich zur herkömmlichen Endpunktdetektion ist die Quantifizierung über einen großen dynamischen Bereich möglich.

Als Auswertungskriterium dient der Zeitpunkt (Zyklusnummer) in dem die gemessene Fluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant und stetig überschreitet (Thresholdcycle C_T). Aus der allgemeinen PCR-Gleichung (Formel 1) lässt sich die Grundgleichung der kinetischen PCR zur Quantifizierung der DNA Ausgangsmenge ableiten (Formel 2).

$$(1) \quad N_C = N_0 \cdot (E+1)^C \quad \Rightarrow \quad (2) \quad N_0 = N_T / (E+1)^{C_T}$$

N_C = DNA Menge zum Zyklus C

N_T = DNA Menge bei Erreichen des Thresholds (Zyklus C_T)

N_0 = Ausgangsmenge an Target-DNA

E = PCR Effizienz

Da sowohl N_T als auch E (für die jeweilige Analyse) konstant sind kann aus dieser Formel die Gleichung 3 abgeleitet werden, die einer allgemeinen Geradengleichung $y=mx+n$ entspricht und zur absoluten Quantifizierung mittels Standardreihe verwendet werden kann.

$$(3) \quad \text{Log}(N_0) = -\text{Log}(E-1) \cdot C_T + \text{Log}(N_T)$$

Durch Verwendung einer Verdünnungsreihe bekannter Kopienzahlen (N_0) und Bestimmung der zugehörigen C_T Werte können durch lineare Regression die Konstanten $m = -\text{Log}(E-1)$

und $n = \log(N_T)$ bestimmt werden, so dass eine Quantifizierung von unbekanntem Proben durch Detektion des C_T Wertes ermöglicht wird (Abb. 2.2.).

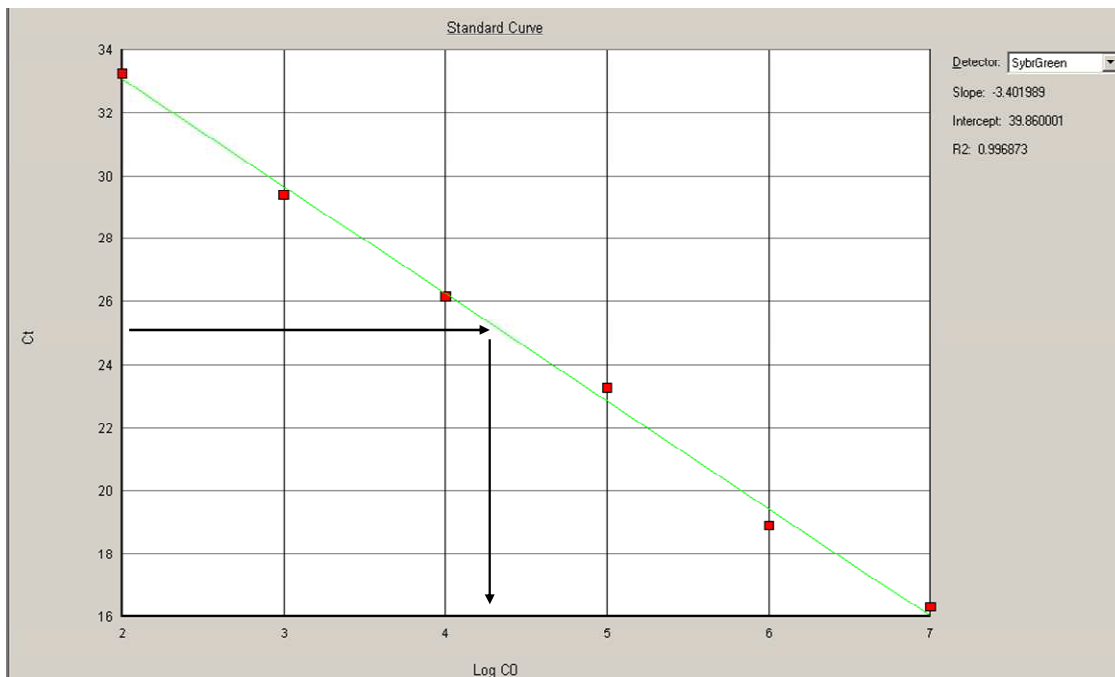


Abb. 2.2.: Regressionsanalyse einer Standardreihe zur Quantifizierung von unbekanntem Proben. Die PCR Effizienz liegt bei 97% (Anstieg -3,401).

Gleichzeitig werden bei Verwendung einer Standardreihe unterschiedliche PCR Effizienzen berücksichtigt bzw. bestimmbar (Formel 4). Allerdings setzt die Quantifizierung mittels Standardreihe eine konstante Effizienz für Proben unterschiedlicher Ausgangsmengen an DNA voraus.

$$(4) E = 10^{-(1/m)} - 1$$

Neben der absoluten Quantifizierung kann eine relative Quantifizierung durchgeführt werden. Dabei wird die Expression des Zielgens relativ zur Expression eines HKG ermittelt, da der delta C_T Wert unabhängig von der eingesetzten Menge an Gesamt-RNA ist (Pfaffl, 2001). Voraussetzung ist eine identische PCR Effizienz bzw. die Berücksichtigung von unterschiedlichen Effizienzen. Nachteilig ist die schlechtere Vergleichbarkeit von verschiedenen PCR-Läufen da von einer identischen Performance ausgegangen werden muss. Die Berechnung der relativen Expression erfolgte über die Gleichung (5):

$$(5) \text{ rel. Expression} = -2^{(C_T(\text{GOI}) - C_T(\text{HKG}))} \quad \text{für } C_T(\text{GOI}) > C_T(\text{HKG})$$

$$= 2^{(C_T(\text{HKG}) - C_T(\text{GOI}))} \quad \text{für } C_T(\text{GOI}) < C_T(\text{HKG})$$

Für die real-time PCR wurde der PowerSybrGreen Master Mix (AppliedBiosystems) mit folgendem 25µl Ansatz verwendet. Alle Bestimmungen wurden im Duplikat durchgeführt.

2x MasterMix	12,5µ
Primer forward (10µM)	1µl
Primer reverse (10µM)	1µl
H ₂ O	8,5µl
cDNA	2µl

Aufgrund der Verwendung des SybrGreen-Detektionssystems, das unspezifisch dsDNA detektiert, wurde bei jeder PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt (Abb. 2.3.). Dafür wurde nach der PCR die Fluoreszenz der Reaktionsansätze stetig aufgezeichnet, während die Temperatur von 65°C auf 95°C erhöht wurde (1°C/min). Unspezifische Peaks bei niedrigen Temperaturen deuten auf Primer-Dimere hin- bei höheren Temperaturen ist von unspezifischen Amplifikaten auszugehen. Proben die keinen eindeutigen spezifischen Peak aufwiesen wurden im 2%-igen Agarosegel analysiert und bei unspezifischen Amplifikationen erneut analysiert oder nicht in die Auswertung einbezogen.

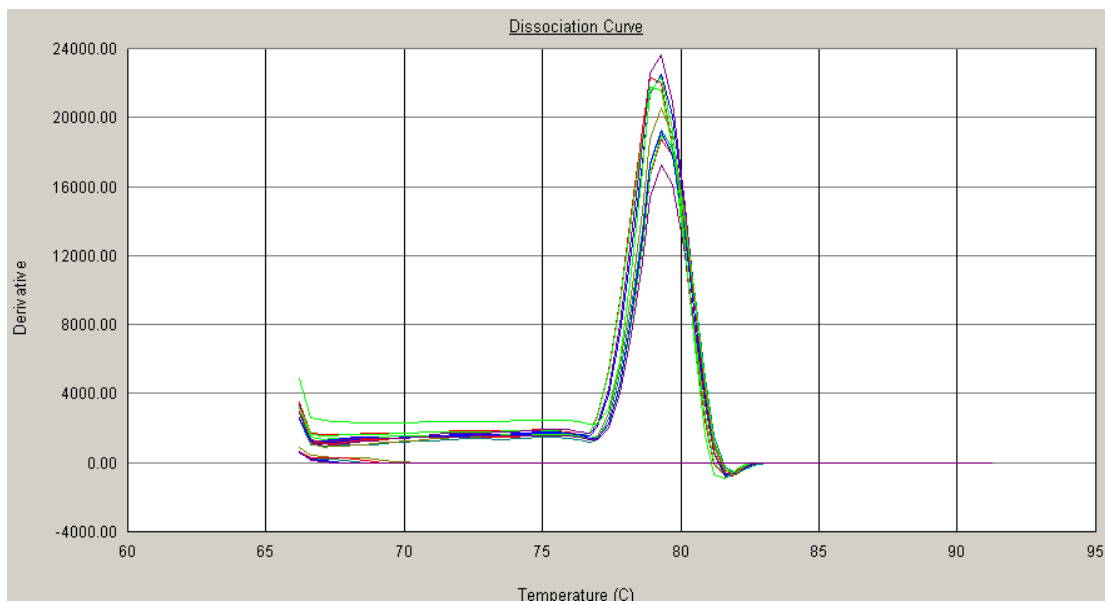
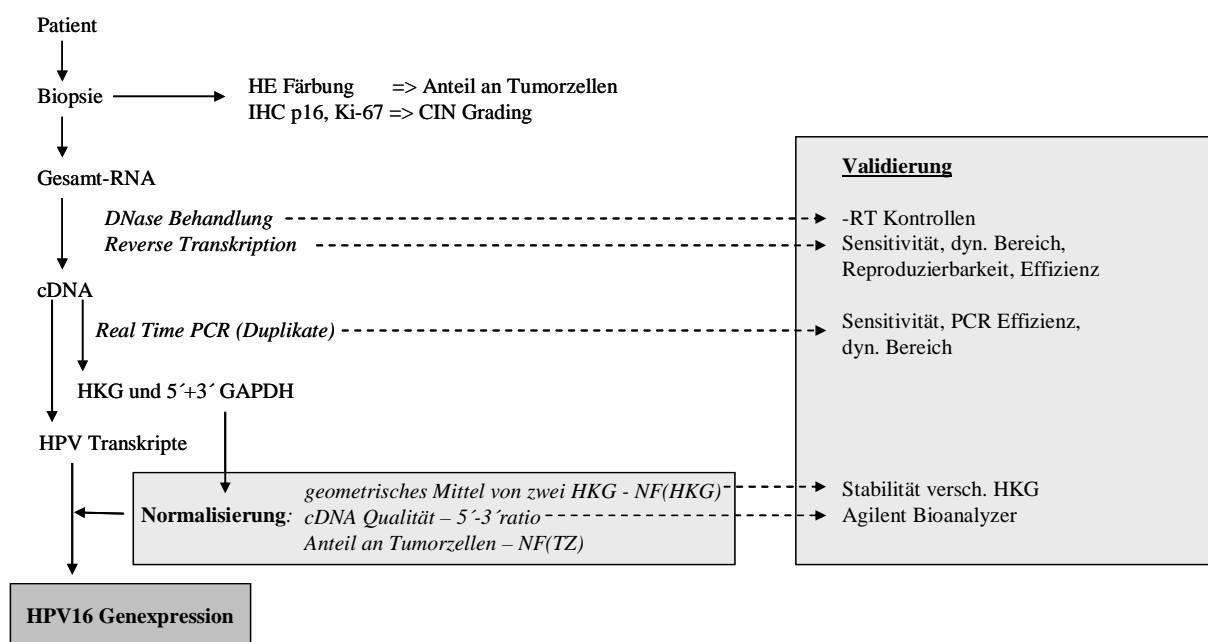


Abb. 2.3.: Schmelzkurvenanalyse von real-time PCR Produkten (HPV16 E6all). Dargestellt ist die erste Ableitung der Fluoreszenzrohdaten. Aufgrund von singulären Peaks und negativen Wasserkontrollen ist von einer spezifischen Amplifikation auszugehen.

2.2.4.1. Normalisierung

Die Methode der Quantifizierung von DNA mittels real-time PCR ist inzwischen weit verbreitet, hoch reproduzierbar und standardisiert. Allerdings wird nur die Menge an Ziel-DNA im Reaktionsansatz bestimmt. Als Ergebnis soll jedoch eine Aussage über die DNA-Kopiezahl oder das Expressionslevel (qRT-PCR) eines Gens im biologischen Material getroffen werden. Somit ist eine Validierung experimenteller Schritte bis zum Vorliegen verwendbarer DNA/cDNA bzw. eine Normalisierung des real-time PCR Ergebnisses notwendig, um sichere und biologisch relevante Aussagen treffen zu können (Abb. 2.4.).



- (6) CIN/CxCa: rel. Expression = $(PK * NF(TZ)) / (NF(HKG) * 5'-3' \text{ratio})$
 (7) Lymphknoten: rel. Expression = $(PK) / (NF(HKG) * 5'-3' \text{ratio})$

Abb. 2.4. Übersicht über den Ablauf der HPV16 Genexpressionsanalyse und durchgeführte Validierungen. Die Genexpressionsdaten wurden aus den erhaltenen Rohdaten (PK-Plasmidkopien) nach den Gleichungen 6 bzw. 7 berechnet.

2.2.4.1.1. Normalisierung durch mehrere „Housekeeping-Gene“

Die Normalisierung von real-time PCR Ergebnissen mittels single-copy DNA Sequenzen (qPCR) oder der „Housekeeping-Gen“ (HKG) Expression (qRT-PCR) dient dem Ausgleich experimentell verursachter Schwankungen die kein Korrelat im zu untersuchenden biologischen Material besitzen. Hier soll nur auf die Analyse von Genexpressionsdaten eingegangen werden, da dies Hauptbestandteil der Arbeit war.

Die Verwendung von HKG zur Normalisierung setzt eine konstante, von experimentellen Bedingungen bzw. der Gewebezusammensetzung unabhängige Expression dieser Gene voraus. Inzwischen wurde gezeigt, dass diese Bedingung nicht immer für alle klassischen HKG gilt. Zum anderen ist eine Unterscheidung zwischen experimentell verursachten Abweichungen und biologisch bedingten Schwankung bei einmaliger Quantifizierung zur Stabilitätsüberprüfung eines HKG nicht möglich. Deshalb wurden verschiedene Methoden entwickelt um aus einer Anzahl an untersuchten HKG die im zu untersuchenden Gewebe stabil exprimierten Gene zu ermitteln. Tabelle 2.7. charakterisiert die beiden in dieser Arbeit verwendeten Methoden. Die danach ermittelten zwei stabilsten HKG wurden für die Analyse von Lymphknoten bzw. Zervixgewebe verwendet.

Tab. 2.7. Vergleich der Programme „geNorm“ und „NormFinder“

Methode	Paarweiser Vergleich – „geNorm“	Statistische Modellierung – „NormFinder“
Charakteristik	<ul style="list-style-type: none"> - Annahme: das Verhältnis der am stabilsten exprimierten Gene ist in allen Proben gleich - Schrittweiser Ausschluss instabiler Gene (größte Varianz in paarweisen Vergleichen) und wiederholte Berechnung der durchschnittlichen Varianz - Das geometrische Mittel der stabilsten HKG wird zur Berechnung des Normalisierungsfaktors verwendet 	<ul style="list-style-type: none"> - neben der globalen Expressionsstabilität werden auch Unterschiede zwischen spezifischen Gruppen berücksichtigt - Voraussetzung: keine generellen Expressionsunterschiede zwischen Probengruppen - Robust gegenüber Ko-Regulation
Referenz	(Vandesompele <i>et al.</i> , 2002)	(Andersen <i>et al.</i> , 2004)

2.2.4.1.2. Berücksichtigung der RNA Qualität – 5'-3' GAPDH Ratio

Obwohl die Normalisierung mittels HKG Expression auch Unterschiede in der RNA Qualität berücksichtigt, war eine quantitative Betrachtung notwendig. Aufgrund der Verwendung von poly-dT Primern für die cDNA Synthese beeinflusst die RNA-Qualität 5' bzw. 3' lokalisierte PCR Amplicons unterschiedlich, da für 5' Amplicons die Wahrscheinlichkeit für die Trennung von der 3' polyA⁺ Sequenz höher ist. Somit ist für die Quantifizierung von HPV16 E6 Transkripten (1300bp von 3' Ende entfernt) eine Bestimmung und Berücksichtigung der RNA Qualität notwendig. Dies wurde durch die Berechnung der 5'-3' Ratio des GAPDH Transkripts ermöglicht. Beide GAPDH cDNA Enden wurden mittels real-time PCR unter Verwendung derselben Plasmid-Standardreihe (Vollängentranskript GAPDH) quantifiziert. Beide PCR Assays wiesen ähnliche PCR Effizienzen auf.

2.2.4.1.3. Gewebezusammensetzung – Tumorzellanteil

Die Quantifizierung von Transkripten in Gewebeproben wird durch die unterschiedliche Zusammensetzung bzw. die gewebsspezifische Genexpression erschwert. Um die HPV16 Genexpression in CIN und CxCa Proben auf den Anteil an dysplastischen Zellen zu beziehen, wurden die jeweils ersten und letzten Schnitte Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Der Anteil von dysplastischen Zellen in den Proben wurde auf <10%; 25%; 50%; 75% oder >90% geschätzt und die real-time PCR Ergebnisse mit den Faktoren 10; 4; 2; 1,5 oder 1 entsprechend normalisiert. Für die CIN Proben wurden zusätzlich immunhistochemische Färbungen für p16 und Ki-67 durchgeführt, um die Ausdehnung dysplastischer Bereiche besser abschätzen zu können.

2.2.5. Amplification of Papillomavirus Oncogene Transcripts – APOT Assay (Klaes *et al.*, 1999)

Der APOT Assay dient dem Nachweis des HPV Genomstatus von transkriptionell aktiven HPV Genomen. Aufgrund der Öffnung des viralen Genoms in der E1/E2 Region während der Integration in das humane Genom kommt es zur Trennung der 3' lokalisierten ORFs (E2, E4, E5) und des polyA Signals vom Promotor p97. Weiterhin bilden integrierte HPV Genome aufgrund von Spleißereignissen viral-zelluläre Fusionstranskripte mit abweichender Größe im Vergleich zu episomalen Vollängentranskripten (Abb. 2.5.). Mit Hilfe einer 3' RACE PCR

wird das 3' Ende von p97 Transkripten amplifiziert, im 1,2% Agarosegel aufgetrennt, geblottet und durch Oligohybridisierung charakterisiert. Während alle Transkripte mit einem E7 Oligo hybridisieren, zeigen episodale Transkripte auch ein E4 Signal. Im Zusammenhang mit der detektierten Fragmentgröße kann der HPV Genomstatus bestimmt werden.

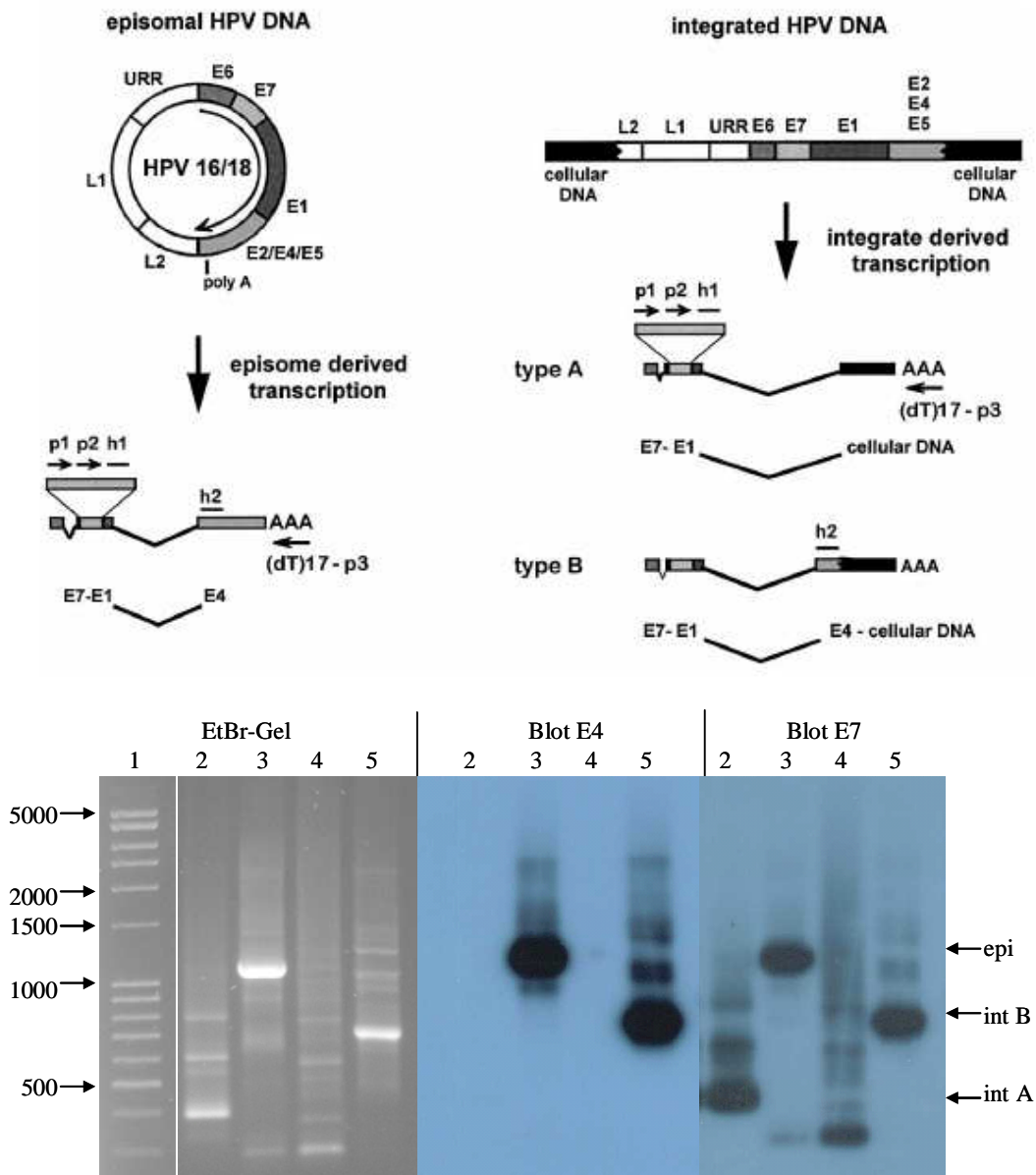


Abb. 2.5. (nach Klaes et. al): APOT Analyse von episodalen bzw. integrat-abgeleiteten Transkripten. Die Unterscheidung erfolgt anhand der Transkriptgröße bzw. Hybridisierungssignalen (E4 Sonde – h2, E7 Sonde – h1). Integratabgeleitete Transkripte Typ B (mit E4 Signal) werden z.B. in CaSki Zellen exprimiert (Spur #5). (Spur: #1 Marker, #2 CxCa mit intergriertem HPV16 Genom, #3 CxCa mit Episomen, #4 CxCa mit Integraten, #5 CaSki)

Folgender PCR Ansatz wurde verwendet:

10x Puffer (Invitrogene)	5µl
MgCl ₂ (50mM)	1,5µl
dNTP (10mM each)	1µl
Primer forward (25µM)	0,5µl
Primer reverse (25µM)	0,5µl
Taq Polymerase (5U/µl)	0,3µl
H ₂ O	37,2µl
cDNA od. 1st PCR	4µl

Für die Erst-PCR wurden die Primer HPV16-for701 und Adapter-p3 und für die nested PCR die Primer HPV16-for728 und Frohman mit folgendem PCR Programm verwendet.

3min	94°C	
30sec	94°C	
30sec	1st PCR 59°C; 2nd PCR 67°C	30x
4min	72°C	
6min	72°C	
∞	4°C	

2.2.6. RNA-Stabilität – ActinomycinD Assay

Zur Bestimmung der Stabilität von HPV16 Transkripten in HPV16 positiven Zelllinien wurde ein Actinomycin D (ActD) Assay durchgeführt. Aufgrund der Interkalation von ActD in dsDNA kommt es zum Abbruch der *de novo* Synthese von RNA. Somit kann die Stabilität von Transkripten durch wiederholte Quantifizierung während einer bestimmten Zeitspanne ermittelt werden.

Es wurden jeweils 6-fach $5 \cdot 10^5$ Zellen in 6cm Kulturschalen ausgesät und 24h kultiviert. Nach dem Austausch des Mediums gegen Medium mit 5µM ActD wurden die Zellen über 1h, 2h, 4h, 6h bzw. 8h kultiviert, danach mit 1x PBS gespült und anschließend durch Zugabe von 350µl Lysepuffer (Macherey-Nagel) geerntet. Die 0h Probe wurde nicht mit ActD behandelt, sondern sofort lysiert. Vor der Zellernte wurde zu jedem Zeitpunkt die Morphologie der Zellen und der Anteil an toten Zellen abgeschätzt. Die aufgereinigte RNA wurde vermessen und jeweils 1µg für die reverse Transkription eingesetzt. Mittels real-time PCR wurde die Expression von HPV16 E6 (E6all) und GAPDH im Duplikat bestimmt. Die Auswertung erfolgte durch relative Quantifizierung (siehe 2.2.4. Formel (5)).

2.2.7. Statistik

Alle mathematischen Berechnungen wurden in MS Excel 2003-SP2 durchgeführt. Die berechneten Expressionsdaten wurden in SPSS Ver. 13.0 exportiert und analysiert. Für den Vergleich der Genexpression in unterschiedlichen Gruppen wurde der Mann-Whitney U-Test (2 unverbundene Stichproben) bzw. der Kruskal-Wallis-Test (mehrere unverbundene Stichproben) verwendet. Wahrscheinlichkeiten von $p < 0,05$ wurden als signifikant, stark signifikant ($p < 0,01$) bzw. hoch signifikant ($p < 0,001$) bewertet. Eine Korrelation in der Expression zweier Gene wurde durch den Korrelationskoeffizienten nach Pearson charakterisiert.

3. Ergebnisse

Das grundlegende Modell der Zervixkarzinogenese basiert auf der kausalen Beteiligung von high-risk humanen Papillomaviren (HR-HPV) und u.a. auf folgenden Beobachtungen:

- (1) Nachweis von HR-HPV DNA in 99,7% der CxCa
- (2) Onkogenes Potential der viralen Proteine E6 und E7
- (3) Notwendigkeit der E6/E7 Expression zum Erhalt des tumorigenen Phänotyps
- (4) Zunahme der Integrationshäufigkeit des viralen Genoms beim Übergang von prämaligen Tumorstufen zum invasiven CxCa

Jedoch ist auch bekannt, dass eine HR-HPV Infektion zwar notwendig, nicht aber hinreichend für die Entstehung des CxCa ist (Bosch *et al.*, 2002). Zusätzliche zelluläre Veränderungen sind Voraussetzung für die Entartung der HPV infizierten Zellen. Diese zellulären Veränderungen können zum einen durch verschiedene Risikofaktoren, wie z.B. rauchen, genetische Veranlagung oder bakterielle Infektionen begünstigt werden, zum anderen kann die HR-HPV Infektion selbst diese Veränderungen fördern. Dafür spricht die Erhöhung des Risikos einer Tumorentstehung bei persistierenden HR-HPV Infektionen. Unklar sind jedoch die zu Grunde liegenden Mechanismen bzw. Faktoren, die eine persistierende, aber später regredierende Neoplasie von einer zum CxCa progredierenden Neoplasie unterscheiden. Als potentielle Ursache für die Progression wird, aufgrund der oben unter Punkt (4) genannten Korrelation, die virale Integration angesehen (Woodman *et al.*, 2007). Demzufolge bewirkt die Integration durch den Verlust des viralen Repressors E2 eine verstärkte Onkogenexpression und gleichzeitig durch die Bildung von viral-zellulären Fusionstranskripten, eine erhöhte Transkriptstabilität. Die erhöhten E6/E7 Level ergeben einen Wachstumsvorteil und verursachen eine verstärkte genomische Instabilität. Diese Hypothese beruht jedoch zum großen Teil auf experimentellen Daten aus Zellkulturexperimenten mit der Zelllinie W12 (Pett and Coleman, 2007).

Hauptziel dieser Arbeit war es daher, die Auswirkung des physikalischen Zustands des viralen Genoms auf die virale Genexpression anhand von Biopsiematerial zu untersuchen (Hafner *et al.*, 2007a). Dafür wurden der APOT Assay zur Bestimmung des Genomstatus und die Methode der real-time RT-PCR zur Quantifizierung der viralen Transkripte eingesetzt (siehe 3.2.). Um aus den Analysen des, an sich stark inhomogenen Biopsiematerials, Aussagen ableiten zu können, wurden verschiedenste Aspekte der Quantifizierung und Normalisierung beachtet und validiert (siehe 3.1.). Neben CIN und CxCa Biopsien wurden auch metastasierte Lymphknoten von Tumorpatientinnen untersucht. Diese Analysen sollten

Aussagen über Unterschiede im viralen Expressionsmuster bzw. im physikalischen Zustand zwischen der Gesamtpopulation an Tumorzellen im Primärtumor und abgesiedelten Zellklonen liefern (3.3.). Des Weiteren wurde durch Zellkulturexperimente der Einfluss der Transkriptstruktur auf die RNA Stabilität bestimmt (3.4.).

3.1. Charakterisierung der quantitativen Transkriptanalyse (qRT-PCR)

3.1.1. Sensitivität und dynamischer Bereich

Um eine genaue und vergleichbare Quantifizierung verschiedener HPV16 Transkripte zu ermöglichen, wurden die verwendeten PCR Assays validiert (Abb. 3.1.). Für die drei E6 Assays wurde derselbe forward-Primer (F102) jeweils mit spezifischen reverse-Primern verwendet (siehe Anhang). Während E6all alle von p97 ausgehenden Transkripte detektiert, wird durch E6*I nur das gespleißte Haupttranskript E6*I bzw. durch E6FL nur das Vollängentranskript amplifiziert.

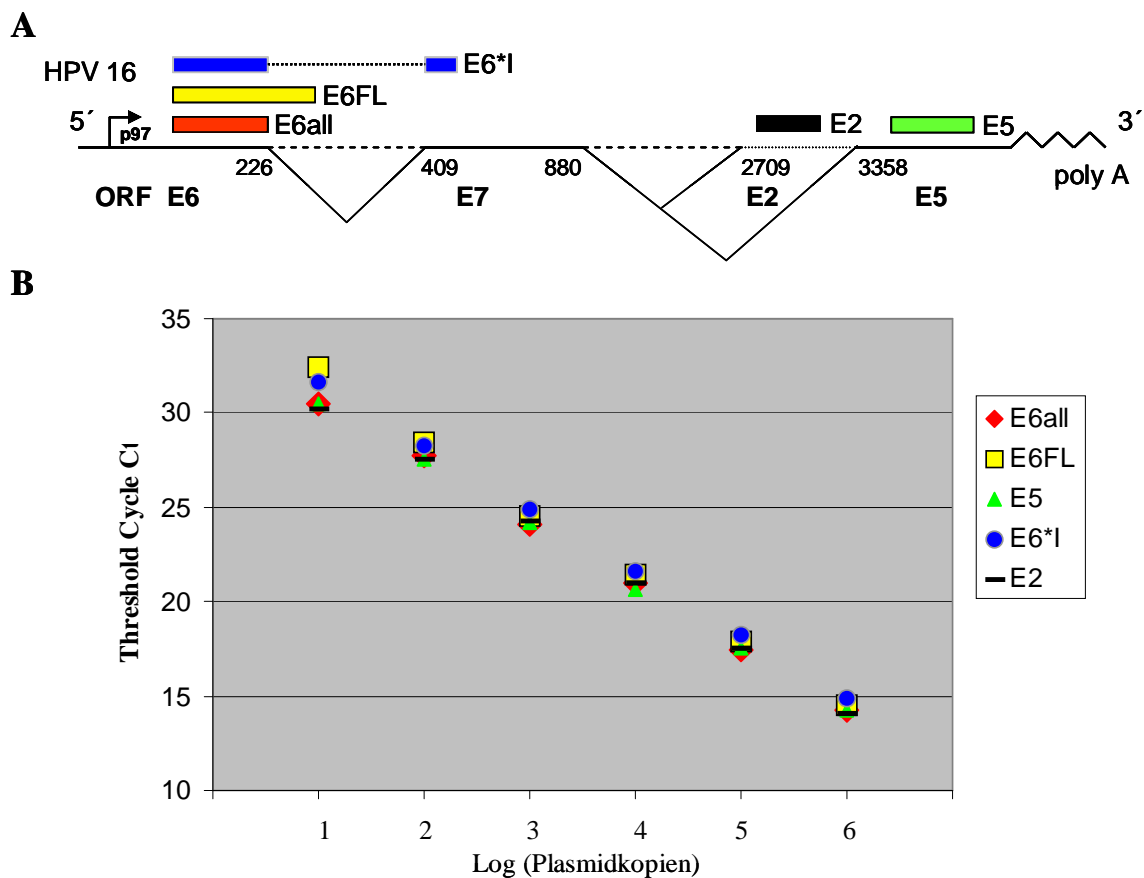


Abb. 3.1.: HPV16 Assay Validierung. (A) Übersicht über die Lokalisierung der verwendeten qPCR Assays auf den frühen p97 Transkripten von HPV16. (B) Validierung der PCR Effizienz und des dynamischen Bereiches aller HPV16 Assays. Amplifiziert wurde jeweils eine Plasmidverdünnungsreihe von 10^6 bis 10^1 Kopien.

Somit werden durch E6all sowohl E6 als auch E7 codierende Transkripte quantifiziert, wohingegen das Transkript E6*I nur für E7 und das Vollängentranskript hauptsächlich für E6 codiert (Sedman *et al.*, 1991). Die Primer für den E2 Assay detektieren nur Transkripte die das komplette E2 Protein exprimieren. Vergleichbar zu E6all, quantifiziert der E5 Assay alle episomalen p97 Transkripte, jedoch am 3' Ende der cDNA. Abbildung 3.1.(B) zeigt identische PCR Eigenschaften der verschiedenen HPV16 Assays. Sowohl die PCR Effizienz (95-100%; berechnet nach Formel (4) Kapitel 2.2.4.) als auch der dynamische Bereich sind vergleichbar. Mit allen Assays können 10 Plasmidkopien zuverlässig detektiert und quantifiziert werden. Geringe Unterschiede in den PCR Effizienzen bzw. Abweichungen zwischen verschiedenen PCR Läufen werden durch die interne Quantifizierung mittels Standardreihe ausgeglichen.

3.1.2. Validierung der relativen Standardreihen Methode

Um eine Quantifizierung von cDNAs in unbekanntenen Proben mittels Plasmidstandardreihe zu ermöglichen, sollten vergleichbare PCR-Eigenschaften bei Verwendung von unterschiedlichen templates vorliegen (Souaze *et al.*, 1996). Abbildung 3.2. zeigt die C_T -Werte von Verdünnungsreihen verschiedener DNA templates die mittels HPV16 E6all Assay bestimmt wurden. Die identische Amplifikation von reiner Plasmid-DNA und Plasmidverdünnung im Hintergrund von 50ng HPV16-negativer cDNA (C33A) verdeutlicht die Möglichkeit der Quantifizierung von cDNA anhand von Plasmidstandardreihen. Auch die Amplifikation ausgehend von cDNA Verdünnungen zeigt eine ähnliche PCR Effizienz bei Verwendung von cDNA. Die geringere PCR Effizienz wird wahrscheinlich durch die Verdünnung in reinem Wasser ohne Trägermaterial, der damit verbundenen starken Abnahme an Gesamt-DNA und durch die kleinen Volumina, die bei der cDNA Verdünnung pipettiert wurden verursacht. Der große dynamische Bereich der Quantifizierung kann auch auf das Ausgangsmaterial übertragen werden. Eine lineare Korrelation zwischen Zellzahl und C_T Wert kann im Bereich von 10^5 SiHa Zellen bis zu einer SiHa Zelle im Hintergrund von 10^5 C33A Zellen bestimmt werden. Somit kann die Expression von Genen im Ausgangsmaterial über einen großen Konzentrationsbereich quantitativ ermittelt werden. Auch hier zeigt sich eine geringere Effizienz, wobei diese, unter der Berücksichtigung kleiner Zellzahlen (SiHa) und der dabei möglichen Beeinträchtigung von Pipettierschritten und RNA Extraktion, vermutlich nicht auf eine stark abweichende PCR Effizienz zurückzuführen ist. Eine absolute Quantifizierung von Transkripten ist bei der Anwendung der relativen Standardkurven-

Methode jedoch nicht möglich- da um eine Aussage über die absolute Kopienzahl in den Proben treffen zu können, eine externe RNA den Proben zugesetzt und quantifiziert werden müsste (Gilsbach *et al.*, 2006).

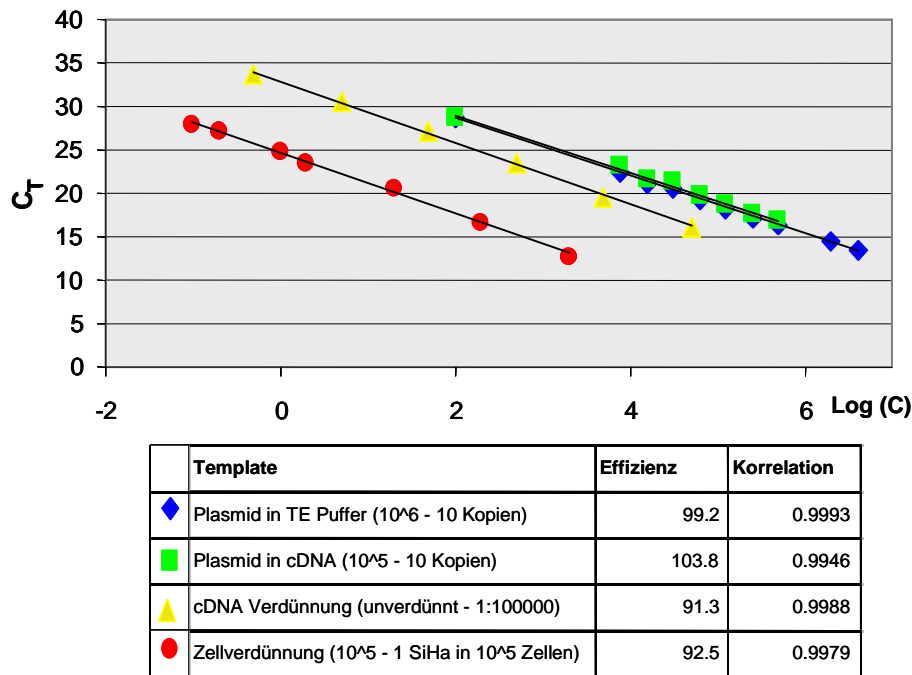


Abb. 3.2.: Validierung der relativen Standardreihenmethode. Die Quantifizierung von reiner Plasmid-DNA als Standardreihe liefert gleiche Ergebnisse wie die Amplifikation aus artifiziellen Proben (50ng cDNA+Plasmid). Weiterhin ergeben sich ähnliche PCR Effizienzen bei Verwendung von SiHa cDNA Verdünnungen bzw. Zellverdünnungen SiHa in C33A.

3.1.3. Validierung der Reversen Transkription

Die Quantifizierung mittels real-time PCR ermittelt nur die Kopienzahl der vorhandenen cDNA Moleküle. Um auch die vorliegende Menge an Transkripten bestimmen zu können ist eine Validierung der reversen Transkription notwendig. Auch der RT-Schritt sollte eine hohe und über den dynamischen Bereich gleich bleibende Effizienz und eine gute Reproduzierbarkeit besitzen. Um dies für das verwendete RT-System (SuperScriptII) zu validieren, wurde eine 10x serielle Verdünnungsreihe von SiHa RNA in COS7 RNA (1µg SiHa RNA bis 10pg SiHa RNA bei konstanten 1µg Gesamt-RNA) angesetzt. Je Verdünnungsstufe wurde 1µg RNA im Triplikat in cDNA umgeschrieben und jede cDNA wiederum im Triplikat mittels qPCR analysiert (Abb. 3.3.). In Abbildung 3.3. ist eine konstante Effizienz (93,8%; berechnet nach Formel (4) Kapitel 2.2.4.) über den gesamten Konzentrationsbereich zu erkennen. Nur die letzte Verdünnungsstufe wurde im dritten RT Ansatz nicht detektiert. Dabei handelt es sich um 10pg SiHa RNA (<1 Zelläquivalent) in 1µg COS7 RNA. Somit sollte trotzdem ein ausreichender dynamischer Bereich der reversen

Transkription vorliegen und das Umschreiben von verschiedensten Mengen an spezifischen Transkripten reproduzierbar erfolgen.

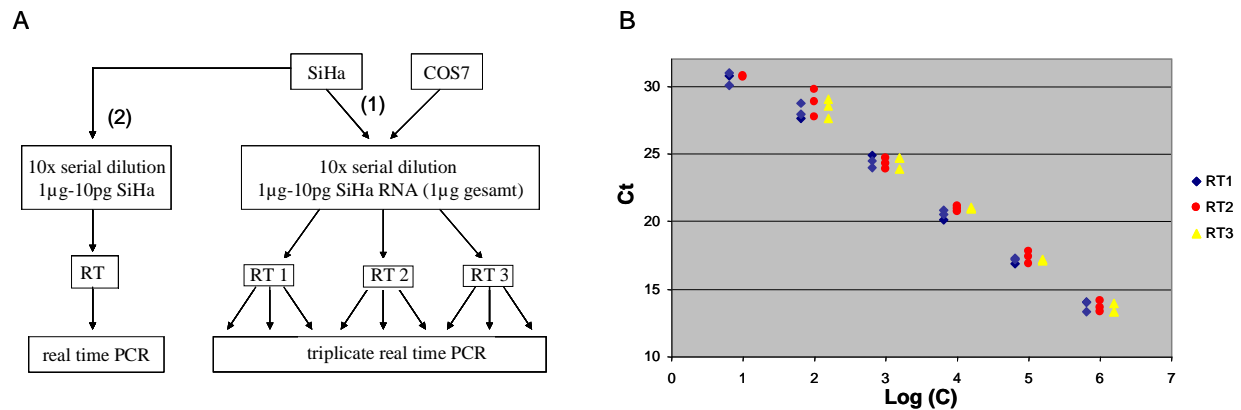


Abb. 3.3.: Validierung der Reversen Transkription. (A) Vorgehen zur Bestimmung der Effizienz und Reproduzierbarkeit (1) bzw. der Ermittlung genspezifischer Effekte bei der RT (2). (B) Ergebnisse der Triplikat-RT. Die HPV16 Genexpression wurde mit dem Assay E6all quantifiziert. Zu erkennen ist eine gute Reproduzierbarkeit des RT Schrittes über den gesamten Konzentrationsbereich und eine gleich bleibende Effizienz (93,8%).

Neben der viralen Genexpression wurden auch zelluläre Gene (z.B. housekeeping genes – HKG) quantifiziert. Deshalb wurden etwaige genspezifische Unterschiede in der reversen Transkription untersucht. Dabei ist es jedoch nicht möglich die Gesamtmenge an RNA konstant zu halten- so dass eine SiHa RNA Verdünnung in 1x TE Puffer angesetzt wurde (siehe Abb. 3.3.(A)). Allerdings kann es dadurch zu konzentrationsabhängigen Unterschieden bei der reversen Transkription kommen (Stahlberg *et al.*, 2004). Für die untersuchten Gene wurde eine vergleichbare Effizienz der RT ermittelt (Abb. 3.4.). Jedoch ist die Effizienz geringer, als bei vorherigen Versuchen mit konstanter RNA Menge (Abb. 3.3.(B)). Dies ist wahrscheinlich auf die abnehmende Menge an RNA zurückzuführen. Bei geringen Gesamtmengen an Nukleinsäuren haben Adsorptionseffekte an Oberflächen Einfluss auf Pipettiergenauigkeit und Reproduzierbarkeit. Aufgrund der unterschiedlich starken Genexpression der einzelnen Gene wurden nicht alle Verdünnungsstufen durch alle PCR Assays detektiert.

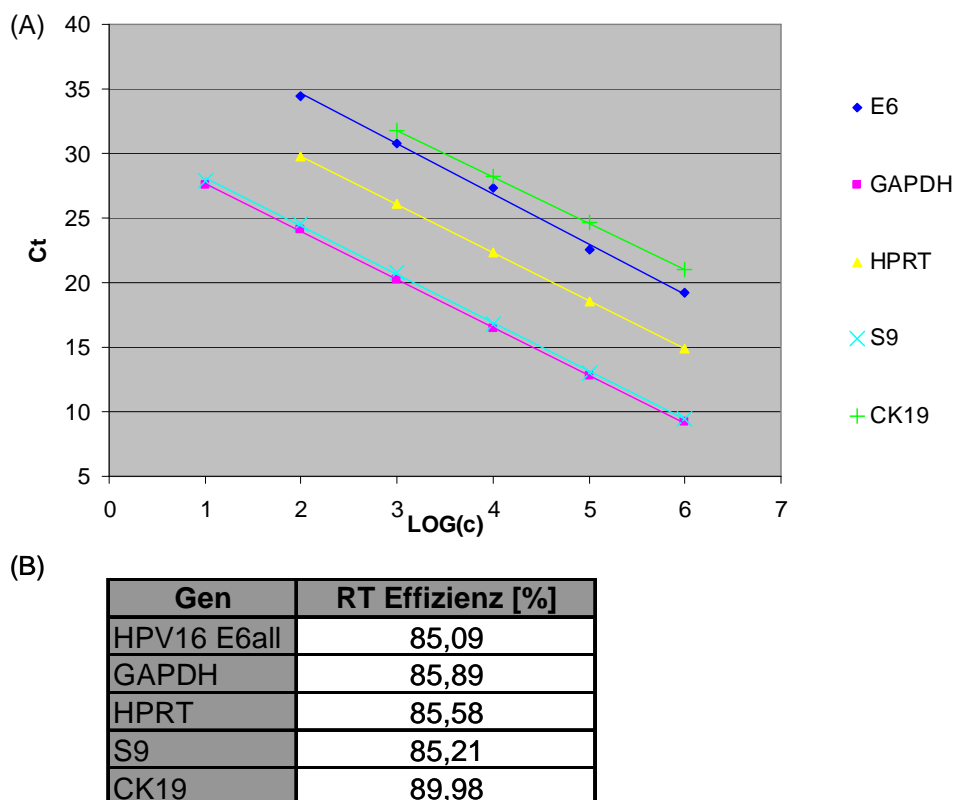


Abb. 3.4. Vergleichbarkeit der reversen Transkription bei der Quantifizierung verschiedener Transkripte. (A) Amplifikation einer SiHa RNA Verdünnungsreihe (1µg bis 10pg) und Nachweis verschiedener Gene. (B) Anhand der RNA Verdünnungsreihe ermittelte RT Effizienzen.

3.1.4. Validierung der DNase Behandlung von RNA

Aufgrund der Struktur der HPV-Transkripte konnte nur der *E6*I* Assay Transkript- und RNA-spezifisch (Exon-überspannende Primer) durchgeführt werden. Um auch für die anderen Assays ein für RNA spezifisches Ergebnis zu erhalten, wurde während der RNA Extraktion ein DNase-Verdau durchgeführt. Dadurch sollte eine ausreichende Reduktion von DNA Molekülen stattfinden. Die Effizienz des DNase-Verdaus wurde durch minus-RT Kontrollen (n=30) bestimmt. Zu diesen Proben wurde während der cDNA Synthese keine reverse Transkriptase (SuperScriptII) gegeben. Durch Messung der E6VL Kopiezahl wurde der Anteil an residualer DNA bestimmt und der daraus resultierende Anteil von DNA an der ermittelten Transkriptkopiezahl berechnet (Tab. 3.1.). Insgesamt zeigte sich nur ein geringer Anteil (<1% des E6 Vollängentranskripts) an residualer DNA. Wie zu erwarten wiesen Proben mit Episomen, aufgrund der höheren Anzahl an HPV Genomen einen etwas höheren Anteil an DNA auf.

Tab. 3.1. Anteil an residueller DNA in DNase-behandelten RNA Präparationen
(DNA ratio [%] = DNA Kopiezahl / cDNA Kopiezahl * 100).

HPV Status	n	Median DNA ratio [%]
Episome	14	0,794
Episome + Integrate	5	0,338
Integrate	11	0,088

3.1.5. Reproduzierbarkeit

Zur weiteren Validierung der Quantifizierung von Transkripten durch die qPCR wurde die Reproduzierbarkeit der Methode überprüft. Dazu wurde die HPV16 E6all Expression in cDNAs von verschiedenen Zelllinien, im Triplikate und in drei Versuchen mittels Plasmidstandardreihe quantifiziert (Tabelle 3.2.). Die sich ergebenden prozentualen Standardabweichungen für den intra- und inter-assay Vergleich (<10% bzw. 10-20%) liegen innerhalb der für die Methode publizierten Werte (Larionov *et al.*, 2005).

Tabelle 3.2.: Intra- und inter-assay Reproduzierbarkeit der quantitativen PCR.
HPV16 E6all Plasmidäquivalente in 50ng RNA
(MW – Mittelwert, SD – Standardabweichung)

	intra-assay Reproduzierbarkeit									inter-assay Repro.		
	Versuch 1			Versuch 2			Versuch 3			1+2+3		
	MW	SD	SD [%]	MW	SD	SD [%]	MW	SD	SD [%]	MW	SD	SD [%]
SiHa	223363	22657	10,14	256266	5701	2,22	332615	951	0,29	270748	56047	20,70
CaSki	748656	54166	7,24	849714	97787	11,51	930164	64143	6,90	842845	90949	10,79
MRI	677811	6519	0,96	475199	8185	1,72	577306	53388	9,25	576772	101307	17,56
HPKIA	248349	6004	2,42	192921	1827	0,95	215331	21824	10,14	218867	27883	12,74
HPKII	211921	4736	2,23	197582	44194	22,37	189259	2933	1,55	199588	11463	5,74
		MW:	4,60			7,75			5,62			13,51

Um zusätzlich den gesamten Ablauf der Quantifizierung zu überprüfen wurde die RNA von drei Proben (SiHa, #4601, #5234) im Duplikate analysiert (Tab. 3.3.). Die Duplikate aller Proben wurden als unabhängige Samples quantifiziert und normalisiert. Die prozentualen Standardabweichungen der Analysen ausgehend von identischen RNAs sind vergleichbar mit den Werten aus Tabelle 3.2.

Tab. 3.3.: Ergebnisse der Duplikatanalyse von identischen RNAs (SiHa, #4601, #5234).

(MW – Mittelwert, SD – Standardabweichung)

	E6all	E6 VL	E6*1	E5	
SiHa 1	6602	1440	2077	13	
SiHa 2	8627	1517	2642	9	
MW	7615	1478	2360	11	
SD	1432	55	399	3	
SD [%]	19	4	17	27	MW 17
#4601 - 1	8265	152	5200	0	
#4601 - 2	6338	165	5539	5	
MW	7301	159	5370	2	
SD	1363	9	240	3	
SD [%]	19	5	4	[134]	MW 10
#5234 - 1	22088	1629	10308	2	
#5234 - 2	18209	1590	8441	0	
MW	20149	1610	9374	1	
SD	2743	28	1320	2	
SD [%]	14	2	14	[141]	MW 10

3.1.6. Normalisierung

Die Stabilität verschiedener Housekeeping Gene (HKG) wurde sowohl in Lymphknoten (Test-Set n=20) als auch in Zervixgeweben verschiedener Dysplasiegrade (Normalgewebe n=11, CIN n=12, CxCa n=12) getestet. Zuvor wurden die PCR Produkte der HKG Assays kloniert, sequenziert und dann als Standard für die Quantifizierung der HKG Expression eingesetzt. Für die Auswertung der real-time PCR Ergebnisse wurden die Programme geNorm (Vandesompele *et al.*, 2002) und NormFinder (Andersen *et al.*, 2004) verwendet (siehe 2.2.4.1.). Abbildung 3.5. zeigt die Ergebnisse der Expressionsstabilität in Lymphknoten. Am stabilsten exprimiert wurden die Gene GAPDH (Glycerinaldehyde-3-Phosphat Dehydrogenase) und HPRT (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase). Bei Versuchen die nur Lymphknotengewebe einschlossen wurden diese Gene verwendet. Dahingegen beruhten Analysen von Primärtumor und Lymphknoten, zur besseren Vergleichbarkeit, auf der Normalisierung mit GAPDH und β -Actin.

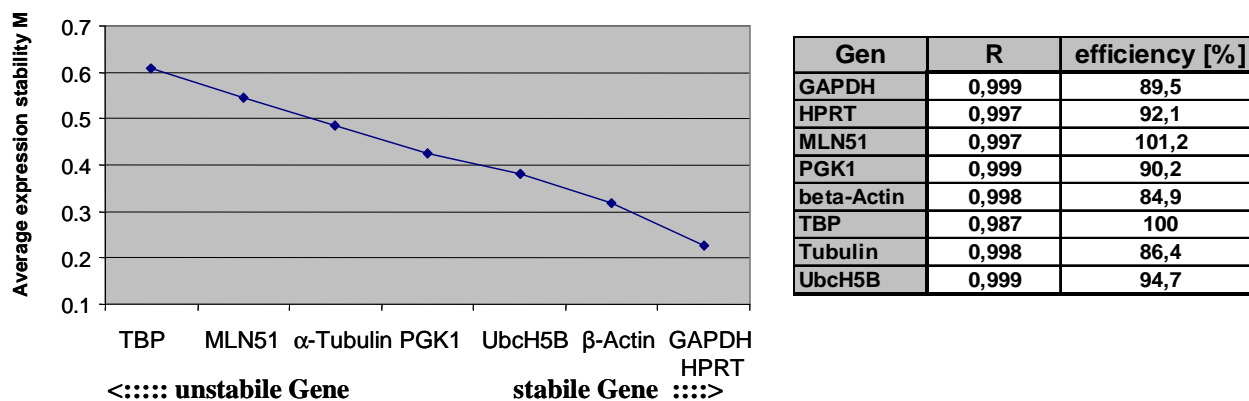


Abb. 3.5. Bestimmung der HKG Expressionsstabilität in Lymphknoten. Verwendet wurde das Programm geNorm. In der Tabelle sind die Effizienzen der PCR Assays aufgeführt. (TBP – TATA Box binding Protein, MLN51 – Metastatic Lymph Node 51, PGK1 – Phosphoglycerat-Kinase 1, UbcH5B – human E2 ubiquitin conjugating enzyme, R – Korrelationskoeffizient der Standardreihe)

Die Stabilitätsanalyse für das Zervixgewebe wurde sowohl mit dem Programm geNorm als auch mit NormFinder durchgeführt. Aufgrund der unterschiedlichen Analysemethoden (siehe 2.2.4.1.), wie z.B. der Einbeziehung von Proben Gruppen (N, CIN, CxCa) in die Auswertung (NormFinder) sollte damit ein aussagekräftiges Ergebnis erzielt werden (Abb. 3.6.). Beide Programme bewerten β -Actin und GAPDH als die am stabilsten exprimierte Gene im Zervixgewebe unterschiedlicher Ausprägung. Somit wurde die Expression dieser Gene für die Normalisierung der HPV16 Daten herangezogen.

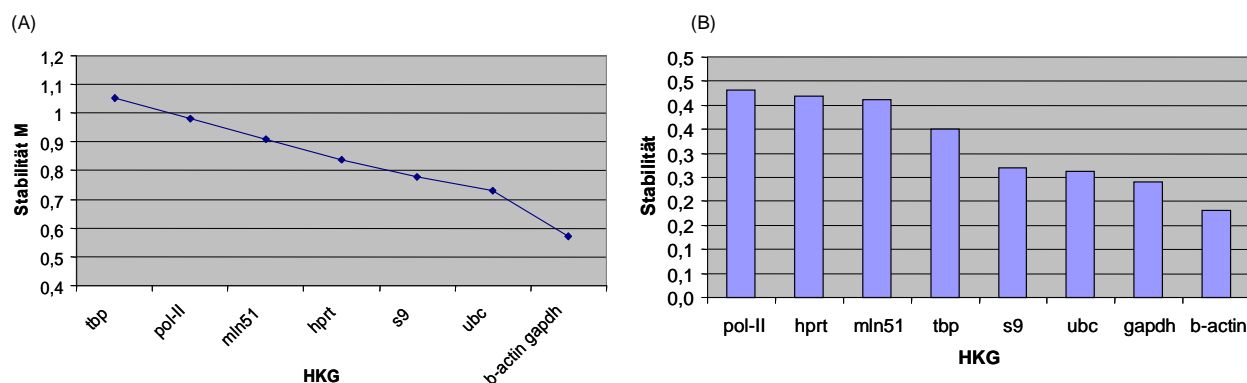


Abb. 3.6. Bestimmung der HKG Expressionsstabilität im Zervixgewebe. Analysiert wurden Normalgewebe, CIN und CxCa mit den Programmen geNorm (A) und NormFinder (B).

Abbildung 3.7.(A) zeigt die Expression der beiden HKG in den HPV16-Biopsien und Zelllinien. Zu erkennen ist eine gute Korrelation der Expression von GAPDH und β -Actin ($r=0,7$). Auffällig ist jedoch die starke Streuung der Expressionsstärke trotz konstanter Menge an Gesamt-RNA die für die reverse Transkription eingesetzt wurde (200ng). Ursächlich dafür könnte eine stark unterschiedliche RNA-Qualität der Proben sein. Darauf deutet die Korrelation der HKG Expression und des 5'-3' ratios von GAPDH hin (Abb. 3.7.(B); $r=0,77$).

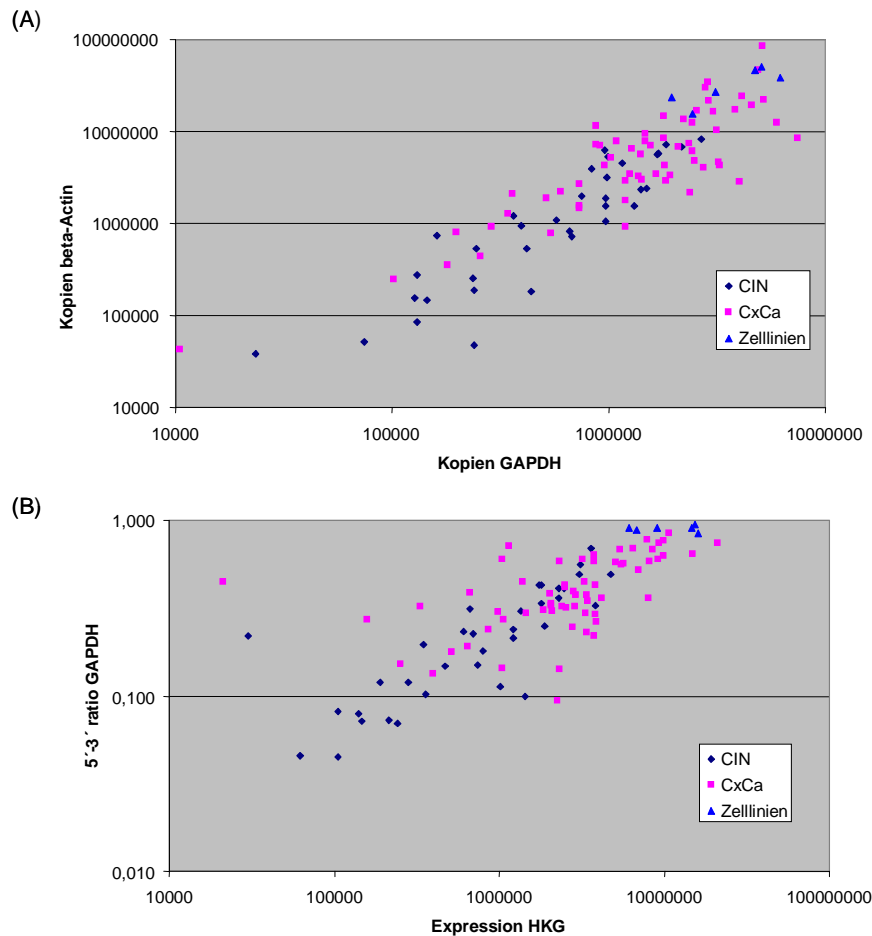


Abb. 3.7. HKG Expression und RNA Qualität. Untersucht wurden HPV16 positive CIN (n= 35), CxCa (n= 59) und Zelllinien (n=6). (A) Vergleich der GAPDH und β -Actin Expression (Kopien in 10ng RNA), (B) Korrelation des Expressionslevel der HKG (geometrisches Mittel GAPDH + β -Actin) und der RNA-Qualität (5'-3' ratio GAPDH, siehe 3.1.7.)

3.1.7. Bestimmung der RNA-Qualität durch die Ermittlung der 5'-3' Ratio GAPDH

Die RNA Qualität ist für die Analyse der Genexpression von großer Bedeutung. Deshalb werden bei qPCR Analysen mit poly-dT geprimter cDNA, Sequenzen im 3' terminalen Bereich amplifiziert, um den Einfluss der RNA Qualität zu verringern und die Ergebnisse einzelner Assays vergleichbar zu machen. Da dies aufgrund der HPV16 Transkriptstruktur (Abb. 3.1.) nicht möglich war und eine starke Streuung der HKG Expression trotz konstanter Menge an eingesetzter Gesamt-RNA auftrat (Abb. 3.7.) wurde die RNA-Qualität quantitativ bestimmt. Dazu wurde je ein qPCR Assays für das 5' und 3' Ende der GAPDH cDNA entwickelt. Weiterhin wurde das gesamte GAPDH Transkript kloniert und die Bereiche des 5' bzw. 3' Amplikons sequenziert. Das entsprechende Plasmid konnte somit für beide Assays als Standard eingesetzt werden.

Durch die Bestimmung der 5'-3' Ratio lässt sich, bei poly-dT geprimter cDNA, der Anteil an intakter cDNA bzw. RNA ermitteln (Abb. 3.8.(A)). Aufgrund des degradationsbedingten

Bruchs der RNA kommt es zu einer Trennung von 5' cDNA-Ende und polyA Schwanz bzw. zu einer sinkenden Kopiezahl an 5'-lokalisierten cDNA Sequenzen. Um eine Korrelation von 5'-3' Ratio und RNA-Qualität zu überprüfen wurde von 11 Proben zusätzlich eine RNA-Qualitätsanalyse mittels Agilent Bioanalyzer durchgeführt (Abb. 3.8. (B)). Zu erkennen ist eine Übereinstimmung der 5'-3' Ratio und des Elektropherogramms. Mit Abnahme der 5'-3' ratio zeigt sich eine zunehmende Degradation der RNA (Abnahme der 18S und 28S peaks und Zunahme niedrigmolekularer RNA Fragmente).

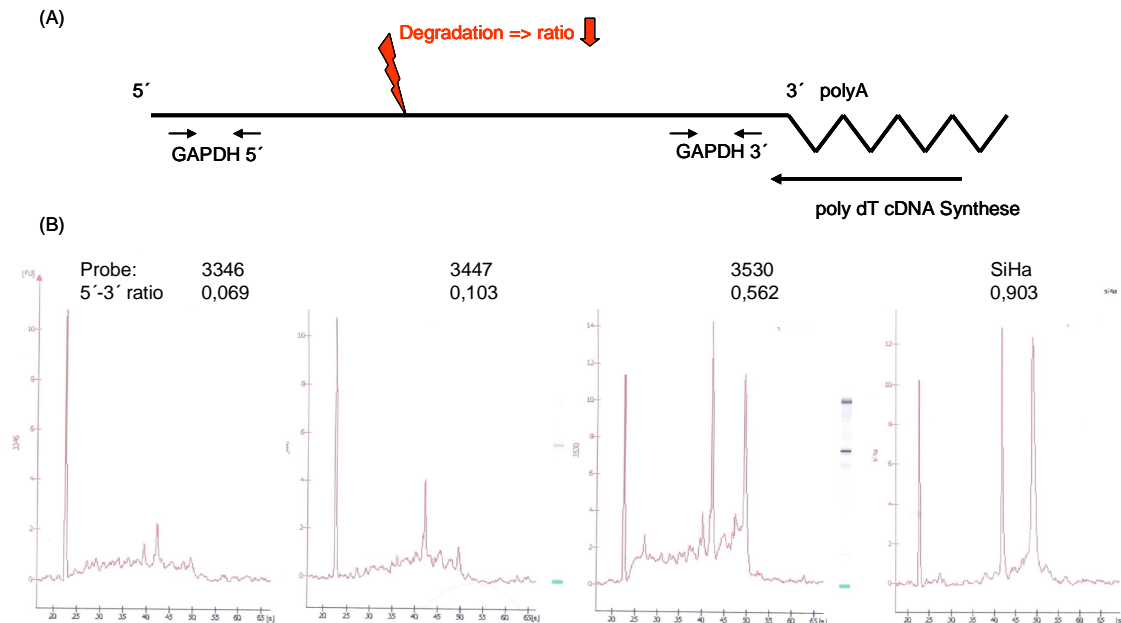


Abb. 3.8. 5'-3' GAPDH Ratio und RNA Qualität. (A) Schematische Darstellung des Zusammenhangs von RNA Degradation und 5'-3' Ratio. (B) Validierung der Aussagekraft des 5'-3' Ratios über die RNA Qualität. Dargestellt sind 4 aus 11 untersuchten Fällen.

Aufgrund dieser Korrelation wurde die 5'-3' ratio in allen CIN und CxCa Proben zur Ermittlung der RNA/ cDNA Qualität bestimmt. Abbildung 3.9. zeigt die RNA Qualität der untersuchten Proben. Während isolierte RNA aus Zelllinien eine sehr gute Qualität (mediane 5'-3' ratio = 0,896) aufweist, zeigt sich eine starke Streuung der Werte in den Biopsien. Dabei ist die 5'-3' ratio in CIN Proben (Median = 0,247) signifikant kleiner als in CxCa Biopsien (Median = 0,426; Mann-Whitney Test, $p < 0,05$). Allerdings lässt sich kein Unterschied zwischen CxCa mit Episomen bzw. Integrierten feststellen ($p > 0,05$). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die 5'-3' ratio in die Normalisierung der Genexpression einbezogen.

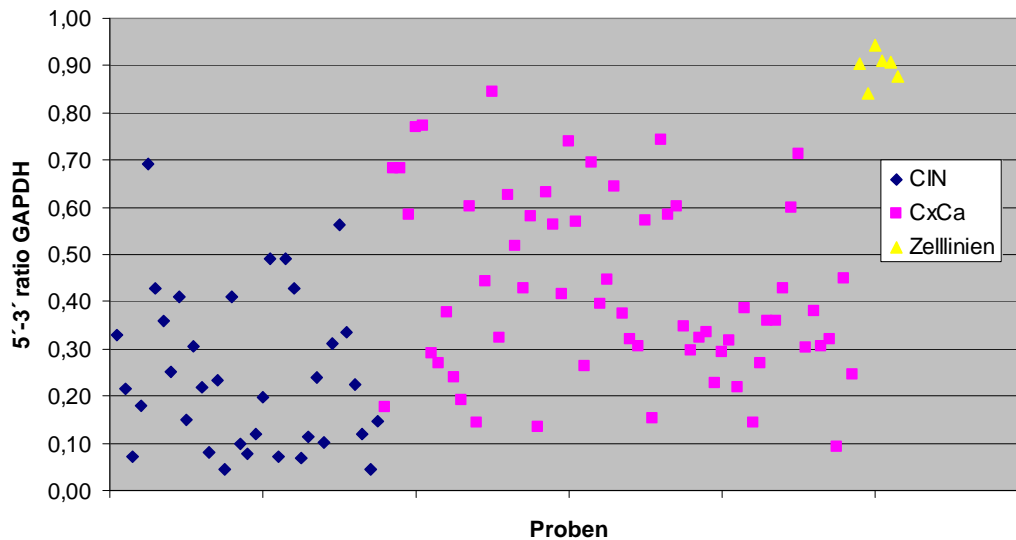


Abb 3.9.: RNA Qualität in CIN (n=35) CxCa (n=59) und Zelllinien (n=6). Während RNA aus Zelllinien hohe 5'-3' Ratios aufweist, zeigen RNAs aus Biopsien geringere Werte. CIN Proben haben eine signifikant geringere RNA Qualität als CxCa Proben (Mann-Whitney Test, $p < 0,05$).

3.2. Einfluss des Genomstatus auf die virale Genexpression - Analyse HPV16 positiver CIN und CxCa

Hauptziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Auswirkung des HPV16 Genomstatus auf die virale Genexpression. Dafür wurden erstmalig klinische Biopsien verwendet. Nach der Bestimmung des physikalischen Status des HPV16 Genoms mittels APOT Test, wurden verschiedene Transkriptspezies durch real-time RT-PCR Assays quantifiziert. Verwendet wurden sowohl CIN, als auch CxCa Biopsien. Die histologische Begutachtung wurde mit Unterstützung von Dr. Gajda (Institut für Pathologie, Klinikum FSU Jena) durchgeführt.

3.2.1. HPV16 Genomstatus

Zur Bestimmung des physikalischen Zustandes des HPV16 Genoms wurde der APOT Assay verwendet (siehe 2.2.5). Aufgrund von Sequenzunterschieden (Verlust der 3' Region der frühen Transkripte) bzw. Unterschieden in der Transkriptgröße von rein viralen episomalen Transkripten bzw. viral-zellulären Fusionstranskripten konnte der Genomstatus der transkriptionell aktiven Genome bestimmt werden. Während episomale Transkripte in der 3' RACE PCR ein 1000bp PCR Fragment liefern, zeigen Fusionstranskripte abweichende

Fragmentgrößen. Nach der Hybridisierung mit HPV16 E4 bzw. E7 spezifischen Sonden fand eine endgültige Klassifizierung statt. Episomale Transkripte hybridisieren sowohl mit der E4 als auch der E7 Sonde, wohingegen die E4 Sequenz bei den meisten Fusionstranskripten nicht vorliegt. Nach der Durchführung von nested PCR und Southern Blot konnte der Genomstatus in 83 von 94 Proben bestimmt werden. In 47% der 83 Biopsien wurden rein episomale Transkripte detektiert, während 37,4% und 15,6% der Proben Integrat-abgeleitete Transkripte bzw. beide Transkripttypen exprimierten. Nach der Stratifizierung in CIN und CxCa kam es zu der in Tabelle 3.4. erfassten Verteilung.

Tab. 3.4.: HPV16 Genomstatus in CIN und CxCa.

	Episome	Episome + Integrate	Integrate
CIN (n=28)	23 (82,1%)	2 (7,1%)	3 (10,7%)
CxCa (n=55)	16 (29%)	11 (20%)	28 (51%)
gesamt (n=83)	39 (47%)	13 (15,6%)	31 (37,4%)

3.2.2. Expression der HPV16 Transkripte

Die Expression der HPV16 Transkripte wurde im Duplikat bestimmt und mittels Expressionslevel der HKG, dem GAPDH 5'-3' ratio und dem Anteil an dysplastischen Zellen in der Biopsie normalisiert. Eine Ausnahme bildet die Analyse der HPV16 E5 Expression. Aufgrund der Lokalisierung am 3' Ende der p97 Transkripte wurde die RNA Qualität (5'-3' Ratio) nicht zusätzlich zur HKG Expression berücksichtigt. Die Medianwerte der Expression aller viralen Gene, in verschiedenen Gruppen, sind im Anhang aufgeführt (siehe 9.3.)

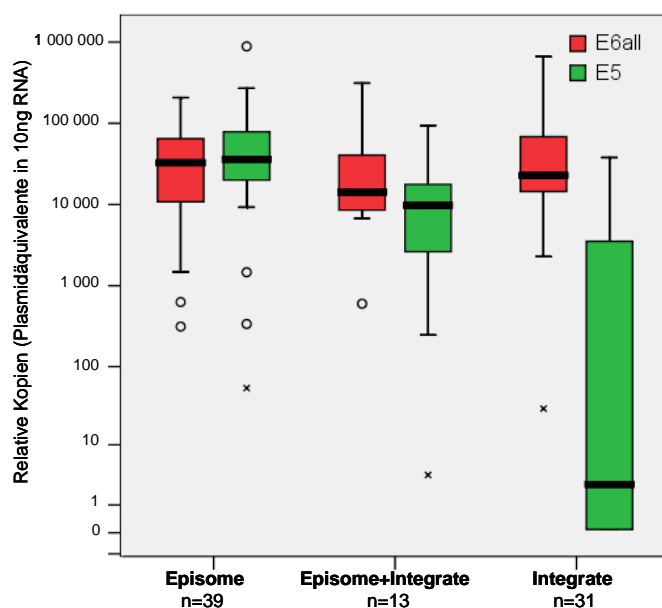


Abb. 3.10.: HPV16 Genexpression (E6all, E5) in Biopsien mit Episomen, Integraten oder beiden Genomzuständen.

Abbildung 3.10. zeigt die Expressionslevel aller p97 Transkripte (E6all) und die Expression von HPV16 E5, in Abhängigkeit vom physikalischen Zustand des HPV Genoms. Die Abnahme der E5 Level von episomalen Proben, über Biopsien mit episomalen und integrierten Genomen hin zu alleinigen Integraten bestätigt die Ergebnisse der APOT Analyse (35930, 9768 bzw. 35 Kopien im Median pro 10ng RNA). Aufgrund der Öffnung des viralen Genoms in der E1/E2 Region während der Integration kommt es zu einem Verlust der 3' Region und einer Abnahme an E5 Kopien. Im Gegensatz zur Korrelation von Genomstatus und E5 Level ist die E6all Expression unabhängig vom physikalischen Zustand des viralen Genoms (Abb. 3.10.). Die medianen Expressionslevel von E6/E7 in 10ng RNA in Proben mit episomalen (32878 Kopien), integrierten (23292 Kopien) oder beiden Genomen (14263 Kopien) sind statistisch nicht signifikant unterschiedlich (Mann-Whitney Test, $p > 0,05$ für paarweise Vergleiche). Um mögliche Fehler durch die ungleichmäßige Verteilung von CIN und CxCa Proben in den Gruppen mit unterschiedlichem physikalischem Zustand des Genoms (Tab. 3.4.) auszuschließen, wurden die Proben zusätzlich nach dem histologischen Befund stratifiziert (Abb. 3.11.). Des Weiteren wurde die Analyse von E6*I, dem Haupttranskript von HPV16, einbezogen. Da dieses Assay Exon-überspannende Primer verwendet kann die Amplifikation von restlicher DNA ausgeschlossen werden. Sowohl E6all- als auch E6*I Analysen ergaben als Ergebnis eine ähnliche Expression ohne signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen. Innerhalb aller Gruppen zeigten sich jedoch starke Schwankungen der HPV16 Expression. Für CIN Biopsien mit Integraten bzw. Integraten und Episomen sind aufgrund der geringen Fallzahlen nur eingeschränkt Aussagen möglich. Besonders die geringe Expression in e+i CIN Proben sollte nicht überbewertet werden. Während E6*I für das Onkoprotein E7 codiert, wird vom Vollängentranskript das E6 Protein exprimiert. Auch dieses Transkript wurde in allen Gruppen mit ähnlichem Level detektiert. Allerdings sind relativ zur E6all Expression in den CxCa Biopsien geringere E6VL Kopiezahlen zu erkennen (Abb. 3.11.). Daher wurde das Speißmuster in den einzelnen Gruppen, auf der Basis von Einzelproben genauer analysiert (siehe 3.2.3.).

Neben den Onkogenen E6/E7 wurde auch die Expression des viralen Gens E2 quantifiziert. Der ORF dieses Gens ist häufig aufgrund des Integrationsereignisses partiell deletiert oder zumindest vom Promotor p97 entkoppelt. Dies konnte in den Untersuchungen bestätigt werden (Abb. 3.12.). Vergleichbar mit der Expression von E5 codierenden Transkripten ist eine Abnahme des E2 Levels nach der Integration zu erkennen.

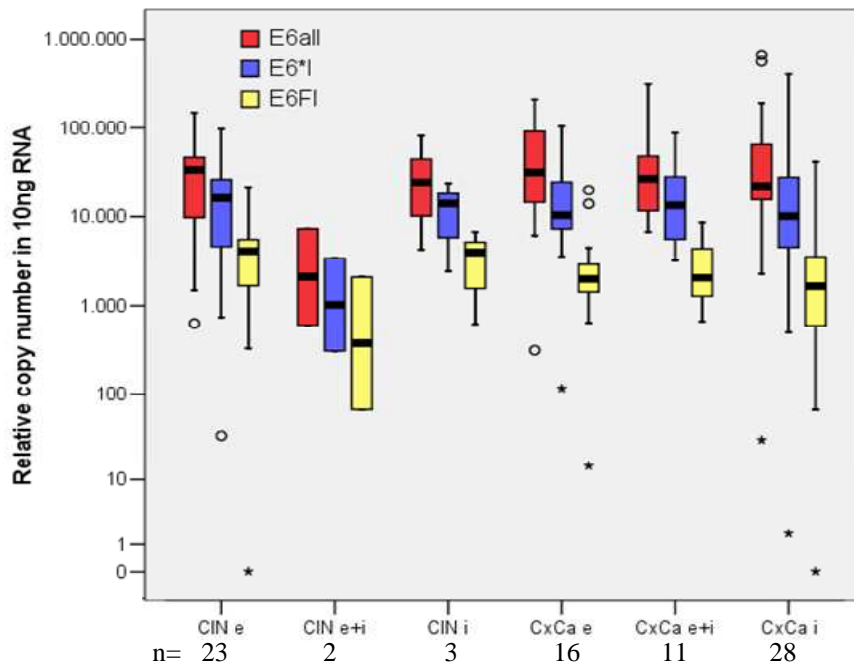


Abb. 3.11. HPV16 p97 Aktivität (E6all), E6*I und E6VL Expression in CIN und CxCa. Es wurden jeweils Biopsien mit unterschiedlichem Genomstatus (e – episomal, e+i, episomal + integriert, i – integriert) analysiert.

Neben dem E2 Verlust durch das Integrationsereignis wird eine Reprimierung der E2 Expression in CxCa mit episomalen Genomen durch ein erhöhtes Spleißen im E2 ORF (E1^{E4}) diskutiert. Daher wurde auch dieses Spleißereignis auf Einzelprobenebene detailliert untersucht (siehe 3.2.3.).

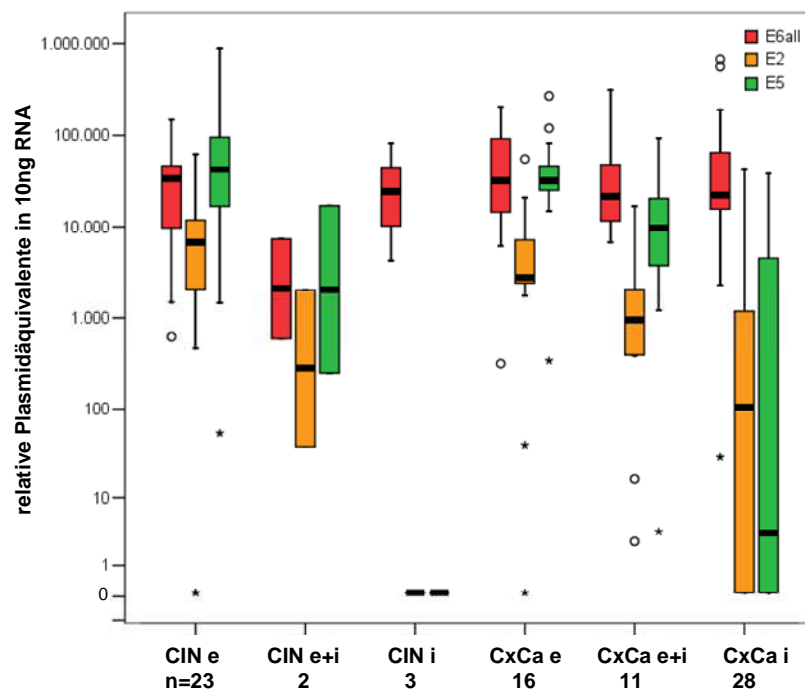


Abb. 3.12. Expression von E6all und den 3' lokalisierten Genen E2 und E5. Sowohl in CIN als auch in CxCa ist eine deutliche Abnahme der Kopienzahl infolge der Integration zu erkennen.

3.2.3. HPV16 Spleißmuster in CIN und CxCa

Humane Papillomaviren exprimieren poly-cistronische mRNAs und regulieren die Expression einzelner ORF zumindest teilweise durch verschiedene Spleißereignisse. So wird durch das Spleißen im E6 ORF (E6* Transkripte) die E6 Expression verhindert und die Expression von E7 begünstigt (Sedman *et al.*, 1991). Des Weiteren kann durch das E1^{E4} Spleißereignis die Expression des E2 Vollängenproteins verhindert werden. Die Bedeutung dieser Spleißereignisse im Hinblick auf die Zervixkarzinogenese wird kontrovers diskutiert.

Deshalb und aufgrund der Unterschiede zwischen CIN und CxCa Proben im Verhältnis der E6all und E6VL Expression (Abb. 3.11.) wurde für alle Proben der Anteil an E6-Vollängentranskript (E6FL) an den gesamten p97 Transkripten berechnet (E6all/E6FL Ratio, Abb. 3.12.). Je größer dieses Verhältnis ist, desto geringer ist die E6FL Expression und umso effizienter wird das Vollängentranskript in E6 gespleißt. In Abbildung 3.13. ist zu erkennen, dass in CxCa ein statistisch signifikant höheres E6all/E6FL Verhältnis vorliegt als in CIN (Mann-Whitney Test, $p < 0,001$). Dabei ist die geringe E6FL Expression in CxCa bzw. die höhere Expression in CIN unabhängig vom Genomstatus. CIN Proben exprimieren im Median 1/6 der p97 Transkripte als ungespleißte mRNA, während in CxCa im Median nur 1/16 der p97 Transkripte nicht in E6 gespleißt werden.

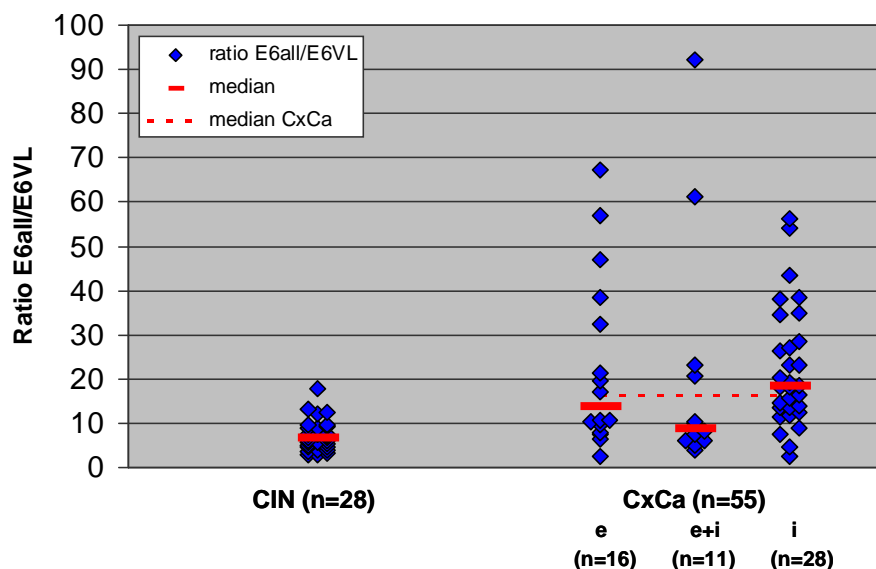


Abb. 3.13. E6FL Expression in Bezug auf die gesamte p97 Aktivität in CIN und CxCa. Die Unterteilung der CIN Biopsien nach physikalischem Zustand des HPV Genoms wurde aufgrund der homogenen Werte innerhalb der Gruppe unterlassen. CxCa zeigen unabhängig vom Genomstatus eine im Median signifikant höhere E6all/E6FL Ratio.

Die Folge dieses verstärkten Spleißens sollte eine Abnahme der E6 Expression sein. Dahingegen ist aufgrund der an sich hohen E6*I Expression kaum ein Einfluss auf die E7

Expression zu vermuten. Weiterhin lässt sich keine Korrelation zwischen E6all Expression und E6all/E6FL Ratio erkennen (Abb. 3.14.). Trotzdem könnte ein individuelles E6 Level durch verschieden starkes Spleißen eingestellt werden.

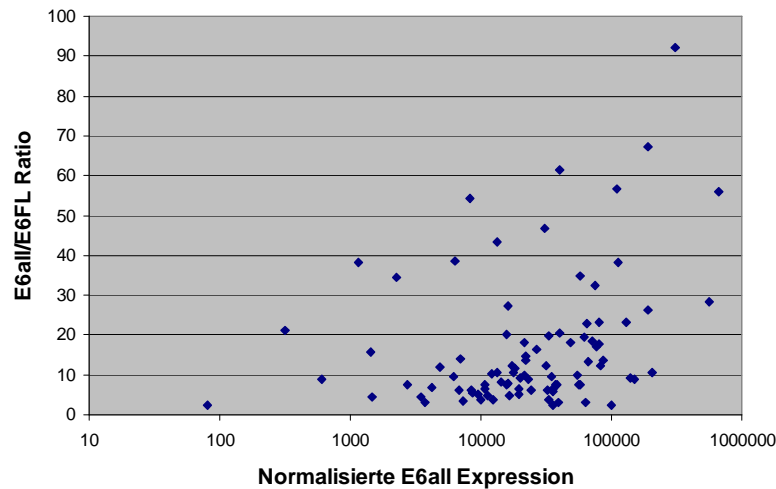


Abb. 3.14. Vergleich der p97 Aktivität und der E6all/E6FL ratio.

Für das E1^{E4} Spleißereignis lassen sich nur anhand von Proben mit episomalem Genom konkrete Aussagen treffen, da die E2 Expression vom Integrationsereignis beeinflusst wird (Abb. 3.12.). Abbildung 3.15. zeigt das Verhältnis der E2 Expression relativ zur E6all Expression in CIN und CxCa Proben mit Episomen, im Vergleich zur E6all Expression. Es konnten nicht alle episodale Proben in die Auswertung einbezogen werden, da jeweils 2 CIN und CxCa keine detektierbare E2 Expression aufwiesen. In CxCa Proben wird E2 relativ zu E6 geringer exprimiert (größere E6all/E2 Ratio, Median 7,31) als in CIN Biopsien (kleinere E6all/E2 Ratio, Median 4,41). Dieser Unterschied ist statistisch signifikant (Mann-Whitney Test, $p < 0,05$). Jedoch zeigt sich kein Zusammenhang mit der p97 Aktivität (Abb 3.15.).

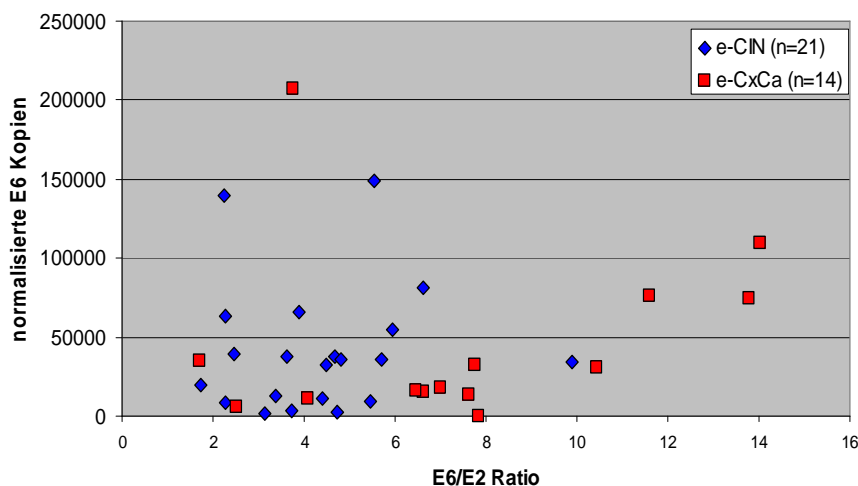


Abb. 3.15. Zusammenhang von E2 und E6all Expression in Proben mit episomalen Genomen. CxCa zeigen eine höhere E6/E2 Ratio (geringere, relative E2 Expression als CIN). Aber es ist keine Korrelation der E6 Expression mit der E6/E2 Ratio zu erkennen.

3.3. Analyse von Lymphknoten

Das Zervixgewebe wird gut mit Blut- und Lymphgefäßen versorgt, so dass das Risiko einer Metastasierung von Zervixkarzinomen gegeben ist. Die Absiedlung von Tumorzellen erfolgt dabei vorwiegend auf dem lymphatischen Weg, wodurch es in pelvinen Lymphknoten zur Metastasenbildung kommen kann. Schwerwiegende Komplikationen und die meisten Todesfälle bei CxCa-Patientinnen sind die Folge der Metastasenbildung. Deshalb kommt, neben der Früherkennung von Tumorvorstufen zur primären Prävention, der Einschätzung des Metastasierungspotentials bzw. der Erkennung von disseminierten Tumorzellen eine große Bedeutung zu. Allerdings ist die standardmäßig angewandte histologische Untersuchung von Lymphknoten zu unsensitiv für eine sichere Detektion von metastasierenden Primärtumoren. Etwa 15-20% der Patientinnen mit histologisch negativen Lymphknoten (N0) erleiden ein Rezidiv. Während Metastasen (>2mm) durch die Histologie erkannt werden, ist die Detektion von Mikrometastasen (0,2 < <2mm) oder disseminierten Tumorzellen mit Hilfe der Standard-Histologie (HE-Färbung) nicht möglich. Zur Detektion dieser Mikrometastasen können Immunhistochemische Methoden (p16, CK19) oder PCR-basierte Verfahren angewandt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Quantifizierung von viralen Onkogen-Transkripten als Detektionsmethode für den Nachweis von Tumorzellen in LK verwendet.

Die Analyse von Primärtumor und zugehörigen LK-Metastasen ermöglicht den Vergleich der Gesamtpopulation von Tumorzellen und metastasierten Zellklonen z.B. im Hinblick auf die virale Genexpression und den HPV Genomstatus (siehe 2.3.2. und 2.3.3.). Dazu wurde zunächst die Spezifität und Sensitivität eines HPV mRNA Nachweises in LK von Tumorpatientinnen validiert.

3.3.1. Quantifizierung von HPV16 Transkripten in histologisch positiven und negativen Lymphknoten

Der Nachweis von HPV Transkripten könnte die Detektion von disseminierten Tumorzellen (DTZ) sowohl vereinfachen als auch verbessern. Die Spezifität und Sensitivität des HPV16 E6all Nachweises in Lymphknoten von CxCa-Patientinnen wurde bereits publiziert (Hafner *et al.*, 2007b). Dabei wurde der E6 Nachweis mit der Quantifizierung des epithelspezifischen Markers CK19 verglichen. Es wurden 140 Lymphknoten von 70 Zervixkarzinom-Patientinnen und 10 Kontroll-Lymphknoten untersucht (Abb. 3.16.). Während sowohl virale

(E6all) als auch epithelspezifische Marker (CK19) übereinstimmend in histologisch positiven LK (H+, n=28) detektiert werden, zeigen sich Unterschiede in histologisch negativen LK (H-) und Lymphknoten von Kontrollpatientinnen. 86% der sowohl histologisch negativen als auch HPV16 E6 negativen LK (H-/E6- LK) und 8 von 10 Kontroll-LK zeigen eine CK19 Expression mit ähnlichem Medianlevel wie H-/E6+ Lymphknoten (103 bzw. 62 Kopien vs. 55 Kopien in 50ng RNA). Aufgrund unterschiedlicher Lokalisierung des E6 bzw. CK19 Assay auf dem jeweiligen Transkript (5' vs. 3' Lokalisierung) wurden Kontrollversuche zur RNA Qualität (5'-3' Ratio GAPDH) und cDNA Synthese (Validierung der Ergebnisse an random-geprimter cDNA) durchgeführt (Abb. 3.17.). Es wurden weder Unterschiede in der RNA Qualität, noch ein fehlender E6 Nachweis aufgrund unvollständig synthetisierte cDNA festgestellt.

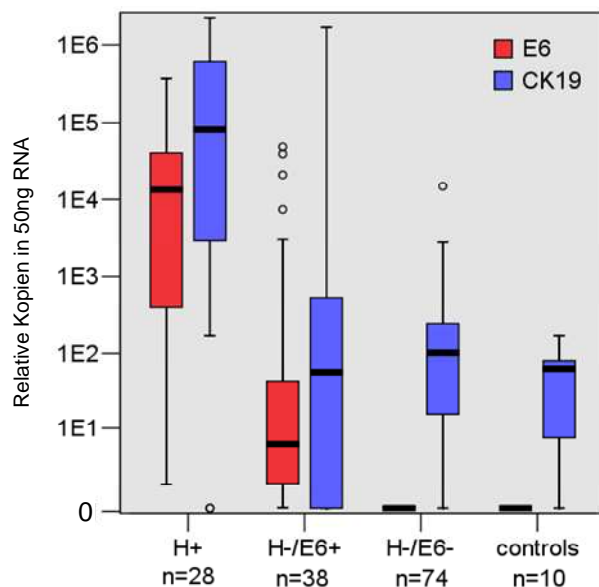


Abb. 3.16. HPV16 E6all und CK19 Expression in Lymphknoten. Untersucht wurden histologisch positive LK (H+; n=28), histologisch negative LK (H-, n=112) und Lymphknoten von Kontrollpatienten (n=10).

Auffallend ist die starke Streuung der HPV Onkogen Expression innerhalb der H+ bzw. H-/E6+ Gruppe. Des Weiteren kommt es zu Überschneidungen zwischen beiden Gruppen (Abb. 3.16.). Jedoch sind die Medianwerte stark unterschiedlich (H+ 13443 Kopien vs. H-/E6+ 6 Kopien in 50ng RNA). Deshalb wurde neben der Quantifizierung der E6all Expression als eventuelles Prognosekriterium, in einem Teil der LK auch die E6VL und E5 Expression bestimmt. Dies trifft für LK zu, die eine HPV16 E6all Expression aufwiesen und zu denen der entsprechende Primärtumor als Kryostatmaterial vorlag. Ziel war es Daten über E6 Spleißereignisse und den Genomstatus in metastasierten Tumorzellen im Vergleich zum Primärtumor zu erlangen. Untersucht wurden Proben von 16 Patientinnen (16 Primärtumore und 32 Lymphknoten).

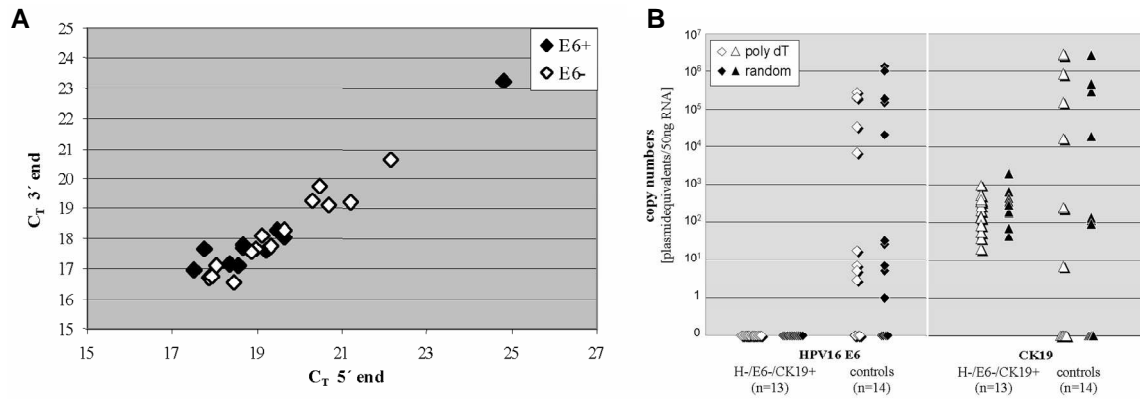


Abb. 3.17. Validierung des negativen E6 Ergebnisses in CK19 positiven LK. (A) Vergleich der RNA Qualität von E6+ und E6- LK. (B) CK19+ LK zeigen auch nach random geprimter cDNA Synthese keine E6 Expression. Die Kontrollen umfassten 5 H+/E6+/CK19+ LK, 4 H-/E6+/CK19+ LK und 5 H-/E6-/CK19- LK, die alle ihren jeweiligen Status auch nach random geprimter RT behielten.

3.3.2. Spleißereignisse in Lymphknoten

Für die Lymphknoten konnte aufgrund der inhomogenen Tumorzellverteilung innerhalb des Gewebes (Blaheta *et al.*, 2004) der Anteil an Tumorzellen nicht ermittelt werden. Somit sind die absoluten Level der HPV Genexpression zwischen PT und LK nicht vergleichbar. Jedoch können Aussagen über Transkriptverhältnisse getroffen werden. Eine Voraussetzung dafür, ist eine ausreichende HPV Expression, die eine Quantifizierung der E6FL Expression ermöglicht. Somit konnte nicht zu jedem PT ein LK untersucht und nur für 18/32 LK die E6all/E6FL Ratio bestimmt werden (Abb. 3.18.). Neben den Proben von 16 Patientinnen mit metastatisierten PT (PT M+) wurden auch 6 PT von Patientinnen analysiert, bei denen kein Verdacht auf metastasierte PT besteht (pN0, Sentinel-LK H-/E6-, PT M-), um einen Vergleich zu ermöglichen. In Abbildung 3.18. ist zu erkennen, dass die anteilige E6-Volllängen Expression in Lymphknoten im Median signifikant höher ist als in den PT (kleinere E6all/E6FL Ratio, Mann-Whitney Test, $p < 0,05$). Auch in allen Einzelfällen, bis auf einen LK (Pat. 1 LK2) in dem die E6all/E6VL Ratio mit dem PT vergleichbar ist, ist die E6all/E6FL Ratio kleiner als im zugehörigen PT. Insgesamt gibt es jedoch eine große Streuung der Werte, so dass der Anteil an E6 Volllängentranskript jeweils Patientenspezifisch zu sein scheint. Auch der Vergleich von PT M+ und PT M- zeigt Unterschiede im Medianwert (Ratio 11,19 vs. 18,37), aber aufgrund der starken Schwankungen innerhalb der Gruppen ist dieser Unterschied nicht signifikant (Mann-Whitney Test, $p > 0,05$).

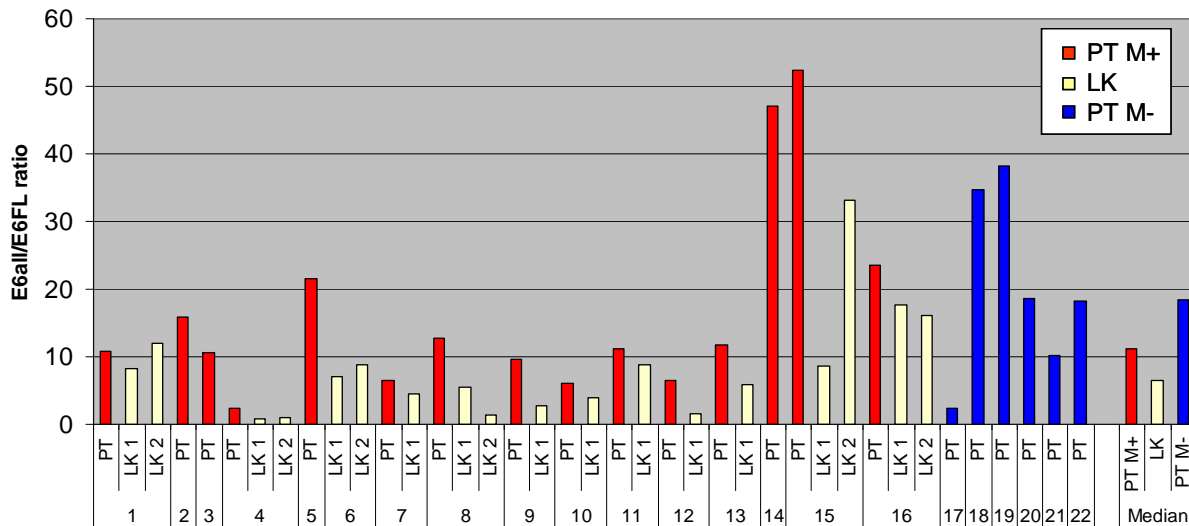


Abb. 3.18. E6all/E6FL ratio in Primärtumoren (PT) und Lymphknoten (LK). Dargestellt sind die Werte der metastasierten PT (PT M+, n=15), der zugehörigen LK (n=18) und von PT ohne Metastasen (PT M-, n=6) bzw. die jeweiligen gruppenspezifischen Medianwerte.

3.3.3. HPV16 Genomstatus in Lymphknoten

Der Genomstatus konnte nur in einem Teil der LK mittels APOT Test bestimmt werden (15/32 LK). Somit war ein Vergleich des physikalischen Zustands nur für 8 der 16 Patientinnen möglich (Abb. 3.19.). Die APOT Ergebnisse zeigen in allen- bis auf einen Fall eine Übereinstimmung des Genomstatus in PT und LK. Der PT von Probe 179 zeigte im APOT Hinweise auf sowohl episomale als auch Integrat-abgeleitete Transkripte, während der zugehörige LK nur ein episomales Transkript aufwies. Um weitere Proben, die eine zu geringe Kopiezahl an HPV Transkripten aufwiesen, analysieren zu können, wurde das E5/E6all Verhältnis bestimmt (Abb. 3.19.). Insgesamt zeigte sich eine gute Übereinstimmung der E5/E6 Ratio in PT und LK. Allerdings kann anhand des Verhältnisses keine eindeutige Einteilung in Proben mit episomalen und integrierten Genomen (e+i) und Proben mit reinen Episomen (e) erfolgen.

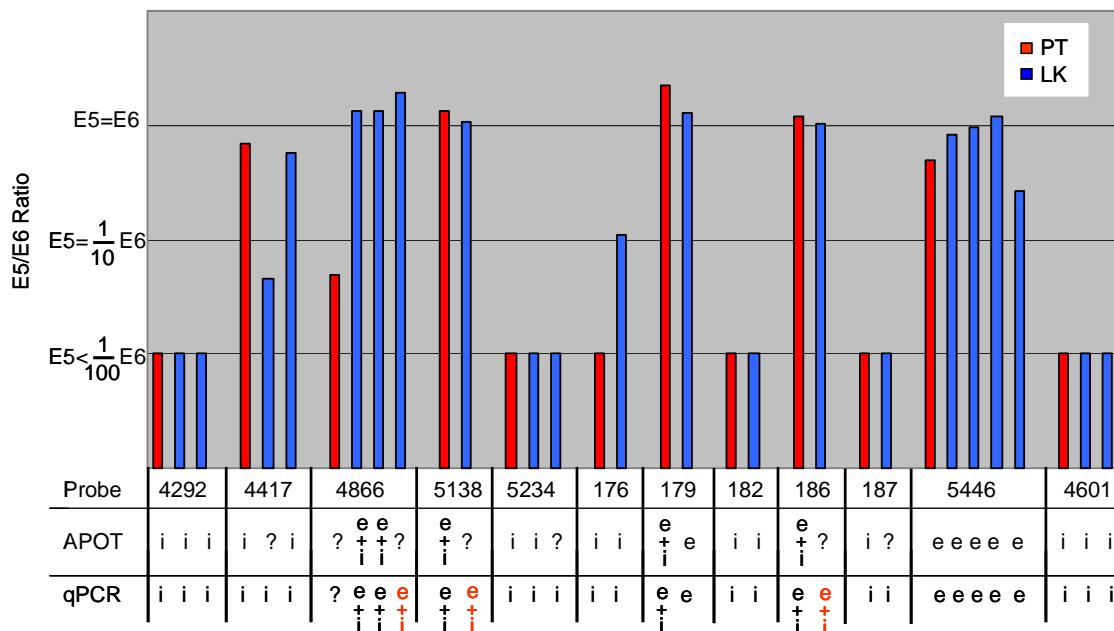


Abb 3.19. Physikalischer HPV16 Genomstatus in PT und LK. APOT Analysen zeigen in allen bis auf eine Patientin (179) einen übereinstimmenden Genomstatus in PT und LK. Durch qPCR und Bestimmung des E5/E6 Verhältnis konnte von zusätzlichen Proben der HPV Status bestimmt werden. Allerdings ist anhand der E5/E6 ratio keine Unterscheidung von episomalem (e) und kombiniertem (e-i) Status möglich.

3.4. Charakterisierung HPV16 positiver Zelllinien – Stabilität von HPV16 Transkripten

HPV16 positive Zelllinien dienen als Modellsysteme für die Untersuchung verschiedenster Aspekte der viralen Infektion und Transformation von Zellen. In dieser Arbeit wurde die Expression und Stabilität der HPV16 Transkripte untersucht. Verwendet wurden sowohl CxCa-Zelllinien (SiHa, CaSki und MRI-H186), als auch durch HPV16 *in vitro* transformierte primäre, humane Keratinozyten (HPK IA, II und III). Um eine Korrelation von Genomstatus bzw. Transkriptstruktur und RNA Stabilität bestimmen zu können wurden der physikalische Genomstatus, die Kopiezahl des viralen Genoms, die HPV16 Genexpression und Transkriptstruktur und schlussendlich die Stabilität der E6/E7 Transkripte ermittelt.

3.4.1. Viral Load

Die Anzahl von HPV16 Genomkopien in Zelllinien schwankt stark und wurde für einige der verwendeten Zelllinien bereits publiziert. So besitzen SiHa Zellen zwei HPV16 Kopien aufgrund einer DNA-Duplikation nach Integration einer Einzelkopie von HPV16 in Chromosom 13 (Mincheva *et al.*, 1987). Dahingegen zeigen CaSki Zellen eine Vielzahl von

Integrationsorten, teilweise multi-copy Integrate und ca. 400 HPV16 Kopien (Mincheva *et al.*, 1987). HPKIA Zellen weisen 2-3 Genomkopien als head-to-tail Integrat auf, während in HPKII Zellen ca. 10 Kopien als head-to-tail Integrate an zwei Chromosomenpositionen detektiert wurden (Durst *et al.*, 1987b). Für HPKIII und MRI-H186 sind noch keine Daten zur Kopiezahl der HPV16 Genome veröffentlicht.

Die Anzahl an HPV16 Genomen in den Zelllinien wurde durch real-time PCR an extrahierter DNA bestimmt. Nach der Quantifizierung eines β -Globin Fragments konnte die Zellzahl und die Anzahl an HPV Kopien (E6all) pro Zelle bestimmt werden (Tab. 3.5.). Die ermittelte Zellzahl in 50ng DNA stimmt mit der theoretisch erwarteten Zellzahl (6pg DNA pro Zelle, ca. 8000 Zellen) gut überein. Auch die ermittelte Anzahl an HPV Kopien pro Zelle entspricht den Literaturangaben. Für HPKIII und MRI-H186 ergaben sich 2-3 bzw. 26 Kopien HPV16 Genom pro Zelle (Tab. 3.5.).

Tab. 3.5.: Viral load in Zelllinien.

	Globin Kopien	HPV Kopien	Zellzahl	HPV/Zelle
SiHa	17706	12548	8853	1,42
CaSki	16974	2737800	8487	322,60
MRI	12445	164430	6222	26,43
HPKI	22531	16188	11265	1,44
HPKII	24942	83430	12471	6,69
HPKIII	11053	13540	5526	2,45

3.4.2. Genomstatus in Zelllinien

Für die meisten der verwendeten Zelllinien ist der Genomstatus bekannt und die HPV Genome liegen integriert vor. Es wurde trotzdem der physikalische Zustand des Genoms durch Restriktionsverdau und Southern Blot bestimmt, um die jeweilige Zelllinie zu bestätigen und das Vorkommen von Vollängen-Genomen zu verifizieren. Da für MRI-H186 keine publizierten Daten vorhanden waren und eine hohe Anzahl an HPV Kopien pro Zelle vorlag, wurde zusätzlich eine 2D Gelelektrophorese durchgeführt um den Genomstatus sicher feststellen zu können. Abbildung 3.19. zeigt exemplarisch die Ergebnisse des Southern Blots für SiHa, HPKIII und MRI-H186. Die genomische DNA (gDNA) der Zelllinien wurde unverdaut (U) bzw. HindIII (H), BamHI (B) oder PstI (P) verdaut, in einem 0,8% Agarosegel aufgetrennt, geblottet und mit dem ³²P-markierten Gesamtgenom von HPV16 hybridisiert. Während keine HindIII Schnittstelle im HPV16 Genom vorhanden ist, schneidet BamHI einmal und PstI fünfmal im HPV16 Genom. Demzufolge ergibt sich nach BamHI Spaltung,

bei vorhandenen Volllängengenomen eine 8kb-Bande und nach PstI Verdau ein charakteristisches Bandenmuster (Abb. 3.20.). Zusätzlich kann nach PstI Verdau, je nach Bandenmuster, auf den Bereich der Öffnung des viralen Genoms geschlossen werden. Ein vorhandenes 2,8kb Fragment deutet auf einen nicht zerstörten E2 ORF hin. Das Fehlen dieser Charakteristika spricht für vorhandene integrierte und trunkeerte Genome (z.B. SiHa). Eine Unterscheidung von integrierten Volllängengenomen (head-to-tail repeats) und Episomen kann anhand des Vergleiches von unverdauter gDNA und HindIII verdauter gDNA erfolgen. Episome werden in ihrem Laufverhalten nicht beeinflusst, wohingegen integrierte Genome aufgrund der HindIII-Spaltung in benachbarten zellulären Sequenzen ein verändertes Laufverhalten zeigen.

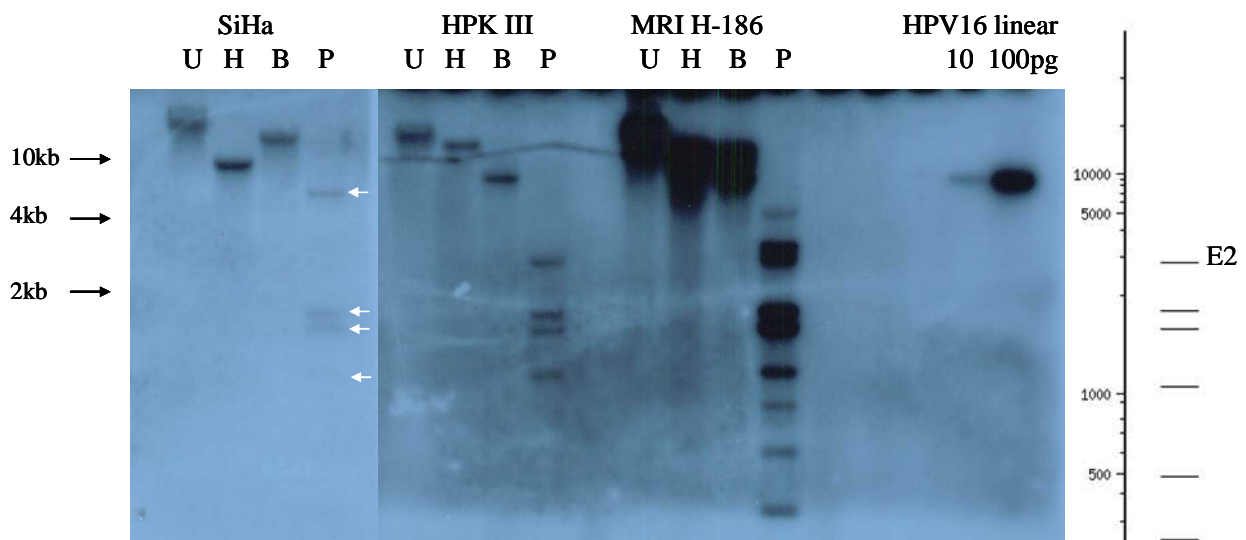


Abb. 3.20.: Southern Blot mit HPV16 Sonde zum Nachweis viraler DNA. Genomische DNA (10µg) wurden unverdaut (U) oder nach Restriktionsverdau mit HindIII (H), BamHI (B) oder PstI (P) aufgetrennt. Als Sensitivitätskontrolle dienten 10 bzw. 100pg linearisiertes HPV16 Genom (entspricht 1 bzw. 100 HPV Kopien/ Zelle). Rechts ist das zu erwartende Fragmentmuster von episomaler HPV16 DNA nach PstI Verdau, mit dem entstehendem 2,7kb E2 Fragment dargestellt. Die weißen Pfeile markieren, zur besseren Sichtbarkeit SiHa PstI Fragmente.

Tabelle 3.6. zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse für alle Zelllinien. Es bestätigen sich die bekannten Genomorganisationen für die untersuchten Zelllinien. SiHa zeigt nur integrierte und in E2 unterbrochene Genome, während CaSki Zellen integrierte und trunkeerte, aber auch integrierte Volllängengenome mit intaktem E2 Bereich aufweist. Die HPK Zelllinien besitzen integrierte HPV16 Genome und weisen intakte E2 Bereiche auf (8kb-BamHI Fragmente und E2 PstI Fragment). Für MRI-H186 zeigen sich sowohl ein 8kb-BamHI, als auch zwei weiteregrößere BamHI Fragmente. Des Weiteren entstehen neben den erwarteten Fragmenten off-size Banden nach PstI Verdau. Somit scheinen sowohl Volllängengenome als auch integrierte und trunkeerte Genome zu existieren. Da zu MRI-H186 keine Informationen zum

Genomstatus vorlagen, wurde zusätzlich eine 2D-Gelelektrophorese durchgeführt um eventuell vorkommende Episome detektieren zu können (Abb. 3.21.). Nach Restriktionsverdau mit einem im HPV16 Genom nicht-schneidenden Restriktionsenzym (HindIII) wurde die genomische DNA erst im 0,4% Agarosegel und danach senkrecht dazu im 0,8% Gel aufgetrennt. Nach durchgeführtem Southern Blot zeigte sich nur die typische Auftrennung linearer DNA und kein einzelner Spot zirkulärer DNA bei 8kb (Abb. 3.21.). Somit liegen alle HPV16 Genomkopien in MRI-H186 integriert vor.

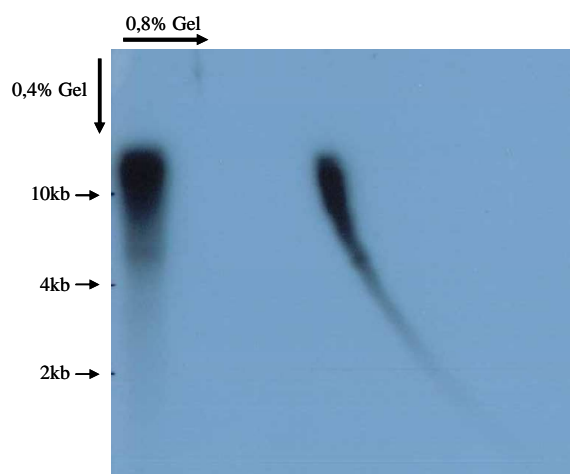


Abb. 3.21.: 2D-Gelelektrophorese und Southern Blot von HindIII-verdauter MRI-H186 DNA. Nach Auftrennung der DNA in die 2. Dimension (0,8% Gel) zeigt sich nur der kurvenförmige Verlauf linearer DNA Fragmente und kein singulärer Spot zirkulärer DNA.

Zusätzlich wurde an allen Zelllinien der APOT Test (siehe 2.2.5.) durchgeführt. Somit konnten auch die jeweils transkriptionell aktiven Genome bestimmt werden. Tabelle 3.6. zeigt die Ergebnisse der Analyse.

Tab. 3.6.: Zusammenfassung der Southern Blot, viral load und APOT Ergebnisse

	gDNA SBlot	HPV/Zelle	APOT
SiHa p7	i(P)+i(H)+i(B)	1,4	i
CaSki p55	E2+i(P)+i(H)+8kb(B)	322,6	i (+e)
MRI p6	E2+i(P)+i(H)+8kb(B)	26,4	e+i
HPKIA p397	E2(P)+i(H)+8kb(B)	1,4	e (+i)
HPKII p335	E2(P)+i(H)+8kb(B)	6,7	e (+i)
HPKIII p74	E2(P)+i(H)+8kb(B)	2,5	e (+i)

(i – integriert, e – episomal, E2 – E2 Fragment nach PstI Spaltung, P – PstI, H – HindIII, B – BamHI)

Insgesamt liefern Southern Blot und APOT Analysen übereinstimmende Ergebnisse. Zelllinien mit intaktem E2 Fragment nach PstI Verdau und 8kb BamHI Fragment exprimieren auch komplette frühe Transkripte. Bei CaSki ist das komplette frühe Transkript jedoch unterrepräsentiert, wird nur schwach exprimiert und konnte nicht immer detektiert werden.

Dies bestätigt die Inaktivierung von integrierten Volllängengenomen durch Methylierung in CaSki Zellen (Van Tine *et al.*, 2004b). MRI-H186 Zellen zeigen sowohl komplette, als auch Integrat-abgeleitete frühe Transkripte, wohingegen die HPK Zelllinien hauptsächlich komplette frühe Transkripte von integrierten Volllängengenomen exprimieren. Fragmente die Integrat-abgeleiteten Transkripten entsprechen könnten wurden in HPK Zellen detektiert, waren jedoch nicht reproduzierbar.

3.4.3. HPV16 Genexpression und Transkriptstruktur

In den Zelllinien wurde die HPV16 Genexpression sowohl qualitativ, als auch quantitativ untersucht. Mittels real-time PCR (siehe 2.2.4.) wurde die Expression von E6all, E6FL, E6*I, E2 und E5 bestimmt (Tab. 3.7.). Die ermittelten Kopiezahlen wurden mittels HKG und RNA Qualität (5'-3' Ratio) normalisiert. Alle Zelllinien zeigen eine ähnliche p97 Aktivität (E6all). SiHa Zellen exprimieren etwas geringere Level an E6/E7 als CaSki Zellen. Dies bestätigt die Ergebnisse von Baker *et al.* (Baker *et al.*, 1987). Übereinstimmend mit der APOT Analyse zeigen SiHa und CaSki Zellen keine bzw. geringe und HPK Zellen eine hohe E5 Expression. Die ermittelten E5/E6all Ratios verdeutlichen intakte frühe Transkripte in HPK und geringe Mengen dieser Transkripte in CaSki Zellen. MRI-H186 Zellen zeigen mit einer Ratio von 1,367 auch komplette virale Transkripte.

Tab. 3.7.: Quantitative Analyse der HPV16 Genexpression in Zelllinien.

	normalisiert HKG + 5'-3'					ratio		
	E6all	E6 FL	E6*I	E2	E5	E6all/E6FL	E5/E6all	E6all/E2
SiHa p7	11878	3394	4352	2235	24	3,500	0,002	5,314
CaSki p55	39525	2968	21290	4244	455	13,315	0,012	9,313
MRI p6	32996	7552	11801	3263	45097	4,369	1,367	10,111
HPKIA p397	31408	4367	19009	5609	48644	7,191	1,549	5,599
HPKII p335	18162	2725	11294	2165	17398	6,666	0,958	8,388
HPKIII p74	31975	3616	16148	3927	48841	8,843	1,527	8,142

Um die Expression von kompletten frühen Transkripten in den Zelllinien mit integrierter HPV DNA zu bestätigen wurde eine nested RT-PCR für diese Transkripte durchgeführt. Die verwendeten Primer amplifizieren cDNAs mit spezifischem 5' Ende (Start E6) bzw. 3' Ende (Stop E5). Somit werden nur komplette Transkripte nachgewiesen. Um die Spezifität zu erhöhen wurde ein Southern Blot mit einer E5 spezifischen Sonde (PCR Produkt) durchgeführt. Als Positiv- bzw. Negativkontrolle wurden neben den untersuchten Zelllinien cDNAs von COS7 Zellen, die mit dem frühen Haupttranskript E6*I-E7-E1⁺E4-E5 bzw. einem viral-zellulärem Fusionstranskript (E6*I-E7-E1⁺SUI-1) adeno-viral transduziert

wurden mitgeführt. Während die Positivkontrolle ein Transkript erwarteter Größe (E6*I 1360bp) aufweist, zeigen die mit dem Fusionstranskript transduzierten Zellen erwartungsgemäß keine intakten frühen Transkripte (Abb. 3.22.).

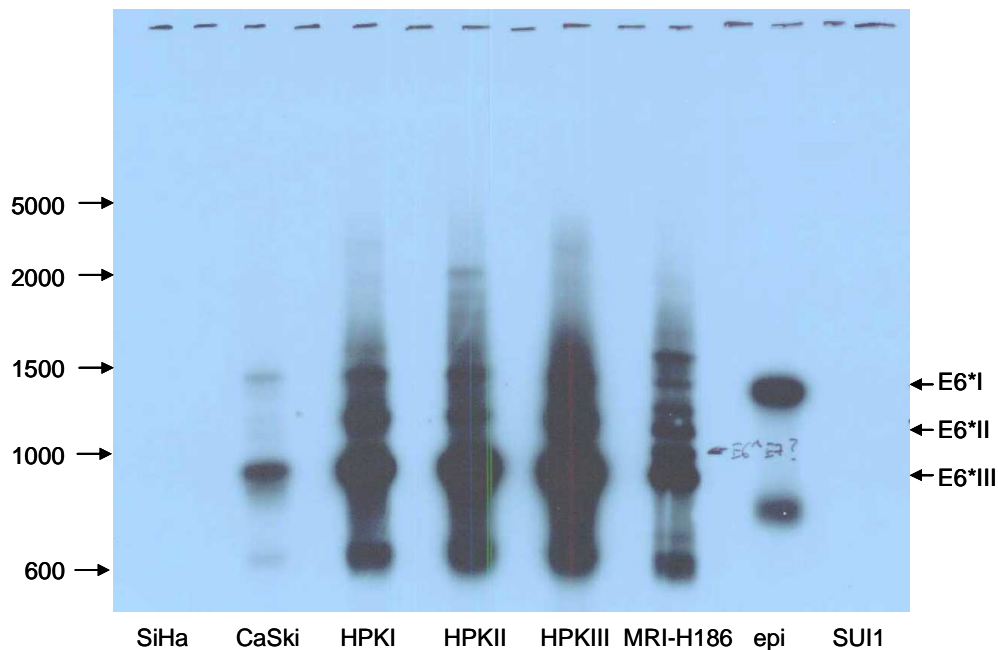


Abb. 3.22.: Qualitative Analyse der Expression kompletter früher Transkripte in Zelllinien mit integrierten HPV Genomen. Außer SiHa Zellen zeigen alle Zelllinien eine Expression von intakten frühen Transkripten. Adenoviral transduzierte episomale E6*I cDNA (epi, Positivkontrolle) bzw. cDNA von Fusionstranskript SUI1 (Negativkontrolle) zeigen die erwarteten Ergebnisse.

Die Ergebnisse der Zelllinien bestätigen die bisherigen Daten. SiHa Zellen zeigen keine rein viralen Transkripte, wohingegen CaSki Zellen geringste Mengen an intakten frühen Transkripten exprimieren. Die stärkste Expression von kompletten Transkripten findet in den HPK Zelllinien statt. MRI-H186 zeigen eine schwächere Expression. Demzufolge exprimieren HPK Zellen und MRI-H186 Zellen trotz integrierten Genomen rein virale, frühe Transkripte.

Überraschend ist der scheinbare Expressionsunterschied $E6*III > E6*II > E6*I$. Allerdings wurden die Transkriptspezies nur anhand der Produktgröße zugeordnet und nicht kloniert und sequenziert. Des Weiteren sind kleinere PCR Produkte bei der Amplifikation begünstigt, so dass anhand dieser Ergebnisse keine quantitativen Aussagen über die Transkriptverteilung getroffen werden können.

3.4.4. RNA-Stabilität

Die Integration des viralen Genoms unter Öffnung des ringförmigen DNA Moleküls im E1-E2 Bereich hat neben dem Verlust dieser ORFs auch den Verlust der viralen 3' UTR zur Folge. Da die 3' UTR AU-reiche Elemente (ARE) aufweist, die eine geringe Transkript-Halbwertszeit hervorrufen können, wird der Verlust als Argument für eine generell höhere Stabilität von viral-zellulären gegenüber episomalen Transkripten angeführt. Die instabilisierende Wirkung der HPV16 3' UTR Sequenz wurde anhand eines artifiziellen Reporterkonstruktes gezeigt (Jeon and Lambert, 1995). Bisher wurde jedoch weder die Auswirkung des Austausches der viralen 3' UTR Sequenz gegen zelluläre Sequenzen, noch der Einfluss des zellulären Hintergrundes näher untersucht. Aufgrund der unterschiedlichen Transkriptstruktur in den zur Verfügung stehenden Zelllinien (siehe 3.4.3.), wurde die Stabilität der E6/E7 Transkripte in diesen Zellen untersucht. Dazu wurden Replikate der einzelnen Zelllinien über unterschiedliche Zeitspannen mit Actinomycin D (ActD) behandelt, RNA isoliert und die Transkriptmenge wurde mittels real-time RT-PCR quantifiziert. Als interne Referenz diente GAPDH, da in Vorversuchen gezeigt werden konnte, dass GAPDH Transkripte über den untersuchten Zeitraum in stabilen Mengen vorliegen. Daher wurde eine relative Quantifizierung (delta C_T Methode, siehe 2.2.4.) durchgeführt.

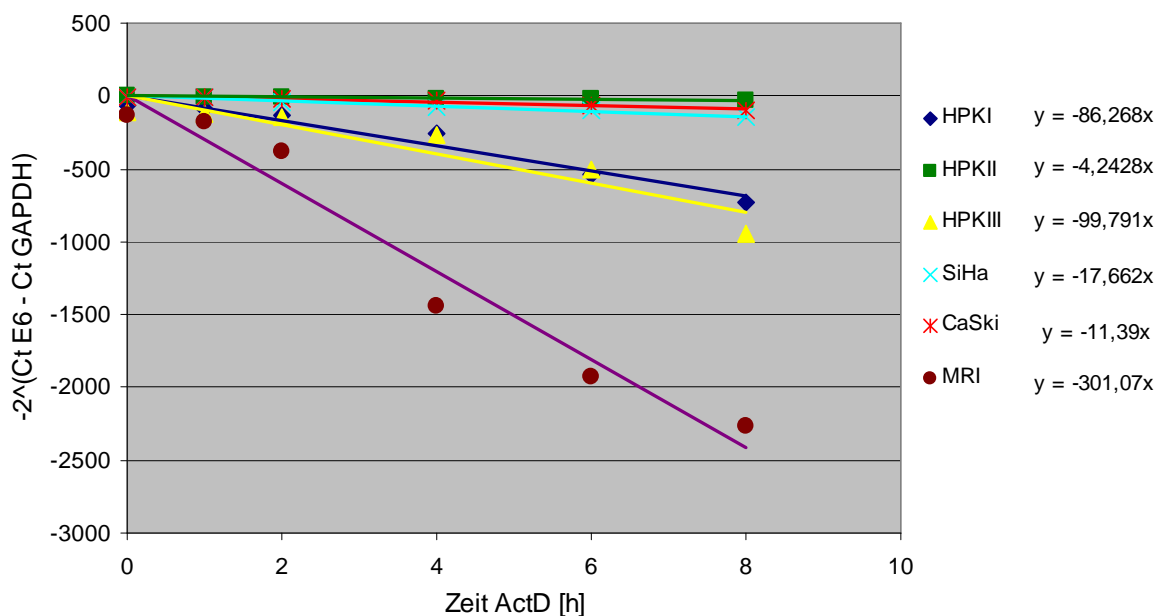


Abb. 3.23.: Stabilitätsanalyse der HPV16 Transkripte. Dargestellt ist die relative Menge an E6 Transkripten im Vergleich zu GAPDH nach ActinomycinD Behandlung über verschiedene Zeitspannen. Der Anstieg der jeweiligen Regressionsgerade gibt die mittlere Veränderung der E6/E7 Transkriptmenge relativ zu GAPDH innerhalb einer Stunde an.

Abbildung 3.23. zeigt die Auswertung eines exemplarischen Versuches. Der Anstieg der ermittelten Regressionsgerade verdeutlicht die durchschnittliche Veränderung der Transkriptmenge relativ zu GAPDH im Zeitraum von einer Stunde. Zu erkennen ist eine ähnliche Stabilität der HPV16 Transkripte in SiHa, CaSki und HPKII, während HPKI, HPKIII und MRI-H186 Zellen eine geringere Stabilität der E6/E7 Transkripte aufweisen. Die ermittelte, extrem geringe Stabilität für MRI-H186 könnte jedoch auf die letzten drei Messzeitpunkte zurückzuführen sein. Nach der ActD Behandlung über 4, 6 und 8h war ein großer Anteil an toten Zellen zu beobachten. In anderen Versuchen zeigten MRI-H186 Transkripte eine vergleichbare Stabilität mit HPKI Transkripten (Tabelle 3.7.). In Tabelle 3.7. sind die Daten von verschiedenen Versuchen zusammengefasst, wobei nicht konstant alle Zelllinien analysiert wurden. Zwischen den einzelnen Versuchen zeigten sich erhebliche Unterschiede, jedoch blieben, bis auf die erwähnten MRI-H186 Zellen in Versuch #2, die Verhältnisse zwischen den Zellen vergleichbar. SiHa, CaSki und HPKII weisen eine hohe RNA Stabilität auf, während die E6/E7 Transkripte in HPKI, HPKIII und MRI instabiler sind. Somit zeigt sich zum einen das sowohl viral-zelluläre Fusionstranskripte, als auch rein virale Transkripte gleiche Stabilität aufweisen können (Vgl. SiHa, CaSki vs. HPKII) und zum anderen, das der zelluläre Hintergrund für die Stabilität eine entscheidende Bedeutung besitzen kann (HPKI vs. HPKII).

Tab. 3.7. Übersicht über die Stabilität von HPV16 E6/E7.

	Assay		
	1	2	3
SiHa	-1,0791	-17,662	-4,0389
CaSki	-1,4874	-11,39	
HPKI	-6,5431	-86,268	-32,577
HPKII		-2,4248	-2,3904
HPKIII		-99,791	
MRI	-4,3425	-301,07	

4. Diskussion

4.1. Bewertung der real-time RT-PCR

Die real-time RT-PCR ist zurzeit eine der am häufigsten angewandte Methode zur Detektion und Quantifizierung von Transkripten. Vorteile sind neben der Generierung von quantitativen Daten über einen Konzentrationsbereich von 6-7 Log-Stufen, die hohe Sensitivität bis zu einer Einzelkopie und die Möglichkeit der Unterscheidung hochgradig-homologer Sequenzen (Morrison *et al.*, 1998; Palmer *et al.*, 2003). Trotzdem ist eine genaue Validierung der durchgeführten Analysen, unter Beachtung potentieller Fehlerquellen, notwendig (Bustin, 2002). Insbesondere ist der Einfluss sämtlicher pre-PCR Schritte, z.B. durch geeignete Normalisierungsprozeduren, zu berücksichtigen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Vergleichbarkeit (i) der Analyse verschiedener Proben und (ii) der Quantifizierung verschiedener Transkripte in einer Probe gewährleistet (siehe 3.1.). Alle verwendeten PCR Assays wiesen eine hohe PCR Effizienz (>95%) über einen identischen Konzentrationsbereich von 10^6 bis 10 Plasmidkopien im PCR Ansatz auf (Abb. 3.1.). Des Weiteren wurden alle Transkripte in einem cDNA Ansatz quantifiziert und es konnte gezeigt werden, dass die RT-Effizienz Gen-unabhängig ist (Abb. 3.4.). Somit sind die Mengen unterschiedlicher Transkripte in einer Probe direkt vergleichbar. Das konstante Umschreiben von RNA in cDNA für verschiedene Gene in einer Probe ist auch eine Voraussetzung für die Normalisierung mittels Housekeeping-Genen (HKG, siehe unten). Um einen aussagekräftigen Vergleich zwischen mehreren Proben zu ermöglichen, wurden weitere Analyseschritte validiert. So erwiesen sich reverse Transkription und PCR, unabhängig von der vorliegenden Targetmenge, als gut reproduzierbar (3.1.3.). Dafür ist eine gleich bleibende Gesamt-RNA-Menge Voraussetzung (Stahlberg *et al.*, 2004). Bei konstanten Reaktionsbedingungen ist die reverse Transkription quantitativ und reproduzierbar. Dies war in der vorliegenden Arbeit gegeben, da Reagenzien und Protokolle unverändert für alle Proben verwendet und eine konstante Menge an Gesamt-RNA eingesetzt wurde. Des Weiteren entsprachen die intra- und inter-Assay Abweichungen der real-time PCR den für die Methode bekannten Werten von <10% bzw. <20% (3.1.5.) (Larionov *et al.*, 2005).

Zur Quantifizierung wurde die Methode der relativen Standardreihe verwendet (Giulietti *et al.*, 2001). Aufgrund der ähnlichen PCR-Effizienzen könnte auch die $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Methode angewendet werden (Pfaffl, 2001). Allerdings besitzt die Quantifizierung mittels Standardreihe den Vorteil, dass sowohl Schwankungen zwischen verschiedenen PCR-Läufen eines Gens, als auch Abweichungen in der PCR-Effizienz zwischen verschiedenen Genen ausgeglichen werden. Im Besonderen wird für die Quantifizierung die jeweils individuelle Performance eines Versuches berücksichtigt, so dass etwaige inter-Assay Abweichungen ausgeglichen werden. Voraussetzung für die Anwendung der Quantifizierung mit einer Standardreihe ist eine vergleichbare PCR Effizienz von Standard und unbekanntem Proben (Souaze *et al.*, 1996). Dies konnte durch Verwendung von verschiedenen Verdünnungsreihen gezeigt werden (3.1.2.). So zeigten reine Plasmid DNA (Standard) und artifizielle Proben (HPV16 negative cDNA + Plasmid) eine identische PCR-Effizienz.

Ein weiterer Analyseschritt, mit Bedeutung für die Transkriptquantifizierung, ist der DNase-Verdau während der RNA Extraktion. Da nicht für alle PCR Assays Transkript-spezifische, Exon-überspannende Primer verwendet werden konnten, musste die Effizienz des DNase-Verdaus bestimmt werden (3.1.4.). Generell wurde im Median weniger als 1% DNA Anteil am E6VL Transkript durch die Quantifizierung von $-RT$ Kontrollen bestimmt. Im Besonderen enthielten auch episomale Proben keinen höheren Anteil an DNA. Da das E6VL Transkript am schwächsten exprimiert wird, ist davon auszugehen, dass andere virale Transkriptanalysen nicht von residualer DNA beeinträchtigt werden. Eine Ausnahme kann die Detektion von E5 in Proben mit integrierten Genomen sein, da in diesen Proben minimale DNA Reste das Vorhandensein von geringen Mengen rein viraler Transkripte vortäuschen können.

Neben der Validierung von Analyseschritten wurden verschiedene Aspekte der Normalisierung berücksichtigt (siehe Abb. 2.4.):

1. Zusammensetzung des Gewebes => Anteil an Tumorzellen
2. Experimentelle Artefakte => housekeeping-Gen Expression
3. RNA-Qualität => 5'-3' Ratio

Eine Berücksichtigung der Zusammensetzung des untersuchten, inhomogenen Gewebes ist, sofern nicht mikrodissiziertes Material verwendet wird, notwendig (Bakay *et al.*, 2002). Die Tumorzellspezifität der viralen Genexpression vereinfacht die Auswertung bzw. ermöglicht die Normalisierung der HPV Genexpression auf den Anteil an dysplastischen Zellen im Gewebe. Dieser Anteil wurde anhand von Hämatoxylin-Eosin (HE-) Färbungen ermittelt. Für CIN Läsionen wurden des Weiteren immunhistochemische Färbungen für p16 und Ki67 zur

besseren Abschätzung dysplastischer Areale angefertigt. Da jeweils die ersten und letzten Gefrierschnitte genutzt wurden, ist eine valide Aussage über den Anteil an dysplastischen Zellen in den für die RNA Extraktion verwendeten Schnitten gewährleistet. Die Notwendigkeit einer Normalisierung von experimentellen Artefakten an sich ist unumstritten- jedoch wird die verwendete Methode kontrovers diskutiert (Bustin, 2002; Huggett *et al.*, 2005; Wong and Medrano, 2005). Eine Normalisierung auf die Gesamtmenge an RNA bzw. auf die Menge an 28S rRNA scheint, aufgrund des geringen und variablen Anteils von mRNA und der unterschiedlichen Transkription durch die RNA Polymerasen I bzw. II, nicht geeignet (Tricarico *et al.*, 2002). In derselben Studie und einer Vielzahl von weiteren Veröffentlichungen konnte jedoch auch gezeigt werden, dass die Normalisierung mittels einzelner HKG potentiell zu fehlerhaften Auswertungen führen kann (Goidin *et al.*, 2001; Tricarico *et al.*, 2002). Die derzeit sicherste Methode zur Normalisierung ist die Verwendung eines Sets an HKG, die sich in Validierungsversuchen als am stabilsten exprimiert erwiesen (Andersen *et al.*, 2004; Vandesompele *et al.*, 2002). Dazu wurde in der vorliegenden Arbeit die Stabilität von jeweils 8 HKG in Zervixgewebe bzw. Lymphknoten ermittelt (3.1.6.). Um experimentelle Schwankungen der viralen Genexpression zu normalisieren, wurde dann die Expression der 2 stabilsten HKG verwendet.

Falls Target-Gen- und HKG Assays eine ähnliche PCR Produktgröße und die gleiche Lokalisation in Relation zum 3' cDNA Ende besitzen, wird durch die HKG-Normalisierung auch ein Unterschied in der RNA Qualität ausgeglichen. Da aufgrund der HPV16 Transkriptsstruktur (Abb. 3.1.A) alle E6 Assays, im Unterschied zu den HKG Amplifikaten, am 5' Ende der cDNA lokalisiert sind, wurde zusätzlich zur HKG Normalisierung die RNA Qualität berücksichtigt (5'-3' GAPDH Ratio). Dieser Schritt war auch aufgrund der stark unterschiedlichen RNA Qualität notwendig (Abb. 3.9.). Die Möglichkeit einer RNA-Qualitätsbestimmung durch den Nachweis partieller Transkriptsequenzen wurde erstmals im Jahr 2000 publiziert (Swift *et al.*, 2000), ist bei Microarray Experimenten Standard (Affymetrix) und wurde auch quantitativ umgesetzt (Wong and Dennis Lo, 2006). Auch in dieser Arbeit konnte eine gute Übereinstimmung der 5'-3' ratio mit der RNA Qualität gezeigt werden (Abb. 3.8.).

Aufgrund der weitreichenden Normalisierungsprozeduren und der Validierung einzelner Analyseschritte kann von einer reproduzierbaren und aussagekräftigen Quantifizierung der viralen Genexpression ausgegangen werden. Dies bestätigen auch die Duplikatanalysen, die alle Schritte der Quantifizierung umfassten (Tab. 3.6.). Die Abweichung zwischen den Duplikaten liegt im Bereich der Standardabweichung der Messmethode (qRT-PCR).

4.2. Virale Genexpression in CIN und CxCa

Die virale Genexpression ist *per se* notwendig um die virale Infektion aufrecht zu erhalten. Die E6/E7 Expression, im Speziellen, ist sowohl eine Voraussetzung für den normalen viralen Lebenszyklus, als auch für den Erhalt des tumorigenen Phänotyps (Thomas and Banks, 1999; von Knebel Doeberitz *et al.*, 1992). Dies konnte in den vorliegenden Untersuchungen bestätigt werden, da alle CIN und CxCa Biopsien eine E6/E7 (*E6all*) Expression aufwiesen (Abb. 3.10.). Zwischen CIN und CxCa Proben gab es keinen signifikanten Unterschied in der E6/E7 Expression (Mann-Whitney Test, $p > 0,05$). Auch das E6 Vollängentranskript (*E6VL*) wurde in allen, außer in 3 Biopsien detektiert, wies aber geringere Kopiezahlen auf (Abb. 3.11. und 3.13.). Die schwache E6VL Expression bestätigt das effiziente Spleißen im E6 ORF (Sherman *et al.*, 1992). Dahingegen ist E6*I das Haupttranskript in CIN und CxCa (Abb. 3.11.). Allerdings addiert sich die E6all Expression nicht aus E6*I + E6VL auf, da es weitere Spleißvarianten neben dem Haupttranskript E6*I gibt (E6*II, III) (Doorbar *et al.*, 1990; Sherman *et al.*, 1992).

Im Gegensatz zu den E6/E7 Sequenzen zeigt sich ein stark signifikanter Unterschied in der E2 und E5 Expression zwischen CIN und CxCa (Mann-Whitney Test $p < 0,01$). E2 und E5 Sequenzen sind in CxCa geringer exprimiert als in CIN Biopsien. Diese Differenz ist auf den unterschiedlichen Anteil an Proben mit episomalen bzw. integrierten Genomen zurückzuführen (siehe 4.3.). In CxCa findet häufiger eine Integration des viralen Genoms statt (Hopman *et al.*, 2005; Klaes *et al.*, 1999), die mit dem Verlust der E2/E5 Expression (Kalantari *et al.*, 1998; Schwarz *et al.*, 1985) und der Bildung von viral-zellulären Fusionstranskripten einhergeht (Klaes *et al.*, 1999).

Während die E2/E5 Expression in dieser Arbeit den gängigen Literaturangaben entspricht, existieren zur E6/E7 Onkogenexpression in CIN und CxCa unterschiedliche Daten. Biopsie-basierte Analysen liefern übereinstimmende Ergebnisse zu den hier vorgestellten Daten und weisen eine E6/E7 Expression sowohl in CIN als auch in CxCa nach (Kraus *et al.*, 2004; Nakagawa *et al.*, 2000). Dahingegen zeigen Studien mit Abstrichmaterial eine Korrelation von E6/E7 mRNA Detektion und Dysplasiegrad (Andersson *et al.*, 2006; Molden *et al.*, 2005; Sotlar *et al.*, 2004). Einer fehlenden E6/E7 Expression in Zellen des Abstrichs leichtgradiger Dysplasien muss jedoch keine generell fehlende E6/E7 Expression in der Läsion zu Grunde liegen. Aufgrund der differenzierungsabhängigen viralen Genexpression kommt es in differenzierten Keratinozyten zu einer Verschiebung der Expression von p97 (frühe Gene) zu p670 Transkripten (späte Gene) (Middleton *et al.*, 2003). Weiterhin zeigen schwergradige

Dysplasien verstärkt Differenzierungsstörungen und einen überwiegenden Anteil an dysplastischen Zellen, der bis an die Epitheloberfläche reichen kann (CIN3, siehe 1.2.). Somit verdeutlicht ein E6/E7 mRNA Nachweis im Abstrich lediglich unterschiedliche Zellpopulationen an der Epitheloberfläche (dysplastische Zellen = E6/E7 positiv, differenzierte Zellen = E6/E7 negativ). Aufgrund des Zusammenhanges zwischen Dysplasiegrad und viraler Genexpression an der Epitheloberfläche könnte ein Onkogentranskript-Nachweis im Abstrich jedoch eine höhere Spezifität für schwergradige Dysplasien haben als ein HPV-DNA Nachweis (Molden *et al.*, 2005). Eine generell geringere E6/E7 Expression in CIN vs. CxCa kann anhand der hier vorgestellten Daten jedoch nicht nachgewiesen werden (Abb. 3.11.). Durch frühere Expressionsanalysen mittels *in-situ* Hybridisierung konnte allerdings eine unterschiedliche intraepitheliale Lokalisierung der Onkogenexpression gezeigt werden. Während teilungsfähige Zellen der Basalzellschicht in leichtgradigen Dysplasien keine E6/E7 Expression aufwiesen, zeigten sie in CIN2/3 Biopsien eine verstärkte Onkogenexpression (Durst *et al.*, 1992). Somit scheint nicht das Expressionslevel von E6/E7 leichtgradige CIN von schwergradigen CIN und CxCa zu unterscheiden, sondern der jeweilige Zelltyp mit Onkogenexpression. Dieser Gedanke wird auch durch die stark unterschiedlichen Expressionsniveaus relativ zur Anzahl an dysplastischen Zellen gestützt. Sowohl in CIN als auch in CxCa scheinen äußerst unterschiedliche Onkogenlevel notwendig bzw. hinreichend für den jeweiligen Phänotyp zu sein (Abb. 3.11.). Die hohe Variabilität in CxCa wird von Ergebnissen anderer Studien bestätigt (de Boer *et al.*, 2007; Rosty *et al.*, 2005). Interessanter Weise ermittelten beide Studien eine prognostische Aussagekraft des Onkogenlevels für den klinischen Verlauf bzw. das Überleben von CxCa Patientinnen. Während Rosty *et al.* eine Korrelation von Transkriptlevel und HPV Genomkopien feststellen, können de Boer und Kollegen keinen Zusammenhang detektieren. Eine mögliche Erklärung für eine Überexpression von E6/E7 könnte, laut derzeitigem Karzinogenesemodell, die Integration des viralen Genoms sein (siehe 4.4.).

4.3. Virales Spleißmuster in CIN, CxCa und Lymphknotenmetastasen

Die generelle p97 Aktivität in den untersuchten CIN und CxCa weist keinen signifikanten Unterschied auf (Abb. 3.11.). Jedoch wird in CxCa signifikant weniger E6VL Transkript im Vergleich zu E6all exprimiert als in CIN (siehe 3.2.3.). Dabei ist das Transkriptmuster unabhängig vom physikalischen Zustand des viralen Genoms (Abb. 3.13.). Dies sind die

bisher ersten veröffentlichten, quantitativen Daten zum Spleißmuster in CIN und CxCa. Bisherige Methoden wie z.B. *in-situ* Hybridisierung und RT-PCR waren zu unsensitiv für die Detektion von E6VL Transkripten bzw. nicht quantifizierbar. Die Daten lassen vermuten, dass nach der Entartung der Zellen eine geringere E6 Menge, bei gleich bleibendem E7 Level, exprimiert wird. Aufgrund der homogenen E6all/E6VL Ratio in CIN ist jedoch keine Unterscheidung von progredierenden und regredierenden Dysplasien möglich. Inwieweit das unterschiedliche E6 Level in CxCa eine Bedeutung für die Progression oder eine prognostische Aussagekraft hat, ist gegenwärtig unklar. Interessant erscheint jedoch die etwas höhere E6VL Expression in Primärtumoren mit metastasierten Lymphknoten (Abb. 3.18.). Allerdings ist dieser Unterschied nicht signifikant. In metastasierten Lymphknoten konnte jedoch ein höheres Level an E6VL Transkript nachgewiesen werden als in dem jeweiligen Primärtumor. Im Gruppenvergleich (PT vs. LK) ergab sich eine signifikant geringere E6all/E6VL Ratio in Lymphknoten (Abb. 3.18.). Somit scheint es im Verlauf einer fortschreitenden Erkrankung zu Schwankungen der E6 Spleißereignisse zu kommen. Relativ zur gesamten p97 Aktivität exprimieren CIN mehr E6 Vollängentranskript als CxCa (Abb. 3.13.), wobei metastasierende CxCa etwas höhere Level an E6VL aufweisen, die in den LK Metastasen noch weiter erhöht sind (Abb. 3.18.). Für eine valide Bestimmung der prognostischen Aussagekraft der E6all/E6VL Ratio sind jedoch größere Fallzahlen notwendig.

Die starke Streuung der p97 Aktivität, die in dieser Arbeit sowohl in CIN als auch in CxCa detektiert wurde und Ergebnisse andere Studien (Van Tine *et al.*, 2004b; von Knebel Doeberitz *et al.*, 1991) lassen vermuten, dass in den Läsionen ein jeweils optimales Onkogenlevel exprimiert wird. Für eine getrennte E6- bzw. E7-Expressionskontrolle ist aufgrund des effizienten Spleißens im E6 ORF jedoch anzunehmen, dass die Regulation der E6VL Transkriptmenge eher auf der Ebene des Spleißens stattfindet, als durch eine veränderte Promotoraktivität. Das erhöhte E6 Level in metastasierenden PT bzw. in LK Metastasen könnte eine Voraussetzung für die Metastasierung darstellen, da gezeigt wurde, dass E6 mit Zytoskelett-assoziierten Proteinen (Paxillin, Dlg) wechselwirken und somit die Zellpolarität bzw. Zell-Zellkontakte beeinflussen kann (Kiyono *et al.*, 1997; Tong *et al.*, 1997).

4.4. Auswirkung der HPV16 Integration auf die virale Genexpression

Die Integration des viralen Genoms ist als ein wichtiger Schritt der Karzinogenese anerkannt. Eine Vielzahl von Studien detektiert einen steigenden Anteil von integrierter HPV DNA mit

zunehmenden Schweregrad der Läsion. In der Mehrzahl der Karzinome liegen integrierte HPV16 Genome vor (Klaes *et al.*, 1999; Peitsaro *et al.*, 2002). Nur 10-25% von untersuchten CxCa weisen reine Episome auf (Woodman *et al.*, 2007). In Neoplasien wird dahingegen, je nach angewendeter Methode, ein unterschiedlicher Anteil an Integraten detektiert. Transkript-basierte Analysen detektieren keine bzw. nur geringe Anteile (~15%) an Integraten in CIN 1 bzw. CIN 2/3 (Klaes *et al.*, 1999). Dahingegen zeigen DNA-basierte Analysen (SouthernBlot, 2D-Gelelektrophorese, E2/E6 ratio) teilweise ein verstärktes Auftreten von Integraten in leichtgradigen und schwergradigen CIN (0-72% bzw. 44-88%) (Woodman *et al.*, 2007). Allerdings ist der Anteil an Integraten in CIN generell geringer als bei CxCa und die überwiegende Mehrheit charakterisierter Integrationsorte stammt aus CxCa (Wentzensen *et al.*, 2004).

In Folge der Integration und der Öffnung des viralen Genoms kommt es zu einem Verlust der Leseraster für E1, E2 und E5 (Choo *et al.*, 1987; Kalantari *et al.*, 1998). Dahingegen bleiben die NCR und E6/E7 Sequenzen erhalten (Choo *et al.*, 1987; Schwarz *et al.*, 1985). Weiterhin bilden sich charakteristische viral-zelluläre Fusionstranskripte aufgrund der Nutzung zellulärer Spleißakzeptoren bzw. Polyadenylierungssignale (Schneider-Gadicke and Schwarz, 1986). *In-vitro* Studien zeigten für HPV16 Genome mit E2 Verlust eine erhöhte Immortalisierungskapazität (Romanczuk and Howley, 1992) und für die Integration *per se* einen erhöhten Wachstumsvorteil (Jeon *et al.*, 1995). Diese Eigenschaften korrelieren im experimentellen System mit einem erhöhten Onkogen-Transkriptniveau und E7 Proteinlevel (Alazawi *et al.*, 2002; Jeon and Lambert, 1995; Pett *et al.*, 2004). Die verstärkte Onkogenexpression könnte durch eine erhöhte mRNA Stabilität ((Jeon and Lambert, 1995), siehe 4.5.) und durch die de-reprimierte p97 Aktivität aufgrund des E2 Verlust verursacht werden. Zumindest zeigte eine ektopische E2 Expression in CxCa Zelllinien eine Reprimierung der E6/E7 Expression (Dowhanick *et al.*, 1995). Bisher wurde jedoch noch keine Korrelation von viraler Integration und hohem Onkogenlevel in klinischem Material gezeigt.

Ziel dieser Arbeit war es daher die Theorie einer Onkogenüberexpression durch die Integration des viralen Genoms anhand von Biopsiematerial zu validieren. Die ermittelte Verteilung von Episomen und Integraten in CIN und CxCa stimmt mit bereits publizierten APOT-Ergebnissen überein (Klaes *et al.*, 1999). Des Weiteren zeigte Satish *et al.* die Amplifikation von Vollängen E2 PCR-Produkten in ca. 50% von CxCa, was mit dem hier detektierten Anteil von Proben mit episomalen Transkripten (50%, Tab. 3.4.) übereinstimmt (Sathish *et al.*, 2004). Auffallend ist die geringe Integrationsrate in CIN 2/3, basierend auf

Transkriptanalysen, im Vergleich zu DNA-basierten Studien. Dies könnte durch die Inhibierung der Integrat-abgeleiteten Expression durch das E2-Protein, welches von vorhandenen Episomen exprimiert wird, erklärt werden (Herdman *et al.*, 2006). Obwohl die Existenz von „latenten“ Integraten in episomalen Proben nicht ausgeschlossen werden kann, ermöglicht gerade die Einteilung nach Transkripttyp (e; e+i; i) mittels APOT Assay die angestrebte Aussage über die Korrelation von Genomstatus und Transkriptlevel.

Zur Quantifizierung der viralen Transkriptlevel wurden validierte Real-Time PCR Assays und Normalisierungsprozeduren verwendet (siehe 2.2.4.). Um eine Vergleichbarkeit von Genomstatus und Expressionslevel zu gewährleisten wurde für beide Analysen dieselbe RNA genutzt. Die abnehmenden E5 Level von episomalen zu episomalen + integrierten Genomen und die größtenteils fehlende E5 Expression in Proben mit reinen Integraten bestätigt die Ergebnisse des APOT Assays (Abb. 3.10.). Aufgrund der Öffnung des viralen Genoms im E1/E2 Bereich kommt es zur Trennung des E5 ORF vom p97 Promotor und dem Verlust der E5 Expression (Schwarz *et al.*, 1985). Die teilweise geringe E5 Expression (0,01% der E6 Expression im Median) könnte von vereinzelt Zellen mit Episomen oder von Vollängenintegraten an Multicopy-Loci stammen. Die von diesen Genomen exprimierten rein viralen Transkripte können vor dem Hintergrund der viral-zellulären Fusionstranskripte vermutlich nicht vom APOT Assay detektiert werden. Obwohl van Tine *et al.* eine Reprimierung von Vollängengenomen in Multicopy-Integraten durch Methylierung zeigen konnten (Van Tine *et al.*, 2004b), war die verwendete Methode nicht sensitiv genug, um eine geringe Hintergrundaktivität detektieren zu können. Andererseits könnten minimale E5 Level auch von residueller DNA stammen, da -RT-Kontrollen einen Anteil von 0,1% DNA in der RNA von Proben mit Integraten ergaben (siehe 3.1.4.). Insgesamt ist jedoch festzustellen, dass es eine hoch signifikante Korrelation der E5 und E2 Level mit dem HPV Genomstatus gibt (episomale vs. integrierte Genome, Mann-Whitney Test, $p < 0,001$). Aufgrund des Integrationsereignisses kommt es zum Verlust der E2 und E5 Expression.

Im Gegensatz dazu konnte keine Veränderung der E6/E7 Expression durch die Integration festgestellt werden (Abb. 3.10.). Um eine mögliche fehlerhafte Auswertung aufgrund unterschiedlicher Anteile von CIN und CxCa Proben innerhalb der, nach HPV Genomstatus stratifizierten Gruppen zu vermeiden, wurde auch der histopathologische Status berücksichtigt (Abb. 3.11.). Jedoch zeigte sich keine Abhängigkeit der Onkogenexpression vom physikalischen Genomstatus. Weder e-CIN (34470 Kopien) noch e-CxCa (31900 Kopien) exprimierten weniger E6/E7 Transkripte als i-CxCa (22805 Kopien, Medianwert in 10ng RNA). Auch das E6*I Haupttranskript wurde in allen Gruppen mit ähnlichem Level

exprimiert (Abb. 3.11.). Somit ist ein genereller Fehler durch unterschiedliche Mengen an residualer DNA auszuschließen, da der E6*I Assay Transkript-spezifische Ergebnisse, aufgrund der Verwendung von Exon-überspannenden Primern, liefert. Anhand dieser Daten ist keine generelle Überexpression nach der Integration des viralen Genoms festzustellen. Aufgrund der stark variablen Onkogenexpression in CIN und CxCa (pro dysplastische Zelle) ist zu vermuten, dass unterschiedliche E6/E7 Level sowohl zum Erwerb als auch zum Erhalt des tumorigenen Phänotyps notwendig bzw. hinreichend sind.

Die hohe Variabilität der E6/E7 Expression wird auch von anderen Arbeiten, zumindest für CxCa bestätigt (de Boer *et al.*, 2007; Rosty *et al.*, 2005). Ein Einfluss der HPV Genomkopiezahl, wie in diesen Arbeiten diskutiert, lässt sich nicht bewerten. Zum einen wurde in der vorliegenden Arbeit die Genomkopiezahl nicht bestimmt, zum anderen konnte gezeigt werden, dass die Expression von Multicopy-Integraten selektiv supprimiert werden kann (Van Tine *et al.*, 2004b). Des Weiteren ist nicht bekannt, ob alle Episome zu einem Zeitpunkt eine ähnliche Expressionsaktivität zeigen. Somit wäre ein direkter Vergleich von DNA und RNA Kopien nicht aussagekräftig. Jedoch ist auch nicht auszuschließen, dass aufgrund der Reprimierung von Multicopy-Integraten eine integrierte und aktive HPV Genomkopie tatsächlich mehr Onkogentranskripte exprimiert als eine episomale Genomkopie. Diese verstärkte Expression könnte notwendig sein, um nach der Integration und der Verringerung der Anzahl von aktiven Genomen eine konstitutive Onkogenexpression zu ermöglichen. So wurde im experimentellen System (W12 Zelllinie) nach der Integration eine gleich bleibende E6/E7 Expression pro Zelle ermittelt, die jedoch eine gesteigerte E6/E7 Expression pro HPV-DNA Kopie bedeutete (Herdman *et al.*, 2006).

Neben der integrationsbedingten E6/E7 Überexpression kann auch eine postulierte, verstärkte E6VL Expression nach der Integration (Andersson *et al.*, 2006) nicht bestätigt werden. Ganz im Gegenteil dazu zeigt Abbildung 3.13. ein verstärktes Spleißen in CxCa Proben im Vergleich zu CIN. Es lässt sich jedoch kein Einfluss des HPV Genomstatus feststellen.

Insgesamt kann in der hier vorgelegten Arbeit kein Einfluss des viralen Genomstatus auf die virale Onkogenexpression pro dysplastische Zelle nachgewiesen werden. Sowohl CIN als auch CxCa exprimieren äußerst variable Mengen an E6/E7 Transkripten, weisen aber unabhängig vom physikalischen Status ähnliche Medianwerte auf (Abb. 3.11.). Auch das Spleißmuster ist unabhängig vom Genomstatus. Des Weiteren zeigt sich, dass sowohl CxCa mit integrierten HPV Genomen als auch mit episomalen Genomen die Fähigkeit zur Metastasierung besitzen (Abb. 3.19.). Der jeweilige physikalische Status des Primärtumors ist

auch in den Lymphknotenmetastasen nachzuweisen (Abb. 3.19.). Dies deutet auf ein klonales Wachstum des CxCa hin.

4.5. Der Verlust des viralen E2 Proteins

Wie in Kapitel 4.4. dargestellt, bewirkt die Virus-Integration zwar einen Verlust der E2 Expression, ohne jedoch eine generelle Überexpression der Onkogene E6/E7 zu verursachen. Des Weiteren zeigten Bechtold *et al.* das E2 nur auf integrierte, nicht jedoch auf episomale Genome einen reprimierenden Effekt ausübt (Bechtold *et al.*, 2003). Demnach könnte der E2 Verlust eine Voraussetzung für die konstitutive Genexpression nach der Integration sein (siehe 4.4.). Zusätzlich lassen Ergebnisse von van Tine und Kollegen vermuten, dass ein E2 Verlust zur Vermeidung der Bildung von viro-Centromeren und der damit verbundenen Entstehung von Chromosomenbrüchen notwendig ist (Van Tine *et al.*, 2004a). Entstehende Chromosomenbrüche könnten zu so genannten „breakage-fusion-bridge-cycles“ führen (McClintock, 1951) und in Verbindung mit der E6 vermittelten p53 Degradation (Scheffner *et al.*, 1990) in einer mitotischen Katastrophe enden (Van Tine *et al.*, 2004a). Somit ist anzunehmen, dass der E2 Verlust zwar notwendig ist um eine Onkogenexpression auch nach der Integration zu ermöglichen und die Bildung von viro-Centromeren zu vermeiden, aber die Selektion von Integraten nicht auf dem Verlust der Repressor-Funktionen beruht.

Trotzdem könnte der Verlust anderer E2 Funktionen ursächlich an der Zervixkarzinogenese beteiligt sein. Die Analyse der E2 Expression in CIN und CxCa bestätigt den E2 Verlust durch die Integration (Abb. 3.12.), zeigt aber auch den fehlenden Einfluss des E2 Repressors auf die episodale Genexpression (Abb. 3.15). Somit werden die Ergebnisse von Bechtold *et al.* an klinischem Material bestätigt. Gleichzeitig konnte aber eine Supprimierung der E2 Expression auch in episomalen Proben durch ein verstärktes Spleißen (E1^ΔE4) gezeigt werden (Abb. 3.15.). Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit nicht-quantitativen Daten anderer Arbeitsgruppen (Ordonez *et al.*, 2004). Episomale CxCa exprimieren signifikant weniger E2 Vollängentranskript als episodale CIN (Mann-Whitney Test, $p < 0,05$). Inwieweit diese Abnahme der E2 Expression physiologische Auswirkungen hat, ist allerdings unklar. Jedoch deuten verschiedene Studien auf E2 Funktionen neben der Repressorfunktion hin, die eine Bedeutung für die Karzinogenese haben könnten. So zeigte Romanzcuk *et al.* eine erhöhte Immortalisierungskapazität für HPV16 Genome mit E2 Mutationen, die aber nicht vollständig durch die p97 Repression erklärt werden konnten. HPV16 Genome mit Mutationen in den E2 Bindestellen der NCR zeigten eine geringere

Immortalisierungskapazität als die E2 ORF Mutanten (Romanczuk and Howley, 1992). Des Weiteren ergaben erste *in-vitro* Studien einen potentiellen Effekt des E2 Proteins auf die intrazelluläre Lokalisation und eine Hemmung der Funktion der Onkoproteine E6 und E7 (Gammoh *et al.*, 2006; Grm *et al.*, 2005). Falls diese Ergebnisse in klinischem Material bzw. während des normalen viralen Lebenszyklus bestätigt werden, könnte diese Onkogenregulation auf Proteinebene die verringerte E2 Expression in episomalen CxCa Proben erklären. Eine zusätzliche E2 Funktion könnte die Transkriptionsregulation von zellulären Genen sein. So konnte eine Reprimierung des hTERT Promotors im experimentellen System gezeigt werden (Lee *et al.*, 2002). Außerdem könnte die Integration, durch den Verlust von viralen Proteinen, die Präsentation potentieller, immunstimulatorischer Peptide verhindern. So wurden sowohl T-Zell-Epitope in E2 nachgewiesen, als auch ein höherer Anteil an E2 spezifischen T-Zellen in Patientinnen mit regredierenden CIN als in Patientinnen mit progredierenden Dysplasien gefunden (Dillon *et al.*, 2007; Konya *et al.*, 1997).

4.6. HPV Transkriptstruktur und RNA Stabilität

Die Integration des viralen Genoms betrifft hauptsächlich den E1/E2 Bereich, ist häufiger in CxCa als in CIN zu detektieren und führt zur Bildung von viral-zellulären Fusionstranskripten (Arias-Pulido *et al.*, 2006; Kalantari *et al.*, 1998; Klaes *et al.*, 1999). Diese Fusionstranskripte werden vom Promotor p97 aus exprimiert und weisen aufgrund des Übergangs von viraler DNA zu humanen Sequenzen ein abweichendes 3' Ende im Vergleich zu episomalen Transkripten auf (Schneider-Gadicke and Schwarz, 1986). Jeon und Lambert konnten im Modellsystem W12 (siehe 1.2.2.) zeigen, dass E6/E7 Transkripte in Zellklonen mit integrierten Genomen eine höhere Halbwertszeit (RNA-Stabilität) aufweisen als rein virale Transkripte (Jeon and Lambert, 1995). Des Weiteren wurde in artifiziellen Reporter-genkonstrukten eine instabilisierende Wirkung der viralen 3'-UTR Sequenz, die AU-reiche Elemente (ARE) enthält, detektiert (Jeon and Lambert, 1995). Allerdings existieren bisher keine Daten zu einem direkten Vergleich von rein viralen Transkripten und authentischen viral-zellulären Fusionstranskripten. Weiterhin sind die spezifischen ARE bindenden Proteine (ARE-BP), die eine instabilisierende Wirkung der 3'-UTR HPV Sequenz vermitteln können, unbekannt.

Die generelle Bedeutung der RNA Stabilität wurde anhand von Micro-Array Analysen, die einen Anteil der RNA-Stabilität von 40-50% an Genexpressionsveränderungen zeigten,

nachgewiesen (Cheadle *et al.*, 2005; Fan *et al.*, 2002). Allerdings ist auch bekannt, dass eine Vielzahl von ARE bindenden Proteinen an der jeweiligen genspezifischen Regulation der RNA Stabilität beteiligt sind. Des Weiteren existieren sowohl stabilisierende, als auch instabilisierende ARE-BP, deren genspezifisch Aktivität durch Signaltransduktionswege reguliert wird (Garneau *et al.*, 2007). So wird z. B. die Myogenin-Transkriptstabilität durch die p38 MAPK abhängige Phosphorylierung des ARE-BP KSRP (KH splicing regulatory protein) reguliert. Die dadurch hervorgerufene Dissoziation des instabilisierenden Proteins (KSRP) von der RNA ermöglicht die Bindung von HuR (stabilisierend) und erhöht somit die Stabilität des Myogenin-Transkriptes (Briata *et al.*, 2005; Figueroa *et al.*, 2003).

Somit erscheinen generelle Aussagen über die virale Transkriptstabilität anhand bisher veröffentlichter Daten eher unsicher. So sollten authentische viral-zelluläre Fusionstranskripte und rein virale Transkripte in standardisierten und reproduzierbaren Stabilitätsanalysen verglichen, beteiligte Proteine identifiziert und auch der jeweilige zelluläre Hintergrund beachtet werden.

Die Notwendigkeit einer genauen und differenzierten Analyse begründen auch die Ergebnisse dieser Arbeit. Die Analyse verschiedener HPV16 positiver Zelllinien ergab eine unterschiedliche Stabilität der E6/E7 Transkripte in diesen Zelllinien (Abb. 3.23.). So zeigten CaSki- und SiHa-Zellen, die Fusionstranskripte exprimieren, eine hohe RNA-Stabilität. Dahingegen wiesen HPKI und III eine deutlich geringere Transkriptstabilität auf. Da diese Zellen überwiegend rein virale Transkripte exprimieren (Tab. 3.6 und 3.7.), bestätigen diese Ergebnisse die Theorie von Jeon und Lambert. Fusionstranskripte ohne virale 3' UTR zeigen eine höhere Stabilität als rein virale Transkripte (Jeon and Lambert, 1995). Allerdings weisen HPKII Zellen überraschenderweise eine ähnliche Stabilität der rein viralen Transkripte auf, vergleichbar mit SiHa und CaSki (Abb. 3.23. Tab. 3.7.). Somit zeigt sich, dass auch rein virale Transkripte eine hohe RNA-Stabilität aufweisen können. Dies konnte auch durch Stabilitätsanalysen nach adenoviraler Transduktion von rein viralen bzw. authentischen Fusionstranskripten nachgewiesen werden (C. Driesch, I. Kraus, M. Dürst – nicht publizierte Daten). Zusätzlich wird anhand der hier gezeigten Ergebnisse jedoch auch deutlich, dass es einen Einfluss des jeweiligen zellulären Hintergrundes gibt. So weisen HPKI und II, trotz identischer Transkriptstruktur, unterschiedliche Stabilität auf (Abb. 3.23.).

Die Expression von rein viralen, kompletten frühen Transkripten in den HPK Zelllinien wurde durch den APOT Assay detektiert und durch qRT-PCR und nested PCR bestätigt. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit bereits publizierten Ergebnissen (Rohlf's *et al.*, 1991; Sherman *et al.*, 1992). Trotzdem liegen die HPV16 Genome in diesen Zelllinien

integriert, aber als Volllängengenome vor (siehe 3.4.2., (Durst *et al.*, 1987b)). Die Expression von kompletten viralen Transkripten ausgehend von Integraten steht im Widerspruch zu Beobachtungen an klinischen Proben bzw. CxCa-Zelllinien. In klinischen Proben wurden bei integrierter HPV DNA nur Integrat-abgeleitete Transkripte detektiert (Ziegert *et al.*, 2003), integrierte Volllängengenome werden durch Methylierung abgeschaltet (Van Tine *et al.*, 2004b) und eine E2 Expression, ausgehend von rein viralen frühen Transkripten, würde die Expression integrierter HPV Sequenzen reprimieren (Dowhanick *et al.*, 1995; Herdman *et al.*, 2006). Somit scheinen HPK Zellen eine Ausnahmestellung einzunehmen. Dies könnte durch die *in-vitro* Transfektion von primären Keratinozyten mit religierten HPV16 Genomen (Durst *et al.*, 1987b) bedingt sein. Die Religation linearer HPV16 Genome könnte das Entstehen von Katananen verursachen und somit die Integration von „head-to-tail“ HPV-Genom Anordnungen begünstigen. Des Weiteren wurde für die Transfektion der HPV16 Prototyp verwendet. Dieses erste HPV16 Isolat weist jedoch im Vergleich zum Wildtyp eine E1 frame-shift Mutation (Deletion nt1138) auf. Im Vergleich zum Wildtyp besitzt der Prototyp eine ca. 8-fach höhere Immortalisierungskapazität (Romanczuk and Howley, 1992). Während die Immortalisierungsfähigkeit des Wildtyps jedoch durch E2 Mutationen gesteigert werden kann, zeigt sich kein additiver Effekt für den Prototyp (Munger *et al.*, 1989; Romanczuk and Howley, 1992). Somit scheint der Prototyp aufgrund der E1 Mutation keinen zusätzlichen, im Normalfall durch die Integration verursachten, E2 Verlust für die Immortalisierung zu benötigen. Dies könnte die Expression von kompletten viralen Transkripten ausgehend von Integraten erklären. Trotzdem deutet dieser Umstand auf die Möglichkeit einer falschen Eingruppierung von Biopsien durch den APOT Assay hin. Theoretisch könnten komplette virale Transkripte zur Einordnung als Probe mit Episomen führen, obwohl sie von Integraten exprimiert werden. Ein genereller Fehler kann jedoch aufgrund der durch DNA- und RNA-Analysen übereinstimmend ermittelten Anteile von Episomen und Integraten in CxCa ausgeschlossen werden (siehe 1.3.).

4.7. Integration und Zervixkarzinogenese

Die Entstehung eines Tumors ist ein „evolutionärer“ Selektionsvorgang. Somit ist davon auszugehen, dass die in verschiedenen CxCa detektierten Zustände, die für die Tumorentstehung bzw. für die Aufrechterhaltung des Phänotyps jeweils optimalen Bedingungen ergeben. Zwar werden in der überwiegenden Mehrheit von HPV16 positiven CxCa integrierte Genome detektiert, aber eine endgültige Beurteilung der Bedeutung des

Integrationsereignisses ist bisher nicht möglich. Es wird sowohl die ursächliche Beteiligung an der Tumorentstehung, als auch das Auftreten der Integration als Folge bzw. Begleiterscheinung der Karzinogenese diskutiert. Falls eine eindeutige Entscheidung überhaupt möglich bzw. richtig ist, unterstützen die hier vorgestellten Ergebnisse eher die zweite Möglichkeit. Zumindest kann in den untersuchten Biopsien die bisher postulierte Überexpression von E6/E7 nach der Integration und ein dadurch hervorgerufener Wachstumsvorteil nicht nachgewiesen werden. Die Onkogenlevel unterscheiden sich nicht zwischen Proben mit episomalen oder integrierten HPV Genomen (siehe 4.3.). Die gleichzeitig starke Streuung und im Median ähnliche Expression in CIN und CxCa (siehe 3.2.2.) lässt vielmehr vermuten, dass die Integration eine konstitutive E6/E7 Expression ermöglicht. Dies steht im Widerspruch zum W12-Modellsystem, in dem der kausale Zusammenhang: Integration => E6/E7 Überexpression => genomische Instabilität gezeigt wurde (Alazawi *et al.*, 2002; Pett *et al.*, 2004). Diesem Modell widersprechen jedoch auch Daten einer Studie an klinischen Proben, die eine erhöhte genomische Instabilität in der Mehrzahl von Biopsien vor der Integration des viralen Genoms detektierte (Melsheimer *et al.*, 2004). Dies bestätigen *in-vitro* Ergebnisse, die eine erhöhte genomische Instabilität auch durch eine episodale E6/E7 Expression nachweisen (Duensing *et al.*, 2001). Außerdem konnte Kesis *et al.* zeigen, dass eine E6/E7 Expression die Integration von Fremd-DNA in das humane Genom erhöht (Kesis *et al.*, 1996). Des Weiteren deutet die häufige Integration in „common fragil sites“ (CFS) auf eine ungerichtete Insertion hin, die Bereiche betrifft, welche stark von der E6/E7 induzierten genomischen Instabilität betroffen sind (Thorland *et al.*, 2000; Wentzensen *et al.*, 2004). Trotzdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Integration in CFS einen Wachstumsvorteil bietet. So könnte sich die Chromatinstruktur im Bereich der CFS günstig auf die virale Expression auswirken.

Der direkte Einfluss der Integration, aufgrund einer erhöhten Onkogenexpression, erscheint anhand der hier vorgestellten Daten (siehe 4.4.) unwahrscheinlich. Allerdings existieren Daten, die eine Insertionsmutagenese mit potentiellen Auswirkungen auf die Karzinogenese nachweisen. So konnten Reuter *et al.* zeigen, dass durch Integration des HPV68 Genoms in der Zelllinie ME-180 das Tumorsuppressorgen APM-1 zerstört wird (Reuter *et al.*, 1998). Eine generelle Bedeutung des Verlustes dieses Gens beweisen qRT-PCR Daten, die eine integrationsunabhängige Supprimierung der APM-1 Expression während der Progression von Normalgewebe, zu CIN und weiter zum CxCa zeigen (Dürst M, Schwarz E; Vortrag 21. Internationale Papillomavirus Konferenz). Des Weiteren wurde eine gehäufte Integration in 8q24 nahe des c-myc Locus detektiert (Durst *et al.*, 1987a; Ferber *et al.*, 2003) und eine

Überexpression von c-myc in Zelllinien mit HPV-Integration in 8q24, im Vergleich zu Zelllinien mit anderen Integrationsorten, gezeigt (Peter *et al.*, 2006).

Außer den beiden extremen Beurteilungen der Integration: (i) direkte Beteiligung der Integration an der Zervixkarzinogenese und (ii) keine Beteiligung an der Tumorentstehung, wird auch eine indirekte Beteiligung diskutiert (Pett and Coleman, 2007). Typ I Interferon vermittelte anti-virale Mechanismen können zu einer Reduktion der episomalen Kopiezahl führen (Herdman *et al.*, 2006). Dabei wird eine Hemmung der episomalen Replikation aufgrund der Veränderung von „promyelocytic leukemia bodies“ (PML Körperchen), dem vermutlichen Ort der viralen Replikation, angenommen (Chelbi-Alix *et al.*, 1998; Day *et al.*, 2004; Herdman *et al.*, 2006). Somit besitzen Zellen mit latenten Integraten (reprimiert durch episomales E2) den Vorteil einer Interferon-resistenten Replikation und einer konstanten E6/E7 Onkogenexpression, auch nach Reduktion der episomalen Kopiezahl. Diese Theorie steht im Einklang mit den hier vorgestellten Daten (siehe 4.4.). Trotzdem sollten diese Ergebnisse aus dem W12-Modellsystem auch an klinischen Proben validiert werden. Unklar ist weiterhin der Grad der Reprimierung integrierter Genome durch episomales E2. In dieser Arbeit konnten in 20% der CxCa sowohl episomale als auch Integrat-abgeleitete Transkripte detektiert werden. Jedoch konnte nicht ermittelt werden, ob verschiedene Transkriptspezies in derselben Zelle vorliegen oder ob der Tumor diesbezüglich eine heterogene Zellpopulation aufweist.

5. Literaturverzeichnis

- Alazawi W, Pett M, Arch B, Scott L, Freeman T, Stanley MA *et al.* (2002). Changes in cervical keratinocyte gene expression associated with integration of human papillomavirus 16. *Cancer Res* **62**: 6959-65.
- Alfandari J, Shnitman Magal S, Jackman A, Schlegel R, Gonen P, Sherman L. (1999). HPV16 E6 oncoprotein inhibits apoptosis induced during serum-calcium differentiation of foreskin human keratinocytes. *Virology* **257**: 383-96.
- Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* **64**: 5245-50.
- Andersson S, Hansson B, Norman I, Gaberi V, Mints M, Hjerpe A *et al.* (2006). Expression of E6/E7 mRNA from 'high risk' human papillomavirus in relation to CIN grade, viral load and p16INK4a. *Int J Oncol* **29**: 705-11.
- Arias-Pulido H, Peyton CL, Joste NE, Vargas H, Wheeler CM. (2006). Human papillomavirus type 16 integration in cervical carcinoma in situ and in invasive cervical cancer. *J Clin Microbiol* **44**: 1755-62.
- Bakay M, Chen YW, Borup R, Zhao P, Nagaraju K, Hoffman EP. (2002). Sources of variability and effect of experimental approach on expression profiling data interpretation. *BMC Bioinformatics* **3**: 4.
- Baker CC, Phelps WC, Lindgren V, Braun MJ, Gonda MA, Howley PM. (1987). Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J Virol* **61**: 962-71.
- Baldus SE, Schwarz E, Lohrey C, Zapatka M, Landsberg S, Hahn SA *et al.* (2005). Smad4 deficiency in cervical carcinoma cells. *Oncogene* **24**: 810-9.
- Barbosa MS, Vass WC, Lowy DR, Schiller JT. (1991). In vitro biological activities of the E6 and E7 genes vary among human papillomaviruses of different oncogenic potential. *J Virol* **65**: 292-8.
- Bechtold V, Beard P, Raj K. (2003). Human papillomavirus type 16 E2 protein has no effect on transcription from episomal viral DNA. *J Virol* **77**: 2021-8.
- Birnboim HC. (1983). A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol* **100**: 243-55.
- Blaheta HJ, Roeger S, Sotlar K, Schittek B, Breuninger H, Bueltmann B *et al.* (2004). Additional reverse transcription-polymerase chain reaction of peripheral slices is not superior to analysis of the central slice in sentinel lymph nodes from melanoma patients. *Br J Dermatol* **150**: 477-83.
- Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. (2002). The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* **55**: 244-65.
- Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* **106**: 761-71.
- Briata P, Forcales SV, Ponassi M, Corte G, Chen CY, Karin M *et al.* (2005). p38-dependent phosphorylation of the mRNA decay-promoting factor KSRP controls the stability of select myogenic transcripts. *Mol Cell* **20**: 891-903.
- Buck CB, Pastrana DV, Lowy DR, Schiller JT. (2004). Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors. *J Virol* **78**: 751-7.
- Bustin SA. (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* **29**: 23-39.
- Cheadle C, Fan J, Cho-Chung YS, Werner T, Ray J, Do L *et al.* (2005). Control of gene expression during T cell activation: alternate regulation of mRNA transcription and mRNA stability. *BMC Genomics* **6**: 75.
- Chelbi-Alix MK, Quignon F, Pelicano L, Koken MH, de The H. (1998). Resistance to virus infection conferred by the interferon-induced promyelocytic leukemia protein. *J Virol* **72**: 1043-51.
- Choo KB, Pan CC, Han SH. (1987). Integration of human papillomavirus type 16 into cellular DNA of cervical carcinoma: preferential deletion of the E2 gene and invariable retention of the long control region and the E6/E7 open reading frames. *Virology* **161**: 259-61.
- Cole ST, Danos O. (1987). Nucleotide sequence and comparative analysis of the human papillomavirus type 18 genome. Phylogeny of papillomaviruses and repeated structure of the E6 and E7 gene products. *J Mol Biol* **193**: 599-608.
- Cooper K, Herrington CS, Stickland JE, Evans MF, McGee JO. (1991). Episomal and integrated human papillomavirus in cervical neoplasia shown by non-isotopic in situ hybridisation. *J Clin Pathol* **44**: 990-6.
- Day PM, Baker CC, Lowy DR, Schiller JT. (2004). Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 14252-7.
- de Boer MA, Jordanova ES, Kenter GG, Peters AA, Corver WE, Trimbois JB *et al.* (2007). High human papillomavirus oncogene mRNA expression and not viral DNA load is associated with poor prognosis in cervical cancer patients. *Clin Cancer Res* **13**: 132-8.
- de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology* **324**: 17-27.

- Delius H, Saegling B, Bergmann K, Shamanin V, de Villiers EM. (1998). The genomes of three of four novel HPV types, defined by differences of their L1 genes, show high conservation of the E7 gene and the URR. *Virology* **240**: 359-65.
- Dillon S, Sasagawa T, Crawford A, Prestidge J, Inder MK, Jerram J *et al.* (2007). Resolution of cervical dysplasia is associated with T-cell proliferative responses to human papillomavirus type 16 E2. *J Gen Virol* **88**: 803-13.
- DiPaolo JA, Woodworth CD, Popescu NC, Notario V, Doniger J. (1989). Induction of human cervical squamous cell carcinoma by sequential transfection with human papillomavirus 16 DNA and viral Harvey ras. *Oncogene* **4**: 395-9.
- Doorbar J. (2006). Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)* **110**: 525-41.
- Doorbar J, Ely S, Sterling J, McLean C, Crawford L. (1991). Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* **352**: 824-7.
- Doorbar J, Parton A, Hartley K, Banks L, Crook T, Stanley M *et al.* (1990). Detection of novel splicing patterns in a HPV16-containing keratinocyte cell line. *Virology* **178**: 254-62.
- Dowhanick JJ, McBride AA, Howley PM. (1995). Suppression of cellular proliferation by the papillomavirus E2 protein. *J Virol* **69**: 7791-9.
- Duensing S, Duensing A, Flores ER, Do A, Lambert PF, Munger K. (2001). Centrosome abnormalities and genomic instability by episomal expression of human papillomavirus type 16 in raft cultures of human keratinocytes. *J Virol* **75**: 7712-6.
- Duensing S, Lee LY, Duensing A, Basile J, Piboonnyom S, Gonzalez S *et al.* (2000). The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 10002-7.
- Duensing S, Munger K. (2004). Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins. *Int J Cancer* **109**: 157-62.
- Durst M, Croce CM, Gissmann L, Schwarz E, Huebner K. (1987a). Papillomavirus sequences integrate near cellular oncogenes in some cervical carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 1070-4.
- Durst M, Dzarlieva-Petrusevska RT, Boukamp P, Fusenig NE, Gissmann L. (1987b). Molecular and cytogenetic analysis of immortalized human primary keratinocytes obtained after transfection with human papillomavirus type 16 DNA. *Oncogene* **1**: 251-6.
- Durst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H. (1983). A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**: 3812-5.
- Durst M, Glitz D, Schneider A, zur Hausen H. (1992). Human papillomavirus type 16 (HPV 16) gene expression and DNA replication in cervical neoplasia: analysis by in situ hybridization. *Virology* **189**: 132-40.
- Durst M, Kleinheinz A, Hotz M, Gissmann L. (1985). The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumours. *J Gen Virol* **66** (Pt 7): 1515-22.
- Durst M, Seagon S, Wanschura S, zur Hausen H, Bullerdiek J. (1995). Malignant progression of an HPV16-immortalized human keratinocyte cell line (HPK1A) in vitro. *Cancer Genet Cytogenet* **85**: 105-12.
- Dyson N, Dembski M, Fattaey A, Ngwu C, Ewen M, Helin K. (1993). Analysis of p107-associated proteins: p107 associates with a form of E2F that differs from pRB-associated E2F-1. *J Virol* **67**: 7641-7.
- Dyson N, Guida P, Munger K, Harlow E. (1992). Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins. *J Virol* **66**: 6893-902.
- Evan GI, Vousden KH. (2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* **411**: 342-8.
- Evander M, Frazer IH, Payne E, Qi YM, Hengst K, McMillan NA. (1997). Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol* **71**: 2449-56.
- Fan J, Yang X, Wang W, Wood WH, 3rd, Becker KG, Gorospe M. (2002). Global analysis of stress-regulated mRNA turnover by using cDNA arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 10611-6.
- Favre M, Orth G, Croissant O, Yaniv M. (1975). Human papillomavirus DNA: physical map. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**: 4810-4.
- Ferber MJ, Thorland EC, Brink AA, Rapp AK, Phillips LA, McGovern R *et al.* (2003). Preferential integration of human papillomavirus type 18 near the c-myc locus in cervical carcinoma. *Oncogene* **22**: 7233-42.
- Figuroa A, Cuadrado A, Fan J, Atasoy U, Muscat GE, Munoz-Canoves P *et al.* (2003). Role of HuR in skeletal myogenesis through coordinate regulation of muscle differentiation genes. *Mol Cell Biol* **23**: 4991-5004.
- Frattoni MG, Laimins LA. (1994a). Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 12398-402.
- Frattoni MG, Laimins LA. (1994b). The role of the E1 and E2 proteins in the replication of human papillomavirus type 31b. *Virology* **204**: 799-804.

- Friedl F, Kimura I, Osato T, Ito Y. (1970). Studies on a new human cell line (SiHa) derived from carcinoma of uterus. I. Its establishment and morphology. *Proc Soc Exp Biol Med* **135**: 543-5.
- Funk JO, Waga S, Harry JB, Espling E, Stillman B, Galloway DA. (1997). Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev* **11**: 2090-100.
- Gammoh N, Grm HS, Massimi P, Banks L. (2006). Regulation of human papillomavirus type 16 E7 activity through direct protein interaction with the E2 transcriptional activator. *J Virol* **80**: 1787-97.
- Garneau NL, Wilusz J, Wilusz CJ. (2007). The highways and byways of mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 113-26.
- Gilsbach R, Kouta M, Bonisch H, Bruss M. (2006). Comparison of in vitro and in vivo reference genes for internal standardization of real-time PCR data. *Biotechniques* **40**: 173-7.
- Giroglou T, Florin L, Schafer F, Streeck RE, Sapp M. (2001). Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol* **75**: 1565-70.
- Gissmann L, Wolnik L, Ikenberg H, Koldovsky U, Schnurch HG, zur Hausen H. (1983). Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**: 560-3.
- Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. (2001). An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* **25**: 386-401.
- Gius D, Grossman S, Bedell MA, Laimins LA. (1988). Inducible and constitutive enhancer domains in the noncoding region of human papillomavirus type 18. *J Virol* **62**: 665-72.
- Gluzman Y. (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* **23**: 175-82.
- Goidin D, Mamessier A, Staquet MJ, Schmitt D, Berthier-Vergnes O. (2001). Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations. *Anal Biochem* **295**: 17-21.
- Gonzalez SL, Stremlau M, He X, Basile JR, Munger K. (2001). Degradation of the retinoblastoma tumor suppressor by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is important for functional inactivation and is separable from proteasomal degradation of E7. *J Virol* **75**: 7583-91.
- Grm HS, Massimi P, Gammoh N, Banks L. (2005). Crosstalk between the human papillomavirus E2 transcriptional activator and the E6 oncoprotein. *Oncogene* **24**: 5149-64.
- Hafner N, Driesch C, Gajda M, Jansen L, Kirchmayr R, Runnebaum IB *et al.* (2007a). Integration of the HPV16 genome does not invariably result in high levels of viral oncogene transcripts. *Oncogene*.
- Hafner N, Gajda M, Altgassen C, Hertel H, Greinke C, Hillemanns P *et al.* (2007b). HPV16-E6 mRNA is superior to cytokeratin 19 mRNA as a molecular marker for the detection of disseminated tumour cells in sentinel lymph nodes of patients with cervical cancer by quantitative reverse-transcription PCR. *Int J Cancer* **120**: 1842-6.
- Hamalainen HK, Tubman JC, Vikman S, Kyrola T, Ylikoski E, Warrington JA *et al.* (2001). Identification and validation of endogenous reference genes for expression profiling of T helper cell differentiation by quantitative real-time RT-PCR. *Anal Biochem* **299**: 63-70.
- Hanahan D, Weinberg RA. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57-70.
- Heilman CA, Law MF, Israel MA, Howley PM. (1980). Cloning of human papilloma virus genomic DNAs and analysis of homologous polynucleotide sequences. *J Virol* **36**: 395-407.
- Hengstermann A, Linares LK, Ciechanover A, Whitaker NJ, Scheffner M. (2001). Complete switch from Mdm2 to human papillomavirus E6-mediated degradation of p53 in cervical cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 1218-23.
- Herdman MT, Pett MR, Roberts I, Alazawi WO, Teschendorff AE, Zhang XY *et al.* (2006). Interferon-beta treatment of cervical keratinocytes naturally infected with human papillomavirus 16 episomes promotes rapid reduction in episome numbers and emergence of latent integrants. *Carcinogenesis* **27**: 2341-53.
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* **11**: 1026-30.
- Hopman AH, Kamps MA, Smedts F, Speel EJ, Herrington CS, Ramaekers FC. (2005). HPV in situ hybridization: impact of different protocols on the detection of integrated HPV. *Int J Cancer* **115**: 419-28.
- Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. (2005). Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* **6**: 279-84.
- Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM. (1991). A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *Embo J* **10**: 4129-35.
- Itoshima T, Fujiwara T, Waku T, Shao J, Kataoka M, Yarbrough WG *et al.* (2000). Induction of apoptosis in human esophageal cancer cells by sequential transfer of the wild-type p53 and E2F-1 genes: involvement of p53 accumulation via ARF-mediated MDM2 down-regulation. *Clin Cancer Res* **6**: 2851-9.
- Jeon S, Allen-Hoffmann BL, Lambert PF. (1995). Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J Virol* **69**: 2989-97.

- Jeon S, Lambert PF. (1995). Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 1654-8.
- Johnson PH, Grossman LI. (1977). Electrophoresis of DNA in agarose gels. Optimizing separations of conformational isomers of double- and single-stranded DNAs. *Biochemistry* **16**: 4217-25.
- Jones DL, Alani RM, Munger K. (1997). The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. *Genes Dev* **11**: 2101-11.
- Joyce JG, Tung JS, Przysiecki CT, Cook JC, Lehman ED, Sands JA *et al.* (1999). The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J Biol Chem* **274**: 5810-22.
- Kalantari M, Karlsen F, Kristensen G, Holm R, Hagmar B, Johansson B. (1998). Disruption of the E1 and E2 reading frames of HPV 16 in cervical carcinoma is associated with poor prognosis. *Int J Gynecol Pathol* **17**: 146-53.
- Kawana Y, Kawana K, Yoshikawa H, Taketani Y, Yoshiike K, Kanda T. (2001). Human papillomavirus type 16 minor capsid protein I2 N-terminal region containing a common neutralization epitope binds to the cell surface and enters the cytoplasm. *J Virol* **75**: 2331-6.
- Kessis TD, Connolly DC, Hedrick L, Cho KR. (1996). Expression of HPV16 E6 or E7 increases integration of foreign DNA. *Oncogene* **13**: 427-31.
- Kessis TD, Slebos RJ, Nelson WG, Kastan MB, Plunkett BS, Han SM *et al.* (1993). Human papillomavirus 16 E6 expression disrupts the p53-mediated cellular response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 3988-92.
- Kiyono T, Hiraiwa A, Fujita M, Hayashi Y, Akiyama T, Ishibashi M. (1997). Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 11612-6.
- Klaes R, Woerner SM, Ridder R, Wentzensen N, Duerst M, Schneider A *et al.* (1999). Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *Cancer Res* **59**: 6132-6.
- Klingelhutz AJ, Foster SA, McDougall JK. (1996). Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* **380**: 79-82.
- Konya J, Eklund C, af Geijerstam V, Yuan F, Stuber G, Dillner J. (1997). Identification of a cytotoxic T-lymphocyte epitope in the human papillomavirus type 16 E2 protein. *J Gen Virol* **78** (Pt 10): 2615-20.
- Kraus I, Molden T, Erno LE, Skomedal H, Karlsen F, Hagmar B. (2004). Human papillomavirus oncogenic expression in the dysplastic portio; an investigation of biopsies from 190 cervical cones. *Br J Cancer* **90**: 1407-13.
- Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH. (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* **387**: 299-303.
- Lambert PF. (1991). Papillomavirus DNA replication. *J Virol* **65**: 3417-20.
- Lancaster WD, Castellano C, Santos C, Delgado G, Kurman RJ, Jenson AB. (1986). Human papillomavirus deoxyribonucleic acid in cervical carcinoma from primary and metastatic sites. *Am J Obstet Gynecol* **154**: 115-9.
- Larionov A, Krause A, Miller W. (2005). A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinformatics* **6**: 62.
- Lechner MS, Mack DH, Finicle AB, Crook T, Vousden KH, Laimins LA. (1992). Human papillomavirus E6 proteins bind p53 in vivo and abrogate p53-mediated repression of transcription. *Embo J* **11**: 3045-52.
- Lee D, Kim HZ, Jeong KW, Shim YS, Horikawa I, Barrett JC *et al.* (2002). Human papillomavirus E2 down-regulates the human telomerase reverse transcriptase promoter. *J Biol Chem* **277**: 27748-56.
- Loo YM, Melendy T. (2004). Recruitment of replication protein A by the papillomavirus E1 protein and modulation by single-stranded DNA. *J Virol* **78**: 1605-15.
- Lossos IS, Czerwinski DK, Wechsler MA, Levy R. (2003). Optimization of quantitative real-time RT-PCR parameters for the study of lymphoid malignancies. *Leukemia* **17**: 789-95.
- Mandel M, Higa A. (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* **53**: 159-62.
- Masterson PJ, Stanley MA, Lewis AP, Romanos MA. (1998). A C-terminal helicase domain of the human papillomavirus E1 protein binds E2 and the DNA polymerase alpha-primase p68 subunit. *J Virol* **72**: 7407-19.
- McClintock B. (1951). Chromosome organization and genic expression. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **16**: 13-47.
- Melsheimer P, Vinokurova S, Wentzensen N, Bastert G, von Knebel Doeberitz M. (2004). DNA aneuploidy and integration of human papillomavirus type 16 e6/e7 oncogenes in intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the cervix uteri. *Clin Cancer Res* **10**: 3059-63.
- Middleton K, Peh W, Southern S, Griffin H, Sotlar K, Nakahara T *et al.* (2003). Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *J Virol* **77**: 10186-201.

- Mietz JA, Unger T, Huibregtse JM, Howley PM. (1992). The transcriptional transactivation function of wild-type p53 is inhibited by SV40 large T-antigen and by HPV-16 E6 oncoprotein. *Embo J* **11**: 5013-20.
- Mincheva A, Gissmann L, zur Hausen H. (1987). Chromosomal integration sites of human papillomavirus DNA in three cervical cancer cell lines mapped by in situ hybridization. *Med Microbiol Immunol* **176**: 245-56.
- Miyashita T, Reed JC. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* **80**: 293-9.
- Modis Y, Trus BL, Harrison SC. (2002). Atomic model of the papillomavirus capsid. *Embo J* **21**: 4754-62.
- Molden T, Kraus I, Karlsen F, Skomedal H, Nygard JF, Hagmar B. (2005). Comparison of human papillomavirus messenger RNA and DNA detection: a cross-sectional study of 4,136 women >30 years of age with a 2-year follow-up of high-grade squamous intraepithelial lesion. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **14**: 367-72.
- Moreno V, Bosch FX, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV, Walboomers JM *et al.* (2002). Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *Lancet* **359**: 1085-92.
- Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT. (1998). Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* **24**: 954-8, 960, 962.
- Munger K, Phelps WC, Bubb V, Howley PM, Schlegel R. (1989). The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol* **63**: 4417-21.
- Munoz N, Castellsague X, de Gonzalez AB, Gissmann L. (2006). Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* **24S3**: S1-S10.
- Nakagawa S, Yoshikawa H, Yasugi T, Kimura M, Kawana K, Matsumoto K *et al.* (2000). Ubiquitous presence of E6 and E7 transcripts in human papillomavirus-positive cervical carcinomas regardless of its type. *J Med Virol* **62**: 251-8.
- Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T *et al.* (2000). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* **288**: 1053-8.
- Ordonez RM, Espinosa AM, Sanchez-Gonzalez DJ, Armendariz-Borunda J, Berumen J. (2004). Enhanced oncogenicity of Asian-American human papillomavirus 16 is associated with impaired E2 repression of E6/E7 oncogene transcription. *J Gen Virol* **85**: 1433-44.
- Orth G, Favre M, Croissant O. (1977). Characterization of a new type of human papillomavirus that causes skin warts. *J Virol* **24**: 108-20.
- Ostor AG. (1993). Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol* **12**: 186-92.
- Palmer S, Wiegand AP, Maldarelli F, Bazmi H, Mican JM, Polis M *et al.* (2003). New real-time reverse transcriptase-initiated PCR assay with single-copy sensitivity for human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J Clin Microbiol* **41**: 4531-6.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* **55**: 74-108.
- Patillo RA, Hussa RO, Story MT, Ruckert AC, Shalaby MR, Mattingly RF. (1977). Tumor antigen and human chorionic gonadotropin in CaSki cells: a new epidermoid cervical cancer cell line. *Science* **196**: 1456-8.
- Peitsaro P, Johansson B, Syrjanen S. (2002). Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. *J Clin Microbiol* **40**: 886-91.
- Peter M, Rosty C, Couturier J, Radvanyi F, Teshima H, Sastre-Garau X. (2006). MYC activation associated with the integration of HPV DNA at the MYC locus in genital tumors. *Oncogene* **25**: 5985-93.
- Pett M, Coleman N. (2007). Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? *J Pathol* **212**: 356-67.
- Pett MR, Alazawi WO, Roberts I, Downen S, Smith DI, Stanley MA *et al.* (2004). Acquisition of high-level chromosomal instability is associated with integration of human papillomavirus type 16 in cervical keratinocytes. *Cancer Res* **64**: 1359-68.
- Pfaffl MW. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**: e45.
- Reuter S, Bartelmann M, Vogt M, Geisen C, Napierski I, Kahn T *et al.* (1998). APM-1, a novel human gene, identified by aberrant co-transcription with papillomavirus oncogenes in a cervical carcinoma cell line, encodes a BTB/POZ-zinc finger protein with growth inhibitory activity. *Embo J* **17**: 215-22.
- Reznikoff CA, Belair C, Savelieva E, Zhai Y, Pfeifer K, Yeager T *et al.* (1994). Long-term genome stability and minimal genotypic and phenotypic alterations in HPV16 E7-, but not E6-, immortalized human uroepithelial cells. *Genes Dev* **8**: 2227-40.
- Rohlf M, Winkenbach S, Meyer S, Rupp T, Durst M. (1991). Viral transcription in human keratinocyte cell lines immortalized by human papillomavirus type-16. *Virology* **183**: 331-42.
- Romanczuk H, Howley PM. (1992). Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 3159-63.

- Rosty C, Sheffer M, Tsafrir D, Stransky N, Tsafrir I, Peter M *et al.* (2005). Identification of a proliferation gene cluster associated with HPV E6/E7 expression level and viral DNA load in invasive cervical carcinoma. *Oncogene* **24**: 7094-104.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA *et al.* (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-4.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-7.
- Sathish N, Abraham P, Peedicayil A, Sridharan G, John S, Chandy G. (2004). Human papillomavirus 16 E6/E7 transcript and E2 gene status in patients with cervical neoplasia. *Mol Diagn* **8**: 57-64.
- Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM. (1993). The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* **75**: 495-505.
- Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* **63**: 1129-36.
- Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN, Glass AG, Cadell DM, Rush BB *et al.* (1993). Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* **85**: 958-64.
- Schneider-Gadicke A, Schwarz E. (1986). Different human cervical carcinoma cell lines show similar transcription patterns of human papillomavirus type 18 early genes. *Embo J* **5**: 2285-92.
- Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A *et al.* (1985). Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* **314**: 111-4.
- Seagon S, Durst M. (1994). Genetic analysis of an in vitro model system for human papillomavirus type 16-associated tumorigenesis. *Cancer Res* **54**: 5593-8.
- Sedman SA, Barbosa MS, Vass WC, Hubbert NL, Haas JA, Lowy DR *et al.* (1991). The full-length E6 protein of human papillomavirus type 16 has transforming and trans-activating activities and cooperates with E7 to immortalize keratinocytes in culture. *J Virol* **65**: 4860-6.
- Sherman L, Alloul N, Golan I, Durst M, Baram A. (1992). Expression and splicing patterns of human papillomavirus type-16 mRNAs in pre-cancerous lesions and carcinomas of the cervix, in human keratinocytes immortalized by HPV 16, and in cell lines established from cervical cancers. *Int J Cancer* **50**: 356-64.
- Slebos RJ, Kessis TD, Chen AW, Han SM, Hedrick L, Cho KR. (1995). Functional consequences of directed mutations in human papillomavirus E6 proteins: abrogation of p53-mediated cell cycle arrest correlates with p53 binding and degradation in vitro. *Virology* **208**: 111-20.
- Solinas-Toldo S, Durst M, Lichter P. (1997). Specific chromosomal imbalances in human papillomavirus-transfected cells during progression toward immortality. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 3854-9.
- Sotlar K, Stubner A, Diemer D, Menton S, Menton M, Dietz K *et al.* (2004). Detection of high-risk human papillomavirus E6 and E7 oncogene transcripts in cervical scrapes by nested RT-polymerase chain reaction. *J Med Virol* **74**: 107-16.
- Souzae F, Ntodou-Thome A, Tran CY, Rostene W, Forgez P. (1996). Quantitative RT-PCR: limits and accuracy. *Biotechniques* **21**: 280-5.
- Southern EM. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**: 503-17.
- Stahlberg A, Hakansson J, Xian X, Semb H, Kubista M. (2004). Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification. *Clin Chem* **50**: 509-15.
- Stanley MA, Browne HM, Appleby M, Minson AC. (1989). Properties of a non-tumorigenic human cervical keratinocyte cell line. *Int J Cancer* **43**: 672-6.
- Swift GH, Peyton MJ, MacDonald RJ. (2000). Assessment of RNA quality by semi-quantitative RT-PCR of multiple regions of a long ubiquitous mRNA. *Biotechniques* **28**: 524, 526, 528, 530-1.
- Thomas M, Banks L. (1999). Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types. *J Gen Virol* **80** (Pt 6): 1513-7.
- Thorland EC, Myers SL, Persing DH, Sarkar G, McGovern RM, Gostout BS *et al.* (2000). Human papillomavirus type 16 integrations in cervical tumors frequently occur in common fragile sites. *Cancer Res* **60**: 5916-21.
- Tong X, Salgia R, Li JL, Griffin JD, Howley PM. (1997). The bovine papillomavirus E6 protein binds to the LD motif repeats of paxillin and blocks its interaction with vinculin and the focal adhesion kinase. *J Biol Chem* **272**: 33373-6.
- Tricarico C, Pinzani P, Bianchi S, Paglierani M, Distante V, Pazzagli M *et al.* (2002). Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Anal Biochem* **309**: 293-300.
- Ustav M, Ustav E, Szymanski P, Stenlund A. (1991). Identification of the origin of replication of bovine papillomavirus and characterization of the viral origin recognition factor E1. *Embo J* **10**: 4321-9.

- van Regenmortel M, Fauquet C, Bishop D, Carstens E, Estes M, Lemon S *et al.* *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press: New York, San Diego.
- Van Tine BA, Dao LD, Wu SY, Sonbuchner TM, Lin BY, Zou N *et al.* (2004a). Human papillomavirus (HPV) origin-binding protein associates with mitotic spindles to enable viral DNA partitioning. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 4030-5.
- Van Tine BA, Kappes JC, Banerjee NS, Knops J, Lai L, Steenbergen RD *et al.* (2004b). Clonal selection for transcriptionally active viral oncogenes during progression to cancer. *J Virol* **78**: 11172-86.
- Van Trappen PO, Gyselman VG, Lowe DG, Ryan A, Oram DH, Bosze P *et al.* (2001). Molecular quantification and mapping of lymph-node micrometastases in cervical cancer. *Lancet* **357**: 15-20.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A *et al.* (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **3**: RESEARCH0034.
- von Knebel Doeberitz M, Bauknecht T, Bartsch D, zur Hausen H. (1991). Influence of chromosomal integration on glucocorticoid-regulated transcription of growth-stimulating papillomavirus genes E6 and E7 in cervical carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 1411-5.
- von Knebel Doeberitz M, Rittmuller C, zur Hausen H, Durst M. (1992). Inhibition of tumorigenicity of cervical cancer cells in nude mice by HPV E6-E7 anti-sense RNA. *Int J Cancer* **51**: 831-4.
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV *et al.* (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* **189**: 12-9.
- Wentzensen N, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M. (2004). Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer Res* **64**: 3878-84.
- Werness BA, Levine AJ, Howley PM. (1990). Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* **248**: 76-9.
- Wettstein FO, Stevens JG. (1982). Variable-sized free episomes of Shope papilloma virus DNA are present in all non-virus-producing neoplasms and integrated episomes are detected in some. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**: 790-4.
- White AE, Livanos EM, Tlsty TD. (1994). Differential disruption of genomic integrity and cell cycle regulation in normal human fibroblasts by the HPV oncoproteins. *Genes Dev* **8**: 666-77.
- Wong BC, Dennis Lo YM. (2006). Plasma RNA integrity analysis: methodology and validation. *Ann N Y Acad Sci* **1075**: 174-8.
- Wong ML, Medrano JF. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* **39**: 75-85.
- Woodman CB, Collins SI, Young LS. (2007). The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* **7**: 11-22.
- Zerfass-Thome K, Zwerschke W, Mannhardt B, Tindle R, Botz JW, Jansen-Durr P. (1996). Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene* **13**: 2323-30.
- Ziegert C, Wentzensen N, Vinokurova S, Kisseljov F, Eienkel J, Hoeckel M *et al.* (2003). A comprehensive analysis of HPV integration loci in anogenital lesions combining transcript and genome-based amplification techniques. *Oncogene* **22**: 3977-84.
- Zimmermann H, Degenkolbe R, Bernard HU, O'Connor MJ. (1999). The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300. *J Virol* **73**: 6209-19.
- zur Hausen H. (1976). Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Res* **36**: 794.
- zur Hausen H. (2000). Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* **92**: 690-8.
- zur Hausen H. (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* **2**: 342-50.

6. Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Dürst, für die Möglichkeit dieses Thema im Labor für „Gynäkologische Molekularbiologie“ bearbeiten zu können, für die hervorragende Betreuung und die ständige Bereitschaft zu konstruktiven Gesprächen.

Desweiteren bedanke ich mich bei Prof. Große und Prof. Gissmann für die Übernahme der Gutachten.

Mein Dank gilt weiterhin allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeiter des Forschungslabors, besonders Claudia, Katrin und Lars für die Unterstützung bei der täglichen Laborarbeit und der gesamten Gruppe für das angenehme Arbeitsklima.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei meinen Eltern, für die ständige, hilfreiche Unterstützung während meines Studiums und der Promotion.

Ebenso möchte ich mich bei meiner Freundin für die Unterstützung während der letzten Jahre und für das entgegengebrachte Verständnis für die zeitliche Belastung während der Promotion bedanken.

7. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbst und nur mit Unterstützung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt zu haben. Insbesondere wurden keine Textabschnitte eines Dritten ohne Kennzeichnung übernommen.

Jena, den 29.10.2007

Norman Häfner

8. Tabellarischer Lebenslauf

Name: Norman Häfner
Adresse: Dorfstrasse 60b
07646 Trockenborn
Telefon: 036428/41998
e-mail: norman.haefner@med.uni-jena.de

geb. am: 31.08.1977
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit : deutsch

Schulbildung und Wehrdienst

09/1984 – 08/1991	Polytechnische Oberschule Neustadt/Orla
09/1991 – 07/1996	Staatl. Gymnasium Neustadt/Orla – Abitur (Note 1,2)
09/1996 – 07/1997	Wehrdienst Gefechtsübungszentrum Heer, Born

Studium

10/1997 – 11/2002	Studium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena - Studiengang: Biochemie - Schwerpunkte: Molekularbiologie, Molekulare Medizin - Hilfswissenschaftler am Institut für Biochemie, FSU Jena - Diplomarbeit im Forschungslabor „Gynäkologische Molekularbiologie“ der Frauenklinik FSU Jena - Diplomnote 1,3
-------------------	---

Berufstätigkeit

seit 02/2003	Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Forschungslabor „Gynäkologische Molekularbiologie“
--------------	--

Publikationen

1. “HPV16-E6 mRNA is superior to Cytokeratin 19 mRNA as a Molecular Marker for the Detection of Disseminated Tumour Cells in Sentinel Lymph Nodes of Patients with Cervical Cancer by Quantitative Reverse-Transcription PCR.”, Häfner *et al.*; Int J Cancer 2007 May 1;120(9):1842-6
2. “Integration of the HPV16 genome does not invariably result in high levels of viral oncogene transcripts”, Häfner *et al.*; Oncogene 2007 (advanced online publication, 10 September 2007; doi:10.1038)

Jena, den 29.10.2007

N. Häfner

9. Anhang

9.1. Oligonukleotidübersicht

Assay	Genbank		Sequenz [5' - 3']	T _A [°C]
real-time PCR				
GAPDH 5'	M33197	F	GCCACATCGCTCAGACACCA	60
	nt 42-257	R	TGGCAACAATATCCACTTTACCAG	
GAPDH 3'	M33197	F	GCGACACCCACTCCTCCACC	60
	nt 923-1041	R	GAGGTCCACCACCCTGTTGC	
β-Actin	NM001101	F	GGACTTCGAGCAAGAGATGG	57
	nt 736-1031	R	GCAGTGATCTCCTTCTGCATC	
HPRT	NM000194	F	ACGAAGTGTGGATATAAGC	52
	nt 592-805	R	ATAATTTTACTGGCGATGTC	
UbcH5B (1)	NM003339	F	TGAAGAGAATCCACAAGGAATTGA	58
	nt 634-705	R	CAACAGGACCTGCTGAACACTG	
MLN51 (1)	NM007359	F	CAAGGAAGGTCGTGCTGGTT	59
	nt 1190-1253	R	ACCAGACCGGCCACCAT	
PGK1 (2)	NM000291	F	GGGAAAAGATGCTTCTGGGAA	59
	nt 462-536	R	TTGGAAAAGTGAAGCTCGGAAA	
TBP (2)	NM003194	F	GCACAGGAGCCAAGAGTGAAA	58
	nt 894-1021	R	TCACAGCTCCCCACCATGTT	
rib. S9	NM001013	F	TCAAATTTACCCTGGCCAAG	58
	nt 193-402	R	TGAAGACCTGGGTCTGCAG	
CK19 (3)	Y00503	F	TCGACAACGCCGCTCTG	61
	nt 496-603	R	CCACGCTCATGCGCAG	
		P	CCGAACCAAGTTTGAGACGGAACAGG	
β-Globin	NM000518	F	ACACAACGTGTTCACTAGC	56
	nt 14-124	R	CAACTTCATCCACGTTCCACC	
HPV16				
E6all	NC001526	F	AATGTTTCAGGACCCACAGG	58
	nt 103-226	R	CTCACGTCGCAGTAACTGTTG	
E6VL	NC001526	F	AATGTTTCAGGACCCACAGG	60
	nt 103-395	R	CACACAACGGTTTGTGTATTGCTG	
E6*I	NC001526	F	AATGTTTCAGGACCCACAGG	60
	nt 103-427 [#]	R	CTTTTGACAGTTAATACACCTCACG	
E2	NC001526	F	GCCAACGTTTAAATGTGTGTCAG	60
	nt 2768-2877	R	CACATTCTAGGCGCATGTGTTT	
E5	NC001526	F	CCACAACATTAAGTGGCGTGC	60
	nt 3871-4014	R	GCAGAGGCTGCTGTTATCCAC	
reverse Transkription				
Frohmann			GACTCGAGTCGACATCGA (T) ₁₇	
CDS			AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTAC (T) ₃₀ VN	
APOT				
Adapter p3		R	GACTCGAGTCGACATCG	59
HPV16F-701		F	CGGACAGAGCCCATTACAAT	59
HPV16F-728		F	CCTTTTGTGCAAGTGTGACTCTACG	67
Sonde E7			TCGTACTTTGGAAGACCTGTTAATG	
Sonde E4			GAAGAAACACAGACGACTATCCAG	

Fortsetzung Oligonukleotidübersicht

nested PCR				
HPV16-F44		F	GGTTGAACCGAAACCGGTTAGT	
CDS-R2		R	AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACT	
HPV16-F72		F	GCAGACATTTTATGCACCAAAGAGA	
HPV16-RE5		R	CATTATGTAATTAAAAAGCGTCATGT	

- (1) (Hamalainen *et al.*, 2001)
(2) (Lossos *et al.*, 2003)
(3) (Van Trappen *et al.*, 2001)

9.2. Plasmidübersicht

Plasmid	Vektor	Insert	Verwendung
HPV16	Bluescribe	HPV16 Gesamtgenom, DNA	Standard qPCR E6all, E6VL, E2, E5
pDEST-E6*I	pDEST	HPV16 early Transkript E6*I-E7-E1^E4-E5, cDNA	Standard qPCR E6*I
pCRII-GAPDH	pCRII	GAPDH partieller ORF, cDNA	Standard qPCR, 5'-3' Ratio, HKG
		β -Actin partieller ORF, cDNA	Standard qPCR, HKG
		HPRT partieller ORF, cDNA	Standard qPCR, HKG
pCRII-TBP	pCRII-Topo	TBP partieller ORF, cDNA	Standard qPCR, HKG
pCRII-MLN51	pCRII-Topo	MLN51 partieller ORF, cDNA	Standard qPCR, HKG
pCRII-UbcH5B	pCRII-Topo	UbcH5B partieller ORF, cDNA	Standard qPCR, HKG
pCRII-PGK1	pCRII-Topo	PGK1 partieller ORF, cDNA	Standard qPCR, HKG
pCRIV-Globin	pCRIV-Topo	β -Globin partielle gDNA	Standard qPCR, Zellzahlbestimmung

9.3. Übersicht über die Medianwerte der viralen Genexpression

Median	E6all	E6 VL	E6*1	E2	E5	E6/E6VL	E5/E6all
epi (n=39)	32878	2869	13526	4237	35930	7,76	1,51
epi+int (n=13)	14263	2013	8780	1215	9768	8,63	0,71
int (n=31)	23292	1674	10202	31	35	18,14	0,00
CIN (n=31)	24323	3612	13526	3792	34019	6,64	1,51
CxCa (n=57)	22589	1937	10179	1065	7852	16,21	0,19
e-CIN (n=23)	34469	4582	14609	7214	49062	6,64	1,55
e+i CIN (n=2)	3960	1077	1856	1035	8615	6,25	1,37
i CIN (n=3)	24323	3958	13886	0	0	6,98	0,00
e CxCa (n=16)	31900	1998	10408	2795	31984	13,90	1,34
e+i CxCa (n=11)	27509	2066	13906	1215	9768	9,05	0,71
i CxCa (n=28)	22805	1668	10096	104	4	18,37	0,00

Dargestellt sind die Medianwerte der Expression der jeweiligen viralen Gene in verschiedenen Proben Gruppen. Verwendet wurden die normalisierten Expressionsdaten (siehe 2.2.4.1.). Rot hervorgehoben sind wichtige und im Text diskutierte Daten.

9.4. Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
BPV	Bovin Papillomavirus
bzw.	Beziehungsweise
C	Celsius
C	Cytosin
CDK	cyclin dependent kinase – Cyclin-abhängige Kinase
cDNA	complementary DNA (revers-transkribierte mRNA)
CIN	Cervical Intraepithelial Lesion
CKI	CDK-Inhibitor
C _t	Cycle Threshold
CxCa	cervical carcinoma - Gebärmutterhalskrebs
d.h.	dass heißt
dATP	Desoxyadenintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
dsDNA	Doppelstrang-DNA
dTTP	Desoxythymintriphosphat
E6-AP	E6-assoziiertes Protein
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EZM	extrazelluläre Matrix
F	forward (Primer-Orientierung)
FSU	Friedrich-Schiller-Universität
G	Guanosin
h	Stunde
HPV	Human Papillomavirus
HR	high-risk
IPTG	Isopropyl-Thio-β-D-Galactopyranosid
kb	Kilo-Basenpaare
LCR	Long Control Region
LR	low-risk
mA	Milliampere
min	Minuten
NaOH	Natronlauge
NCBI	National Center of Biotechnology Information
neg	negativ
nt	Nucleotide
OD	Optische Dichte
ORF	Open Reading Frame, Offenes Leseraster
ORI	origin of replication – Replikationsursprung
PBS	phosphat buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaktion
R	reverse (Primer-Orientierung)

RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunden
ssDNA	Einzelstrang-DNA
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borate-EDTA
UV	Ultraviolett
V	Volt
W	Watt
X-Gal	5-Bromo-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactosid