

**IDENTIFIKATION UND CHARAKTERISIERUNG VON
POTENTIELLEN BIOMARKERN FÜR DIE PERSISTENZ UND
PROGRESSION EINER HPV16-INFEKTION**

DISSERTATION

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

vorgelegt von
Anna Manawapat-Klopfer
aus Weingarten

Tübingen 2013

TAG DER MÜNDLICHEN QUALIFIKATION: 01.07.2013

DEKAN: PROF. DR. WOLFGANG ROSENSTIEL

1. BERICHTERSTATTER: PROF. DR. THOMAS IFTNER

2. BERICHTERSTATTER: PROF. DR. HANS-GEORG RAMMENSEE

1 ZUSAMMENFASSUNG	1
2 EINLEITUNG.....	3
2.1 Klassifizierung und Pathogenität humaner Papillomviren	3
2.2 Prophylaktische HPV-Impfung.....	5
2.3 Lebenszyklus und Replikation der Papillomviren	5
2.4 Genomorganisation der Papillomviren	6
2.5 Virale Proteine	7
2.5.1 E1 und E2 Proteine	7
2.5.2 Die Onkogene E6 und E7	8
2.6 Persistenz und Progression einer HPV-Infektion.....	9
2.7 Viruslast und Integration des Virusgenoms	11
2.8 Früherkennung und Diagnostik	11
2.9 Biomarker	13
2.10 Zielsetzung.....	14
3 Material und Methoden.....	16
Verwendete Abkürzungen.....	16
3.1 Material	18
3.1.1 Chemikalien	18
3.1.2 Fertige Reaktionssysteme und Reagenzien.....	18
3.1.3 Enzyme	19
3.1.4 Antikörper.....	19
3.1.5 Medien und Puffer	21
3.1.6 Medien für Bakterienkultur.....	23
3.1.7 Medien für die Zellkultur.....	24

3.1.8 Eukaryotische Zellen.....	25
3.1.9 Oligonukleotide	26
3.1.10 siRNAs.....	28
3.1.11 Plasmide und Vektoren	28
3.1.12 Geräte	29
3.1.13 Kleingeräte/Verbrauchsmaterialien	29
3.1.14 Studien und Probenmaterial	30
3.2 Methoden	35
3.2.1 Mikrobiologische Methoden	35
3.2.2 DNA-Methoden	35
3.2.2.1 Standardmethoden	35
3.2.2.2 Präparative Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	35
3.2.2.3 DNA-Fragmentelution aus Agarosegelen	36
3.2.2.4 Ligation von DNA-Fragmenten	36
3.2.2.5 Sequenzierung.....	36
3.2.2.6 DNA-Extraktion aus Biopsie-Material.....	36
3.2.2.7 DNA-Extraktion aus Zellen.....	36
3.2.2.8 Multiplex qRT PCR.....	37
3.2.3 RNA-Methoden.....	38
3.2.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen.....	38
3.2.3.2 RNA Isolation aus PBS Abstrichen	38
3.2.3.3 RNA Isolation aus Dünnschichtzytologie-Material	39
3.2.3.4 Synthese von copy-DNA	39
3.2.3.5 RT-PCR	40
3.2.3.6 Quantitative Real Time PCR.....	40
3.2.4 Zellkultur-Methoden	41
3.2.4.1 Kultivierung von Säugerzellen und Arbeiten mit Säugerzellen	41

3.2.4.2 Mitomycinbehandlung von NIH3T3-J2	42
3.2.4.3 Ernten von Zellen.....	42
3.2.4.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen	42
3.2.4.5 DNA Transfektion von Humanzellen mit einem Komplexbildner	43
3.2.4.6 siRNA Transfektion von Humanzellen mit einem Komplexbildner	43
3.2.4.7 Behandlung der Zellen mit MG132	43
3.2.5 Proteinbiochemische-Methoden	44
3.2.5.1 Herstellung von Zellextrakten aus eukaryoten Zellen.....	44
3.2.5.2 SDS-Gelelektrophorese	44
3.2.5.3 Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose-Membran (Immunoblot)	44
3.2.5.4 Immunologischer Nachweis der transferierten Proteine.....	45
3.2.5.5 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse von Proteinen.....	46
3.2.5.6 Herstellung des Antikörpers TMEM45A-K.....	46
4 ERGEBNISSE	47
4.1 Viruslast und Integrationsstatus als potentielle Marker für die Persistenz und Progression einer HPV16-Infektion (Junge Dänische Kohorte).....	47
4.1.1 Die HPV16 Viruslast ist in transienten und persistenten HPV16-Infektionen signifikant unterschiedlich	48
4.1.2 Die HPV16 Viruslast ist kein potentieller Marker für die Progression einer persistenten HPV16-Infektion	49
4.1.3 Der Integrationsstatus des HPV16 Genoms ist in transienten und persistenten HPV16-Infektionen signifikant unterschiedlich	51
4.1.4 Der Integrationsstatus ist kein potentieller prädiktiver Marker für die Progression einer persistenten HPV16-Infektion	52
4.1.5 Korrelationen von Viruslast und Integrationsstatus über die Zeit	54
4.2 Viruslast und Integrationsstatus als potentielle Marker für die Persistenz einer HPV16-Infektion in einer größeren prospektiven Dänischen Kohorte („LBC Kohorte“) mit 40 382 Frauen zwischen 14 und 96 Jahren	56
4.2.1 Etablierung einer Multiplex Real Time PCR zur Bestimmung der Viruslast und des Integrationsstatus in HPV16-positiven Proben	57

4.2.2 Die Viruslast ist möglicherweise ein potentieller Marker für eine transiente oder persistente HPV16-Infektion	61
4.2.3 Der Integrationsstatus ist kein potentieller Marker für eine transiente oder persistente HPV16-Infektion	62
4.2.4 Korrelationen von Viruslast und Integrationsstatus über die Zeit	63
4.2.5. Vergleich der Methoden zur Viruslast und Integrationsbestimmung.....	64
4.3 Identifikation von potentiellen mRNA Markern für die Persistenz und Progression einer HPV16-Infektion.....	66
4.3.1 Validierung der Microarray Analyse „HPV-negative Frauen vs. HPV16 persistent infizierte Frauen“ mittels quantitativer Real Time PCR.....	67
4.3.2 Die potentiellen Marker <i>p16/CDKN2A</i> und <i>TMEM45a</i> unterscheiden zwischen progredierenden und nicht progredierenden persistenten HPV16-Infektionen	69
4.4 <i>TMEM45a</i> - Charakterisierung des potentiellen Markers für persistierende und progredierende und/oder prävalente HPV16-Infektionen	70
4.4.1 Proteinnachweis von <i>TMEM45a</i>	70
4.4.2 Identifikation einer weiteren Transkriptvariante von <i>TMEM45a</i> durch RT-PCR.....	78
4.4.3 <i>TMEM45a</i> mRNA- und Proteinmengen in HPV-negativem und HPV-positivem Zellkulturmaterial	81
4.4.4 <i>TMEM45a</i> mRNA wird in HPV-positiven Zellen durch Hypoxie induziert	82
4.4.5 Der „Knock-down“ von <i>TMEM45a</i> führt zu morphologischen Veränderungen, Ablösung und Tod von Zellen	86
4.4.6 <i>TMEM45a</i> ist im Golgi-Apparat und in Vesikeln lokalisiert	89
5 DISKUSSION.....	92
5.1 Viruslast und Integrationsstatus.....	92
5.2. <i>TMEM45A</i> und <i>p16/CDKN2A</i> als neue potentielle Marker für die Persistenz und Progression einer HPV16 Infektion.....	95
5.3 Charakterisierung von <i>TMEM45A</i>	97
5.4 Fazit.....	101
6 LITERATURVERZEICHNIS.....	102

7 ANHANG.....	111
7.1 Sequenzvergleich der TMEM45a Transkriptvarianten	111
8 AKADEMISCHER LEBENSLAUF	113
9 PUBLIKATIONEN	114
10 DANKSAGUNGEN	115

1 ZUSAMMENFASSUNG

Eine persistente Infektion mit einem Hochrisiko (HR)-Typ humaner Papillomviren (HPV) ist ein notwendiger Risikofaktor für die Entstehung von zervikalen Krebsvorstufen und eines Zervixkarzinoms. Infektionen mit humanen Papillomviren sind häufig, jedoch verlaufen die meisten HPV-Infektionen transient und heilen spontan aus. In weniger als 30% der Fälle gelingt es dem Virus, sich langfristig zu etablieren und die Infektion bleibt bestehen. Eine Progression dieser persistenten Infektionen kann in ca. 50% dieser Fälle beobachtet werden. In prä-invasiven Läsionen und Zervixkarzinomen wird HPV16 am häufigsten gefunden, jedoch erkranken nicht alle Frauen mit einer HPV16-Infektion. Dies lässt darauf schließen, dass weitere Faktoren einen Einfluss auf den Ausgang einer Infektion mit einem HR-HPV Typ haben. Ziel dieser Arbeit ist die Identifikation solcher potentiellen Biomarker, welche nach einer einmaligen Bestimmung eine Aussage über das Progressionsrisiko einer Frau mit einer persistenten HPV-Infektion treffen können. Mit Hilfe solcher Marker kann die Lebensqualität infizierter Frauen gesteigert, und die wirtschaftliche Belastung reduziert werden. Mit Hilfe einer ca. 11 000 Frauen umfassenden dänischen Kohorte („Junge Dänische Kohorte“) konnten zwei neue prädiktive Biomarker für die Entwicklung einer schweren Dysplasie oder eines Karzinoms in persistent HPV16-infizierten Frauen identifiziert werden: TMEM45a und p16/CDKN2A zeigen eine signifikant höhere Expression in Frauen, welche innerhalb einer medianen Nachbeobachtungszeit von 12,9 Jahren eine hochgradige zervikale Läsion oder schwerer (CIN3+) entwickelten, jedoch zum Zeitpunkt der Probenentnahme eine normale Zytologie aufwiesen.

Zuvor publizierte Ergebnisse, dass es sich bei TMEM45A um ein durch Hypoxie reguliertes Gen handelt, konnten bestätigt werden. Eine Induktion der TMEM45A mRNA unter hypoxischen Bedingungen konnte jedoch ausschließlich in HPV-haltigen Zellen beobachtet werden, in HPV-negativen Zelllinien blieb die Menge konstant oder wurde sogar reduziert. Ebenso konnten morphologische Zellveränderungen, Ablösen von Zellen und Zellsterben nach einem „Knock-down“ von TMEM45A durch siRNA nur in HPV-haltigen Zellen beobachtet werden. Eine anti-apoptotische Funktion wurde bereits beschrieben, jedoch konnte der Mechanismus, über den die anti-apoptotische Funktion vermittelt wird, nicht geklärt werden. Mittels RT-PCR wurde eine neue Transkriptvariante von TMEM45A identifiziert und es konnte gezeigt werden, dass sich das Protein in zytoplasmatischen Vesikeln befindet. Der Proteinnachweis von TMEM45A mittels Immunoblot war durch das Auftreten mehrerer unterschiedlich großer Banden erschwert. Nach der Analyse mehrerer kommerziell erhältlicher Antikörper, sowie der Herstellung eines weiteren α -TMEM45A-Antikörpers

konnte eine Bande identifiziert werden, deren Intensität sich durch Überexpression und siRNA „Knock-down“ spezifisch veränderte.

Als mögliche Marker für die Persistenz und Progression einer HPV16-Infektion werden weiterhin sowohl die Viruslast als auch der Integrationsstatus des viralen Genoms diskutiert. Beide Marker wurden in Proben der bereits erwähnten Dänischen Kohorte, sowie einer zweiten, ca. 42 000 Frauen umfassenden Kohorte („LBC-Kohorte“), mit Hilfe der quantitativen Real Time PCR (qRT PCR) bestimmt. Es konnten in der Jungen Dänischen Kohorte signifikante Unterschiede der Viruslast und des Integrationsstatus zwischen transienten und persistenten Infektionen, jedoch nicht zwischen nicht-progredierenden und progredierenden HPV16-Infektionen gefunden werden. Für die Validierung dieser Resultate wurde eine Multiplex-PCR zur simultanen Bestimmung der beiden viralen Proteine E2 und E6, sowie eines Referenzgens zur Zellzahlbestimmung, etabliert. Die Ergebnisse dieser Messungen in der LBC-Kohorte zeigten jedoch überraschenderweise keine signifikanten Unterschiede der potentiellen Marker zwischen transienten und persistenten Infektionen. Aufgrund der Inkonsistenz der Ergebnisse der Viruslast und des Integrationsstatus kann deshalb keine eindeutige Aussage über deren Rolle als Marker für die Persistenz einer HPV16-Infektion getroffen werden.

2 EINLEITUNG

2.1 Klassifizierung und Pathogenität humaner Papillomviren

Humane Papillomviren (HPV) sind kleine, unbehüllte, ikosaedrische DNA Viren, welche zusammen mit den animalen Papillomviren die Familie der Papillomaviridae bilden. Die Viruspartikel haben einen Durchmesser von etwa 55-60 nm und besitzen ein ca. 8 000 bp großes, kovalent geschlossenes, doppelsträngiges DNA Genom. Bisher wurden 143 humane Papillomviren beschrieben (<http://pave.niaid.nih.gov>), die einen strikten Gewebetropismus für Keratinozyten der Haut und Schleimhaut besitzen (David M Knipe; Peter M Howley; Bernard N Fields et al. 2007) und in kutane und genitale Papillomviren eingeteilt werden (de Villiers et al. 2004). Eine weitere Einteilung erfolgt in verschiedene Genera. Die größte und eine der am weitesten verbreiteten Gruppe, die Gruppe der α -Papillomviren, enthält kutane Typen wie HPV2, aber auch HPV-Typen, welche mit der Entstehung von Karzinomen des Anogenitaltraktes, v.a. der Zervix, assoziiert sind (Doorbar 2006). Die Infektion mit HPV-Typen der β 2-Gruppe wird hingegen mit der Entstehung des nicht-melanozytären Hautkrebses (Non-melanoma Skin Cancer, NMSC) in Zusammenhang gebracht (Forslund et al. 2007). Weiterhin verursacht das Virus gutartige genitale Kondylome, niedrig- und hochgradige Dysplasien und unterschiedliche Karzinome des Anogenitaltraktes bei Männern und Frauen. Humane Papillomviren sind ebenfalls verantwortlich für die rezidivierende respiratorische Papillomatose (RRP) und für warzenartige Läsionen der Schleimhäute, der Mundhöhle und des Oropharynx, von denen manche zu Karzinomen progredieren können. Aufgrund des unterschiedlichen karzinogenen Potenzials werden Papillomviren in Hochrisiko- („high risk“, HR) und Niedrigrisiko („low-risk“, LR)-Typen eingeteilt (de Villiers et al. 2004; Munoz et al. 2006). Infektionen mit Niedrigrisikotypen verursachen hauptsächlich gutartige Tumoren oder Genitalwarzen, die oftmals spontan regredieren. Aufgrund ihrer Assoziation mit zervikalen Läsionen wurden die HPV-Typen 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 56, 58, 59 und 66 als Typ 1/2a karzinogen für den Menschen klassifiziert, was angibt, dass diese Viren das Potenzial besitzen, Krebs zu verursachen (Schiffman et al. 2009). Erwiesenermaßen haben HPV16 und HPV18 ein größeres karzinogenes Potenzial als andere HPV Typen. Studien zeigten, dass während 26,7% der einmalig HPV16-positiven und 19,7% der HPV18-positiven Frauen ein CIN3 entwickelten, sind es bei den übrigen HR-HPV Typen nur 6% der Frauen mit einem schweren Verlauf (Nielsen et al. 2010). HPV16 und 18 werden in den meisten zervikalen Läsionen gefunden und verursachen ca. 70% aller Zervixkarzinome (Smith et al. 2007). HPV18 ist der HPV Typ, der am stärksten mit Adenokarzinomen der Zervix assoziiert ist und darüber hinaus sind HPV16 und 18 die

vorwiegend gefundenen HPV Typen in Plattenepithelkarzinomen („squamous cell carcinoma“, SCC) (Munoz et al. 2003; Clifford et al. 2006).

Gebärmutterhalskrebs ist weltweit die zweithäufigste Krebsart bei Frauen mit ungefähr 530 000 Neuerkrankungen und 275 000 Todesfällen jährlich (2008). Mehr als 85% dieser Fälle treten in Entwicklungsländern auf und in manchen Regionen ist das Zervixkarzinom die häufigste Krebsart bei Frauen ((Parkin et al. 2005); <http://globocan.iarc.fr/>). Obgleich Gebärmutterhalskrebs in Industrieländern aufgrund effizienter Vorsorge-Programme nicht mehr so häufig ist, wurden dennoch im Jahr 2000 in Europa 65 000 Neuerkrankungen registriert. Gebärmutterhalskrebs wird durch eine persistente Infektion mit HR-HPV Typen verursacht. Die zervikale HPV-Infektion ist die häufigste sexuell übertragbare Infektion und die meisten Frauen werden kurz nach ihrem ersten sexuellen Kontakt infiziert (Collins et al. 2002). Die höchste Prävalenz wird bei Frauen unter 25 beobachtet (Castle et al. 2005; Franceschi et al. 2006; Iftner et al. 2010). Ein Zervixkarzinom entsteht aus Krebsvorstufen (Präkanzerosen), welche in milde Dysplasien (*Cervical intraepithelial neoplasia*, CIN 1), mäßige Dysplasien (CIN 2) und schwere Dysplasien (CIN 3 und *carcinoma in situ*, CIS) eingeteilt werden. Diese Zellveränderungen finden im Bereich der Transformationszone statt, in welchem Zylinderepithel in nicht verhornendes Plattenepithel umgewandelt wird (Metaplasie). Die präkanzerösen Läsionen CIN 1 und CIN 2 können sich häufig spontan zurückbilden (57% bzw. 47%), während eine schwere Dysplasie unbehandelt bei 30-70% der Patientinnen in ein invasives Zervixkarzinom übergeht (Ostor 1993). Ein Zervixkarzinom entwickelt sich somit nur in einer vergleichsweise geringen Anzahl von HPV-infizierten Frauen. Somit kann weder die Detektion zervikaler Abnormitäten, noch die Detektion von HPV ausreichend dazu beitragen, zwischen Infektionen ohne schweren klinischen Verlauf oder mit der Entstehung von Krebsvorstufen/Karzinom zu unterscheiden. In einer prospektiven Kohorte haben 46% aller Frauen mit einer persistenten HPV16-Infektion innerhalb einer medianen Nachverfolgungszeit von 12,9 Jahren ein Karzinom (oder dessen Vorstufen) entwickelt (Kjaer et al. 2010). Weitere prospektive Studien (Castle et al. 2002; Khan et al. 2005; Schiffman et al. 2005) zeigen, dass der Hauptfaktor für die Krebsentstehung bei Frauen mit ursprünglich normaler Zytologie, eine Infektion mit einem HR-HPV Typ ist. Ungefähr 17% der Frauen mit einem negativen Papanicolaou (Pap)-Abstrich und einem positiven HR-HPV Test entwickelten innerhalb von 5 Jahren einen abnormalen Pap-Test (Castle et al. 2002; Dillner et al. 2008) und 13,6% entwickelten innerhalb von 12,9 Jahren eine zervikale intraepitheliale Neoplasie 3. Grades (CIN3) oder ein Karzinom (Kjaer et al. 2010).

2.2 Prophylaktische HPV-Impfung

Seit 2006 ist durch kommerziell erhältliche Impfstoffe der Schutz vor der Infektion mit HPV16 und HPV18 und der damit verbundenen Entstehung von Gebärmutterhalskrebs, möglich. Der quadrivalente HPV-Impfstoff von Merck & Co. (Gardasil®) schützt vor Infektionen mit den HR-HPV Typen 16 und 18 und den LR Typen 6 und 11, der bivalente Impfstoff Cervarix® von GlaxoSmithKline GmbH & Co. KG schützt vor Infektionen mit den HR-Typen 16 und 18. Da die HPV Typen 16 und 18 für ungefähr 70% aller Zervixkarzinome (Bosch et al. 1995; Walboomers et al. 1999) und für 60% aller Vorstufen verantwortlich sind, ersetzen diese Impfungen nicht die Krebsvorsorgeuntersuchung, bieten aber zusätzlichen Schutz für die teilnehmenden Frauen zukünftiger Früherkennungsprogramme. Das empfohlene Alter für die Impfung liegt unter 18 Jahren bzw. vor dem ersten sexuellen Kontakt (Empfehlung der STIKO, Ständige Impfkommision). Der schützende Effekt ist weitaus geringer in älteren Frauen, welche bereits HR-HPV Typen ausgesetzt waren (Munoz et al. 2009). Da bis heute ist kein multivalenter Impfstoff gegen alle HPV-Typen erhältlich ist und in der Regel nur Frauen unter 18 Jahre geimpft werden, wird die Anzahl der Zervixkarzinome und dessen Vorstufen in den kommenden 40-50 Jahren weiterhin hoch bleiben. Zudem ist die Akzeptanz in Ländern mit opportunistischer Impfung, wie beispielsweise in Deutschland, nicht höher als 39% (Schätzung Robert Koch-Institut) was zusätzlich den Effekt der Impfung verringert und das Erreichen einer hohen Durchimpfungsrate verzögert. Die Impfung kann nicht als Ersatz für die Krebsfrüherkennung dienen und somit müssen auch geimpfte Frauen an den Früherkennungsprogrammen teilnehmen.

2.3 Lebenszyklus und Replikation der Papillomviren

Papillomviren infizieren die basalen Stammzellen der Epidermis, nachdem das Virus durch Mikroläsionen in das Epithel eindringt. Der Replikationszyklus ist abhängig vom Differenzierungsgrad der Epithelzellen (David M Knipe; Peter M Howley; Bernard N Fields et al. 2007). In den undifferenzierten basalen Epithelschichten werden nur die frühen viralen Gene exprimiert, was zu einer Etablierung der viralen DNA mit 10-100 episomalen Kopien des Genoms pro Zelle führt (Sedman and Stenlund 1996; Stubenrauch and Laimins 1999). Mit zunehmender Differenzierung der Keratinozyten beginnt die produktive Phase. Es kommt zu einer verstärkten Replikation der viralen DNA und zur Expression der späten Gene, was schließlich zur Bildung infektiöser Viruspartikel führt (David M Knipe; Peter M Howley; Bernard N Fields et al. 2007, Stubenrauch and Laimins 1999). Diese Viruspartikel werden an der Epitheloberfläche durch das natürliche Absterben der Hautzellen freigesetzt (Abb. 1) (Munger et al. 2004).

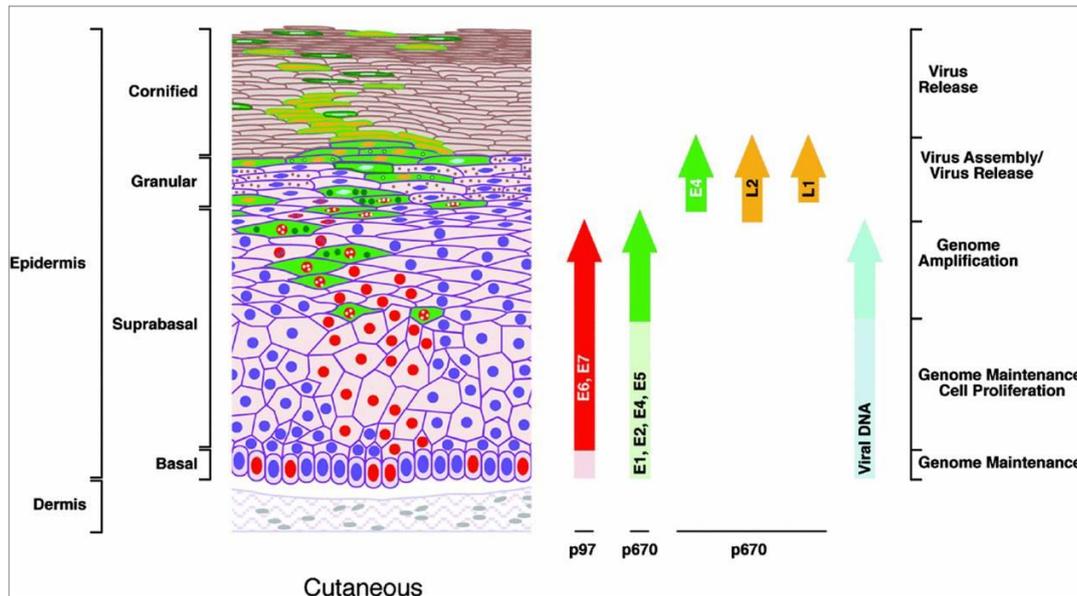


Abb. 1 Lebenszyklus der Papillomviren

Die Genexpression ist ebenso wie die Replikation abhängig vom Differenzierungsgrad der Wirtszelle. In den basalen Epithelzellen findet die Expression der frühen Gene statt, das Virusgenom liegt in niedrigen Kopienzahlen vor. Mit zunehmender Differenzierung beginnt die Replikation und im Anschluss die Expression der späten Gene L1 und L2. Die viralen Partikel werden in den oberen Schichten freigesetzt. Abbildung modifiziert nach (Doorbar 2006).

2.4 Genomorganisation der Papillomviren

Das doppelsträngige zirkuläre Genom der Papillomviren kann in drei Bereiche eingeteilt werden: frühe Region (early, E), späte Region (late, L) und regulatorische Region (long control region (LCR), upstream regulatory region (URR) oder non-coding region (NCR)). Diese sind durch zwei Poly-Adenylierungssignale (pA) getrennt: dem frühen und dem späten pA, die sich am Anfang bzw. am Ende der späten Region befinden. Die späte Region (ca. 40% des Genoms) kodiert für die Strukturproteine L1 und L2, welche zusammen das ikosaedrische Kapsid bilden. Die nichtkodierende Region (ca. 10% des Genoms) umfasst einen Bereich von ca. 850 Basenpaaren und hat keine proteinkodierende Funktion. Sie beinhaltet den Replikationsursprung, sowie Transkriptionselemente für die Genexpression (Ustav et al. 1991; Ustav et al. 1993; Kanaya et al. 1997). Die frühe Region (ca. 50% des Genoms) kodiert für sechs offene Leseraster (E1, E2, E4, E5, E6 und E7; Abb.2) (Danos et al. 1982). Zusätzlich konnte für einige Papillomviren ein E8-Leserahmen identifiziert werden, welcher vermutlich nur von einer gespleißten mRNA in Form des E8^{E2C} Fusionsproteins exprimiert wird (Doorbar et al. 1990; Stubenrauch et al. 2000; Jeckel et al. 2003). Die Expression der polycistronischen Transkripte von HR-HPV Typen wird durch frühe (HPV16: p97, HPV18: p105, HPV31: p97) und späte (HPV16: p670, HPV31: p742) Promotoren reguliert (Hummel et al. 1992; Grassmann et al. 1996).

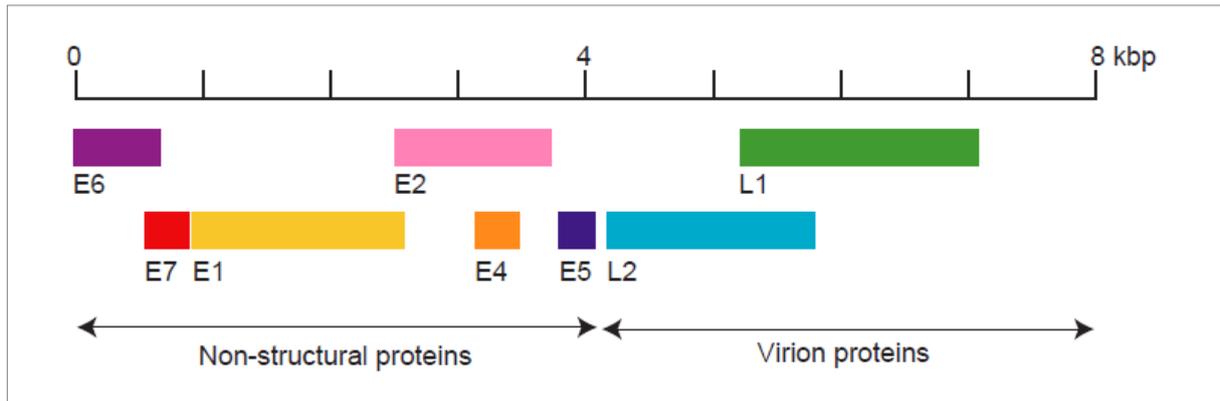


Abb. 2 Vereinfachte (linearisierte) Organisation des HPV16 Genoms

Die Rechtecke stellen die Positionen der unterschiedlichen Leserahmen dar. Die E Gene kodieren für Proteine die zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion produziert werden, während die L Gene für Proteine kodieren, die im späten Stadium der Infektion produziert werden (Man 1998).

2.5 Virale Proteine

2.5.1 E1 und E2 Proteine

Die viralen Proteine E1 und E2 spielen eine essentielle Rolle bei der Replikation von Papillomviren (Ustav et al. 1991). Beide Proteine binden an die LCR (Spalholz et al. 1987), wobei E2 die Bindung des E1 Proteins, welches DNA-Helikase-Aktivität besitzt (Masterson et al. 1998), an die DNA verstärkt (Frattini and Laimins 1994). Weiterhin rekrutiert E2 zelluläre Replikationsproteine und initiiert damit die virale Replikation (Frattini and Laimins 1994). E2 verfügt über eine konservierte N-terminale Transaktivierungsdomäne (ca. 200 AS) und eine konservierte C-terminale DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne (ca. 90 AS), welche durch die nicht-konservierte Hinge-Region verbunden sind. Desweiteren inhibiert E2 die Aktivität des frühen Promotors, der u.a. für die Expression der Onkoproteine E6 und E7 verantwortlich ist. Häufig wird bei der Integration des viralen Genoms in das Wirtszellgenom der E2-ORF unterbrochen. Durch die fehlende E2-Repression der E6 und E7 Transkription werden diese Onkogene unkontrolliert exprimiert, was die maligne Entartung begünstigt (Turek 1994; Park et al. 1997; Corden et al. 1999; Pett et al. 2004). Wird z.B. exogenes E2 in HPV-positive Zervixkarzinomzelllinien wie z.B. HeLa-Zellen, die kein endogenes E2 exprimieren, eingebracht, führt dies zur Repression der E6 und E7 Transkription und zur Inhibition des Zellwachstums durch Reaktivierung der p53- und pRB Signalwege (Hwang et al. 1993; Dowhanick et al. 1995; Hwang et al. 1996; Naeger et al. 1999; Wells et al. 2000; Johung et al. 2007; Stubenrauch et al. 2007).

2.5.2 Die Onkogene E6 und E7

Für die Entartung von HR-HPV infizierten Zellen sind die viralen Onkoproteine E6 und E7 von großer Bedeutung (Munger et al. 1989). Papillomviren greifen mit Hilfe dieser Onkogene in Signalwege der Zelle ein, die den Zellzyklus kontrollieren (Hawley-Nelson et al. 1989). Die E7-Proteine der HR-HPV Typen können Mitglieder der Retinoblastom-Proteinfamilie binden (pRB, p107 und p130) und so ihre Funktionen inhibieren (Dyson et al. 1989; Jones and Munger 1996). In nicht HPV-infizierten Zellen inhibieren diese Tumorsuppressorproteine Mitglieder der zellulären E2F-Transkriptionsfaktorfamilie und unterbinden die Expression S-Phase-spezifischer Gene. Der Übergang in die S-Phase wird hiermit verhindert. In HPV-negativen Zellen wird pRb durch Cyclin-abhängige Kinasen (CyclinD/Cdk4/6) von E2F gelöst, was daraufhin zur Aktivierung bestimmter Gene führt, die für die DNA-Synthese benötigt werden (Stevaux and Dyson 2002) (Abb. 3A). Das Protein p16^{INK4a} ist für die Regulation der aktiven Mengen von CyclinD/Cdk in der Zelle verantwortlich und bietet somit einen Rückkopplungsmechanismus um die Expression derjenigen Proteine, die verantwortlich sind für die S-Phase Progression, zu regulieren. P14^{ARF}, ein alternatives Spleißprodukt des CDKN2A-Gens, reguliert die Aktivität der E3 Ubiquitin-Protein Ligase MDM2 (Mouse double minute 2 homolog), welches wiederum die p53 Menge reduziert um einen Zellzyklusarrest oder Apoptose zu verhindern (Zhang et al. 1998).

Bindet E7 in HPV-infizierten Zellen an Rb-Proteine, wird dieses degradiert und E2F dissoziiert (Boyer et al. 1996; Huh et al. 2007) (Abb.3B). Dies führt zu einer E2F-stimulierten Expression zellulärer Proteine wie z.B. Cyclin A, D und E (Zerfass et al. 1995; Adams and Kaelin 1996), die für die S-Phase Progression benötigt werden (Stevaux and Dyson 2002). Da diese HPV-vermittelte Zellproliferation nicht von pRb abhängt, wird der p16^{INK4a}-abhängige Rückkopplungsmechanismus umgangen. Der daraus resultierende Anstieg von p14^{ARF} führt zur Inhibition der MDM2-Aktivität und einem Anstieg der p53 Menge. Dies wird jedoch durch die Präsenz von E6 verhindert. Die Ubiquitinligase E6AP (E6 associated protein) bindet über E6 an p53 was zu dessen Ubiquitinierung und dadurch zu einem verstärkten proteasomalen Abbau von p53 führt (Huibregtse et al. 1991; Scheffner et al. 1993). Weiterhin bindet E7 an die Cyclin-abhängigen Kinase (cdk)-Inhibitoren p21 und p27 (Funk et al. 1997; Helt et al. 2002). Die Fähigkeit von E7 zur Induktion der Zellzyklusprogression ist abhängig von der Menge an p21 und p27. In Zellen mit einem hohen p21/ p27 Level und geringer E7 Menge (wie z.B. in niedrig-gradigen Läsionen) kann es zur Bildung von inaktiven p21/E7/CyclinE-Komplexen kommen und somit die E7-vermittelte Zellproliferation inhibiert werden. Liegen p21 und p27 in geringen Mengen und E7 dagegen in hoher Konzentration vor (wie z.B. in zervikalen Krebszellen), kann diese Blockade durch die Bildung eines E7/p21-Komplexes und der resultierenden Inaktivierung, umgangen werden (Noya et al. 2001).

Die E6-vermittelte Degradation von p53 und die Eigenschaften von E7 führen somit zu einem Verlust der zellulären Zellzykluskontrolle und zur unkontrollierten Proliferation der infizierten Wirtszelle (Funk et al. 1997; Munger et al. 2001; Thomas et al. 1998). In HPV-positiven Zervixkarzinomen kann eine kontinuierliche Expression der E6/E7-Gene nachgewiesen werden (Jeon and Lambert 1995).

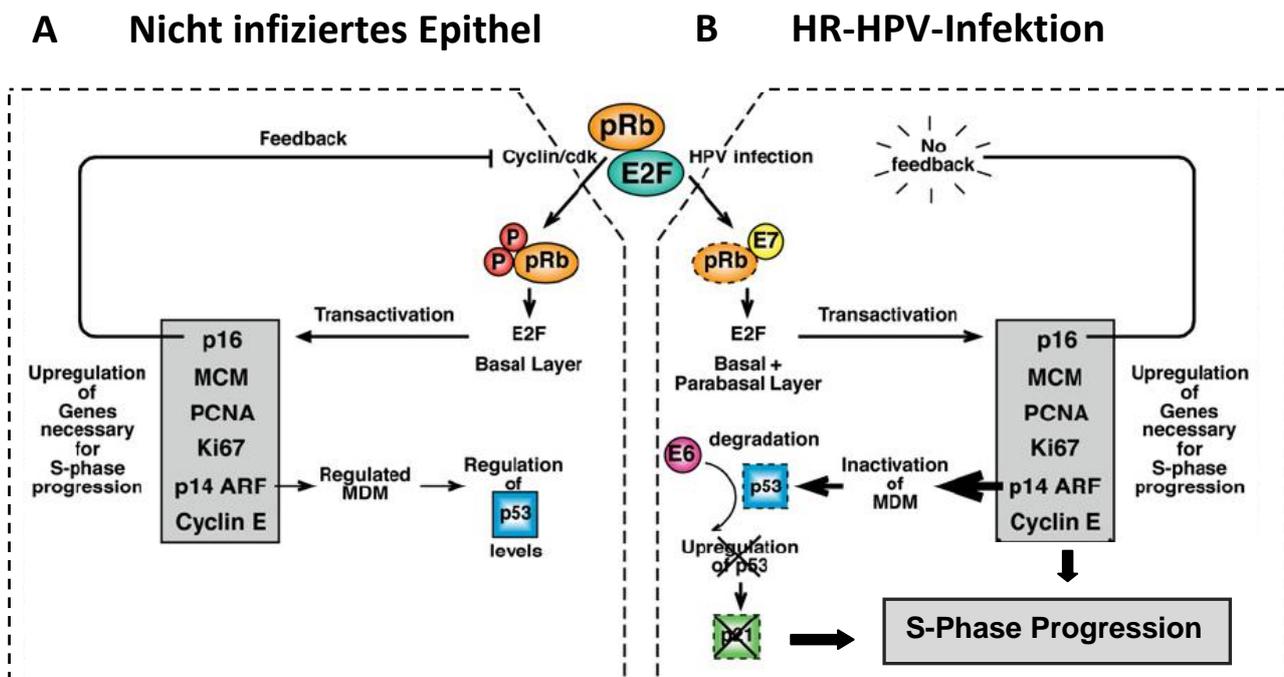


Abb. 3 In HR-HPV haltigen Zellen wird der Zellzyklus dereguliert und es kommt zur unkontrollierten Proliferation. Modifiziert nach (Doorbar 2006)

A: In einer nicht HPV-infizierten Zelle kontrolliert pRb die Expression zellulärer Proteine, welche für Progression des Zellzyklus verantwortlich sind. Wird Rb phosphoryliert, kommt es zur Freisetzung von E2F und zur Transaktivierung von Genen, die für die Regulation von MDM2 verantwortlich sind. Dadurch wird die Stabilität von p53 beeinflusst und somit bei Bedarf (z.B. durch Schäden die während der Teilung entstehen) ein Zellzyklusarrest oder Apoptose ausgelöst werden kann. Weiterhin wird p21, ein Inhibitor von Cyclin-abhängigen Kinasen (cdk), transaktiviert.

B: In einer HR-HPV-infizierten Zelle bindet E7 an pRb, es wird degradiert und E2F wird freigesetzt. Durch diese Freisetzung kommt es zur Expression von Proteinen die den G1/S-Übergang der Zelle regulieren. Vor dem Übergang in die S-Phase findet jedoch keine Kontrolle statt, da es durch die Anwesenheit von E6 zur Degradation von p53 durch E6 und E6AP kommt. Eine p53-induzierte Apoptose wird verhindert und es findet eine unkontrollierte Teilung der Zelle statt.

2.6 Persistenz und Progression einer HPV-Infektion

Die meisten HPV-Infektionen der Zervix sind asymptomatisch und ca. 70-85% der detektierten Infektionen werden innerhalb von zwei Jahren vom Immunsystem erkannt und eliminiert (Ostor 1993; Moscicki et al. 2006). Die Dauer einer transienten Infektion liegt zwischen 8 bis 15 Monaten

(Ho et al. 1998; Munoz et al. 2004). Ca. 30% der 20-29 Jahre alten Frauen sind nach 13,4 Jahren *follow-up* noch HPV16-positiv (Kjaer et al. 2010). Infektionen mit LR-HPV Typen dauern im Allgemeinen weniger lang, als solche mit HR-HPV Typen (Richardson et al. 2003). Ein weiterer Risikofaktor neben der Infektion mit einem HR-HPV Typ (Kjaer et al. 2002) ist möglicherweise eine hohe Viruslast (Dalstein et al. 2003; Syrjanen et al. 2005). 46% der Frauen mit einer persistenten HPV16-Infektion entwickeln Krebsvorstufen (Zervikale Intraepitheliale Neoplasie 3, CIN 3), welche zu einem invasivem Zervixkarzinom (invasive cervical cancer, ICC) progredieren können (Kjaer et al. 2010). Dies weist darauf hin, dass weitere Faktoren zur Progression einer HPV-Infektion zu Krebsvorstufen/einem Karzinom beitragen. Es wird vermutet, dass die Krebsentstehung schrittweise abläuft und ein Resultat mehrerer zusammenwirkender genetischer und epigenetischer Veränderungen ist, die zusammen zu einer unkontrollierten Zellproliferation führen. HR-HPV Typen können durch das Aussenden wachstumsfördernder Signale, die Störung der zellulären Proliferations-Kontrolle, die Anhäufung genetischer Veränderungen, die Schädigung der Erbinformation und die Unterdrückung der Immunantwort die Entstehung eines Karzinoms auslösen (zur Hausen 2006). Genetische und immunologische Wirtsfaktoren sowie virale Faktoren wie z.B. der Virustyp, der Genomstatus (integriert vs. episomal), die Viruslast und unterschiedliche individuelle Mengen viraler Transkripte tragen höchstwahrscheinlich zur Progression einer HPV-Infektion zu einem Zervixkarzinom bei. Mechanismen die zur Etablierung einer persistenten Infektion beitragen, sind jedoch noch weitgehende unbekannt.

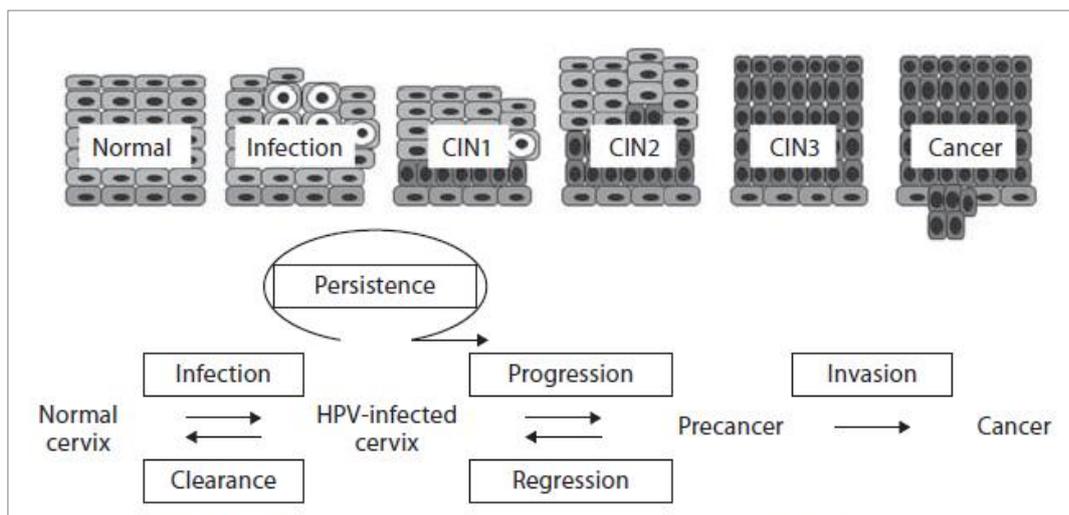


Abb. 4 Modell der zervikalen Karzinogenese

Infektionen mit HPV sind häufig, jedoch heilt die Mehrheit aller zervikalen Infektionen innerhalb von 2 Jahren wieder aus. Im Fall einer Persistenz kann es bei einem Teil der Infektionen zum Auftreten abnormaler Zellen kommen (zervikalen intraepithelialen Neoplasien, CIN (1-3)). Die milde Dysplasie (CIN1) verschwindet häufig innerhalb weniger Monate von selbst. Aber auch eine hochgradige Veränderung des Gebärmutterhalses (CIN3) kann sich entweder spontan oder durch eine Behandlung zurückbilden. Wenn diese abnormalen Zellen die Basalmembran durchbrechen und ins umliegende Gewebe eindringen, spricht man vom Zervixkarzinom. (Wentzensen and Klug 2009; Crow 2012).

2.7 Viruslast und Integration des Virusgenoms

Da das virale Genom in CIS oder Zervixkarzinomen häufig integriert vorliegt, wird dies als wichtiger Mechanismus für die Krebsentstehung und Progression angesehen (Kalantari et al. 1998; Klaes et al. 1999). Durch die Integration des viralen in das zelluläre Genom kommt es häufig zur Zerstörung des E2/E4 Bereiches, was zu einem Verlust des E2 Proteins und des E8^{E2C} Proteins führt (Desaintes et al. 1997; Stubenrauch et al. 2007). Die fehlende Repression des Promotors der viralen Onkogene E6/E7 führt zu einer verstärkten Expression dieser Proteine. Eine Mischung episomaler und integrierter Virusgenome wurde häufig in normalem oder leicht verändertem Epithel gefunden, während integrierte Genome häufiger in CIN3+ gefunden werden. Das Fehlen der E2/E8^{E2C} Repressorproteine bietet der infizierten Zelle einen klaren Wachstumsvorteil. Der Integrationsstatus des viralen Genoms wurde fast ausschließlich in *case control* Studien untersucht und die Mehrzahl berichtet von einer Korrelation zwischen Integration und ansteigendem Schweregrad der Läsionen (Tonon et al. 2001; Hudelist et al. 2004; Briolat et al. 2007; Cricca et al. 2009). Jedoch wird integrierte virale DNA auch in 44% aller Kontrollproben mit normaler Zytologie nachgewiesen (Kulmala et al. 2006; Boulet et al. 2009), was gegen den Integrationsstatus als Biomarker spricht. Diese frühen Integrationsereignisse wurden häufig bei jungen Frauen mit HPV16-(26%) und HPV18-(58%) Infektionen beobachtet (Collins et al. 2009). Daher ist es nach wie vor unklar, ob der Integrationsstatus des Genoms einen Risikofaktor für die Entwicklung einer persistenten Infektion oder gar eines Zervixkarzinoms darstellt.

Mehrere epidemiologische Studien zeigen, dass es eine Korrelation zwischen der Viruslast bei Infektionen mit einem HR-HPV Typ, dem Risiko der Persistenz und Progression gibt. Allerdings beruht die Menge der viralen Kopien auch auf der Menge der eingesetzten Zellen und eine Normalisierung auf die eingesetzte Zellzahl ist eine Notwendigkeit, die oft nicht erfüllt wurde.

2.8 Früherkennung und Diagnostik

In Deutschland haben Frauen ab 20 Jahren einen Anspruch auf eine jährliche Früherkennungsuntersuchung für Gebärmutterhalskrebs. Ziel dieser Vorsorgeuntersuchung ist die Identifikation von zervikalen Erkrankungen im Frühstadium. Das Präventionsprogramm entspricht einem opportunistischen Screening, d.h. die Frauen werden nicht aktiv zu dieser Vorsorgeuntersuchung eingeladen, sondern sie können sie im Rahmen einer jährlichen Routineuntersuchung beim Gynäkologen wahrnehmen. Die Intervalle der Vorsorgeuntersuchungen liegen in anderen europäischen Ländern zwischen 2 und 5 Jahren. Nach einer gynäkologischen Untersuchung, sowie der Entnahme eines Abstrichs des Muttermundes und des

Gebärmutterhalskanals wird der Papanicolaou (Pap)-Abstrich zytologisch beurteilt (Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe-DGGG 2008). Entzündliche Zellveränderungen sowie 50% der Krebsvorstufen und Krebszellen können hierbei identifiziert werden. Seit der Einführung des Vorsorgeprogramms konnte in mehreren Ländern ein Rückgang inzidenter Zervixkarzinome beobachtet werden (Day 1984; Gustafsson et al. 1997; Boyle et al. 2000; Franco et al. 2001). Jedoch haben Studien gezeigt, dass 16-24% der neu aufgetretenen Zervixkarzinome bei Frauen aufgetreten sind, die an Früherkennungsprogrammen teilgenommen haben (Janerich et al. 1995; Sasieni et al. 1996). Möglicherweise ist diese niedrige Sensitivität von 20-51% des Pap-Abstrichs (McCrary et al. 1999; Schneider et al. 2000; Petry et al. 2003) durch oft unzureichendes Probenmaterial und falsche Interpretation der zytologischen Präparate zu erklären. Falsch positive Ergebnisse führen dagegen zu unnötigen Behandlungen der betroffenen Patientin (Golbang et al. 1997). Um die Effizienz des Vorsorgeprogramms zu verbessern, wird der Einsatz der HPV-DNA Diagnostik im Rahmen der Zervixkarzinomprävention diskutiert (S2k Leitlinie DGGG; Gemeinsame Stellungnahme der Fachgesellschaften GfV-Gesellschaft für Virologie/DGGG-Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe/GMDS-Deutsche Gesellschaft für Medizinische Informatik, Biometrie und Epidemiologie/DAE-Deutsche Arbeitsgemeinschaft Epidemiologie, 2004). Der Vorteil des Nachweises von HPV-DNA ist die höhere Sensitivität, jedoch beweist ein positiver HPV-DNA Befund nicht das Vorliegen zervikaler Läsionen.

Eine etablierte Methode für den Nachweis von HPV-DNA ist die Amplifikation der viralen DNA durch eine Polymerasekettenreaktion (PCR) mit Hilfe spezifischer Oligonukleotide (z.B. GP5+/GP6+, MYO9/11) oder der semiquantitative Hybrid Capture 2 (HC2)-Test (Qiagen). Die zugrundeliegende Methode des HC2 Tests ist die Bildung von DNA/RNA-Hybriden welche nach Signalamplifikation mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert werden können. Mit Hilfe spezifischer RNA-Sonden können 13 HR-HPV Typen (16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68) und 5 LR-HPV Typen (6/11/42/43/44) identifiziert werden, eine Unterscheidung der einzelnen HPV-Typen innerhalb der beiden Gruppen ist jedoch nicht möglich. Es kann 1 pg HPV-DNA pro Milliliter nachgewiesen werden. 2003 wurde der HC2-Test von der amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) für die Zervixkarzinom-Früherkennung für Frauen ab 30 Jahren zugelassen, ebenso besitzt er auch ein CE-Zertifikat für Europa. Vorteile des HC2-Tests sind seine relativ einfache Handhabung, gute Reproduzierbarkeit und eine standardisierte Verfügbarkeit. Für die HPV-Typisierung sind zwei kommerzielle Kits verfügbar: der Linear Array HPV Genotyping Test (Roche) und der INNO-LiPA Extra HPV Genotyping-Kit (Innogenetics). Es können mit Hilfe des Linear Array HPV Genotyping Tests (nach Amplifikation mit dem PGMY09/11-Primer) 37, und mit dem INNO-LiPA HPV Genotyping-Kit (nach Amplifikation mit dem Primer SPF-10) 25 verschiedene HPV-Typen detektiert werden. Weiterhin existieren für den

Nachweis von HR-HPV-mRNA zwei kommerzielle Tests: Der Aptima® HPV Test (GenProbe) detektiert die mRNA von 14 HR-HPV Typen während der PreTect®HPV-Proofer (Norchip) nur mRNAs von 5 HPV-Typen erkennt. Weitere Testsysteme zur Detektion von HR-HPV mRNA sind NucliSENS EasyQ® HPV (BioMerieux) und HPV OncoTect® von InCellDx.

2.9 Biomarker

Bei nur 46% der Frauen mit einer persistenten HPV16-Infektion ist eine Progression zu einer präkanzerösen Läsion oder schwerer (CIN3+) zu beobachten (Kjaer et al. 2010). D.h. die Risikostratifizierung ist für ca. 50% der Frauen falsch positiv. Ein zentrales Thema ist daher die Identifikation von Biomarkern, die das Progressionsrisiko von persistenten HR-HPV Infektionen vorhersagen können. Eine Vielzahl potentieller Marker zur Vorhersage der Krebsentwicklung wurde propagiert, darunter HR-HPV-mRNA, Ki-67 (Kruse et al. 2001), MYC, Zyklone, Survivin (Branca et al. 2005), TOP2A sowie p16^{INK4a} (Sano et al. 1998; Klaes et al. 2001) als indirekter Marker für die Aktivität der HPV-Onkogene. Die durch die Transformation ausgelöste chromosomale Instabilität soll durch Methylierungsmarker, Aneuploidie, HPV-Integration oder LOH-Marker (LOH, loss of heterozygosity) nachgewiesen werden können (Wentzensen and von Knebel Doeberitz 2007). Der Nachweis des Kapsidproteins L1 soll eine transformierende Infektion von harmlosen produktiven Infektionen unterscheiden (Griesser et al. 2004).

Das CDKN2A (cyclin dependent kinase inhibitor 2A) Gen kodiert unter anderem für die Genprodukte p16^{INK4a} und p14^{ARF}, welche sich im ersten Exon unterscheiden. P16^{INK4a} ist ein zyklinabhängiger Kinaseinhibitor, welcher den Rb-abhängigen Zellzyklusarrest in der G1-Phase reguliert, während p14^{ARF} die HDM2 induzierte Degradation des p53 Tumorsuppressors blockiert (Serrano et al. 1997). P16^{INK4a} besitzt Tumorsuppressorfunktion und ist in vielen Karzinomen durch Deletion oder Hypermethylierung inaktiviert (Klaes et al. 2002). In nicht HPV-assoziierten Tumoren führt diese Inaktivierung zu einer erhöhten zyklinabhängigen Kinaseaktivität und der Inaktivierung von Rb. In HPV-assoziierten Läsionen kommt es zu einer E7-vermittelten Induktion der KDM6B Demethylase. Es wurde gezeigt, dass es durch die Entfernung von inhibierenden Chromatin-Modifikationen durch KDM6B vom p16^{INK4a} Promotor, zu einer gesteigerten Expression von p16^{INK4a} kommt (McLaughlin-Drubin et al. 2011). Diese Überexpression und zelluläre Akkumulation von p16^{INK4a} ist ein spezifischer Marker für zervikale präkanzeröse Läsionen und kann mit Hilfe immunhistochemischer Färbung von Histologie- und Zytologie-Präparaten gemessen werden. Viele Studien haben gezeigt, dass p16^{INK4a} ein Marker für Dysplasien der Zervix ist (Klaes et al. 2001; Murphy et al. 2003; Dray et al. 2005). Die

Expression von p16^{INK4a} korreliert weiterhin mit dem Schweregrad der Dysplasie (Agoff et al. 2003; Negri et al. 2004). Roche mtm laboratories AG hat die Detektion von p16^{INK4a} im Zytoplasma zusammen mit dem Proliferationsmarker Ki-67 im Zellkern im CINtec® PLUS Verfahren kombiniert. Der gleichzeitige Nachweis von p16^{INK4a} und Ki-67 in einer Zelle dient als Beleg eines deregulierten Zellzyklus und somit des Transformationsprozesses durch HR-HPV. Unter den zytologischen Ergebnissen einer leichten bis mäßigen Dysplasie (low grade squamous intraepithelial lesion, LSIL; entspricht CIN 1) können sich auch hochgradige Läsionen (high grade squamous intraepithelial lesion, HSIL; entspricht CIN2+3) befinden. Mit Hilfe der dualen Färbung können diejenigen Frauen identifiziert werden, bei denen die Wahrscheinlichkeit für eine hochgradige Läsion am größten ist (Waldstrom et al. 2013). In einer prospektiven Studie mit 1 170 Frauen zwischen 25 und 60 Jahren konnte über eine Nachverfolgungszeit von drei Jahren gezeigt werden, dass die Überexpression von p16^{INK4a} ein prädiktiver Marker für die Entstehung eines CIN 2 sein könnte (Carozzi et al. 2013).

Im Gegensatz zu der erfolgreich etablierten Immunhistochemischen Färbung von p16^{INK4a} als Marker für präkanzeröse Läsionen, gibt es wenige Daten über eine mögliche Verwendung von p16 mRNA als Marker in der Zervixkarzinom Diagnostik. Eine erhöhte Expression von p16/CDKN2A mRNA konnte in Abstrichmaterial von Patientinnen mit hochgradigen zervikalen Läsionen festgestellt werden, während die Expression in Frauen mit zytologisch unauffälligem Abstrich eine geringere Menge an p16/CDKN2A mRNA zeigten (von Keyserling et al. 2012; V. Simanaviciene1 2011). Keyserling et al. haben weiterhin gezeigt, dass es auch eine Zunahme von p14^{ARF} in hochgradigen zervikalen Läsionen gibt, jedoch war die gemessene p16 Expression höher als die p14^{ARF} Expression.

Von allen bisher untersuchten Biomarkern sind p16^{INK4a} und Ki-67 die stabilsten und prädiktivsten Marker für prävalente Läsionen, die im Moment verfügbar sind (Baak et al. 2006). Es konnte bisher jedoch für keinen der untersuchten Marker eindeutig gezeigt werden, dass er eine risikoabhängige Stratifizierung bei der Krebsvorsorge ermöglichen kann. Dies liegt höchstwahrscheinlich auch an den bisherigen Studiendesigns, die lediglich eine kleine Anzahl von Frauen beinhalteten und keine ausreichend lange Nachverfolgung hatten, um Krebspatientinnen oder Patientinnen mit einer Krebsvorstufe zu identifizieren. Diese könnten für eine individuelle Risikobeurteilung genutzt werden, um die entsprechenden Nachuntersuchungen planen zu können und unnötige Untersuchungen zu vermeiden.

2.10 Zielsetzung

Eine persistente Infektion mit einem HR-HPV-Typ ist ein notwendiger Risikofaktor für die Entstehung eines Zervixkarzinoms und seinen Vorstufen. Ein einmaliger Nachweis von HR-HPV DNA bietet jedoch

nicht ausreichend Information um eine persistente HPV-Infektion frühzeitig zu identifizieren. Nur ein zweiter HR-HPV-Nachweis würde Informationen darüber geben, ob es sich um eine transiente oder persistente Infektion handelt. Da jedoch auch nur 46% der persistent HPV16-infizierten Frauen über einen Zeitraum von 13 Jahren eine schwere zervikale Läsion entwickeln, reicht dies nicht aus um das jeweilige Progressionsrisiko einer Frau zu bestimmen. Um zervikale Läsionen frühzeitig zu erkennen wird in Deutschland sowie den USA die Früherkennung im Rahmen der jährlichen gynäkologischen Untersuchung durchgeführt, einem sog. opportunistischen Screening. Die Früherkennung von zervikalen Veränderungen ist jedoch, aufgrund der niedrigen Sensitivität des standardmäßig verwendeten Papanicolaou (Pap)-Abstrich im Rahmen des Krebsvorsorgeprogramms, limitiert. Um eine optimale Versorgung von Frauen mit erhöhtem Risiko zu erhalten und um unnötige Behandlungen zu vermeiden, ist die Identifikation von prädiktiven Biomarkern von großer Bedeutung. Mit Hilfe von Probenmaterial aus zwei großen dänischen Kohorten sollen mögliche prädiktive Marker für die Persistenz und Progression einer HPV16-Infektion identifiziert und charakterisiert werden. Zusätzlich sollen bereits beschriebene potentielle Marker wie die p16/CDKN2A Expression, die Viruslast und der Integrationsstatus auf ihr Potential als prädiktive Biomarker untersucht werden. Mit Hilfe dieser potentiellen Biomarkern könnte das Risiko, an Gebärmutterhalskrebs oder seinen Vorstufen zu erkranken, mit Hilfe eines einmaligen Tests bestimmt werden und somit die Belastung für Patientin und Gesellschaft vermindert werden.

3 Material und Methoden

Verwendete Abkürzungen

α	“anti-„
A	Ampere
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CAPS	Cyclohexylaminopropansulfonsäure
ca.	circa
cDNA	copy-DNA
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CP	“crossing point“
CS	Kälberserum
CxCa	Zervixkarzinom
DEPC	Diethylpyrocarbonat
ddH ₂ O	doppelt deionisiertes Wasser
DMEM	Dulbecco´s modifiziertes, minimal essentielles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ds	Doppelstrang, doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
h	Stunde
HA	Hämagglutinin-Epitop
HC2	Hybrid Capture 2
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N´-2-Ethansulfonsäure
HPV	Humanes Papillomvirus
HR	„High Risk“
HRP	Meerrettich-Peroxidase

IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktosid
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
LBC	“Liquid based cytology”
LR	„Low Risk“
μ	micro
mM	Milimolar
M	Molar
min	Minute
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
N	Normal
Nt	Nukleotid
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PS	Polystyrol
qRT PCR	„quantitative Real Time PCR“
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	"small interfering" RNA
TEMED	N',N',N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Einheit der Enzymaktivität
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen
V/V	Volumen-/Volumenverhältnis
W/V	Gewichts-/Volumenverhältnis
WT	Wildtyp

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden die verwendeten Chemikalien im Reinheitsgrad p.a. („*pro analysis*“, zur Analyse) von den Firmen AppliChem, BioRad, Biozym, Fluka, Medac, Merck, Perkin-Elmer, PeQlab, Roche, Roth und Sigma bezogen.

3.1.2 Fertige Reaktionssysteme und Reagenzien

Tab. 1: Fertige Reaktionssysteme und Reagenzien

NAME	HERSTELLER	ANWENDUNG
FuGene® HD Transfection Reagent	Roche Diagnostics; Promega	Transfektion von Plasmid-DNA
HiPerFect Transfection Reagent	Qiagen	Transfektion von siRNA
LightCycler SYBR Green I Master	Roche	qRT-PCR
TaqMan® Fast Advanced Master Mix	Life technologies	Multiplex PCR
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen	Plasmidisolation
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen	Plasmidisolation
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen	DNA-Gelextraktion
Rapid DNA Ligation Kit	Fermentas	DNA-Ligation
SuperSignal® West Dura Extended Duration	Pierce (Fisher Science)	Western Blot-Detektion
RNEasy® Mini Kit	Qiagen	RNA-Isolation
QuantiTect® Reverse Transcription Kit	Qiagen	Reverse Transkription, cDNA Synthese
One Step RT-PCR	Qiagen	Reverse Transkription
DFO-(Desferrioxamin)	Sigma Aldrich	Hypoxie Induktion
Halt™ Proteinase & Phosphatase Inhibitor (784433)	Thermo Scientific	Proteinase und Phosphatase Inhibitor
MG132 (540411)	Calbiochem	Proteasomeninhibitor
DAPI	Fluka	Interkalierender

Peptide-N-Glycosidase F (PNGase)	NEB	Fluoreszenzfarbstoff
Gasgemisch (94%N ₂ ; 5% CO ₂ und 1% O ₂)	Westfalen AG	Rekombinante Glycosidase
Saponin (S-4521)	Sigma	Gasgemisch für Hypoxie
		Inkubationskammer
		Permeabilisieren von Zellen

3.1.3 Enzyme

Restriktionsenzyme wurden von den folgenden Firmen bezogen:

- Fermentas
- New England Biolabs

Sonstige Enzyme:

- Alkalische Phosphatase (New England Biolabs)
- Proteinase K (Fermentas)
- Pyrobest DNA-Polymerase (Takara)
- RNase A (Roche)
- T4-DNA-Ligase (Fermentas)

3.1.4 Antikörper

Nachfolgend sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten primären und sekundären Antikörper, die Bezugsquellen und die jeweils eingesetzten Verdünnungen im Immunoblot angegeben.

Primärantikörper

Tab. 2: Primärantikörper

ANTIGEN	SPEZIES, KLONALITÄT	HERSTELLER (BESTLLNUMMER)	EINGESETZE VERDÜNNUNG (WB/IF)
TMEM45A(P-18)	Rabbit polyclonal	Santa Cruz BT (sc-100197)	1:500 / 1:20
TMEM45A (C-13)	Rabbit polyclonal	Santa Cruz BT (sc-100196)	1:500 / 1:20
TMEM45A (Y-16)	Rabbit polyclonal	Santa Cruz BT (sc-100198)	1:500 / 1:20
HIF-1 α	Mouse monoclonal	BD Transduction Laboratories (610959)	1:250
HSP90	Mouse monoclonal	Santa Cruz BT (sc-69703)	1:2000
HA	Rabbit polyclonal	Covance (MMS-101P)	1:1000 / 1:50
Rab5 (D-11)	Mouse monoclonal	Santa Cruz BT (sc-46692)	-/1:20
FITC α -GM130	FITC Mouse anti- GM130	BD Transduction Laboratories (612008)	-/1:100
α -Tubulin	Mouse monoclonal	Calbiochem (CP06)	1:1000/1:50
Zytomegalovirus gB	Mouse monoclonal	Novus biological (2F12)	1:5000

Sekundärantikörper

Tab. 3: Meerrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppelte Sekundärantikörper

ANTIGEN	SPEZIES, KLONALITÄT	HERSTELLER (BESTLLNUMMER)	EINGESETZE VERDÜNNUNG
anti-rabbit IgG	Swine polyclonal	Dako (P0399)	1:1000
anti-mouse IgG	Rabbit polyclonal	Dako (P0260)	1:2000

Tab. 4: Fluoreszenzgekoppelte Sekundärantikörper

ANTIGEN	SPEZIES, KLONALITÄT	HERSTELLER (BESTLLNUMMER)	EINGESETZE VERDÜNNUNG
anti-mouse (green)	goat anti-mouse, IRDye 800	Odyssey Infrared Imaging (926-32210D)	1:20000
anti-mouse (red)	goat anti-mouse, IRDye 680	Odyssey Infrared Imaging (926-32211D)	1:20000
anti-rabbit (green)	goat anti-rabbit IRDye 800	Odyssey Infrared Imaging (926-32211D)	1:20000
anti-rabbit (red)	goat anti-rabbit IRDye 680	Odyssey Infrared Imaging (926-32221D)	1:20000

3.1.5 Medien und Puffer

Blocking Puffer (für Western Blot)

- TBS-T mit 5% (w/v) Magermilchpulver (AppliChem; A0830 0500)

CAPS-Transferpuffer

- 10 mM CAPS; 10% (v/v) Methanol; pH 10,3 (eingestellt mit NaOH)

10x DNA-Ladepuffer

- 20% (w/v) Ficoll 400;
- 0,1 M Na₂EDTA (pH 8,0);
- 1% (w/v) SDS;
- 0,25% (w/v) Bromphenolblau;
- 0,25% (w/v) Xylencyanol

4x Proteinauftragungspuffer

- Roti®-Load 1 (Carl Roth)

Sammelgelpuffer

- 1,5 M Tris/HCl; pH 6,8

5x SDS-PAGE Laufpuffer

- 125 mM Tris/HCl;
- 0,96 M Glycin;
- 17,3 mM SDS

50x TAE Puffer

- 2 M Tris;
- 1 M Essigsäure;
- 0,1 M EDTA; pH 8,5

10x TBS

- 500 mM Tris;
- 1,5 M NaCl; pH 7,5

1x TBS-T

- TBS mit 0,1% (v/v) Tween 20 (Sigma)

Trenngelbuffer

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

10x PBS

- 137 mM NaCl;
- 2,7 mM KCl;
- 1,5 mM KH_2PO_4 pH 7,2

1x PBS-T

- PBS mit 0,1% (v/v) Tween 20 (Sigma)

RIPA-Puffer

- 50 mM Tris/HCl pH 7,5;
- 150 mM NaCl;
- 0,1 % (v/v) SDS;
- 0,1% (v/v) Natrium-Deoxycholat;
- 1% (v/v) NP-40;

- 1 mM DTT;
- Protease-Inhibitoren

2x Urea Probenpuffer

- 50 mM Tris/HCl pH 6,8;
- 1,6% (w/v) SDS;
- 7% (v/v) Glycerol;
- 8 M Urea;
- 4% (v/v) β -Mercaptoethanol;
- 0.016% (w/v) Bromophenolblau

3.1.6 Medien für Bakterienkultur

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium)

20 g LB Broth Base (Invitrogen) auf 1 Liter H₂O

SOC-Medium

2% (w/v) Bacto-Trypton,
0,5% (w/v) Bacto-Yeast Extrakt,
10 mM NaCl,
2,5 mM KCl,
10 mM MgCl₂,
10 mM MgSO₄,
20 mM Glukose

LB-Agar(Luria-Bertani-Agar)

30 g Lennox L Agar (Invitrogen) auf 1 Liter H₂O

Einfriermedium

- 10 mM Tris-HCl pH 7,
- 100 mM MgSO₄,
- 50% (v/v) Glycerin

3.1.7 Medien für die Zellkultur

- **DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco, Invitrogen) FKS**
Fertiglösung mit Zusatz von 50 mg/l Gentamycin und 10% (v/v) fötalem Kälberserum (FKS, Seromed Biochrom)
- **DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco, Invitrogen) CS**
Fertiglösung mit Zusatz von 50 mg/l Gentamycin und 10% Kälberserum (CS, Gibco Invitrogen)
- **E-Medium**
Adenin (1,8 mM); Hydrocortison (417 µg/ml); Insulin (50 µg/ml); Transferrin (50 µg/ml); Trijodthyronin T3 (20 pM); Cholera toxin (10 nM); 50% DMEM + 50% DMEM/Ham's F12 1:1; 10 µl/ml Penicillin/Streptomycin; mit 5% definiertem fötalem Kälberserum (HC-FKS; Perbio)
- **PBS Dulbecco's (PAA)**
Fertiglösung ohne Kalzium, Magnesium und Natriumbikarbonat
- **Trypsin-EDTA (Gibco, Invitrogen)**
0,5 g Trypsin (1:250) und 0,2 g EDTA pro Liter modifizierter PUCK's Salzlösung A
- **Mitomycin C (Medac)**
Stammlösung 4 mg/ml in PBS
- **OptiMEM (Gibco, Invitrogen)**
Serumreduziertes Medium mit Glutamax-I (L-Alanyl-L-Glutamin)
- **Versene**
PBS-Fertiglösung mit 0,5 mM EDTA

Marker für Gelelektrophoresen

- **DNA-Längenstandard**
1 kb DNA Ladder (Invitrogen)
- **Protein-Größenstandard**
Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas)

Bakterienstämme

- *Escherichia coli* DH5α (Clontech)

3.1.8 Eukaryotische Zellen

Tab. 5: Übersicht Zelllinien

ZELLINIE	BESCHREIBUNG
CC7	neu isolierte HPV16-positive Zervixkarzinom-Zelllinie (Michnov et al. 2012)
CC10	neu isolierte HPV16-positive Zervixkarzinom-Zelllinie (Michnov et al. 2012)
CaSki	HPV16-positive Zervixkarzinom-Zelllinie (Pattillo et al. 1977)
HeLa	HPV18-positive Zervixkarzinom-Zelllinie (Gey 1952)
HPK42-HPV16E6/E7	Humane Keratinozyten, immortalisiert mit HPV16-E6/E7 (Reiser et al. 2011)
NHK	normale humane Keratinozyten (Ruesch et al. 1998)
NIH3T3-J2	murine Fibroblasten-Zelllinie (Rheinwald and Green 1975)
C33A	Humane HPV-negative Zervixkarzinomzelllinie mit Mutationen in pRB und p53 (Scheffner et al. 1991)
SiHa	HPV16-haltige humane Zervixkarzinomlinie (Friedl et al. 1970)
25-18	humane Keratinozyten, immortalisiert mit dem HPV 18- Genom (Genom liegt episomal in der Zelle vor) (Karstensen et al. 2006)

3.1.9 Oligonukleotide

Die folgenden Oligonukleotide zur Verwendung in der quantitativen Real-Time PCR wurden von Invitrogen oder Qiagen (QuantiTect) synthetisiert und sind in 5'-3' Orientierung dargestellt.

Tab.6: Oligonukliotide für die qRT PCR

BEZEICHNUNG	SEQUENZ (5'-3')
β-actin for	(797)-AGAGCTACGAGCTGCCTGAC-(816)
β-actin rev	(980)-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-(961)
TMEM45A for	(1403)-AGTTGGATGCCACACTATG-(1422)
TMEM45A rev	(1481)-AGTAGCAAGCCCAGTAACCTTG-(1460)
VEGFA F	(2963)-CTCTCTCCCTGATCGGTGACA-(2983)
VEGFA R	(3040)-GGAGGGCAGAGCTGAGTGTTAG-(3019)
HPV16 E6 for	(12)-GAGAACTGCAATGTTTCAGGACC-(34)
HPV16 E6 rev	(92)-TGTATAGTTGTTTGCAGCTCTGTGC-(68)
CDKN2a	Hs_CDKN2A_1_SG QuantiTect Primer Assay (Qiagen) (QT00089964)

Die folgenden Oligonukleotide und Sonden zur Verwendung in der quantitativen Real-Time PCR (Multiplex) wurden von Invitrogen synthetisiert oder als vorgefertigte Oligonukleotid-Sonden Mischung gekauft und sind in 5'-3' Orientierung dargestellt.

Tab.7: Oligonukleotide und Sonden für die Multiplex PCR

BEZEICHNUNG	SEQUENZ (5'-3')
HPV16E2 for	(607)-AACGAAGTATCCTCTCCTGAAATTATTAG-(635)
HPV16E2 rev	(688)-CCAAGGCGACGGCTTTG-(672)
HPV16E2 Sonde	(624/Cy5)-CACCCCGCCGCGACCCATA-(643/DQ)
HPV16E6 for	(12)-GAGAACTGCAATGTTTCAGGACC-(34)
HPV16E6 rev	(92)-TGTATAGTTGTTTGCAGCTCTGTGC-(68)
HPV16E6 Sonde	(36/FAM)-CAGGAGCGACCCAGAAAGTTACCACAGTT-(65/DQ)
ACTB	TaqMan Gene Expression Assay Hs03023880_g1 (Applied Biosystems)

Die folgenden Oligonukleotide wurden zu Klonierungszwecken verwendet, von Invitrogen synthetisiert, und sind in 5'-3' Orientierung dargestellt:

Tab.8: Oligonukleotide für Klonierungen

BEZEICHNUNG	SEQUENZ (5'-3')
TMEM45a EX1-F	(245)-GCCGCTGTCTGATTTTAAGC-(264)
TMEM45a - EX6-R	(1424)-TTCATAGTGTGGGCATCCAA-(1405)
TMEM45a ATG F	(314)-ATGGGGAATTTTCAGAGGTCATG-(335)
TMEM45A Stop R	(1141)-TCACATTTCTTCTTCTGATTCT-(1120)
EcoRI_ATG_HA_TMEM45A	GCCCGCGAATTCATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCT ₍₃₁₄₎ ATGGGGAATTTTCAGAGGTC
HA_STOP_EcoRI_TMEM45A	GCCCGCGAATTCTCAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGT ₍₁₁₄₃₎ ACATTTCTTCTTCTGATTCT
TMEM45a 291-EcoRI F	ATATATGAATTC ₍₂₉₁₎ ATGACCAATGACTCAG
TMEM45a 291 F	(291)-ATGACCAATGACTCAGAAGGGA-(313)
TMEM45a STOP BglII	AGACGTAGATCT ₍₁₁₄₁₎ TCACATTTCTTCTTCT
TMEM45A Mut Stop EcoR1	GCCCGCGAATTCG ₍₁₁₄₃₎ CATTTCTTCTTCTGATTCTTGT

Zur Sequenzierung wurden die folgenden von Invitrogen synthetisierten und in 5'-3' Orientierung dargestellten Oligonukleotide genutzt:

Tab.9: Oligonukleotide für Sequenzierungen

BEZEICHNUNG	SEQUENZ (5'-3')
pSG5 1167 rev	(1167)-ACCACAAGTAGAATGCAGTGAA-(1189)
pSG5 978 for	(978)-TGCTGGTTATTGTGCTGTCTC-(999)
CMV_fwd (519-539)	(519)-CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG-(539)

3.1.10 siRNAs

Tab.10: siRNAs

BEZEICHNUNG (BESTELLNUMMER)	ZIELSEQUENZ (5'-3')	HERSTELLER
Allstars Neg. Control (1027281)		QIAGEN
AllStars Cell Death Control (10727298)		QIAGEN
TMEM45a_2 (04154423)	(898)-TCAGATTGGATTTGTCCTGTA-(918)	QIAGEN
TMEM45a_3 (04226803)	(213)-TTGGTCTTTGGTGGTGTACAA-(233)	QIAGEN
TMEM45a_4 (04257764)	(626)-TTGGGTGTGGCAGATATCTTA-(646)	QIAGEN

Die siRNAs wurden nach Anleitung des Herstellers auf eine Konzentration von 20 µM eingestellt.

3.1.11 Plasmide und Vektoren

pBS16 114b: kloniertes HPV16 Genom von M.Dürst

pSG5 (Stratagene): eukaryontes Expressionsplasmid, bei dem die Expression des inserierten Gens unter der Kontrolle des frühen SV40 Promotors steht.

pSG5-TMEM45A-HA: von pSG5 abgeleitetes Expressionsplasmid für TMEM45a, das die codierende Region von TMEM45A, sowie ein HA-Epitop am C-Terminus enthält.

pSG5-HA-TMEM45A: von pSG5 abgeleitetes Expressionsplasmid für TMEM45a, das die codierende Region von TMEM45A, sowie ein HA-Epitop am N-Terminus enthält.

pSG5-HA-TMEM45A-HA: von pSG5 abgeleitetes Expressionsplasmid für TMEM45a, das die codierende Region von TMEM45A, sowie zwei HA-Epitope enthält (N- und C-terminal).

3.1.12 Geräte

Tab.11: Geräte

GERÄT UND BEZEICHNUNG	HERSTELLER
Blotkammer, Trans-Blot Cell	Biorad
CO ₂ Inkubator, C200	Labotect
Durchlichtmikroskop, DM IRB	Leica
Einfrierbox, MR. FROSTY	Nalgene
Feinwaage, GJ und 770	Kern
Fluoreszenzmikroskop, Axiovert M200	Zeiss
Agarose-Gelelektrophorese-Kammern, Sub Cell GT Mini-Sub Cell GT Wide Mini-Sub Cell GT	BioRad

3.1.13 Kleingeräte/Verbrauchsmaterialien

Tab.12: Kleingeräte und Verbrauchsmaterialien

GERÄT UND BEZEICHNUNG	HERSTELLER
Blue-Cap Tubes, 15 ml und 50 ml	Greiner bio-one
Einweg-Skalpell	B. Braun Biotech
Gel-Blotting Filterpapier	Whatman
Kryoröhrchen, Cellstar Cryo.s	Greiner
Nitrozellulose-Membran, Protran 0,22 µm	Whatman
PCR-Reaktionsgefäße, PCR-Softtubes 0,2 ml	Biozym
Plastikpipette; 2, 5, 10, 25, 50 ml	Becton/Dickinson
Pipettenspitzen gestopft (10, 20, 200, 1000 µl), ART®	Molecular Bio Products
Aerosol Resistant Tips	
Pipettenspitzen, 0,5-10 µl (transparent) 10-200 µl (gelb) 200-1000 µl (blau)	Biozym® Greiner
96-Multiwellplatten	Roche

3.1.14 Studien und Probenmaterial

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Proben von zwei einzigartigen, prospektiven populationsbasierten Kohorten untersucht: Die „Junge Dänische Kohorte“ (11 088 Frauen zwischen 20 und 29 Jahren, rekrutiert zwischen 1991 und 1993) und die LBC Kohorte (40 382 Frauen zwischen 23 und 65 Jahren, seit 2002). Diese Studien wurden in Kooperation mit der Danish Cancer Society durchgeführt (Kjaer et al. 2006; Kjaer et al. 2008; Nielsen et al. 2010; Jensen et al. 2012; Nielsen et al. 2012).

Junge Dänische Kohorte

In die Studie wurden 11 088 Frauen aus Dänemark zwischen 20 und 29 Jahren eingeschlossen, die zufällig aus der Kopenhagener Bevölkerung ausgewählt wurden (Kjaer et al. 2006; Kjaer et al. 2008).

Zwischen Mai 1991 und Januar 1993 (1. Untersuchung) wurden 11 088 eingeladene Frauen persönlich befragt und gynäkologisch untersucht. Es wurde endo- und ektozervikales Zellmaterial für die HPV-Testung entnommen und anschließend in ein Röhrchen mit TE-Puffer überführt. Parallel wurde mit Hilfe eines Wattestäbchens und einer *Cytobrush* ein Pap Abstrich entnommen und ebenfalls in TE-Puffer überführt. Alle entnommenen Proben wurden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren.

Zwei Jahre (Oktober 1993 bis Januar 1995) nach der Erstuntersuchung wurden alle Frauen für eine zweite Untersuchung eingeladen wovon 8 656 (78%) Frauen daran teilnahmen. Wiederum wurde ein Abstrich für die HPV-Testung und Genotypisierung entnommen, in TE-Puffer überführt und bei -80°C gelagert. Frauen die nur telefonisch befragt wurden, deren erster Abstrich fehlte oder die einen auffälligen Abstrich bei der ersten Untersuchung zeigten, wurden von der Studienanalyse ausgeschlossen. Letztendlich verblieben für den *follow-up* 7 218 Frauen in der Studie.

In Dänemark besitzt jeder Einwohner eine 10-stellige persönliche Identifikationsnummer, die im zentralen Personenregister (*Central Personal Register, CPR*) erfasst wird. Alle Informationen über den Gesundheitsstatus und die aktuelle Adresse werden dort verwaltet und täglich aktualisiert. Mit Hilfe dieses Personenregisters und der persönlichen Identifikationsnummer ist es möglich, solche Nachverfolgungsstudien (durch den Abgleich zusätzlicher Register) lückenlos durchzuführen. In der dänischen Pathologie-Datenbank werden alle Informationen über zervikale Zytologie Befunde, Zervix Biopsien, Konisierungen und Hysterektomien registriert.

Über die HPV-Befunde der beiden Untersuchungen im Abstand von zwei Jahren, konnten diejenigen Frauen identifiziert werden, die eine persistente HPV16 Infektion (HPV-positiv an beiden Untersuchungszeitpunkten) oder einen transienten Verlauf der Infektion zeigten (nach zwei Jahren HPV-negativ). Die Kohorte wurde passiv, mit Hilfe der nationalen Pathologie Datenbank, nachverfolgt. Abnormale zervikale Diagnosen welche in der Pathologie-Datenbank gespeichert sind,

wurden in die CIN (Zervikale intraepitheliale Neoplasie) Nomenklatur wie folgt übersetzt: Atypien, Koilozytose und leichte Dysplasien wurden als CIN1 zusammengefasst, eine moderate Dysplasie als CIN2 und schwere und Carcinoma in Situ (CIS) als CIN3.

Im Jahr 2007, nach ca. 12 Jahren *follow-up* wurde mit Hilfe der Pathologie-Datenbank erstmals festgestellt, ob die Patientinnen CIN1, CIN2, CIN3 oder ein Zervixkarzinom entwickelt hatten, oder nicht. Die Patientenproben wurden dazu verwendet, potentielle Marker für die Persistenz und Progression einer HPV16 Infektion zu identifizieren. Es wurden Genexpressionprofile mit Hilfe von Mikroarrays erstellt und nach statistischer Analyse einige der unterschiedlich regulierten Gene mittels quantitativer Echtzeit PCR validiert (Manawapat 2009). Aufgrund zusätzlicher Daten zu den in die Studie eingeschlossenen Frauen und deren Diagnosen wurde im Rahmen dieser Arbeit eine neue Auswertung der vorhandenen bereits publizierten Rohdaten mit neu definierten Datensätzen durchgeführt (Abb.5).

Der Vergleich der Genexpressionprofile zwischen HPV-negativen und HPV16-positiven Proben wurde zuerst in einem Teil der gesamten Proben durchgeführt: Für die „technische“ Validierung (n=29) wurden cDNAs aus den RNA-Proben synthetisiert, deren RNA bereits für die Mikroarray Analyse verwendet wurden. Im Anschluss wurde eine weitere Validierung („statistische“ Validierung, n=51) in einem unabhängigen Probenset durchgeführt (Proben der gleichen Gruppe, jedoch nicht auf den Mikroarrays analysiert). Die Analyse wurde separat für beide Auswertungen (Validierungen) durchgeführt. Der Grund hierfür war, dass das erste Probenset die Anforderung einer Validierung im eigentlichen Sinn nicht entsprechen konnte, da es sich um dieselben Proben wie im ursprünglichen Experiment handelt. Der Vergleich der HPV16 persistenten mit und ohne Progression zu einem CIN3 oder einem schlechteren Verlauf wurde mit dem kompletten zur Verfügung stehenden Datensatz (n=80) durchgeführt (ausgeschlossen wurden lediglich die 15 HPV negativen Proben und die Proben von Frauen mit einer persistenten HPV16 Infektion mit Progression zu einer milden Dysplasie (CIN1/2, n=8)). Es wurden insgesamt 32 Frauen ohne Progression und 25 Frauen mit Progression zu einem CIN3+ verglichen und analysiert.

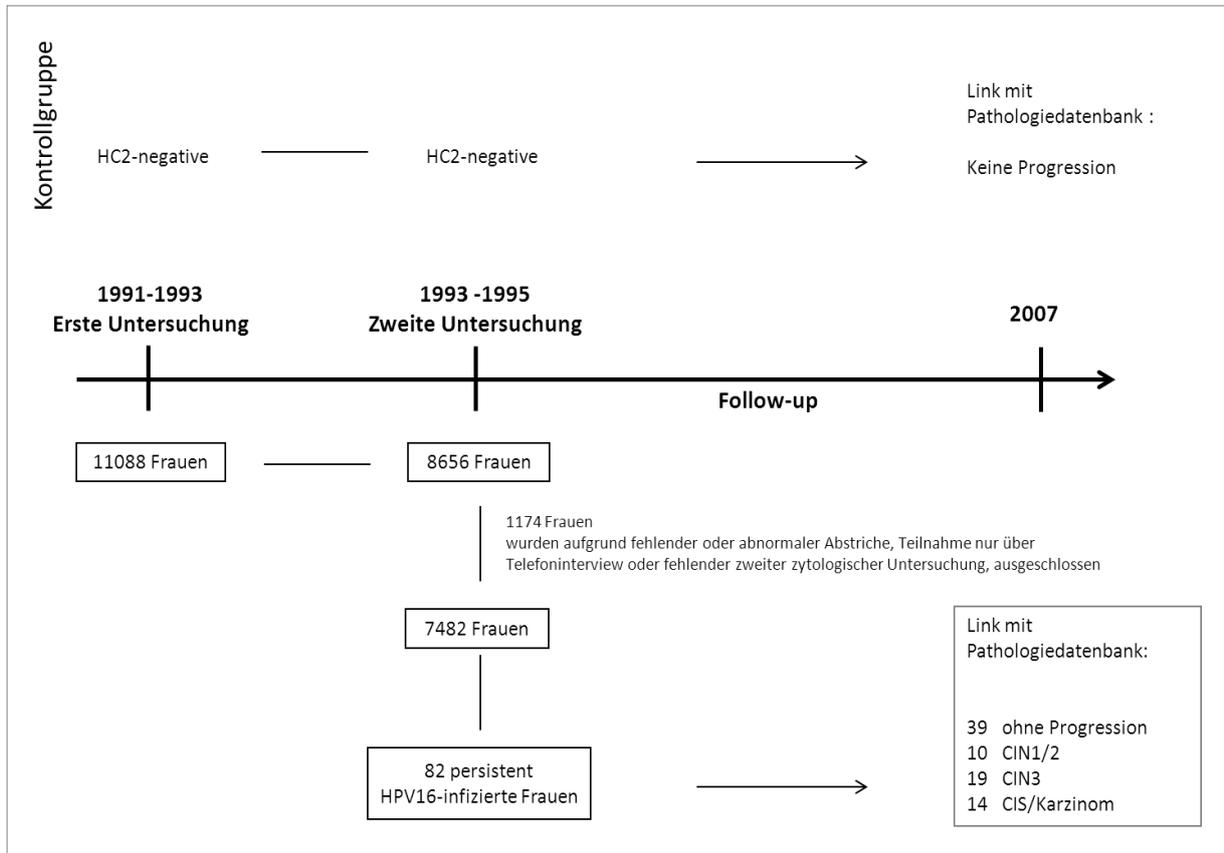


Abb. 5 Übersicht Dänische Kohorten Studie

Der HPV-Status bei der ersten und zweiten Untersuchung erlaubte die Einteilung in transiente (HPV16-positiv – HPV16-negativ) und persistente Infektionen (HPV16-positiv – HPV16-positiv). Nach 12 Jahren *follow-up* folgte der Link mit der Pathologie Datenbank und die Einteilung in die Gruppen mit (CIN1/2, n= 10; CIN3, n=19 und CIS/Karzinom, n=14) und ohne Progression (n=39). Die Kontrollgruppe besteht aus Frauen, die an beiden Untersuchungszeitpunkten negative HPV Befunde hatten und keine zervikalen Veränderungen während des *follow-ups* zeigten.

LBC Kohorte

Die pathologische Abteilung des Hvidovre Krankenhaus in Kopenhagen analysiert alle Zervix-Abstriche und folgende histopathologische Proben welche im Großraum Kopenhagen und Friederiksberg entnommen werden (ca. 60 000 Proben jedes Jahr). Seit 2002 werden die Abstriche in ein Flüssigmedium gegeben (SurePath, TriPath Corporation). Nach der Anfertigung eines Dünnschicht-Ausstriches wird die Probe aufbewahrt bis eine zytologische Diagnose erstellt wurde, anschließend wird die Probe vernichtet. Zwischen 2002 und 2005 wurden dort an zufällig ausgewählten Tagen fortlaufende Proben gesammelt, welche nach der zytologischen Untersuchung übrig geblieben sind. Es wurden Frauen zwischen 14 bis 96 Jahren eingeschlossen (Median: 37 Jahre) und alle Proben wurden von niedergelassenen Ärzten oder Gynäkologen mit Hilfe des SurePath LBC Systems entnommen und innerhalb von zwei Tagen in die pathologische Abteilung des Hvidore Krankenhauses geschickt. Das übriggebliebene Material wurde wöchentlich von der Dänischen

Krebsorganisation gesammelt und spätestens 2-3 Wochen nach Probenentnahme für die HPV Tests an das Institut für medizinische Virologie in Tübingen geschickt. Es wurden insgesamt 42 854 LBC Proben gesammelt, wovon 2 472 Proben ausgeschlossen wurden (Abb.6; fehlende oder unzureichende Identifizierung der Frauen, doppelte Proben der gleichen Frau oder fehlende HC2/LiPaV2/Zytologie-Ergebnisse).

Die Pathologie Datenbank ist, wie bereits im Abschnitt der Jungen Dänischen Kohorte erläutert, ein dänisches Pathologie Register welches Informationen über alle zervikalen zytologischen und histologischen Proben enthält, die in Dänemark entnommen wurden. Mit Hilfe der Studiennummer sowie der persönlichen Identifikationsnummer wurde die Kohorte mit der Pathologie Datenbank verlinkt und alle Informationen über das Ergebnis der Zytologie der ersten Probe und alle folgenden histologischen Untersuchungen zugeordnet (Abb. 6).

Sämtliche Proben wurden mit Hilfe des HC2 Tests auf 13 HR (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68) und 5 LR (6, 11, 42, 43, 44) HPV Typen untersucht, alle positiven Proben (RLU>1) wurden anschließen mit dem LiPaV2 (Innogenetics Inc. Gent, Belgien) (6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 74) genotypisiert.

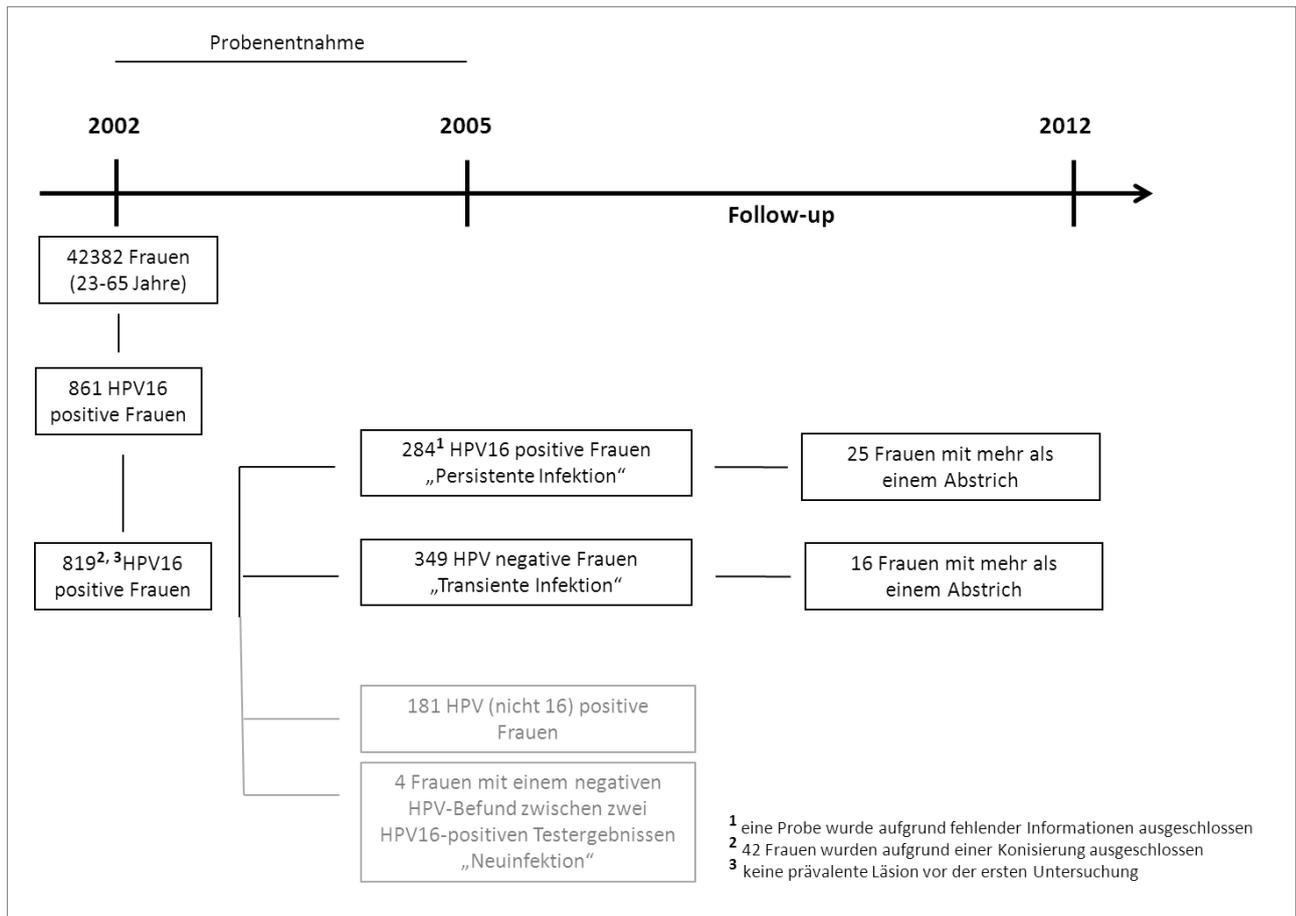


Abb. 6 Übersicht Dänische Kohorten Studie „LBC Kohorte“

Der HPV-Status bei der ersten und zweiten Untersuchung erlaubt die Einteilung in transiente (Erste Untersuchung: HPV16 positiv; Zweite Untersuchung: HPV16 negativ) und persistente Infektionen (Erste Untersuchung: HPV16 positiv; Zweite Untersuchung: HPV16 positiv). Von 819 Frauen waren 284 Frauen persistent und 349 transient infiziert. Zum zweiten Untersuchungszeitpunkt waren 181 positiv für HPV (ohne HPV16) und vier Frauen hatten eine neu erworbene HPV16 Infektion (mind. Ein HPV negativer Befund zwischen beiden Untersuchungszeitpunkten).

3.2 Methoden

3.2.1 Mikrobiologische Methoden

Folgende Methoden wurden nach Protokollen gemäß (Ausubel et al., 1990) durchgeführt:

- Herstellung kompetenter Bakterienzellen
- Transformation von DNA in kompetente Bakterienzellen
- Kulturen für Plasmidisolierung

3.2.2 DNA-Methoden

3.2.2.1 Standardmethoden

Folgende Methoden wurden nach Protokollen gemäß (Ausubel et al., 1990) durchgeführt:

- Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen
- Gelelektrophorese von Nukleinsäuren (Agarosegele)
- Dephosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten
- Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren
- Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase
- Gelelektrophorese von Nukleinsäuren (Agarosegele)

3.2.2.2 Präparative Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die präparative Plasmidisolierung aus Bakterien in verschiedenen Größenordnungen erfolgte mit "Plasmid Mini-" oder "Plasmid Midi-Kits" (QIAprep®) nach der Anleitung des Herstellers. Die DNA – Elution erfolgte in 50-200 µl ddH₂O und die DNA-Konzentration wurde mit Hilfe eines Spektralphotometers (Nanodrop) bestimmt.

3.2.2.3 DNA-Fragmentelution aus Agarosegelen

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte nach dem Ausschneiden der entsprechenden Banden unter UV-Licht mit Hilfe des "Qiaquick Gel Extraction Kit" (Qiagen) nach den Anweisungen des Herstellers. Die DNA wurde in 40 µl ddH₂O eluiert.

3.2.2.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation eluierter DNA-Fragmente mit linearisierten Vektoren erfolgte mit dem Rapid DNA-Ligation-Kit (Fermentas) nach den Angaben des Herstellers. Die dadurch erhaltenen zirkulären Plasmide wurden anschließend in kompetente *E.coli* DH5α transformiert.

3.2.2.5 Sequenzierung

Alle DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma GATC Biotech durchgeführt. Dafür wurden 30-100 ng der aufgereinigten Plasmid-DNA in einem Endvolumen von 30 µl zusammen mit dem Sequenzierungsprimer (Konzentration 10 µM) eingeschickt. Die erhaltenen Sequenzdaten wurden mit dem BLAST Algorithmus abgeglichen.

3.2.2.6 DNA-Extraktion aus Biopsie-Material

Die Extraktion von DNA aus dem Biopsie-Material erfolgte nach einem Denaturierungsschritt aus 200 µl Probenmaterial mit Hilfe des MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit (Roche) nach Herstellerprotokoll. Das Elutionsvolumen betrug 100 µl, die anschließend bei -20°C gelagert wurden. Aus dem restlichen Material von transienten Proben, dh. mit negativem HC2 Befund der zweiten Probe, wurde mit Hilfe des QiaSymphony (Qiagen, Hilden) DNA extrahiert. Hierfür wurde die Probe mit STM auf 400 µl aufgefüllt und DNA mit dem QIASymphony DSP Virus/Pathogen Kit nach Herstellerprotokoll extrahiert und in 60 µl eluiert. Alle Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.2.7 DNA-Extraktion aus Zellen

Die Extraktion von DNA aus Zellpellets erfolgte über einen ProteinaseK-Verdau mit 20 µg ProteinaseK pro 100 µl Puffer bestehend aus 0,1 M EDTA (pH 8,0), 0,05 M Tris (pH 8,0), 0,5 % [v/v] SDS bei 55 °C im Schüttelinkubator über Nacht mit anschließender Phenol-Chloroform-Aufreinigung und Ethanol-Fällung. Alternativ wurde DNA mit Hilfe des EZ1 DNA Tissue Kit (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers isoliert.

3.2.2.8 Multiplex qRT PCR

Die Multiplex PCR Reaktion wurde mit folgenden Reagenzien angesetzt:

- 10 µl Fast Advanced Mastermix (10x)
- 3 µl Oligonukleotid/Sonden Mix (jeweils 4 µM)
- 5 µl H₂O
- +2 µl Probenmaterial

Für die Etablierung der Multiplex qRT PCR wurde einmalig eine einfache qRT PCR Reaktion (Singleplex) mit fünf Replikaten und fünf Wasserkontrollen der drei Oligonukleotid/Sonden Gemische durchgeführt:

Initialer Aktivierungsschritt:	95°C	15 min		
2-Schritt Zyklus:	94°C	60 sec		
	60°C	90 sec	(Messung)	insgesamt 45 Zyklen

Im Anschluss daran erfolgte eine Farbkompensation (für die Farbstoffe VIC, Cy5 und FAM) mit den folgenden Parametern:

95°C	0:01 min	(Ramp Rate 4,5°C/s)
40°C	0:30 min	(Ramp Rate 2,5°C/s)
65°C	Durchgehend	(1 Messung/°C)

Diese Farbkompensationsanalyse wurde abgespeichert und konnte somit für alle Multiplex qRT PCR Experimente angewandt werden.

Um die Effizienz der drei Oligonukleotid/Sonden Paare zu ermitteln wurden Verdünnungsreihen eines Plasmids mit HPV16 Genom (10⁷ Kopien – 1 Kopie pBS16 114b in 1:10 Verdünnungsschritten) und DNA humaner primärer Keratinozyten (20 ng/µl-2 pg/µl HPK DNA in 1:2 Verdünnungsschritten) hergestellt. Diese Verdünnungsreihen wurden mit allen drei Oligonukleotid/Sonden Paaren gemessen, ebenso jedes Paar separat, um mögliche Auswirkungen der Kombination zu ermitteln. Für die Messung der einzelnen Oligonukleotid/Sonden Paare wurde die Verdünnungsreihe mit 25 ng/µl HPK DNA bzw. 100 Kopien pBS16 Plasmid versetzt. Die ermittelte Standardkurve wurde gespeichert und konnte durch das Mitführen eines Kalibrators auf alle folgenden Multiplex-Experimente angewendet werden. Bei jedem Lauf wurden alle Proben in Duplikaten gemessen und Positiv- (pBS16) sowie Negativkontrollen (H₂O) mitgeführt.

Die Messung von Beta-Aktin erlaubte die Bestimmung der absoluten Zellzahl pro μl Probe:

Die Menge an genomischer DNA (ng) in jeder Probe wurde durch das Gewicht eines Genom Äquivalents (6,6 pg/Zelle) dividiert um die Anzahl der Zellen in der Probe zu bestimmen. Die Viruslast wurde als die Anzahl der HPV16E6 Kopien pro Zelle berechnet und der Quotient von HPV16E2/E6 wurde ermittelt um den Integrationsstatus zu bestimmen. Lag der E2:E6 Quotient bei 1 wurde von einem episomal vorliegendem HPV16 Genom ausgegangen, im Gegensatz dazu spricht man bei einem Quotienten von 0 von einem integrierten Genom (Peitsaro et al. 2002). Bei Werten im Bereich von $0,15 < \text{E2:E6} < 0,9$ wird angenommen, dass die Probe integrierte und episomale Formen von HPV16 enthielt.

3.2.3 RNA-Methoden

3.2.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen

Für die Isolierung der Gesamt-RNA wurde das fertige Reaktionssystem *RNeasy® Mini Kit* (Qiagen) verwendet. Nach der Ernte der Zellen wurde das Zellpellet in Lysepuffer RLT aufgelöst und das Zelllysate anschließend mit Hilfe des *QIAshredder® Kits* (Qiagen) homogenisiert. Die RNA wurde in einem Volumen von 40 μl RNase-freiem Wasser eluiert und die Konzentration mit dem Spektralphotometer ND-1000, Nanodrop® bestimmt.

3.2.3.2 RNA Isolation aus PBS Abstrichen

Die Gesamt-RNA der PBS Abstriche wurde mittels eines modifizierten RNeasy Mini-Kits (Qiagen, Hilden) isoliert. Alle verwendeten Lösungen wurden mit Diethylpyrocarbonat (DEPC-behandeltem) H_2O hergestellt, um RNasen zu inaktivieren.

Die bei -80°C in PBS gelagerten Abstriche wurden für die RNA Isolation kurz im Kühlschrank angetaut bis man die Probe an der Abstrichbürste zusammen mit den ca. 2 ml gefrorenem PBS/Abstrichmaterial in eine Petrischale geben konnte. Mit einem Skalpell wurden die Bürsten abgeschnitten und in 2 ml RLT Puffer gegeben. Petrischale und Probengefäß wurden mit RLT Puffer ausgespült und zu dem Probenmaterial gegeben. Mit dem Dispergierer wurden die Proben ca. 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zerkleinert, anschließend auf drei 1,5 ml Eppendorf Gefäße verteilt und bei 14 000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit einem

Volumenanteil 70% igem Ethanol versetzt. Je 700 µl des Probenmaterials wurden auf drei RNeasy-Minispin-Säulen aufgetragen und für 1 min bei 10 000 rpm zentrifugiert. Dies wurde so oft wiederholt bis das gesamte Material aufgereinigt war. Nach einem Waschschrift wurde die gebundene RNA einem DNaseI Verdau über 15 min bei Raumtemperatur unterzogen um eventuell vorhandene genomische DNA zu beseitigen. In mehreren Zentrifugationsschritten wurden die Säulen mit Waschpuffern gereinigt. Für die RNA Elution wurden je 10 µl DEPC Wasser zugegeben und bei 14 000 rpm für 1 min zentrifugiert. Die Konzentration der RNA wurde mit dem Spektralphotometer (NanoDrop ND-1000) bestimmt. Die isolierte RNA wurde bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.2.3.3 RNA Isolation aus Dünnschichtzytologie-Material

Das Gesamtvolumen der Dünnschichtzytologie-Probe wurde bei 14 000 rpm für 2 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf ein Restvolumen von 3 ml in ein neues 15 ml Falcon überführt. Das Pellet wurde anschließend im restlichen Volumen resuspendiert und 1/3 des Gesamtmaterials (1 ml) wurden in ein neues 1,5 ml Gefäß überführt und für die RNA Extraktion verwendet. Der verbleibende Rest (2 ml) wurde mit dem zuvor abgenommenem Originalpuffer aufgefüllt und das Originalröhrchen bei -20°C gelagert. Für die RNA Extraktion wurde nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (4°C, 2 min bei 14 000 rpm) der Überstand abgesaugt und das Pellet in 350 µl RLT resuspendiert. Anschließend wurde die RNA nach Herstellerprotokoll mit dem *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden) extrahiert. Die RNA wurde in 50 µl RNase freiem Wasser eluiert und bei -80 °C gelagert.

3.2.3.4 Synthese von copy-DNA

Unter Verwendung des *QuantiTect® Reverse Transcription Kit* (Qiagen, Hilden) wurde die isolierte gesamtzelluläre RNA zu copy-DNA (cDNA), durch reverse Transkription nach Herstellerangaben, umgeschrieben. Bei RNA aus Zellkulturmaterial wurde 1000 ng Gesamt-RNA eingesetzt und das Volumen wurde nach abgeschlossener Reaktion mit 80 µl ddH₂O auf 100 µl aufgefüllt, so dass man eine Konzentration von 10 ng/µl cDNA erhielt.

3.2.3.5 RT-PCR

Die Reverse Transkription der RNA in DNA wurde unter Verwendung des Qiagen *One Step RT-PCR Kits* durchgeführt nach Anweisungen des Herstellers.

3.2.3.6 Quantitative Real Time PCR

Die quantitative RealTime PCR wurde mit dem *LightCycler® 480* (Roche) durchgeführt. Hierzu wurde ein kommerziell erwerblicher MasterMix *LightCycler® SYBR Green Master I* (Roche) der alle nötigen Komponenten wie dNTPs, Polymerase etc. sowie SYBR Green enthält, benutzt. SYBR Green lagert sich unspezifisch in doppelsträngige DNA ein, somit kann die Zunahme der entstandenen PCR-Produkte sofort am Ende jedes Zyklus bestimmt werden. Im idealen Fall zeigt diese Kurve den linear exponentiellen Anstieg der PCR-Produktmenge während der Reaktion. In der Regel wurde pro Reaktionsansatz 10 µl Mastermix, insgesamt 4 µl Primer, 1 µl Wasser und 5 µl cDNA in einem Gesamtansatz von 20 µl zusammen in eine *LightCycler® 480* Multiwell Platte 96 (Roche) pipettiert und mit einer selbstklebenden Abdeckfolie versiegelt. Wobei zuerst 15 µl des vorgemischten Mastermixes vorgelegt wurde und anschließend 5 µl der jeweiligen cDNA hinzugefügt wurde. Passend zu dem zu untersuchenden Gen wurden sequenzspezifische Primer eingesetzt.

Die PCR lief nach folgendem Programm ab:

Denaturierung	15 min	95°C	1 Zyklus
Amplifikation			40 Zyklen
Annealing	30 sec	55°C	
Elongation	30 sec	72°C	
Schmelzkurve	Hochheizen auf 95°C		
	2 min	60°C	
	0,1°C/sec	bis 95°C	45 Zyklen

Mittels der zugehörigen Software wurden die CP-Werte (Crossing Point) der jeweiligen Reaktionsansätze bestimmt. Der CP-Wert entspricht dem Zyklus, an dem sich die Fluoreszenzsignalintensität der cDNA-Probe erstmals signifikant von der Hintergrundfluoreszenz unterscheidet. Über die Korrelation der Stärke des Fluoreszenzsignals mit der Menge an PCR-Produkt, kann die relative Expression des zu untersuchenden Gens indirekt festgestellt werden. Um methodische Schwankungen auszugleichen, wurden alle cDNAs in Duplikaten gemessen. Zudem wurde parallel zum Zielgen immer ein Referenzgen (beta-Aktin) mitgemessen, dessen Expression konstant sein sollte.

Zur Berechnung der relativen mRNA-Expression des Zielgens wurde nach dem Modell von Pfaffl (Pfaffl 2001) gearbeitet. Dabei bezieht man sich immer auf eine Kontrollprobe (Kontrolle):

$$\text{n-fache Expression} = \frac{\Delta\text{CPZielgen (Kontrolle-Probe)}}{\text{(Effizienz Zielgen)}} \cdot \frac{\text{(Effizienz Referenz)}}{\Delta\text{CPReferenz (Kontrolle-Probe)}}$$

Für die Auswertung der Studien wurden die Werte der n-fachen Expression nach der Normalisierung logarithmiert (log10). Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPadPrism5 und der Verwendung des Mann Whitney Tests. Die Effizienzen der verwendeten Primer wurden anhand einer cDNA- bzw. Plasmid-Verdünnungsreihe und anschließender qRT-PCR über eine Standardkurve ermittelt.

3.2.4 Zellkultur-Methoden

3.2.4.1 Kultivierung von Säugerzellen und Arbeiten mit Säugerzellen

Alle verwendeten Zellen wurden als "Monolayer"-Kultur bei 37°C, 5% CO₂ und humidifizierter Atmosphäre in Plastik-Gewebekulturschalen (NUNC) kultiviert. Sämtliche Zellkulturarbeiten wurden an einer sterilen Werkbank durchgeführt. Die im Folgenden angegebenen Volumina der Medien und Lösungen sind auf die Verwendung einer 100 mm Kulturschale bezogen. Zum Passagieren konfluenter Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 5 ml sterilem PBS kurz gewaschen. Die Zellen wurden durch eine Inkubation mit 2 ml Trypsin-Lösung im Brutschrank von der Kulturschale abgelöst. Anschließend wurde das Trypsin durch Zugabe von 8 ml serumhaltigem Medium inaktiviert, die Zellen aufgenommen und vereinzelt.

CasKi-Zellen, HeLa-Zellen sowie Derivate der Zelllinien wurden in DMEM/10% FKS und Gentamycin kultiviert und maximal im Verhältnis 1:6 passagiert.

NIH3T3-J2-Zellen wurden bis Passage 25 in DMEM-CS (10 % CS und 50 mg/l Gentamycin) kultiviert und im Verhältnis 1:3 geteilt.

CC10-, CC7-Zellen und NHK- sowie immortalisierte NHK-Zellen wurden in E-Medium zusammen mit teilungsunfähigen NIH3T3-J2-Fibroblasten in einer Kokultur gehalten. Zum Passagieren wurden die Zellen auch hier mit PBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin-EDTA für etwa 5 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden zur Inaktivierung des Trypsins mit serumhaltigem Medium versetzt und anschließend in einem Zentrifugenröhrchen für 5 min bei 250 g abzentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands wurde das Pellet in frischem E-Medium aufgenommen und die Zellen im Verhältnis 1:4 auf eine neue Kulturschale (mit teilungsunfähigen NIH3T3-J2) gesplittet.

3.2.4.2 Mitomycinbehandlung von NIH3T3-J2

Um teilungsunfähige Fibroblasten für Kokulturen zu erhalten, wurden die Zellen mit Mitomycin C behandelt. Es verhindert weitere Teilungen der Fibroblasten, indem es die Ausbildung des Spindelapparates hemmt. Dazu wurde das Medium einer zu 80-90% konfluenten 100 mm-Platte NIH3T3-J2 abgesaugt, durch 5 ml frisches DMEM (mit 10% CS und Gentamycin) ersetzt und anschließend mit 100 µl Mitomycin C (400 µg/ml in PBS) versetzt. Die Platte wurde für 60 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die nun teilungsunfähigen Zellen dreimal mit je 10 ml PBS gewaschen und als „Feeder“-Zellen verwendet.

3.2.4.3 Ernten von Zellen

Zum Ernten der Zellen wurden die Zellen mit einem Zellschaber in dem jeweiligen Medium von der Schale gelöst und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt (30 s, 10 000 rpm) wurde das Pellet abhängig von der weiteren Verwendung in der entsprechenden Lösung aufgenommen.

3.2.4.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur langfristigen Lagerung wurden konfluent gewachsene Zellen bei -196°C in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dazu wurden die Zelllinien von einer 10 cm Zellkulturschale mit Trypsin abgelöst und nach Zugabe des entsprechenden Zellkulturmediums bei RT 5 min bei 250 g zentrifugiert. Der Zellrückstand wurde in kaltem Einfriermedium (CaSki und HeLa: 70% DMEM, 20% FKS, 10% DMSO; CC7, CC10 und NHK- sowie immortalisierte NHK-Zellen: 70% E-Medium, 20% FKS, 10% Glycerol) resuspendiert und zumeist auf mehrere Einfriereröhrchen verteilt, die zunächst in einer Einfrierbox langsam auf -80°C eingefroren wurden. Nach 24 h wurden die Zellen auf -196°C gebracht. Für das

Auftauen der Zellen wurde der Inhalt des Einfrierröhrchens in 10 ml Medium aufgenommen und in einer 10 cm Zellkulturschale ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumswechsel.

3.2.4.5 DNA Transfektion von Humanzellen mit einem Komplexbildner

Für diese Methode der Transfektion wurde der liposomenbasierte Komplexbildner FuGene HD (Roche) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die folgenden Angaben beziehen sich auf die Verwendung einer 60 mm-Schale. Die Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion auf Plastik-Kulturschalen ausgesät (Zelldichte: 3×10^5 pro 60 mm Schale). Pro Transfektionsansatz wurde ein steriles PS-Röhrchen mit jeweils 100 μ l OptiMEM vorbereitet, in das die DNA in der entsprechenden Menge mit FuGene HD im Verhältnis 5:2 (5 μ l FuGene HD auf 2 μ g DNA) pipettiert wurde. Nach Vortexen des Gemisches wurde es für 15 min bei RT inkubiert. In dieser Zeit wurde das Medium der zu transfizierenden Zellen gewechselt und nach Ablauf der Inkubationszeit das Transfektionsgemisch tropfenweise zum Medium gegeben. In der Regel wurden HeLa-Zellen in einer 60 mm Schale mit 0,5 μ g DNA transfiziert und CC10-Zellen mit 1,5 μ g DNA.

3.2.4.6 siRNA Transfektion von Humanzellen mit einem Komplexbildner

Die Transfektion von Humanzellen mit siRNA erfolgte mit dem liposomenbasierten Komplexbildner HiPerFect Transfection Reagent von Qiagen nach Anleitung des Herstellers. Die Zellen wurden am Tag vor der Transfektion in Plastikculturschalen ausgesät. Zelldichte für eine 6-Well Kulturschale betrug pro Well $1,8 \times 10^5$ Zellen; pro 60 mm Schale waren es 3×10^5 Zellen. Für den Transfektionsansatz in der 6-Well Kulturschale wurden 12 μ l HiPerFect, 600 ng siRNA (finale siRNA Konzentration: 20 nM) und für eine 60 mm Schale 20 μ l HiPerFect, 1024 ng siRNA (finale siRNA Konzentration: 20 nM) vorbereitet. Die Transfektionsansätze wurden mit OptiMEM auf 100 μ l aufgefüllt, durch Vortexen vermischt und für 10 min bei RT inkubiert. Während dieser 10 min wurde das Medium der zu transfizierenden Zellen gewechselt. Das siRNA-Gemisch wurde nach Ablauf der Inkubation tropfenweise in das Medium gegeben. Am nächsten Tag wurde erneut das Medium gewechselt. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen erneut transfiziert und nach weiteren 48 h geerntet.

3.2.4.7 Behandlung der Zellen mit MG132

MG-132 (Carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucina) ist ein Peptidaldehyd, das reversibel die Aktivität des 26S Proteasomenkomplexes inhibiert. Die Zellen wurden mit einer Konzentration von 10 μ M

über einen Zeitraum von 12 h behandelt. Da das MG-132 in DMSO gelöst ist, wurden die Kontrollen mit derselben Menge DMSO behandelt.

3.2.5 Proteinbiochemische-Methoden

3.2.5.1 Herstellung von Zellextrakten aus eukaryoten Zellen

Die Zellen wurden wie oben beschrieben geerntet und der Zellrückstand wurde in 60 µl Roti®-Load 1 (4x, Carl Roth) gelöst und für 5 min bei 42°C inkubiert. Für die Lyse mit RIPA-Puffer oder Urea-Puffer wurden die Zellen mit dem entsprechenden Puffer versetzt und für 1 Stunde bei 4°C lysiert. Anschließend wurde für 10 min bei 13 000 rpm zentrifugiert.

3.2.5.2 SDS-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte in eindimensionalen, diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen (Laemmli 1970). Die 12%-ige Trenngel-Lösung wurde direkt nach der Zugabe des Polymerisationsstarters APS zwischen zwei vertikale Glasplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt, mit Wasser nachgewaschen und anschließend das 4% Sammelgel gegossen. Als Größenstandard wurden in Gelen 7 µl „Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder“ (Fermentas) benutzt. Die Gelelektrophorese erfolgte über eine Dauer von circa 45-60 min in 1x SDS-Puffer bei 200 V.

3.2.5.3 Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose-Membran (Immunoblot)

Für die immunologische Detektion wurden die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine im Tank-Blot-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Zwei Gel-Blotting-Papiere (Schleicher & Schüll) und eine Nitrocellulosemembran wurden auf die Größe des Trenngels (5,5 x 8,5 cm) zurechtgeschnitten. Die Membran wurde in H₂O befeuchtet und anschließend zusammen mit dem Papier für wenige Minuten in CAPS-Puffer pH 10,3 (10 mM CAPS, 10% (v/v) Methanol) äquilibriert. Nach dem Gellauf wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel kurz in CAPS-Puffer gewaschen. Auf die Kathode der Blotapparatur wurden zwei Lagen Gel-Blotting-Papier, gefolgt von dem Trenngel und anschließend die Nitrocellulose-Membran sowie zwei weitere Lagen Gel-Blotting-Papier gelegt. Der ganze Aufbau erfolgte luftblasenfrei. Für den Transfer wurde für 90 min eine konstante

Spannung von 90 V in einer Tank-Blotkammer mit Kühlschleife, angelegt. Für den Transfer wurde CAPS-Puffer (10 mM CAPS, 10% (v/v) Methanol) mit einem pH-Wert von 10,3 verwendet.

3.2.5.4 Immunologischer Nachweis der transferierten Proteine

Der Nachweis der auf die Membran transferierten Proteine erfolgte durch für die jeweiligen Proteine spezifischen Erstantikörper sowie einem gegen den Erstantikörper gerichteten Sekundärantikörper. Der Sekundärantikörper war entweder an das Enzym HRP oder an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt.

Damit die Ergebnisse quantifizierbar sind, wurde für jeden Blot auch immer eine Ladekontrolle mitdetektiert. Dabei handelt es sich um ein Protein, von dem angenommen wird, dass es immer in gleicher Menge in den Zellen vorhanden ist (hier verwendet wurde HSP90). Alle Inkubationen und Waschschrte wurden auf einem Schüttler durchgeführt. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran mindestens 1 h lang bei RT bei 4°C in Blocklösung (5% Magermilchpulver (w/v) in TBS-T Puffer) inkubiert. Nach zwei Waschschrten mit TBS-T erfolgte die Inkubation mit dem (gemäß Abschnitt 3.1.5 in TBS-T Puffer verdünnten) proteinspezifischen Primärantikörper über Nacht bei 4°C. Am folgenden Tag wurde die Membran 3x für 10 min mit TBS-T gewaschen, um überschüssigen Primärantikörper zu entfernen. Die daran anschließende Inkubation mit dem Zweitantikörper (Verdünnungen gemäß Abschnitt 3.1.4) erfolgte für 1h bei RT. Nach erneuten Waschschrten (3x 10min mit TBS-T) erfolgte die Detektion.

- *Detektion durch das Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP):*

Das HRP erzeugt bei Anwesenheit eines entsprechenden Substrats Chemilumineszenz. Die Detektion erfolgte des Chemilumineszenz-Substrats Super Signal® West Dura mit Hilfe des Fluor-S Multimagers (BioRad). Als Auswertungssoftware wurde das Programm QuantityOne verwendet.

- *Detektion durch Fluoreszenz:*

In diesem Fall waren die Sekundärantikörper an IRDye (Infrarot-Fluoreszenzfarbstoffe) gekoppelt und konnten durch eine Anregung bei einer Wellenlänge von 680 nm bzw. 800 nm detektiert werden. Die Verwendung der fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper erforderte PBS bzw. PBS-T anstelle von TBS als Puffer. Die Detektion erfolgte mit dem Li-Cor® Odyssey Fc und der zugehörigen Auswertungssoftware „Image Studios“.

3.2.5.5 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse von Proteinen

Für die indirekte Immunfluoreszenzanalyse wurden zunächst Zellen, wie beschrieben auf Glasplättchen ausgesät und falls erforderlich, am nächsten Tag mit der entsprechenden DNA oder siRNA transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit einem 1:1 Gemisch aus Methanol und Aceton für 10 Minuten bei RT fixiert. Im Anschluss daran wurde mit 0,05% Saponin für 15 min permeabilisiert. Anschließend wurden die Glasplättchen mit PBS mit 3% BSA und den entsprechenden Primärantikörpern für 1 Stunde in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS mit 0,05% Triton-X-100 wurden die Glasplättchen mit PBS mit 3% BSA und den entsprechenden Sekundärantikörpern für 45-60 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde die Lösung abgenommen und DAPI-Färbelösung (0,01 µg/ml in PBS) für 20 Sekunden zugegeben. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS mit 0,05% Triton-X-100 wurden die Glasplättchen mit Fluoroprep (Biomérieux) auf Objektträgern fixiert. Die Aufnahmen wurden in der Regel mit einer Vergrößerung von 630-fach in Verbindung mit einem Apotom mit einem Zeiss Axiovert 200M Mikroskop oder mit dem Multiphotonenmikroskop LSM 710 NLO (Zeiss) gemacht.

3.2.5.6 Herstellung des Antikörpers TMEM45A-K

Der Antikörper wurde im Rahmen einer Kooperation im Interfakultären Institut für Biochemie in Tübingen (AG Kalbacher) hergestellt. Die Peptide TMEM45A₂₄₂₋₂₆₀ (FITWLKSRKRLCSSEVG), TMEM45A₂₅₅₋₂₇₅ (CSSEVGLLKNAEREQESEEM), TMEM45A₂₆₃₋₂₇₅ (KNAEREQESEEM), und TMEM45A₂₄₂₋₂₇₅ (FITWLKSRKRLCSSEVGLLKNAEREQESEEM) wurden auf einem Syro II Peptidsyntheseroboter (MultiSynTech, Witten) auf Tritylchlorid- Polystyrol-Harz (Intavis, Köln) mittels Standard-Fmoc/tBu-Strategie synthetisiert. Die Peptide wurden per RP-HPLC auf >90% Reinheit aufgereinigt und die Identität mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie bestätigt. Die Peptide TMEM45A₂₄₂₋₂₆₀, TMEM45A₂₅₅₋₂₇₅ und TMEM45A₂₆₃₋₂₇₅ wurden mit der Glutaraldehyd-Methode an Schlitzschnecken-Hämocyanin (KLH) konjugiert. Das Peptid TMEM45A₂₅₅₋₂₇₅ wurde zusätzlich an malmeid-funktionalisiertes KLH gekoppelt. Alle vier Konjugate wurden gemischt und für die Immunisierung eines Kaninchens verwendet (Charles River, Kisslegg). Der spezifische Antikörper wurde aus dem Antiserum mit Hilfe des an CH-aktivierter Sepharose (GE Healthcare, Freiburg) immobilisierten Peptids TMEM45A₂₄₂₋₂₇₅ aufgereinigt. Die Elution des Antikörpers erfolgte mit 100 mM Natriumcitrat pH 2,5 und der Puffer wurde anschließend durch 30 kDa Ultrafiltration (Sartorius, Göttingen) mit PBS ersetzt. Der Antikörper wurde mittels ELISA getestet und zeigte eine erwartete Spezifität gegenüber den Peptidepitopen.

4 ERGEBNISSE

4.1 Viruslast und Integrationsstatus als potentielle Marker für die Persistenz und Progression einer HPV16-Infektion (Junge Dänische Kohorte)

Nach wie vor ist unklar, ob die Viruslast oder der Integrationsstatus des HPV16 Genoms einen Risikofaktor für die Entwicklung einer persistenten Infektion oder gar eines Zervixkarzinoms darstellt. Während mehrere Studien eine Zunahme der Viruslast mit zunehmender Schwere der Läsionen beobachten konnten, wurde in anderen Studien entweder keine Assoziation oder eine höhere Viruslast in niedrig-gradigen Läsionen im Vergleich zu hochgradigen Läsionen gefunden (Hall et al. 1996; Nindl et al. 1997; Swan et al. 1999; Heard et al. 2000; Lillo et al. 2005). Mit Hilfe der Jungen Dänischen Kohorte sollte eine mögliche Korrelation zwischen Viruslast sowie Integrationsstatus und der Persistenz bzw. Progression einer HPV16-Infektion analysiert werden. Die Durchführung der DNA Extraktion und der quantitativen Real Time PCR wurde bereits beschrieben (Manawapat 2009). Aufgrund zusätzlicher Daten zu den in die Studie eingeschlossenen Frauen und deren Diagnosen, wurde eine neue Auswertung der vorhandenen Rohdaten mit neu definierten Datensätzen durchgeführt (Abb. 7):

Gruppe A: 91 Proben von HPV16-positiven Individuen aus **Phase 1** (1991-1993), welche zum Zeitpunkt 2 (1993-1995) HPV16-negativ waren und somit eine **transiente** Infektion hatten.

Gruppe B: 79 Proben von HPV16-positiven Individuen aus **Phase 1** und **Phase 2**, welche zu beiden Zeitpunkten HPV16-positiv waren und somit eine **persistente** Infektion entwickelten. Während der Nachverfolgungszeit entwickelten:

- 39 Frauen keine zervikalen Abnormitäten
- 9 Frauen ein CIN1/2
- 31 Frauen ein CIN3+

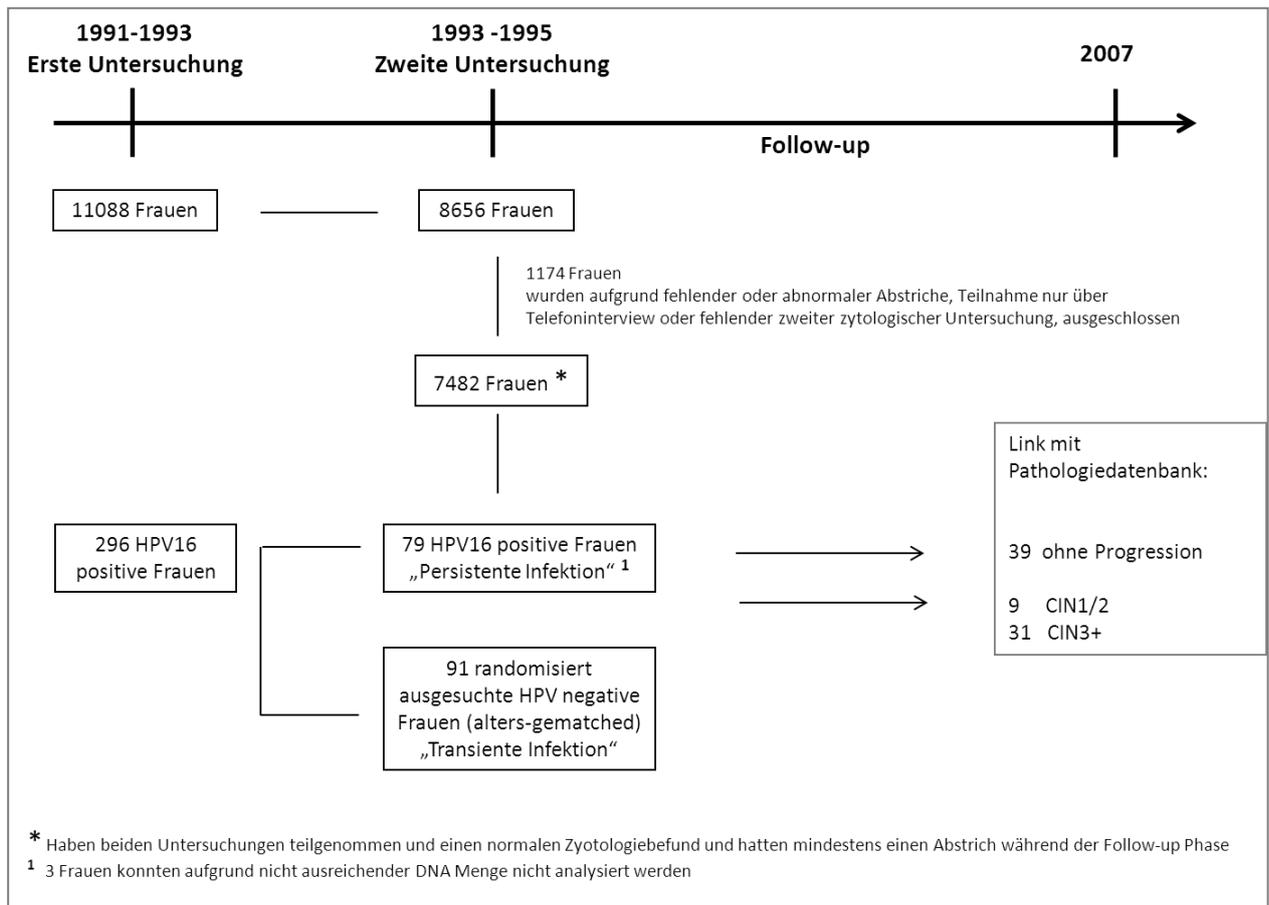


Abb. 7: Übersicht Junge Dänische Kohorte

Die Bestimmung des HPV Status bei der ersten und zweiten Untersuchung erlaubt die Einteilung in transiente (erste Untersuchung HPV16 positiv; zweite Untersuchung HPV16 negativ) und persistente Infektionen (erste Untersuchung HPV16 positiv, zweite Untersuchung HPV16 positiv). Von 7 482 Frauen waren 79 Frauen persistent infiziert. Aus allen Frauen die transient infiziert waren wurden 91 Frauen randomisiert ausgewählt. Nach einem medianen *follow-up* von 12,9 Jahren folgte der Abgleich mit der Pathologie Datenbank und die Einteilung der Frauen mit einer persistenten HPV16 Infektion in die Gruppen mit (CIN1/2, n= 9 und CIN3+, n=31) und ohne Progression (n=39).

4.1.1 Die HPV16 Viruslast ist in transienten und persistenten HPV16-Infektionen signifikant unterschiedlich

Im Abstrichmaterial, welches aus der ersten Untersuchung stammte, wurde mit Hilfe der qRT PCR die Viruslast in HPV16 E6 Kopien/Zelle bestimmt. Die Viruslast lag bei Frauen mit einer transienten Infektion zwischen <1 und 2012 viralen DNA Kopien pro Zelle (Median 20,0) und bei Frauen mit einer persistenten Infektion zwischen <1 und 1958 viralen DNA Kopien pro Zelle (Median 4,72; Tab. 13). Dahingegen war die Viruslast bei Frauen mit einer transienten Infektion im Gegensatz zu Frauen mit einer persistenten Infektion signifikant höher ($p=0,0003$; Abb. 8).

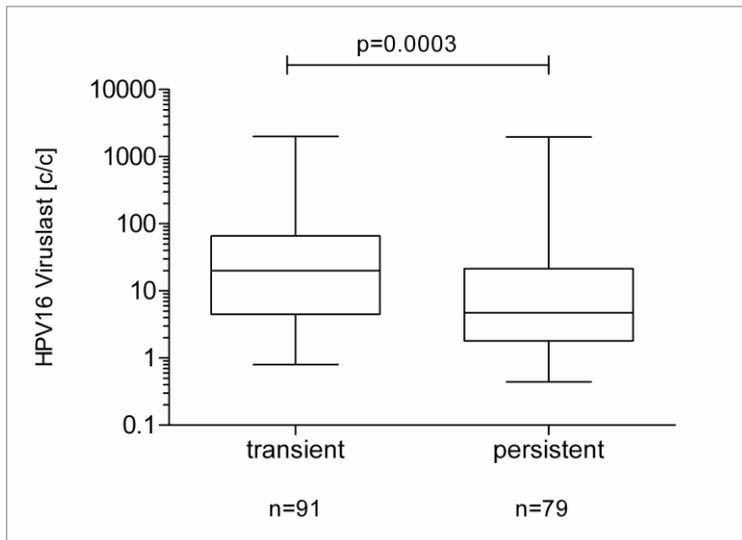


Abb. 8: Viruslast in transienten und persistenten Infektionen (Erster Untersuchungszeitpunkt)

Die y-Achse zeigt die Viruslast (logarithmiert) in HPV16 E6 Kopien pro Zelle. Der Box-Whisker-Plot zeigt den Median, sowie Minimum und Maximum. Die Box beschreibt den Bereich zwischen dem 25ten und 75ten Perzentil. Verglichen wurde der Log10 der Viruslast zwischen transienten (n=91) und persistenten (n=79) Infektionen. Der Unterschied zwischen transienten (Median 20 c/c; 25-75% Quartil: 4,5-65,8) und persistenten (Median: 4,72/c; 25-75% Quartil: 1,8-21,36) Infektionen war statistisch signifikant unterschiedlich ($p=0,0003$).

Tabelle 13: Vergleich der Viruslast von Frauen mit transientser und mit persistenter HPV16-Infektion

Viruslast zum Zeitpunkt:	Transiente Infektion	Persistente Infektion
Erste Untersuchung	(N=91)	(N=79)
Median (Kopien/Zelle)	20	4,72
25-75% Quartile	4,5-65,8	1,8-21,36

4.1.2 Die HPV16 Viruslast ist kein potentieller Marker für die Progression einer persistenten HPV16-Infektion

Um herauszufinden, ob die Viruslast ein möglicher prädiktiver Marker für die Entstehung einer inzidenten hochgradigen zervikalen intraepithelialen Neoplasie (CIN3+) ist, wurde die Viruslast von Frauen miteinander verglichen, die eine persistente HPV16-Infektion hatten und entweder während der Nachverfolgungszeit zytologisch unauffällig waren (n=39) oder nach der zweiten Untersuchung ein CIN3+ entwickelt hatten (n=31). Die Messwerte der Viruslast der ersten Proben lag bei den Frauen ohne Progression zwischen <1 und 225 viralen DNA Kopien/Zelle (Median: 3,7) und bei den Frauen mit Progression zu CIN3+ zwischen <1 und 171 viralen DNA Kopien/Zelle (Median: 3,96; Tab.

14). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe mit oder ohne Progression beobachtet werden ($p=0,85$; Abb. 9).

Das Experiment wurde ebenfalls mit den Proben der zweiten Untersuchung durchgeführt. Hierbei lag die Viruslast zwischen 1 und 745 viralen DNA Kopien/Zelle (Median: 13,93) bei den Frauen ohne Progression und zwischen <1 und 464 viralen DNA Kopien/Zelle (Median: 19,81; Tab. 14) bei den Frauen mit Progression. Der Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant ($p=0,39$; Abb. 10).

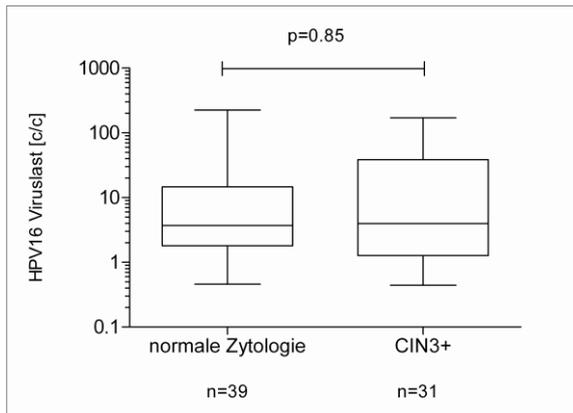


Abb. 9: Viruslast progredierende (CIN3+) gegen nicht progredierende (normale Zytologie) Infektionen (Erster Untersuchungszeitpunkt)

Die Abbildung zeigt die Viruslast zwischen persistent infizierten Frauen die während der *follow-up* Zeit ein CIN3+ (n=31) entwickelten oder zytologisch unauffällig (n=39) geblieben sind (aufgrund der unauffälligen Zytologie wurde keine histologische Untersuchung durchgeführt). Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Frauen mit normaler Zytologie (Median 3,7 c/c; 25-75% Quartil: 1,8-14,61) oder CIN3+ (Median: 3,96c/c; 25-75% Quartil: 1,27-38,5) beobachtet werden ($p=0,85$).

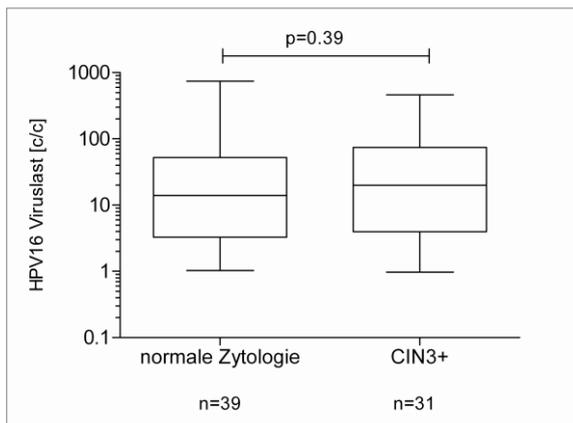


Abb. 10: Viruslast progredierende (CIN3+) gegen nicht progredierende (normale Zytologie) Infektionen (Zweiter Untersuchungszeitpunkt)

Die Abbildung zeigt die Viruslast zwischen persistent infizierten Frauen die während der *follow-up* Zeit ein CIN3+ (n=31) entwickelt haben oder zytologisch unauffällig (n=39) geblieben sind (aufgrund der unauffälligen Zytologie wurde keine histologische Untersuchung durchgeführt). Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Frauen mit normaler Zytologie (Median 13,93c/c; 25-75% Quartil: 3,28-52,11) oder CIN3+ (Median: 19,81c/c; 25-75% Quartil: 3,96-74,61) beobachtet werden ($p=0,39$).

Tabelle 14: Vergleich der Viruslast in Frauen die keine zytologische Auffälligkeiten entwickeln und Frauen die ein CIN3+ entwickelt haben

Viruslast zum Zeitpunkt:	Keine Progression/normale Zytologie (N=39)	CIN3+ (N=31)
Erste Untersuchung:		
Median (Kopien/Zelle)	3,7	3,96
25-75% Quartile	1,8-14,61	1,27-38,5
Zweite Untersuchung:		
Median (Kopien/Zelle)	13,93	19,81
25-75% Quartile	3,28-52,11	3,96-74,61

4.1.3 Der Integrationsstatus des HPV16 Genoms ist in transienten und persistenten HPV16-Infektionen signifikant unterschiedlich

Da in präkanzerösen Läsionen und Karzinomen häufig integrierte Virusgenome nachgewiesen werden können, wird seit langem vermutet, dass der Integrationsstatus von HR-HPV ein möglicher Marker für die Progression sein könnte (Kalantari et al. 1998; Klaes et al. 1999). Diese Integration geht häufig einher mit dem Verlust der E2/E4 Genregion, und somit den Repressorproteinen E2 und E8^{E2C}, unter Beibehaltung der E6/E7 Genregion. Durch die Ermittlung des Quotienten von E6 und E2 Kopien durch die quantitative Real Time PCR (qRT PCR) kann der Integrationsstatus bestimmt werden (Peitsaro et al. 2002). Um herauszufinden, ob der Integrationsstatus als ein möglicher prädiktiver Marker für die Persistenz einer HPV16-Infektion dienen kann, wurde die absolute Menge eines Referenzgenes sowie die Menge von HPV16E2 und E6 in den DNA Proben der transienten und persistenten HPV16-Infektionen bestimmt. Die Kopienzahlen wurden durch die Zellzahl pro Ansatz geteilt und somit die Ergebnisse in E2 bzw. E6 Kopien pro Zelle (c/c) angegeben. Bei einem Quotient von E2/E6 =1 geht man davon aus das alle HPV16 Genome episomal vorliegen. Im Gegensatz dazu spricht man bei einem E2/E6 Quotient=0 von einem integriertem Genom (Peitsaro et al. 2002). Ein Quotient größer als 1 kann durch die Integration in anderen Bereichen des HPV Genoms (in E6) und einer auf eine Deletion und einer somit verminderte Anzahl an E6 Kopien, erklärt werden. Bei einem Quotient zwischen 0,15 und 0,85 wird angenommen, dass die Probe eine Mischung integrierter und episomaler HPV16 Genome enthält. Die Analyse zeigte das die E2/E6 Werte in den Proben der ersten Untersuchung von Frauen mit einer transienten Infektion zwischen Null und 1,24 lagen (Median: 0,68). Im Vergleich dazu lagen die Werte der Proben persistent infizierter Frauen zum selben Untersuchungszeitpunkt signifikant niedriger (0-0,83; Median: 0,53; $p < 0,0001$; Abb. 11; Tab. 15). In der Gruppe der transienten Infektionen zeigten zwei Proben ein E2/E6 Quotient unter 0,15, in 80 Proben war es eine Mischung aus episomalen und integrierten Genomen (Ein E2/E6 Quotient zwischen 0,15 und 0,90) und bei neun Proben wurde ein Quotient von über 0,9 ermittelt. In der Gruppe der persistent infizierten Frauen besitzen sechs Frauen einen E2/E6 Quotient unter 0,15, 73 Frauen zeigten eine Mischung von integrierten und episomalen Genomen (Ein E2/E6 Quotient zwischen 0,15 und 0,90) und neun Frauen hatten einen E2/E6 Quotient über 0,9.

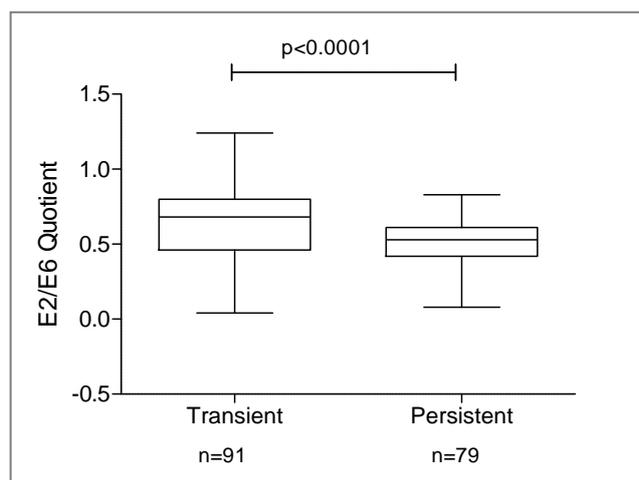


Abb. 11: Integrationsstatus in transienten und persistenten Infektionen (Erster Untersuchungszeitpunkt)

Die y-Achse stellt den E2/E6 Quotienten dar. Der Box-Whisker-Plot zeigt den Median, sowie Minimum und Maximum. Die Box beschreibt den Bereich zwischen dem 25ten und 75ten Perzentil. Der E2/E6 Quotient wurde zwischen transienten (n=91) und persistenten (n=79) Infektionen verglichen. Der Unterschied zwischen transienten (Median 0,68; 25-75% Quartile: 0,46-0,80) und persistenten (Median: 0,53; 25-75% Quartile: 0,42-0,61) Infektionen war statistisch signifikant unterschiedlich ($p < 0,0001$). Die Signifikanz wurde mit dem Mann Whitney Test ermittelt.

Tabelle 15: Vergleich des E2/E6 Quotienten in Frauen mit transientser und persistenter HPV16 Infektion

Proben zum Zeitpunkt: Erste Untersuchung	Transient (N=91)	Persistent (N=79)
Median	0,68	0,53
25-75% Quartile	0,46-0,8	0,42-0,61
Integriert <0,15	2	6
Gemischt 0,15-0,90	80	73
Episomal >0,9	9	0

4.1.4 Der Integrationsstatus ist kein potentieller prädiktiver Marker für die Progression einer persistenten HPV16-Infektion

In einer weiteren Analyse wurde untersucht, ob der Integrationsstatus ein möglicher prädiktiver Marker für die Progression einer persistenten HPV16-Infektion ist. Hierfür wurde der E2/E6 Quotient von persistent HPV16-infizierten Frauen mit (CIN3+) oder ohne Progression (<CIN1, „normale Zytologie“) miteinander verglichen. Zum ersten Untersuchungszeitpunkt lag der E2/E6 Quotient bei Frauen ohne Progression zwischen 0,1 und 0,82 (Median: 0,52) und bei Frauen die während der Nachverfolgungszeit ein CIN3+ entwickelt hatten, zwischen 0,1 und 0,83 (Median: 0,48; Tab. 16). Es konnte keine signifikante Korrelation zwischen dem Integrationsstatus und der Progression einer persistenten HPV16-Infektion nachgewiesen werden ($p=0,61$; Abb. 12). In der Gruppe der Frauen mit normaler Zytologie (n=39) wiesen drei Proben einen E2/E6 Quotient unter 0,15 auf, 36 Frauen besaßen eine Mischung aus episomalen und integrierten Genomen (ein E2/E6 Quotient zwischen 0,15 und 0,90) und in keiner der Frauen war ein E2/E6 Quotient über 0,9 zu detektieren. In der

Gruppe der persistent infizierten Frauen (n=31) besitzen drei Frauen einen E2/E6 Quotient unter 0,15, 28 Frauen zeigten eine Mischung von integrierten und episomalen Genomen (ein E2/E6 Quotient zwischen 0,15 und 0,90) keine der Frauen hatte einen E2/E6 Quotient über 0,9.

Die gleiche Analyse wurde mit den Proben der zweiten Untersuchung durchgeführt, jedoch konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied des E2/E6 Quotienten ($p=0,86$; Abb. 13) zwischen der Gruppe von Frauen ohne Progression (Werte: 0,06-0,55; Median: 0,20) und Progression zu CIN3+ (Werte: 0,07-0,6; Median: 0,19; Tab. 16) festgestellt werden. In der Gruppe der Frauen mit normaler Zytologie (n=39) zeigten acht Proben einen E2/E6 Quotient unter 0,15 und 31 Frauen zeigten eine Mischung aus episomalen und integrierten Genomen (ein E2/E6 Quotient zwischen 0,15 und 0,90). In der Gruppe der persistent infizierten Frauen (n=31) besitzen acht Frauen einen E2/E6 Quotient unter 0,15, 23 Frauen zeigten eine Mischung von integrierten und episomalen Genomen (ein E2/E6 Quotient zwischen 0,15 und 0,90), keine der Frauen hatte einen E2/E6 Quotient über 0,9.

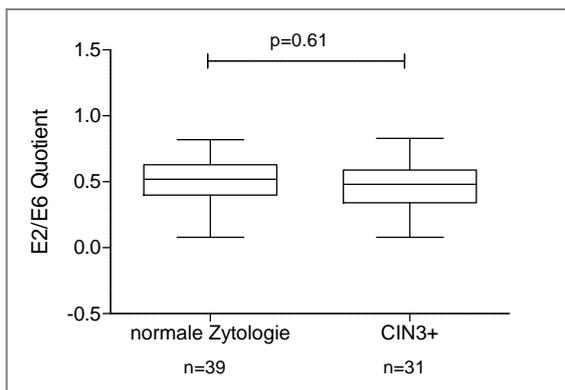


Abb. 12: Integrationsstatus in Frauen mit oder ohne Progression (Erster Untersuchungszeitpunkt)

Der E2/E6 Quotient zwischen persistent infizierten Frauen die während der *follow-up* Zeit ein CIN3+ (n=31) entwickelt haben oder zytologisch unauffällig (n=39) geblieben sind. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Frauen mit normaler Zytologie (Median: 0,52; 25-75% Quartil: 0,4-0,63) oder CIN3+ (Median: 0,48; 25-75% Quartil: 0,34-0,59) festgestellt werden ($p=0,61$).

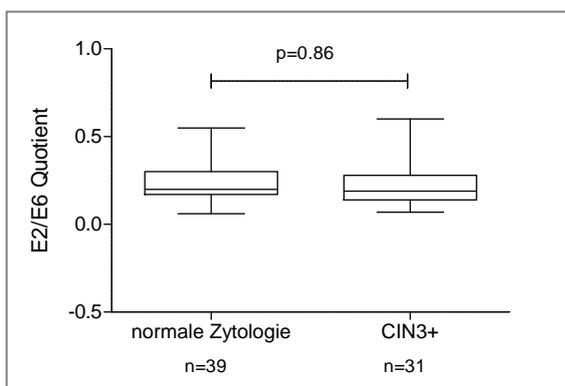


Abb. 13: Integrationsstatus in Frauen mit oder ohne Progression (Zweiter Untersuchungszeitpunkt)

Der E2/E6 Quotient zwischen persistent infizierten Frauen die während der *follow-up* Zeit ein CIN3+ (n=31) entwickelt haben oder zytologisch unauffällig (n=39) geblieben sind. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Frauen mit normaler Zytologie (Median: 0,2; 25-75% Quartile: 0,17-0,30) oder CIN3+ (Median: 0,19; 25-75% Quartile: 0,14-0,28) beobachtet werden ($p=0,86$).

Tabelle 16: Vergleich des E2/E6 Quotienten in Frauen die zytologisch unauffällig blieben und Frauen die ein CIN3+ entwickelt haben

<i>E2/E6 Quotient in</i>		
Proben zum Zeitpunkt:	Keine Progression/Normale Zytologie (N=39)	CIN3+ (N=31)
Erste Untersuchung:		
Median	0,52	0,48
25-75% Quartile	0,4-0,63	0,34-0,59
Integriert <0,15	3	3
Gemischt 0,15-0,90	36	28
Episomal >0,9	0	0
Zweite Untersuchung:		
Median	0,2	0,19
25-75% Quartile	0,17-0,3	0,14-0,28
Integriert <0,15	8	8
Gemischt 0,15-0,90	31	23
Episomal >0,9	0	0

4.1.5 Korrelationen von Viruslast und Integrationsstatus über die Zeit

Durch die Kombination der Viruslast mit dem Integrationsstatus der persistent HPV16-infizierten Frauen und dem Vergleich der beiden Untersuchungszeitpunkte, konnte eine Zunahme der integrierten Genome (E2/E6 Quotient <0,15) beim zweiten Untersuchungszeitpunkt festgestellt werden (Abb. 14). Weiterhin konnte ein allgemein niedrigerer E2/E6 Quotient in den Proben der zweiten Untersuchung beobachtet werden. Während der E2/E6 Quotient zum ersten Untersuchungszeitpunkt zwischen 0 und 0,83 (Median: 0,53) lag und nur 7,6% integrierte Genome (+92,4% gemischte Genomformen) enthielt, konnte zum zweiten Untersuchungszeitpunkt eine Zunahme der integrierten Genome auf 21,5% (+78,4% gemischte Genomformen) und E2/E6 Quotienten zwischen 0,06 und 0,6 (Median: 0,21) detektiert werden.

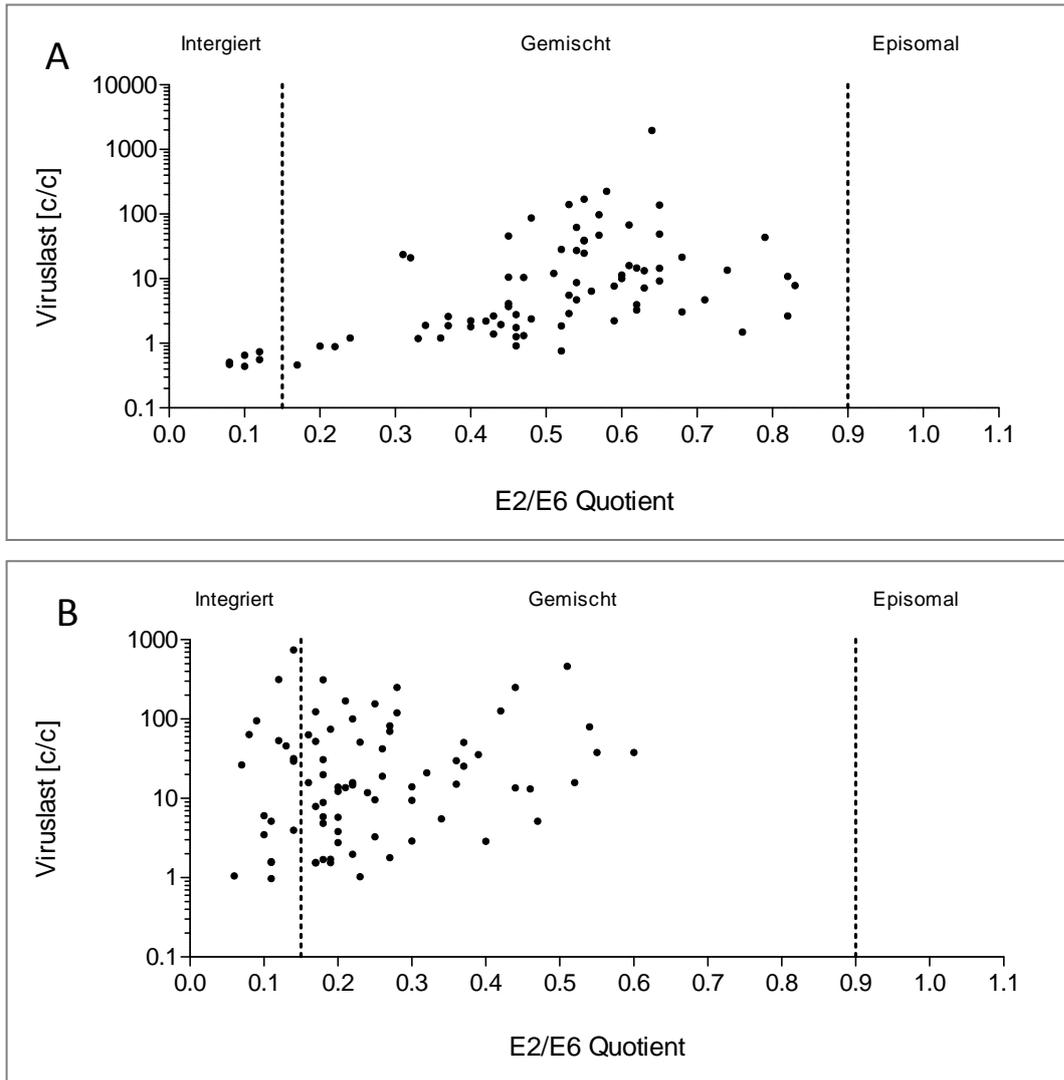


Abb. 14: Korrelation der HPV16 Viruslast und des Integrationsstatus von persistent HPV16-infizierten Frauen (n=79).

Die HPV16 Viruslast ist dargestellt auf der Y-Achse mit der Einheit HPV16 E6 Kopien pro Zelle. Die korrespondierenden E2/E6 Quotienten sind auf der X-Achse aufgetragen. Im Vergleich zu den Proben die zum ersten Untersuchungszeitpunkt (A) entnommen wurden (bei denen nur sechs Frauen integrierte Genome besitzen), zeigen die Proben die zwei Jahre später entnommen wurden (B) eine größere Anzahl an Frauen mit integrierten HPV16 Genomen (n=17).

4.2 Viruslast und Integrationsstatus als potentielle Marker für die Persistenz einer HPV16-Infektion in einer größeren prospektiven Dänischen Kohorte („LBC Kohorte“) mit 40 382 Frauen zwischen 14 und 96 Jahren

Um die im vorangegangenen Abschnitt erzielten Ergebnisse in einer unabhängigen Kohorte zu validieren, wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit die Viruslast und der Integrationsstatus in der „LBC-Kohorte“ bestimmt. Mit Hilfe der HPV-Bestimmung in mehreren Dünnschichtzytologie-Proben einzelner Frauen zwischen 14 und 96 Jahren (mind. 18 Monate zeitlicher Abstand) konnten die Teilnehmenden in Frauen mit transienter und persistenter HPV16-Infektion eingeteilt werden (Abb. 15). Dies ermöglichte die Bestimmung der Viruslast und des Integrationsstatus an zwei unterschiedlichen Zeitpunkten. Im Gegensatz zur Jungen Dänischen Kohorte wurden die Frauen nach Einschluss in die Studie nicht zu einer zweiten Untersuchung eingeladen, die Probenentnahme erfolgte im Kontext der Routinediagnostik.

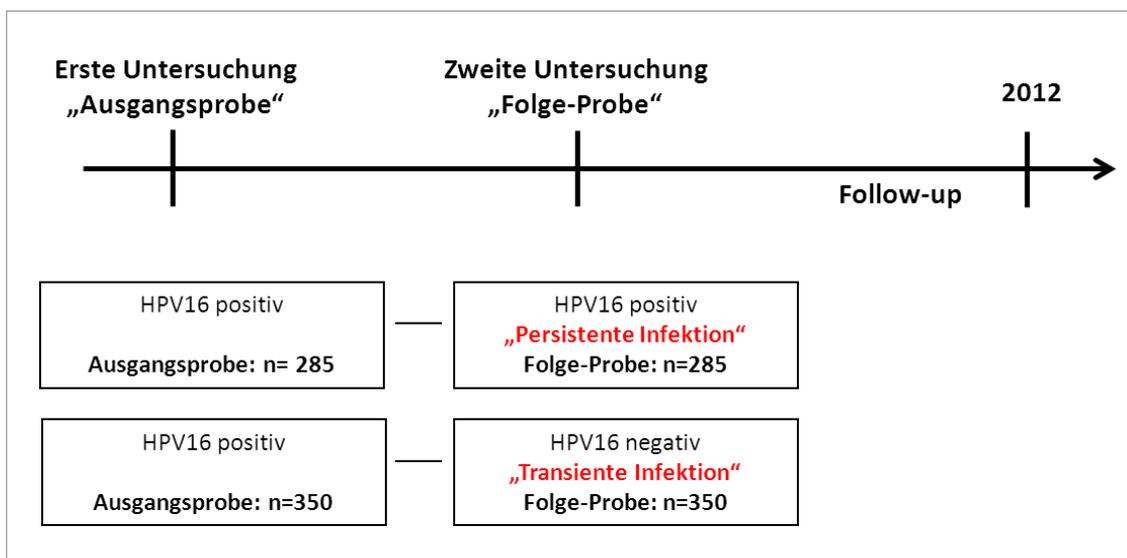


Abb.15: Schema der verfügbaren Proben der „LBC“-Kohorte.

Von insgesamt 820 Frauen die in der Ausgangsprobe HPV16 positiv waren, verblieben 285 Frauen mit einer persistenten und 350 Frauen mit einer transienten HPV16-Infektion. Für die Bestimmung der Viruslast wurden Proben von 285 persistent und 350 transient HPV16 infizierten Frauen untersucht. Es wurde die Viruslast in der jeweiligen „Ausgangsprobe“ und der „Folgeprobe“ jeder Frau bestimmt.

4.2.1 Etablierung einer Multiplex Real Time PCR zur Bestimmung der Viruslast und des Integrationsstatus in HPV16-positiven Proben

Um kostbares Probenmaterial einzusparen und die Anzahl der E2 und E6 Kopien in einem Reaktionsansatz bestimmen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Multiplex PCR zur simultanen Bestimmung von HPV16E2, E6 und des Referenzgens Aktin etabliert. Die Oligonukleotid- und Sondensequenzen für HPV16E2 und E6 wurden bereits publiziert (Peitsaro et al. 2002), die dort verwendete Kombination mit Albumin als Referenzgen konnte bei uns nicht etabliert werden. Daher wurden verschiedene kommerziell erhältliche Primer- und Sonden-Kombinationen getestet, um ein optimales Ergebnis zu erzielen. Nach der Austestung mehrerer Variationen zeigte eine Kombination der bereits publizierten Sequenzen und dem Referenz-Assay für Aktin (Applied Biosystems) die besten Ergebnisse mit sehr guten Effizienzen und geringen Abweichungen zwischen Singleplex- und Multiplexreaktionen (Abb. 16, Tab. 17). Für den direkten Vergleich der Singleplex- und Multiplex-Reaktionen wurde für die Multiplex PCR (siehe Abschnitt 3.2.2.8; Primer- und Sondensequenzen in Tab. 7) eine variable Mischung eines HPV16-Plasmids (pBS16) und genomischer DNA aus HPV-negativen Keratinozyten (NHK) eingesetzt (siehe Tab. 17). Den Singleplex-Reaktionen wurden, um der Beschaffenheit des zu untersuchenden Probenmaterials näher zu kommen (Mischung virales Genom und humaner DNA), 25 ng genomische DNA bzw. 100 Kopien des HPV16-Plasmids zugesetzt. In Tabelle 17 sind die Ergebnisse der Experimente unter Verwendung von Standard DNA (NHK bzw. pBS16 (Plasmid mit HPV16 Gesamtgenom)) gezeigt. Die humane DNA (NHK DNA) wurde zunächst in identischen Konzentrationen und die virale DNA (pBS16 Plasmid) in variablen Konzentrationen verwendet (um den Einfluss extremer DNA-Verhältnisse im Probenmaterial beurteilen zu können), um die Effizienz der HPV16E2 und E6 Primer und Sonden mittels einer Standardkurve zu bestimmen. Ebenso wurde das pBS16 Plasmid in gleichbleibenden Konzentrationen und die humane DNA in variablen Konzentrationen eingesetzt, um die Effizienz des Aktin Referenz-Assays zu bestimmen. Die CP-Werte der Singleplex- und der Triplex-Reaktionen stimmten in allen Reaktionen (HPV16E2, E6 und Aktin) überein. Die Abweichungen der einzelnen Singleplex- Experimente zur Multiplex PCR waren mit einer Abweichung der CP-Werte (*Crossing Point*) von 0,01%-4,3% vergleichbar (entspricht max. 1,5 CP-Werte; Tab. 17), die mit 0,72% geringste Abweichung wurde bei der Detektion von HPV16E6 festgestellt (HPV16E2: 2,49%; Aktin: 1,16%). Bei einer Wiederholung des Experimentes ergaben sich vergleichbare Ergebnisse. In der im Triplex-Ansatz durchgeführten PCR traten nur sehr geringe Abweichungen der verglichenen CP-Werte auf. Daraus konnte geschlossen werden, dass auch unter extremen DNA-Verhältnissen (wenige virale Kopien in sehr vielen humanen Zellen bzw. sehr viele virale Kopien in wenigen humanen Zellen) die parallel ablaufenden Einzelreaktionen keinen negativen Einfluss auf die Sensitivität der jeweils anderen PCR Reaktionen hatte. Alle Standardkurven zeigten eine Effizienz zwischen 1,95 und 2,03 (HPV16 E2 2,03; HPV16E6: 2,03; Aktin: 1,95).

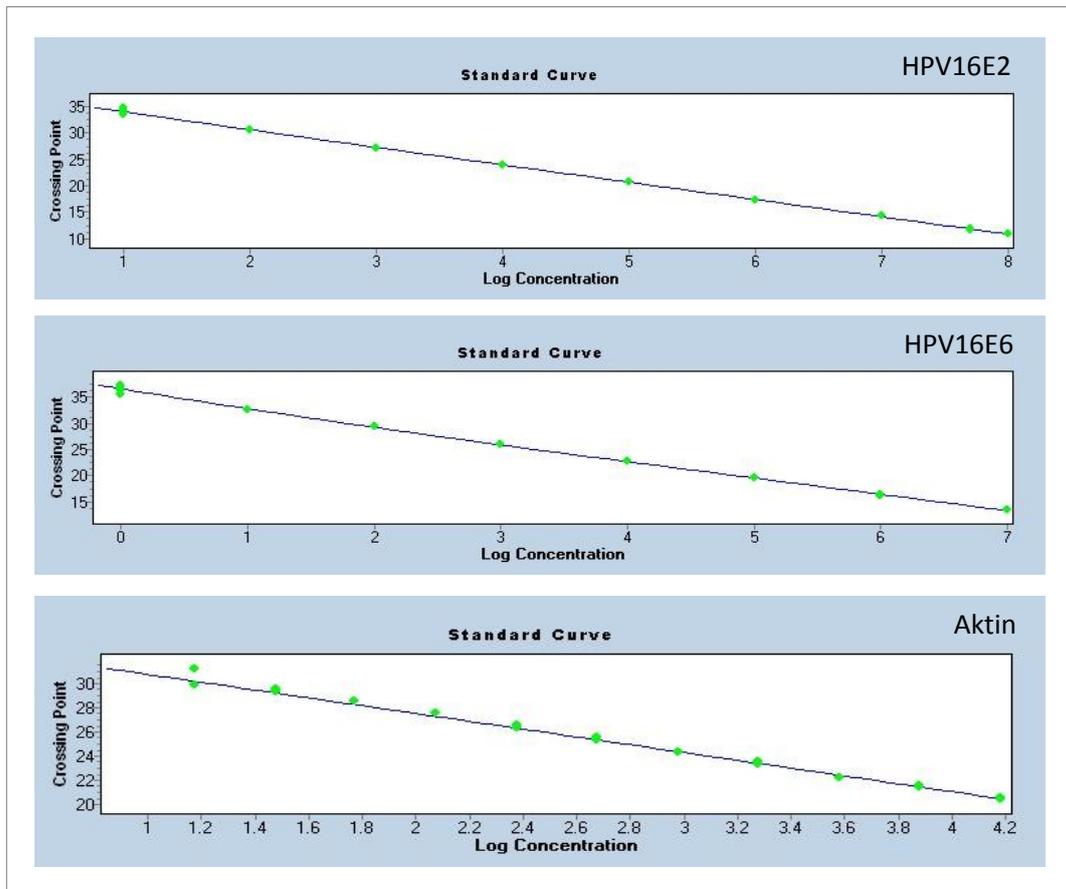


Abb. 16 Standardkurve der Multiplex PCR für HPV16E2, HPV16E6 und Aktin.

Aufgetragen ist der Logarithmus der DNA Ausgangsmenge (ng/μl bzw. Kopien/μl) gegen den CP Wert. Die Fehlerrate des Experiments lag für HPV16E2 bei 0,011, bei HPV16E6 bei 0,0161 und für Aktin bei 0,009. (Analysen wurden durchgeführt mit dem Light Cycler 480 von Roche.)

Tab. 17: Vergleich der Singleplex- und Multiplex-Reaktionen

Verwendet wurde DNA des pBS16 Plasmids und DNA aus humanen Keratinozyten. Als Template wurden unterschiedliche Verdünnungsstufen eingesetzt.

E2(-Cy5) - Multiplex			MW Cp	E2(-Cy5) - Singleplex		MW Cp	% Abw.
10E7	+100 ng/µl DNA	12.80		10E7	+25 ng DNA	12.88	0.6
10E6	+50 ng/µl DNA	15.54		10E6	+25 ng DNA	16.11	3.7
10E5	+25 ng/µl DNA	18.60		10E5	+25 ng DNA	19.25	3.3
10E4	+12 ng/µl DNA	21.95		10E4	+25 ng DNA	22.64	3.1
10E3	+6 ng/µl DNA	25.55		10E3	+25 ng DNA	26.04	1.9
10E2	+3 ng/µl DNA	29.17		10E2	+25 ng DNA	29.72	1.9
10E1	+1,5 ng/µl DNA	32.38		10	+25 ng DNA	32.83	1.1
1	+750 pg/µl DNA	34.95		1	+25 ng DNA	36.45	4.3
E6(-FAM) - Multiplex			MW Cp	E6(-FAM) - Singleplex		MW Cp	
10E7	+100 ng/µl DNA	13.50		10E7	+25 ng DNA	13.11	2.9
10E6	+50 ng/µl DNA	16.28		10E6	+25 ng DNA	16.44	0.9
10E5	+25 ng/µl DNA	19.50		10E5	+25 ng DNA	19.54	0.2
10E4	+12 ng/µl DNA	22.77		10E4	+25 ng DNA	22.79	0.09
10E3	+6 ng/µl DNA	26.02		10E3	+25 ng DNA	26.28	0.01
10E2	+3 ng/µl DNA	29.40		10E2	+25 ng DNA	29.87	1.6
10E1	+1,5 ng/µl DNA	32.66		10	+25 ng DNA	32.67	0.03
1	+750 pg/µl DNA	35.56		1	+25 ng DNA	35.57	0.03
ACTB(-VIC) - Multiplex			MW Cp	ACTB(-VIC) - Singleplex		MW Cp	
10E7	+100 ng/µl DNA	20.48		100 ng DNA	+100copies	20.72	1.2
10E6	+50 ng/µl DNA	21.46		50 ng DNA	+100copies	21.79	1.5
10E5	+25 ng/µl DNA	22.23		25 ng DNA	+100copies	22.86	2.8
10E4	+12 ng/µl DNA	23.40		12 ng DNA	+100copies	23.84	1.9
10E3	+6 ng/µl DNA	24.33		6 ng DNA	+100copies	24.72	1.6
10E2	+3 ng/µl DNA	25.46		3 ng DNA	+100copies	25.82	1.4
10E1	+1,5 ng/µl DNA	26.42		1,5 ng DNA	+100copies	26.66	0.9
1	+750 pg/µl DNA	27.57		750 pg DNA	+100copies	27.71	0.5
1	+375 pg/µl DNA	28.60		375 pg DNA	+100copies	28.74	0.5
1	+188 pg/µl DNA	29.47		188 pg DNA	+100copies	29.76	0.01
1	+94 pg/µl DNA	30.61		94 pg DNA	+100copies	30.50	0.4

Alle Folge-Proben der LBC Kohorte, die ein Hybrid Capture 2 (HC2)-Ergebnis $RLU < 1$ hatten, wurden ursprünglich als HPV-negativ, d.h. als transient eingestuft. Eine möglicherweise persistente HPV16-Infektion mit einer geringen Viruslast ($RLU/Cut\ off < 1,0$ im HC2 Test) würde somit fälschlicherweise nicht in die Gruppe der HPV16-persistenten Frauen eingeordnet. Um dies auszuschließen wurden alle transienten Folge-Proben (d.h. $HC2\ RLU < 1$) mit der neu etablierten Multiplex PCR auf das Vorhandensein von HPV16E6 und E2 getestet. Von den 350 HC2 negativen Proben wurde bei 21 Proben ein eindeutiges HPV16 Signal detektiert und diese somit in die Gruppe der persistent infizierten Frauen eingeordnet.

Unerwarteterweise konnten in 59 HPV16-positiven Proben des ersten Untersuchungszeitpunkts (6 Proben der persistenten Gruppe und 53 Proben der transienten Gruppe) sowie in 12 Proben des zweiten Untersuchungszeitpunktes kein HPV16 Signal mit Hilfe der Multiplex PCR nachgewiesen werden. Da die frühere Einteilung anhand der Ergebnisse des LiPa Extra vorgenommen wurde, folgte ein Vergleich der Sensitivität beider Detektionsmethoden. Die Messung einer Verdünnungsreihe ergab, dass ein positives LiPa Signal auch in solchen Proben nachweisbar war, in denen mit Hilfe der Multiplex kein HPV16 Signal mehr detektierbar war. Der Unterschied ließ sich somit auf die höhere Sensitivität des ursprünglichen Tests zurückführen. Die Proben wurden von jeder weiteren Analyse ausgeschlossen und es blieben 281 Frauen mit einer persistenten und 274 Frauen mit einer transienten HPV16 Infektion.

Abbildung 17 zeigt das Studien-Schema und die Probenverteilung entsprechend der HPV-Detektion mittels Multiplex PCR. Von den 285 persistent infizierten Frauen konnte in sechs Ausgangsproben keine HPV DNA und in sieben Proben keine zelluläre DNA nachgewiesen werden. Bei 12 Folge-Proben wurde festgestellt, dass kein HPV16-Signal mit der Multiplex PCR detektierbar war. Wie im oberen Abschnitt beschrieben, wurde bei 21 Frauen mit einem negativen HC2 Ergebnis ($RLU < 1$) HPV16 detektiert. Daher wurden sie in die Gruppe der persistent infizierten Frauen eingeschlossen. Somit verbleiben 281 Frauen mit einer persistenten HPV16 Infektion. Von den 350 getesteten, transient infizierten Frauen wurden 53 Frauen aufgrund eines negativen HPV16 Signals in der Ausgangsprobe ausgeschlossen, ebenso zwei Frauen in deren Probe keine zelluläre DNA nachzuweisen war. Nach Abzug der Proben, die unerwarteterweise ein HPV16 Signal zeigten, beinhaltete die Gruppe der transient HPV16-infizierten nun 274 Frauen.

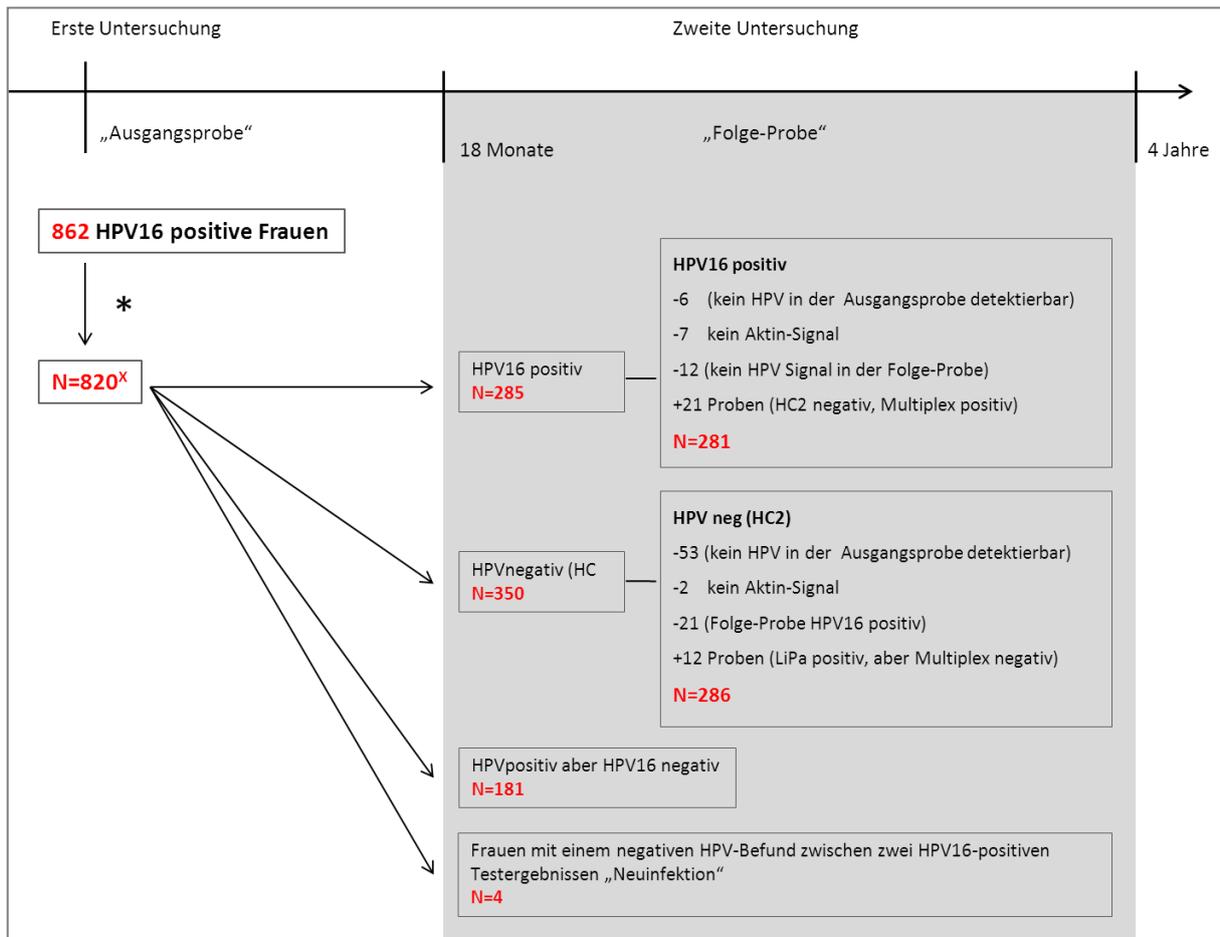


Abb.17: Schema der für die Viruslastbestimmung und Integrationsbestimmung verfügbaren Proben der „LBC“-Kohorte.

Von insgesamt 820 Frauen die in der Ausgangsprobe HPV16-positiv waren, blieben 285 Frauen mit einer persistenten und 350 Frauen mit einer transienten HPV16-Infektion. Nach Ausschluss von Proben ohne HPV16 Signal in der Ausgangsprobe oder fehlendem zellulärem DNA Signal und Neueinteilung in transiente und persistente Infektionen durch Multiplex PCR verbleiben in der persistenten Gruppe 281 Frauen und in der Gruppe mit transienten HPV16-Infektionen 274 Frauen.

* 42 Frauen wurden aufgrund einer Konisierung innerhalb eines Jahres vor der ersten Untersuchung ausgeschlossen.

^x keine prävalente Läsion (HISL und CIN2+) innerhalb eines Jahres vor der ersten Untersuchung.

4.2.2 Die Viruslast ist möglicherweise ein potentieller Marker für eine transiente oder persistente HPV16-Infektion

Mit Hilfe der im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Multiplex PCR wurde in den „LBC“-Proben die Viruslast pro Zelle bestimmt. Die Viruslast lag bei Frauen mit einer transienten Infektion zwischen weniger als einer und 878 viralen DNA Kopien pro Zelle (Median 0,7) und bei Frauen mit einer persistenten Infektion zwischen <1 und 1246 viralen DNA Kopien pro Zelle (Median 1,2; Tab. 18). Die Viruslast war bei Frauen mit einer transienten Infektion im Gegensatz zu Frauen mit einer persistenten Infektion niedriger, dieser Unterschied ist nicht echt signifikant, zeigte jedoch einen Trend ($p=0,06$; Abb. 18).

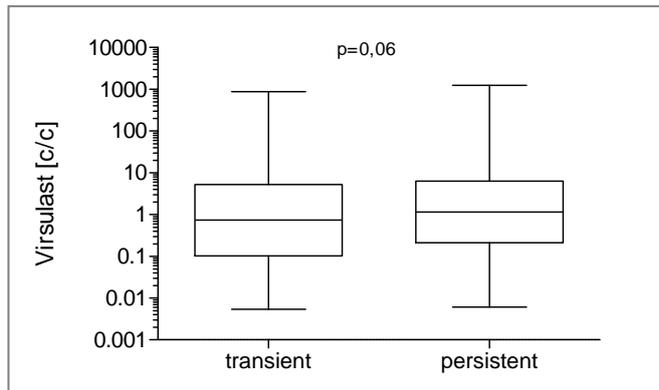


Abb. 18: Viruslast in transienten und persistenten Infektionen (LBC-Ausgangsprobe)

Die y-Achse zeigt die Viruslast (logarithmiert) in HPV16 E6 Kopien pro Zelle. Der Box-Whisker-Plot zeigt den Median, sowie Minimum und Maximum. Die Box beschreibt den Bereich zwischen dem 25ten und 75ten Perzentil. Der Log10 der Viruslast wurde zwischen transienten (n=274) und persistenten (n=281) Infektionen verglichen. Der Unterschied zwischen transienten (Median: 0,7c/c; 25-75% Quartil: 0,1-5,2) und persistenten (Median: 1,5/c; 25-75% Quartil: 0,2-6,3) Infektionen war statistisch nicht echt signifikant unterschiedlich ($p=0.06$).

Tabelle 18: Vergleich der Viruslast von Frauen mit transienter und mit persistenter HPV16-Infektion

Viruslast in	Transiente Infektion	Persistente Infektion
Proben zum Zeitpunkt:	(N=274)	(N=281)
Erster Untersuchung		
Median (Kopien/Zelle)	0,73	1,15
25-75% Quartile	0,1-5,2	0,2-6,3

4.2.3 Der Integrationsstatus ist kein potentieller Marker für eine transiente oder persistente HPV16-Infektion

Nach der Bestimmung der Kopienzahlen für 16E2, 16E6 und der Zellzahl mit Hilfe der Multiplex PCR wurde der Integrationsstatus der transient und persistent HPV16-Infizierten Frauen berechnet (wie bereits in Abschnitt 4.2.3 beschrieben). Die Auswertung der Daten zeigte, dass die E2/E6 Quotienten in den Ausgangsproben von Frauen mit einer transienten Infektion zwischen Null und 2,1 lagen (Median: 0,87). Im Vergleich dazu lagen die Werte der Proben persistent infizierter Frauen zum selben Untersuchungszeitpunkt zwischen 0 und 1,7 (Median: 0,86; Abb. 19; Tab. 19). Es konnte kein signifikanter Unterschied beobachtet werden ($p=0,55$). In der Gruppe der transienten Infektionen zeigten vier Proben einen E2/E6 Quotient unter 0,15, 154 Frauen zeigten eine Mischung aus episomalen und integrierten Genomen (Ein E2/E6 Quotient zwischen 0,15 und 0,90) und 116 Frauen hatten einen E2/E6 Quotient über 0,9. In der Gruppe der persistent infizierten Frauen besitzen sechs Frauen einen E2/E6 Quotient unter 0,15, 161 Frauen zeigten eine Mischung von integrierten und

episomalen Genomen (Ein E2/E6 Quotient zwischen 0,15 und 0,90) und 114 Frauen hatten einen E2/E6 Quotient über 0,9.

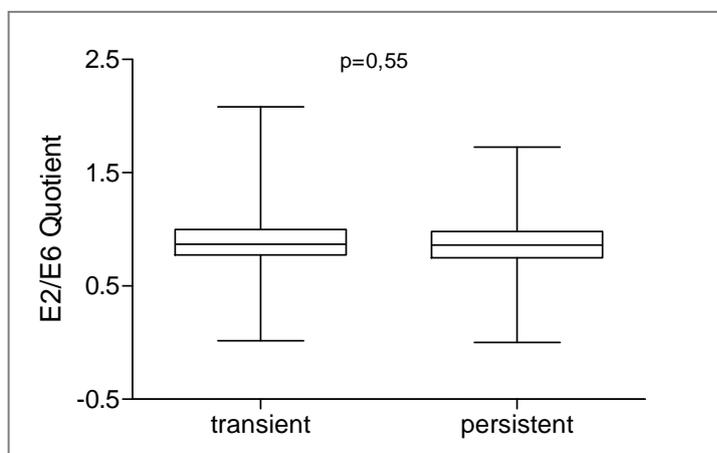


Abb. 19: Integrationsstatus in transienten und persistenten Infektionen (LBC-Ausgangssprobe)
Die y-Achse zeigt den E2/E6 Quotienten. Der Box-Whisker-Plot zeigt den Median, sowie Minimum und Maximum. Die Box beschreibt den Bereich des 25-75% Perzentils. Das E2/E6 Verhältnis wurde zwischen transienten (n=274) und persistenten (n=281) Infektionen verglichen. Der Unterschied zwischen transienten (Median: 0,87; 25-75% Quartil: 0,77-0,99) und persistenten (Median: 0,86; 25-75% Quartil: 0,75-0,98) Infektionen ist statistisch nicht signifikant unterschiedlich ($p=0,55$).

Tabelle 19: Vergleich des E2/E6 Quotienten in Frauen mit transientser und persistenter HPV16-Infektion

<i>E2/E6 Quotient in</i>		
Proben der	Transient (N=274)	Persistent (N=281)
Ersten Untersuchung:		
Median	0,87	0,86
25-75% Quartil	0,77-0,99	0,75-0,98
Integriert <0.15	4	6
Gemischt 0.15-0.90	154	161
Episomal >0.9	116	114

4.2.4 Korrelationen von Viruslast und Integrationsstatus über die Zeit

Bei einer Kombination der Viruslast und des Integrationsstatus der persistent HPV16-infizierten Frauen und dem Vergleich an der beiden Untersuchungszeitpunkte konnte im Gegensatz zur Analyse der Jungen Dänischen Kohorte nur eine sehr geringe Zunahme der integrierten Genome (E2/E6 Quotient < 0,15) beim zweiten Untersuchungszeitpunkt beobachtet werden (Abb. 20). Während nur sechs Frauen in der Ausgangssprobe ein E2/E6 <0,15 zeigten, konnte bei 11 Folgeproben ein solcher Wert beobachtet werden. Auch bei den gemischten Genomformen war eine leichte Zunahme von 57,3% (erster Zeitpunkt) auf 63,7% (zweiter Zeitpunkt) sichtbar, resultierend daraus eine Abnahme der episomalen Formen von 40,6% auf 32,4%. Eine deutliche Verschiebung der Genomformen wie

bei der Jungen Dänischen Kohorte konnte zwischen den beiden Zeitpunkten jedoch nicht beobachtet werden.

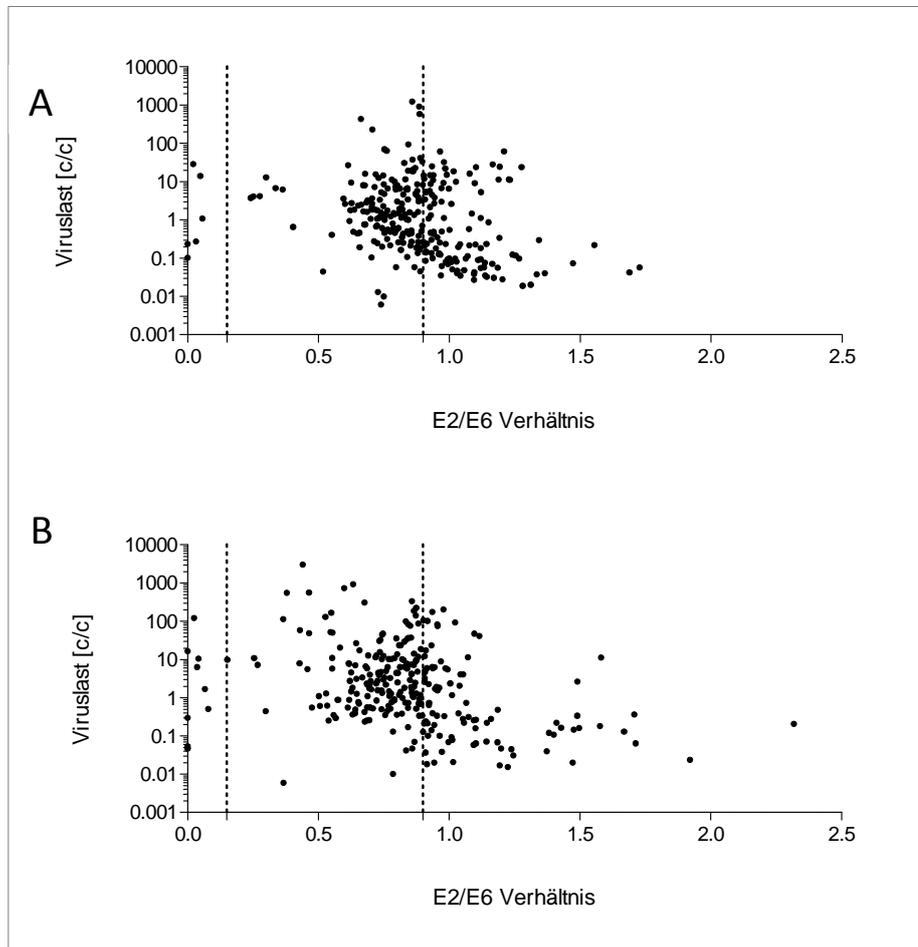


Abb. 20: Korrelation der HPV16 Viruslast und des Integrationsstatus von persistent HPV16-infizierten Frauen (n=281). Die HPV16 Viruslast ist dargestellt auf der Y-Achse in HPV16E6 Kopien pro Zelle. Die korrespondierenden E2/E6 Quotienten sind auf der X-Achse aufgetragen. A: Erster Untersuchungszeitpunkt, B: Zweiter Untersuchungszeitpunkt.

4.2.5. Vergleich der Methoden zur Viruslast und Integrationsbestimmung

Aufgrund der deutlich unterschiedlichen Werte der Viruslast und des Integrationsstatus in der Jungen Dänischen Kohorte und der ebenfalls dänischen LBC Kohorte sollten die Methoden zur HPVE2 und E6-Bestimmung in diesen Kohorten miteinander verglichen werden. Weiterhin sollte die unterschiedliche Bestimmung der Zellzahl, die in der Jungen Dänische Kohorte mit Hilfe von IFNb1 und bei der LBC Kohorte mittels Aktin bestimmt wurde, miteinander verglichen werden. Hierfür wurden HPV16 E2, E6 und Aktin Werte mittels Multiplex PCR (siehe Abschnitt 3.2.2.8) für je 15 Proben der drei unterschiedlichen Gruppen (Transiente Infektion, Persistente Infektion/Erster Untersuchungszeitpunkt und Persistente Infektion/Zweiter Untersuchungszeitpunkt) aus der Jungen

Dänische Kohorte bestimmt. In Abbildung 21A und B sind die somit ermittelten Werte der Viruslast und des Integrationsstatus für insgesamt 45 Proben der Jungen Dänischen Kohorte gegenübergestellt.

Der Median der Viruslast ist in der Analyse basierend auf Singleplex Messungen höher (20,92) als bei der Messung mit der Multiplex PCR (12,45), die Verteilung der Werte aber ähnlich (Singleplex: 0,85-1023; Multiplex: 0,52-1209; Abb. 25A). Die Berechnung des Integrationsstatus basierend auf den Ergebnissen der Singleplex PCR ergab einen ähnlichen Median wie bei der Multiplex PCR (0,72 und 0,74). Bei der Analyse der Multiplex PCR fallen jedoch zwei Proben auf, welche ein deutlich niedrigeres E2/E6 Verhältnis zeigen (Abb.21 B, Pfeil, rot markiert). Aufgrund eines schlechteren HPV16 E2 Signals, welches in die Berechnung mit einfließt, ist das Verhältnis zwischen E2 und E6 ca. 10-fach erniedrigt (Singleplex: 0,5 vs. Multiplex: 0,05 und Singleplex: 0,4 vs. Multiplex: 0,05).

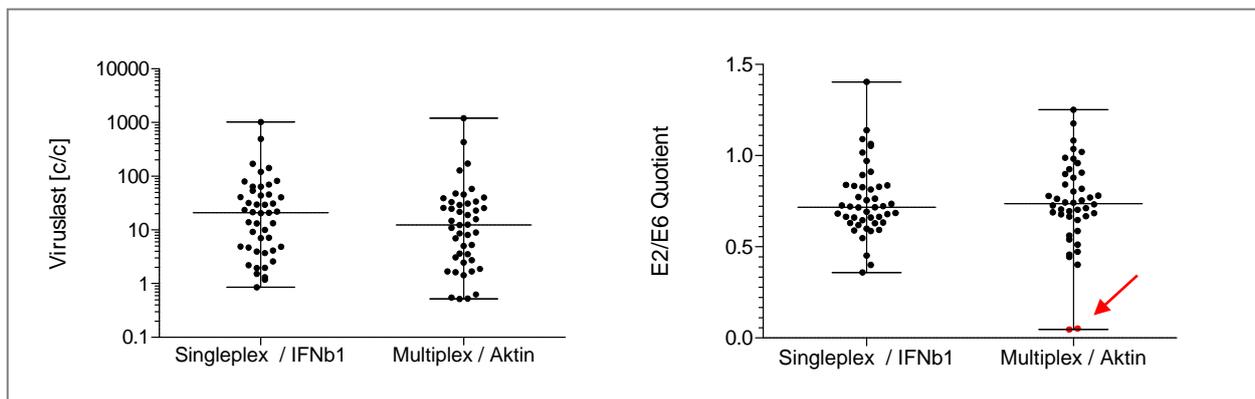


Abb. 21: Vergleich der beiden Methoden zur Bestimmung der Viruslast (A) und des Integrationsstatus (B).

Die mit Hilfe der Singleplex PCR und der Multiplex PCR berechneten Werte von 45 Proben der Jungen dänischen Kohorte wurden miteinander verglichen. Beide Methoden zeigten vergleichbare Werte, nur die in Abbildung B rot markierten Werte zeigten aufgrund eines extrem erniedrigten E2-Signals ein verminderten E2/E6-Quotienten.

4.3 Identifikation von potentiellen mRNA Markern für die Persistenz und Progression einer HPV16-Infektion

Um potentielle Marker für die Persistenz und Progression einer HPV16-Infektion zu identifizieren wurden Genexpressionsprofile von Frauen mit und ohne Progression zu einem CIN3 oder höhergradigen Läsionen (CIN3+) verglichen. Die Durchführung der RNA Extraktion, der Microarrays, der bioinformatische Analyse und der Validierung wurde bereits beschrieben (Manawapat 2009). Aufgrund zusätzlicher Daten zu den in die Studie eingeschlossenen Frauen und deren Diagnosen, wurde eine neue Auswertung der vorhandenen Rohdaten mit neu definierten Datensätzen durchgeführt. Die Genexpressionsprofile folgender Gruppen wurden miteinander verglichen:

- Gruppe C: 12 HPV-negative Proben
- Gruppe D: 15 HPV16-persistent (ohne Progression)
- Gruppe E: 21 HPV16-persistent (Progression)

Für die Analyse der Microarray Daten wurden sieben Datensätze ausgeschlossen (Gruppe A: 1 Probe, Gruppe B und C: jeweils 3 Proben), da diese die Qualitätsanforderungen der Affymetrix Mikroarrays nicht erfüllten. Es blieben somit insgesamt 41 Datensätze mit 11 HPV-negativen Proben, 12 HPV16-persistent infizierte Proben ohne Progression und 18 HPV16-persistent infizierte Proben mit Progression (Abb. 22). Die bioinformatische Analyse der Microarrays der Gruppen HPV-negativ (n=11) gegen HPV16-positiv (n=30) durch Dr. Hans Gmünder (*Genedata*, Basel) resultierte in einer Liste mit 1273 Transkripten, die eine mindestens 2-fache, signifikant veränderte Expression aufwiesen. Für die technische Validierung des Vergleichs HPV-negativ vs. HPV16-positiv wurden folgende Gene aufgrund der statistischen Signifikanz und der veränderten Expression ausgewählt:

- TMEM45a: $p = 5.5 \times 10^{-5}$, 3,6-fach induziert
- TNFAIP6: $p = 8.9 \times 10^{-6}$, 19,4-fach reprimiert
- CD44: $p = 5.9 \times 10^{-6}$, 3,6-fach reprimiert
- CCRL2: $p = 1.8 \times 10^{-6}$, 25-fach reprimiert

Zusätzlich wurde die Menge von CDKN2A Transkripten gemessen (im Folgenden immer p16/CDKN2A genannt), welche auch die des potentiellen Biomarkers p16 beinhalten, auch wenn die Analyse der Microarrays keinen Hinweis auf eine veränderte p16 Transkription ergeben hatte.

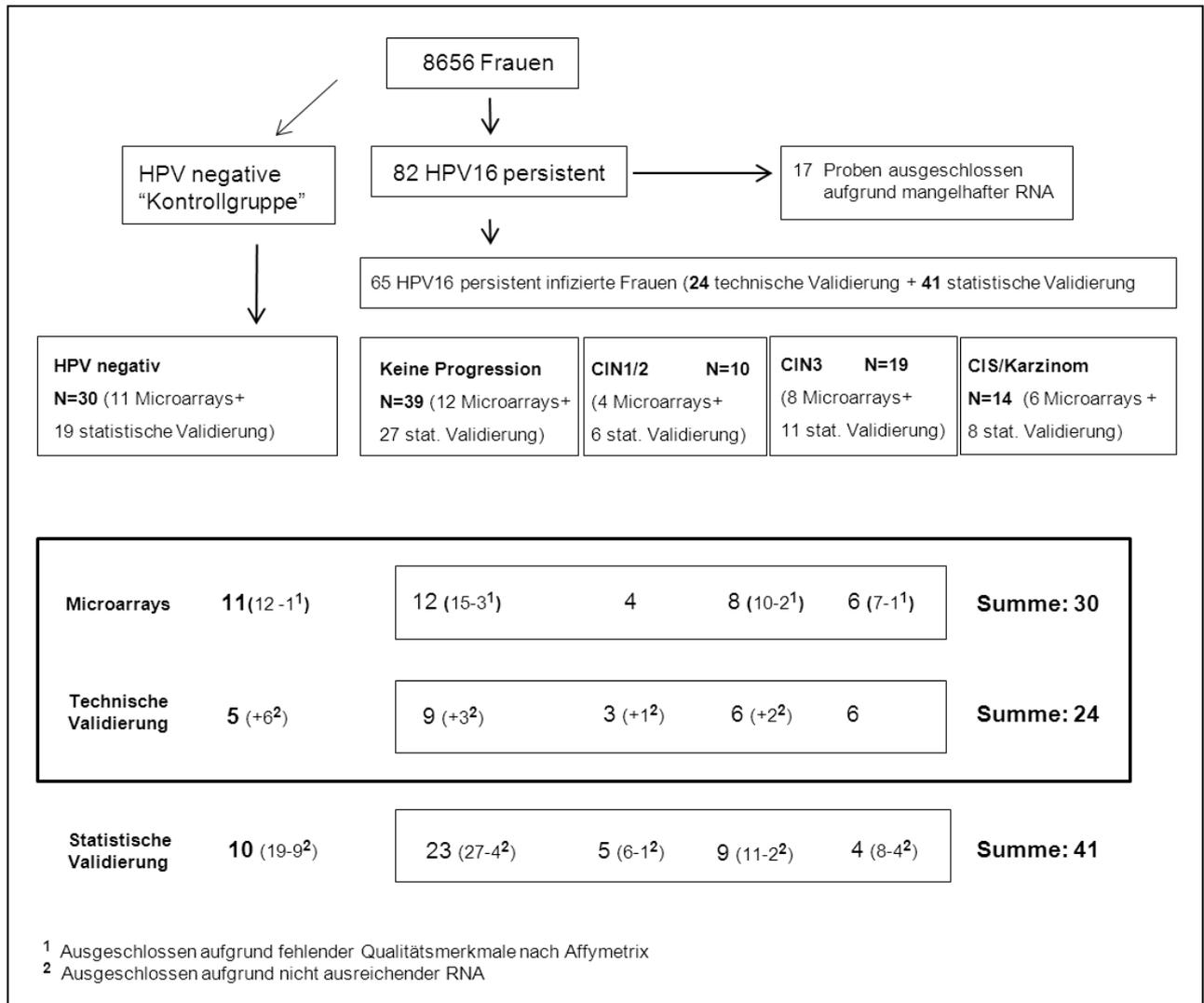


Abb. 22: Probensets für Microarrays und Validierungsexperimente

Für die technische Validierung wurden für alle Proben deren Genexpressionsmuster mittels Microarrays untersucht wurden (HPV-negativ: n=11 und HPV16-positiv: n=30 mit n=12 ohne Progression, CIN1/2 n=4, CIN3 n=8 und CIS/Karzinom n=6), eine Real Time PCR (qRT PCR) für ein bestimmtes Daten Set durchgeführt. Für die technische Validierung wurden 12 Proben (²) wegen unzureichender RNA Menge ausgeschlossen. Für die statistische Validierung wurde die mRNA Menge der vielversprechendsten Marker in einem unabhängigen Daten Set bestimmt (HPV-negativ: n=10; HPV16-positiv: n=41 mit n=23 ohne Progression, CIN1/2 n=5, CIN3 n=9 und CIS/Karzinom n=4).

4.3.1 Validierung der Microarray Analyse „HPV-negative Frauen vs. HPV16 persistent infizierte Frauen“ mittels quantitativer Real Time PCR

Für die technische Validierung der Mikroarrays wurden die Transkriptmengen der ausgewählten Gene sowie das Referenzgen *PGK1* in fünf HPV-negativen und 24 HPV16-positiven Proben bestimmt (Oligonukleotide siehe Tab. 6; siehe Abschnitt 3.2.3.6). Für die Analyse wurden nur Proben verwendet, die bereits auf den Mikroarrays analysiert wurden. Jeweils sechs Proben aus der HPV-

negativen Gruppe und der HPV16-positiven Gruppe konnten aufgrund zu geringer RNA Menge nicht analysiert werden (Abb. 23). Die relative mRNA Menge aller fünf ausgewählten Gene zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den HPV-negativen und HPV16-positiven Proben: *TMEM45a* ($p=0,001$), *TNFAIP6* ($p=0,026$), *CD44* ($p=0,03$), *CCRL2* ($p=0,026$) und *p16/CDKN2A* ($p=0,043$). Im Gegensatz zu den HPV-negativen Proben war die relative mRNA Menge von *p16/CDKN2A* in der HPV16-positiven Gruppe, signifikant erhöht (Abb. 8), ebenso wie die mRNA Menge von *TMEM45a*.

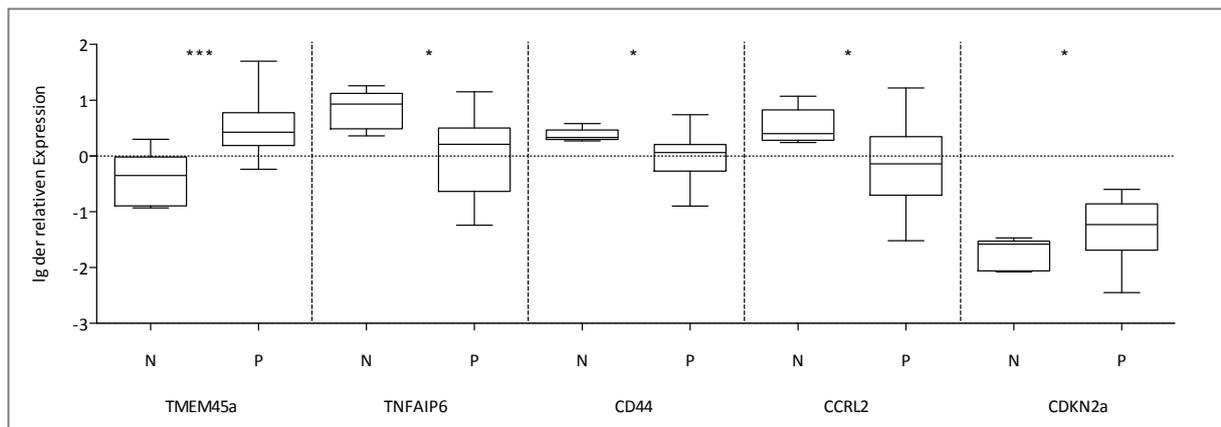


Abb. 23: Vergleich der mRNA Menge der potentiellen Marker zwischen HPV-negativen und HPV16-positiven Frauen (Technische Validierung)

Vergleich HPV-negative Frauen (N; n=5) und persistent HPV16-infizierte Frauen (P; n=24) bezüglich der relativen Veränderung der potentiellen Marker *TMEM45a*, *TNFAIP6*, *CD44*, *CCRL2* und *p16/CDKN2A*. Die mittels qRT PCR ermittelten Werte wurden normalisiert und logarithmiert. Der Box-Whisker-Plot zeigt den Median, sowie das Minimum und das Maximum. Die Box beschreibt den Bereich zwischen dem 25ten und 75ten Perzentil. Eine statistische Signifikanz des Expressionslevels zwischen den beiden Gruppen konnte bei allen potentiellen Markern mit Hilfe des Mann Whitney Tests gezeigt werden: *TMEM45a* ($p=0,001$), *TNFAIP6* ($p=0,026$), *CD44* ($p=0,03$), *CCRL2* ($p=0,026$) und *p16/CDKN2A* ($p=0,043$).

Die statistische Validierung der qRT PCR Daten wurde mit einem unabhängigen Datensatz durchgeführt. Es wurden nur Proben in die Analyse eingeschlossen, die nicht bereits vorher mittels der Mikroarrays analysiert wurden und somit eine unabhängige Gruppe darstellen. Aufgrund der begrenzten Menge von zur Verfügung stehender RNA konnten nur die beiden vielversprechendsten Marker der technischen Validierung (*TMEM45a* und *p16/CDKN2A*) gemessen werden. Beide Marker zeigten auch im unabhängigen Datensatz einen statistisch signifikanten Unterschied, auch wenn der p-Wert zwischen HPV-negativen und HPV16-positiven Proben für *TMEM45a* schlechter und für *p16/CDKN2A* im Vergleich zur technischen Validierung signifikanter wurde (*TMEM45a* ($p=0,032$) und *p16/CDKN2A* ($p=0,005$); Abb. 24).

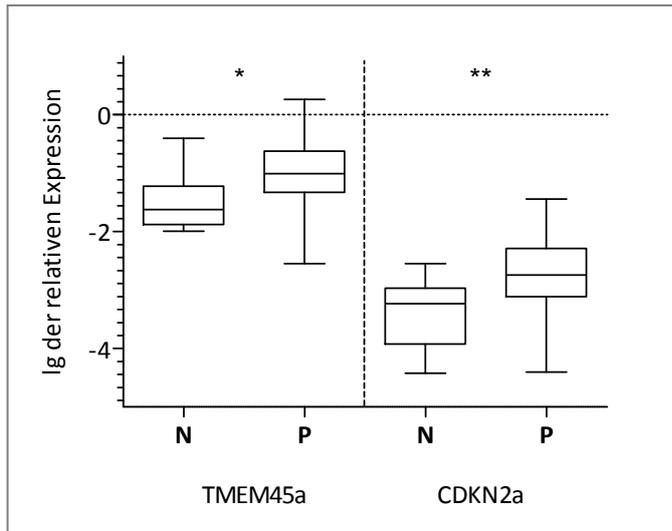


Abb. 24: Vergleich der mRNA Menge der vielversprechendsten potentiellen Marker zwischen HPV-negativen und HPV16-positiven Frauen (Statistische Validierung)

Gegenüberstellung der HPV-negativen Frauen (N; n=10) und der persistent HPV16-infizierten Frauen (P; n=41) in Bezug auf die relative Veränderung der potentiellen Marker *TMEM45a* und *p16/CDKN2A*. Statistische Signifikanz des Expressionslevels zwischen den beiden Gruppen konnte bei beiden potentiellen Markern mit Hilfe des Mann Whitney Tests gezeigt werden: *TMEM45a* ($p=0,032$) und *p16/CDKN2A* ($p=0,005$).

4.3.2 Die potentiellen Marker *p16/CDKN2A* und *TMEM45a* unterscheiden zwischen progredierenden und nicht progredierenden persistenten HPV16-Infektionen

Um potentielle Marker für die Progression einer persistenten HPV16-Infektion zu identifizieren, wurden folgende Genexpressionsprofile analysiert: Frauen mit einer persistenten HPV16-Infektion für die während der Nachverfolgungszeit keine auffällige Diagnose gestellt wurde (<CIN1) und Frauen die während dieser Zeit ein CIN3+ entwickelten. Für die Analyse wurden die Proben der technischen und statistischen Validierung kombiniert, um einen größtmöglichen Datensatz zu bekommen. Eine signifikante Zunahme der mRNA Menge konnte für die untersuchten Gene *TMEM45a* und *p16/CDKN2A* beobachtet werden (*TMEM45a*: $p=0,022$ und *p16/CDKN2A*: $p=0,031$; Abb. 25).

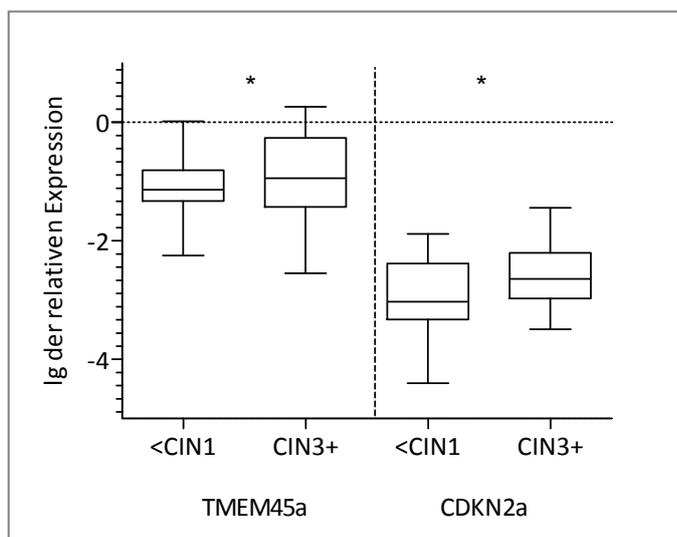


Abb. 25: Analyse der mRNA Menge der vielversprechendsten potentiellen Marker zwischen persistent HPV16-infizierten Frauen mit (CIN3+) und ohne Progression (<CIN1) (Statistische Validierung)

Vergleich der Frauen ohne (<CIN1; n=32) und mit Progression (CIN3+; n=25) bezüglich der relativen Veränderung der potentiellen Marker *TMEM45a* und *p16/CDKN2A*. Der Box-Whisker-Plot zeigt den Median, sowie Minimum und Maximum. Die Box beschreibt den Bereich zwischen dem 25ten und 75ten Perzentil. Statistische Signifikanz des Expressionslevels zwischen den beiden Gruppen konnte bei beiden potentiellen Markern mit Hilfe des Mann Whitney Tests gezeigt werden: *TMEM45a* ($p=0,022$) und *p16/CDKN2A* ($p=0,031$).

4.4 TMEM45a - Charakterisierung des potentiellen Markers für persistierende und progredierende und/oder prävalente HPV16-Infektionen

Die Expression von *TMEM45a* ist in HPV16 positivem Abstrichmaterial und in Proben von persistent HPV16-infizierten Frauen welche im Verlauf ein CIN3+ entwickeln, erhöht (Abb. 25+24, Abschnitt 4.3.1+2). Im Rahmen dieser Arbeit sollte dieses relativ unbekanntes Protein weiter charakterisiert werden. Das Membranprotein TMEM45A besteht aus 275 Aminosäuren (AS), hat ein theoretisches Molekulargewicht von 31 kDa (Ensembl: ENSP00000319009) und ist Teil der TMEM45 Proteinfamilie. Zwei weitere Spleiß-Varianten mit 291 AS (ENSP00000385089) und 191 AS (ENSP00000405597) sind beschrieben. Abhängig von der Wahl des Programms für die Vorhersage von Transmembrandomänen werden fünf (UniProt; Q9NWC5) oder sieben (TMHMM V2.0) Transmembrandomänen vorhergesagt. Die Proteine könnten laut beider Vorhersageprogramme am Serin auf Position 271 phosphoryliert und das Asparagin auf Position 140 N-glykosyliert (www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/) werden. TMEM45A wurde bereits als ein durch Hypoxie induzierbares Gen beschrieben (Martin-Rendon 2007, Benita 2009). Hypoxie bezeichnet die Unterversorgung von Gewebe (oder des gesamten Körpers) mit Sauerstoff. Weiterhin wurde TMEM45A als Protein mit anti-apoptotischer Funktion beschrieben (Michiels 2012), jedoch bleibt der Mechanismus unbekannt. Die Überexpression dieses Proteins soll mit einem höheren Risiko für ein Rezidiv eines Brustkarzinoms verbunden sein (Michiels 2012). Hohe Mengen der TMEM45A mRNA konnten in nicht invasivem Brustkrebs (ductal carcinoma in situ – DCIS) im Vergleich zu invasivem Brustkrebs (invasive breast cancer - IBC) festgestellt werden (Lee, Allred 2012), was für eine mögliche Funktion als Tumorsuppressorprotein spricht. Die Reduktion von TMEM45A mittels shRNA führte zu einer erhöhten Progressionsrate eines Xenograft Modells von nicht invasivem zu invasivem Brustkrebs (Lee 2012).

4.4.1 Proteinnachweis von TMEM45a

Drei unterschiedliche TMEM45a Antikörper sind kommerziell erhältlich. Zwei der Antikörper binden an ein internes Epitop (Santa Cruz, P-18 und Y-16). Der ebenfalls von Santa Cruz erhältliche Antikörper C-13 erkennt ein C-terminales Epitop. Alle Antikörper wurden mit HeLa Gesamt Zellysate getestet, zeigten jedoch unterschiedliche Bandenmuster. Alle Antikörper detektieren eine Bande bei ca. 50 kDa, welche jedoch nicht mit der vorhergesagten Größe von 32 kDa übereinstimmt. Weiterhin konnten Banden bei 34 kDa (P-18) und 20 kDa (C-13) detektiert werden (Abb. 26). Aufgrund der nicht zufriedenstellenden Ergebnisse mit den kommerziellen Antikörpern, wurde in Kooperation mit Dr. Hubert Kalbacher ein Antikörper gegen ein Epitop des C-Terminus produziert. Hierfür wurden drei

überlappende Peptide (Peptid a: 19AS; Peptid b: 21AS, Peptid c: 13AS) synthetisiert und zur Immunisierung im Kaninchen verwendet (Abb. 27). Der neu produzierte Antikörper (TMEM45A-K) erkennt nach der Immunoblotanalyse ebenfalls eine Bande bei ca. 50 kDa und überraschenderweise eine weitere bei ca. 70 kDa (Abb. 26).

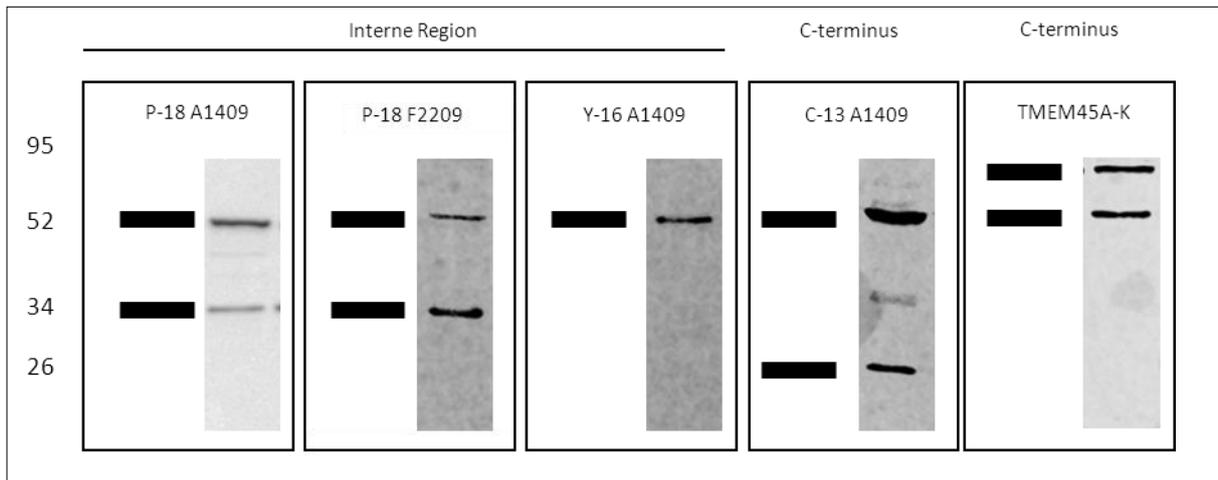


Abb. 26: Immunoblotanalyse HeLa-Zellen. Nach Gesamtproteinextraktion, Auftrennung der Proteine in einem SDS-PAGE und Übertragung auf eine Nitrozellulosemembran wurde das Protein im Immunoblot mit drei unterschiedlichen α -TMEM45a Primärantikörper und einem gegen den Primärantikörper gerichteten HRP-gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen. Für den Antikörper P-18 waren zwei unterschiedliche Chargen verfügbar die beide getestet wurden.

>gi|8922243|ref|NP_060474.1| transmembrane protein 45A [Homo sapiens]

MGNFRGHALPGTFFFIIGLWWCTKSILKYICKKQKRTCYLGSKTLFYRLEILEGITIVGMALTGMAGEQFIPGGPHLM
 LYDYKQGHWNQLLGGWHHFTMYFFFGLLGVADILCFTISSLPVSLTKLMLSNAFVEAFIFYNHTHGREMLDIFVHQL
 LVLVFLTGLVAFLEFLVRNNVLELLRSSLILLQGSWFFQIGFVLYPPSGGPAWDLMDHENILFTICFCWHYAVTIVI
 VGMNYA(241)FITWLKSRKRLCSSEVGLLKNAEREQEEEM(275)



Abb.27: Position der drei überlappenden Peptide für die Antikörperherstellung TMEM45A-K (siehe Abschnitt 3.2.5.6)

Es wurden unterschiedliche Puffer verwendet um das Protein zu solubilisieren. RIPA-Puffer sowie Urea-Puffer (8M) und das kommerzielle erhältliche Roti®-Load (Roth) wurden getestet um die größtmögliche Menge des Membranproteins in Lösung zu bringen (siehe Abschnitt 3.2.5.1). Es konnte nach der Auftrennung mittels SDS-Page jedoch kein Unterschied zwischen den verschiedenen Solubilisierungspuffern festgestellt werden (Abb. 28A). Für alle weiteren Versuche wurden die Zellen deshalb mit Roti®-Load lysiert.

Zusätzlich wurde getestet, ob die Temperatur der Inkubation nach Aufnahme des Zellpellets in Roti®-Load, einen Einfluss auf die Aggregation von TMEM45a hat. Die Temperatur wurde daher von 95°C auf 42°C gesenkt und anschließend beide Versuchsansätze miteinander verglichen. Es wurden HeLa-Zellen geerntet, das Zellpellet in Roti®-Load aufgenommen und bei 42°C oder 95°C für 5 min inkubiert. Eine Aggregation des Proteins konnte bei einer Inkubation bei 42°C vermindert werden und es konnte somit eine Zunahme der Bandenintensität festgestellt werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden alle Lysate der folgenden Experimente bei nur 42°C inkubiert um die Bandenintensität zu erhöhen.

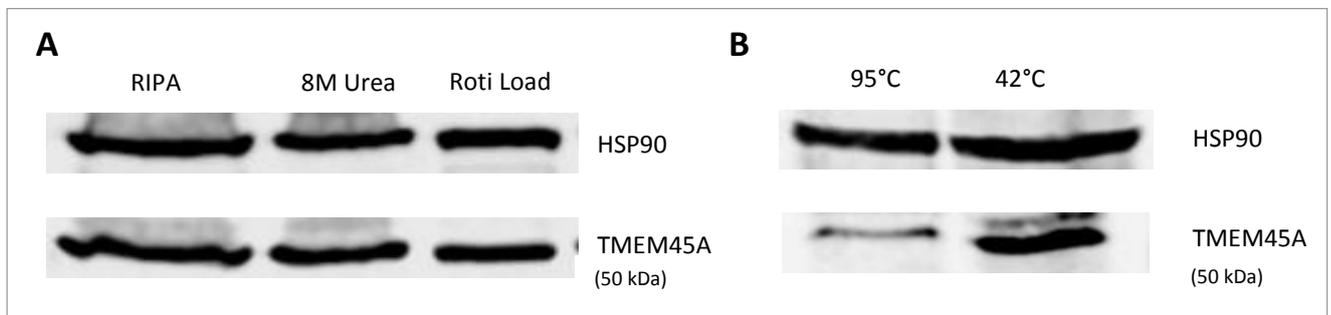


Abb. 28 A: Einfluss unterschiedlicher Puffer auf die Solubilisierung von TMEM45a. HeLa-Zellen wurden entweder in Roti®-Load (Roth) inkubiert oder mit RIPA- oder Urea-puffer für 1 Stunde bei 4°C lysiert. Nach der Auftrennung mittels SDS-Page konnte kein Unterschied in der Effizienz der verschiedenen Puffer festgestellt werden.

B: Einfluss der Temperatur auf die Aggregation des Membranproteins. HeLa-Zellen wurden nach der Ernte in Roti®-Load aufgenommen und bei 42°C und 95°C für 5 min inkubiert. Anschließend wurden beide Lysate mittels SDS-Page aufgetrennt.

Um zu klären welcher der verschiedenen Banden TMEM45a repräsentiert, wurden RNA Interferenz Experimente durchgeführt. Hierfür wurden HeLa-Zellen mit drei verschiedenen siRNAs gegen TMEM45a transfiziert (siT2, 3 und 4; 20 nM). Die mRNA Menge nach 48 Stunden zeigt eine Reduktion nach Behandlung mit allen drei siRNA, jedoch ist die Reduktion bei der siRNA (siT-3) am größten, welche in allen folgenden Experimenten zum „Knockdown“ von TMEM45a verwendet wurde (Abb. 29).

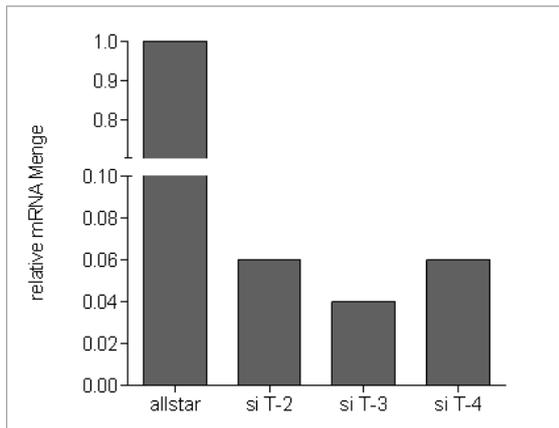


Abb. 29: RNA Interferenz gegen TMEM45a

Die Veränderung der Transkriptmengen nach siRNA Transfektion von HeLa-Zellen wurde durch qRT-PCR überprüft. Dazu wurden die Zellen wie in Abschnitt 3.2.4.6 beschrieben transfiziert und nach 48 Stunden die RNA isoliert. Die Detektion der TMEM45a mRNA erfolgte mit spezifischen Oligonukleotiden. Die Werte der verschiedenen siRNAs beziehen sich auf die mRNA Menge in Kontroll-siRNA (siAllstar) transfizierten Zellen.

Die Zellen zeigten 48 Stunden nach siRNA Transfektion (siehe Abschnitt 3.2.4.6) zwar eine Reduktion der mRNA Menge (Abb. 29 und 30), jedoch konnte keine Reduktion der verschiedenen Banden im Immunoblot nachgewiesen werden. Daraufhin wurden die Zellen 48 Stunden nach der ersten Transfektion ein weiteres Mal mit der gleichen Menge siRNA transfiziert und nach weiteren 48 Stunden geerntet. Nach der zweifachen Transfektion der Zellen wurde im Immunoblot eine Reduktion unterschiedlicher Banden sichtbar (Abb. 30). Durch die Reduktion der Proteinmenge konnte jedoch nicht auf die richtige Bandengröße geschlossen werden, da mit den verschiedenen Antikörpern mehrere unterschiedlich große Banden (20 kDa, 25 kDa, 27 kDa, 30 kDa und 40 kDa) eine Reduktion zeigen (Abb. 31).

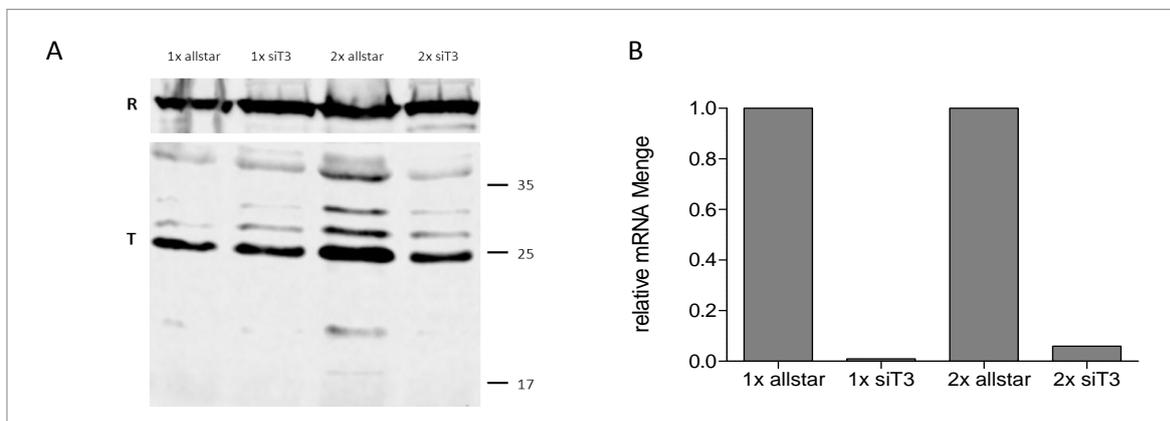


Abb.30 RNA Interferenz gegen TMEM45a

A) Immunoblotanalyse der HSP90 (R) und TMEM45a (T) Proteinmengen nach siRNA Transfektion. HeLa-Zellen wurden mit je 600 ng siRNA TMEM45a oder siAllstar transfiziert. Nach 48 h wurden Zellextrakte hergestellt und im Immunoblot auf die Anwesenheit von TMEM45a (T) und einem Referenzprotein (R, HSP90) kontrolliert. Die zweite Transfektion wurde 48 h nach der ersten Transfektion im parallelen Versuchsansatz durchgeführt. Nach weiteren 48 h wurden Zellextrakte hergestellt und TMEM45a (Antikörper: TMEM45A-C) und HSP90 im Immunoblot nachgewiesen.

B) Die Veränderung der Transkriptmengen nach siRNA Transfektion wurde durch qRT PCR überprüft. Dazu wurden die Zellen wie oben beschrieben transfiziert und RNA isoliert. Die Detektion der TMEM45a mRNA erfolgte mit spezifischen Oligonukleotiden. Die Werte der einfachen und doppelten Transfektion mit siT3 beziehen sich auf die mRNA Menge in Kontroll- siRNA (siAllstar) transfizierten Zellen.

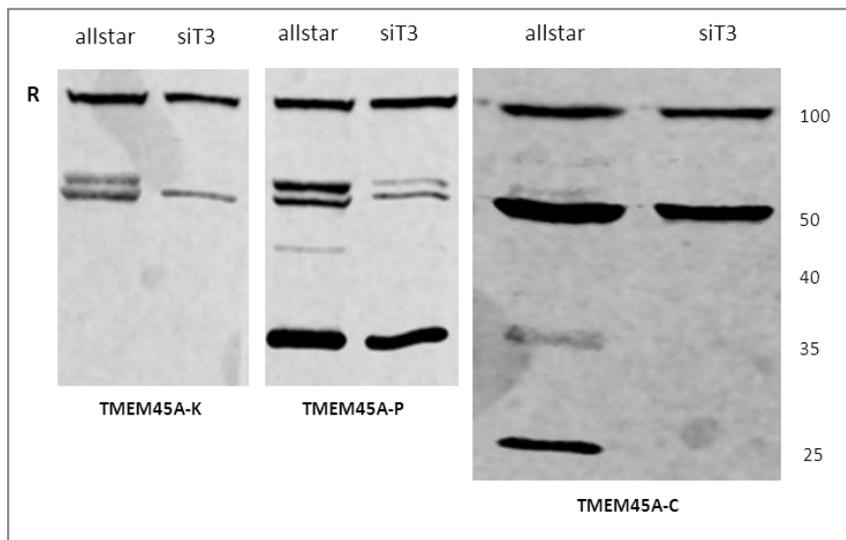


Abb.31: Immunoblotanalyse der TMEM45a Proteinmengen nach zweifacher siRNA Transfektion. HeLa-Zellen wurden zweimal mit je 600 ng siRNA TMEM45a oder siAllstar transfiziert. 48 h nach der zweiten Transfektion wurden Zellextrakte hergestellt und im Immunoblot auf die Anwesenheit von TMEM45a und einem Referenzprotein (R, HSP90) kontrolliert. Es wurde der neu synthetisierte TMEM45A-K Antikörper sowie zwei kommerziell erhältliche Antikörper (TMEM45A-C und -P) verwendet.

Da mit Hilfe der RNA Interferenz keine eindeutige Aussage über das Molekulargewicht von TMEM45a getroffen werden konnte, wurde versucht, mit Hilfe einer Überexpression eines HA-markierten TMEM45a, die richtige Größe zu identifizieren. Hierfür wurden HeLa-Zellen mit HA-TMEM45a Expressionskonstrukt oder dem leeren Vektor (pSG5) transient transfiziert (siehe Abschnitt 3.2.4.5). Der Nachweis des HA markierten TMEM45a mittels Immunoblot zeigte mit zwei unterschiedlichen Antikörpern (C-13 und TMEM45A-K) eine Bande bei 25kDa, welche mit dem HA Signal übereinstimmt. Aufgrund der Tatsache, dass der kommerziell erhältliche C-13 Antikörper auch das endogene TMEM45a Protein erkennt, wurden alle weiteren Versuche mit diesem Antikörper durchgeführt (Abb. 32).

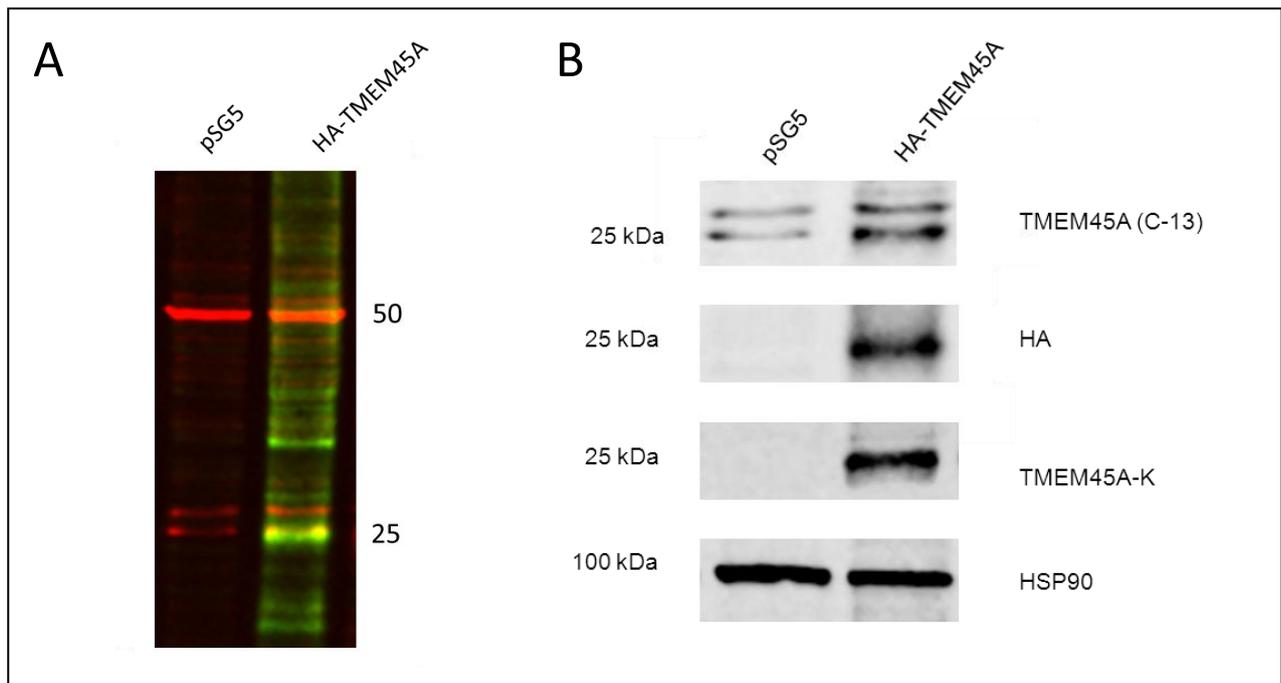


Abb. 32: Überexpression eines HA-TMEM45a Expressions-konstrukts

HeLa-Zellen wurden transient mit einem TMEM45a Expressionskonstrukt oder dem leerem Vektor (pSG5) transfiziert. Die Zellen wurden 48h nach der Transfektion geerntet, die Zellextrakte wurden mit Hilfe des Immunoblots auf die Anwesenheit von TMEM45a, HA und einem Referenzprotein (HSP90) kontrolliert.

A: Nachweis von TMEM45A (TMEM45A-C; rot) und HA (grün) mittels fluoreszenz-gekoppelter Sekundäntikörper.

B: Nachweis des Referenzproteins HSP90, HA und TMEM45A (mit zwei unterschiedlichen Antikörpern, TMEM45A-K und TMEM45A-C).

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Bandengrößen des Proteins könnte die posttranslationale Modifikation des Proteins sein. Aufgrund der unterschiedlichen Bandengröße und der Vorhersage (www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/) eines N-glykosylierten Asparagins auf Position 140 wurden HeLa-Zellen mit PNGase F (Peptide-N-Glycosidase F) behandelt. PNGase F ist eine Endoglykosidase die effizient N-Glykosylierungen entfernt. HeLa-Zellen wurden nach Herstellerprotokoll vorbereitet und 4 Stunden bei 73°C mit PNGase inkubiert. Nach Zugabe von Ladebuffer wurde das behandelte Zellextrakt mit Hilfe eines Immunoblots analysiert. Als Positivkontrolle für die PNGase F Behandlung wurden mit HCMV (Humanes Zytomegalovirus) infizierte humane Fibroblasten verwendet. Es wurden von jeder Probe jeweils ein Ansatz mit PNGase F und ein Kontrollansatz ohne die Zugabe von Enzym im Western Blot analysiert. Das Glykoprotein B Protein von HCMV wies nach dem Verdau mit PNGase F ein geringeres Molekulargewicht auf, wohingegen die Kontrollprobe (DMSO) keine Veränderungen zeigten. Im Gegensatz dazu waren bei TMEM45a nach dem Endoglykosidase-Verdau keine Unterschiede im Molekulargewicht zu erkennen (Abb. 33).

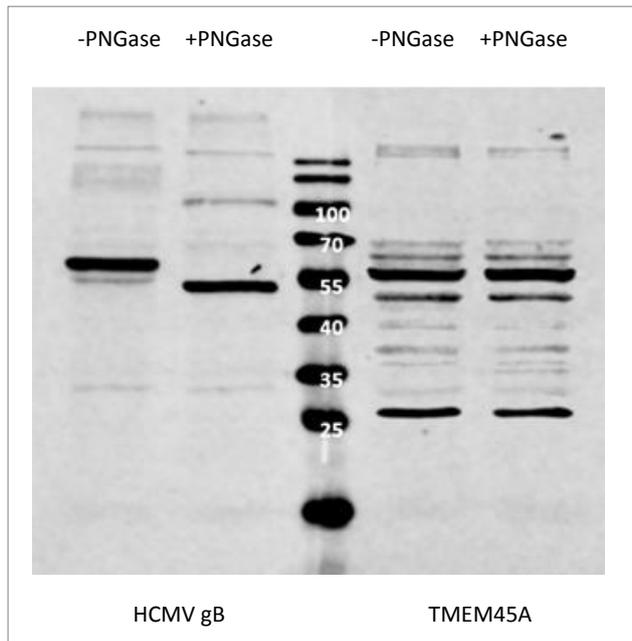


Abb.33: N-Glykosylierungsstatus von TMEM45a

Immunoblot Analyse des Endoglykosidase Verdaus. HeLa-Zellen und HCMV-infizierte Fibroblasten-Proben wurden mit Peptid-Endoglykosidase F (PNGase F) verdaut. Die unverdauten Kontrollproben wurden unter Zugabe von DMSO der gleichen Prozedur unterzogen. Im Gegensatz zum Glykoprotein B von HCMV zeigt TMEM45a (Antikörper: TMEM45A-C) kein reduziertes Molekulargewicht nach Verdau mit PNGase F.

Da somit eine N-Glykosylierung des Proteins ausgeschlossen werden kann, wurde überprüft ob es sich bei den Banden um proteasomale Abbauprodukte handelt. HeLa-Zellen sowie HPV16-positive CC10 Zellen wurden für 12 Stunden mit dem Proteasomen-Inhibitor MG132 (10 μ M) behandelt. Anschließend wurden die Proben der Kontrollgruppe (DMSO) gegenübergestellt und mittels Immunoblot das Bandenmuster analysiert. Abbildung 34 zeigt das Bandenmuster für TMEM45a in CC10 und HeLa-Zellen in Abhängigkeit von einer Behandlung mit dem Proteasomen-Inhibitor MG132. Die Abbildung zeigt deutlich eine Zunahme der 70 kDa Bande und eine gleichzeitige Abschwächung der Banden bei 50 kDa und 25 kDa. Die Abnahme möglicher Abbauprodukte nach der Hemmung des ubiquitin-abhängigen Proteinabbaus durch MG132 spricht dafür, dass es sich bei der 70 kDa Bande ebenfalls um TMEM45a handelt.

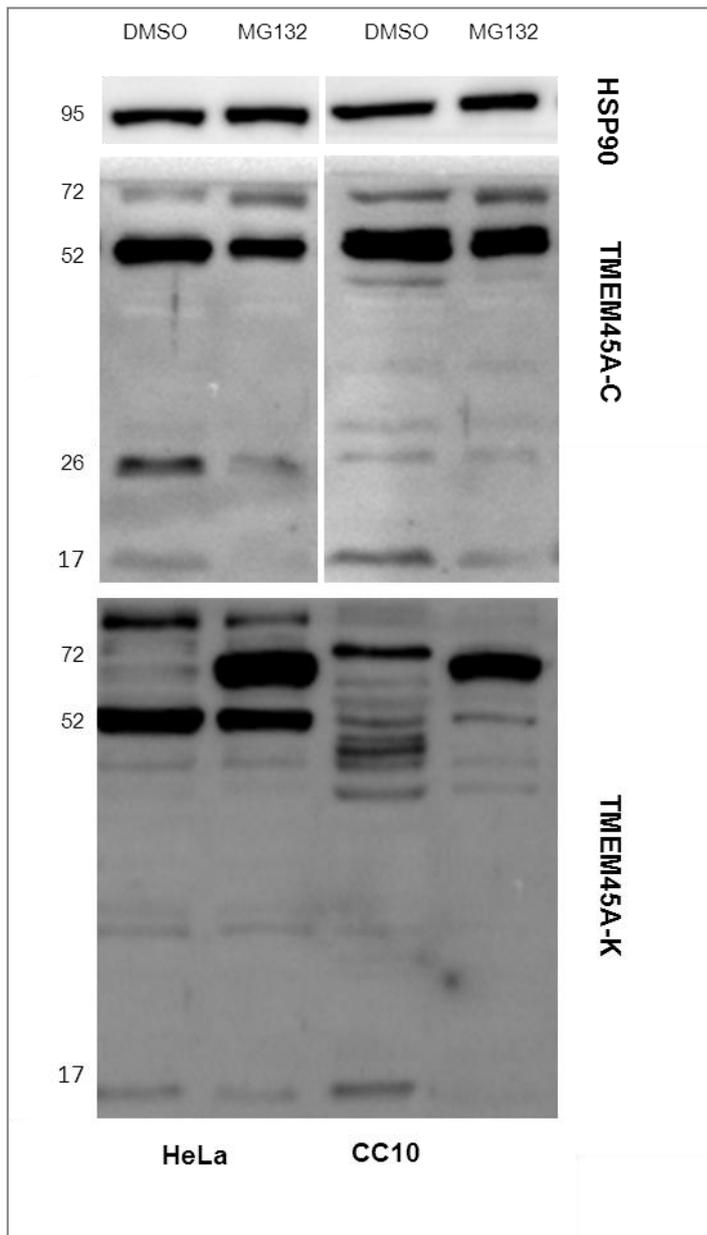


Abb. 34: MG132 Behandlung der CC10 und HeLa-Zellen. Die Zellen wurden für 12 Stunden mit 10 μ M Proteasomen-Inhibitor MG132 bzw. DMSO behandelt. Nach der Herstellung von Zellextrakten wurde mit Hilfe eines Immunoblots die Anwesenheit von TMEM45a (A:TMEM45a-C; B: TMEM45a-K) und des Referenzproteins HSP90 überprüft. Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit der entsprechenden Menge DMSO behandelt und den MG132 behandelten Zellen gegenübergestellt.

Um nachzuweisen, dass die beobachtete Stabilisierung der 70 kDa Bande ubiquitin-abhängig ist, wurden HeLa-Zellen zusätzlich mit dem Protease-Inhibitor-Cocktail HALT behandelt. Dieser beinhaltet mehrere Serinprotease-Inhibitoren, Aminopeptidase-, Zysteinprotease-, Metalloprotease- und Asparaginsäureprotease-Inhibitoren. Eine Zunahme der 70 kDa Bande wie durch die MG132 Behandlung konnte nicht beobachtet werden (Abb. 35).

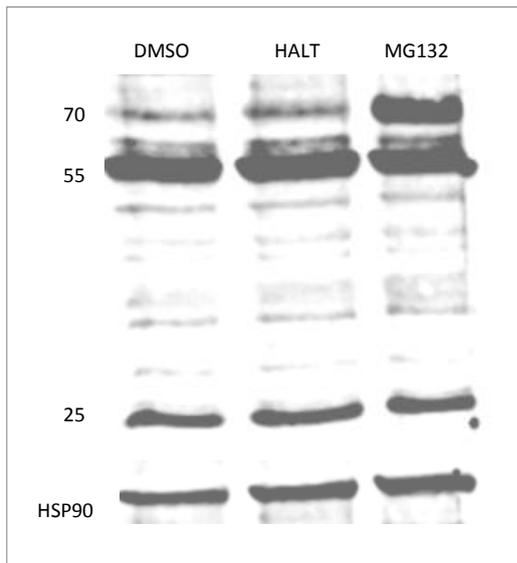


Abb. 35: HALT- und MG132-Behandlung von HeLa-Zellen. Die Zellen wurden für 6 Stunden mit 10x HALT Proteasenhinhibitor sowie 10 μ M Proteasomen-Inhibitor MG132 und DMSO behandelt. Nach der Herstellung von Zellextrakten wurde mit Hilfe eines Immunoblots die Anwesenheit von TMEM45a (Antikörper: TMEM45A-C) und des Referenzproteins HSP90 überprüft. Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit der entsprechenden Menge DMSO behandelt und den HALT- bzw. MG132 behandelten Zellen gegenübergestellt.

4.4.2 Identifikation einer weiteren Transkriptvariante von TMEM45a durch RT-PCR

Zusätzlich zur 275 AS langen Variante sind zwei weitere TMEM45a-Varianten mit 291 AS und 191 AS beschrieben (Ensembl). Um die am stärksten exprimierte Form zu identifizieren und eventuell einer der zusätzlichen Banden zuzuordnen, wurde versucht beide Transkriptvarianten (TV2, 291AS und TV3, 191 AS) in einen Überexpressionvektor zu klonieren. Mittels RT-PCR wurde RNA aus HeLa- und CC10-Zellen umgeschrieben und mit den passenden Primern in den Vektor pSG5 kloniert. Zusätzlich wurde die TV1 (275AS) mit 5'UTR kloniert, oder am 5'Ende oder am 3'Ende mit einer HA-Sequenz markiert. Die Klonierung der TV3 war trotz mehrerer unterschiedlicher Klonierungsansätze nicht erfolgreich. HeLa-Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion der vier unterschiedlichen Überexpressionsvektoren geerntet und mittels Immunoblot auf die Anwesenheit von zusätzlichen Banden von TMEM45a überprüft. Beide HA-markierten Transkriptvarianten sowie die TV1/UTR-Variante zeigen eine Zunahme bei ca. 25 kDa, wobei die am C-Terminus markierte Variante ein Protein mit größerem Molekulargewicht zeigte wie die N-Terminus markierte Variante (Abb. 36). Der Vektor mit der 291 AS langen Transkriptvariante (TV2) zeigte keinen Unterschied zur pSG5-Kontrolle.

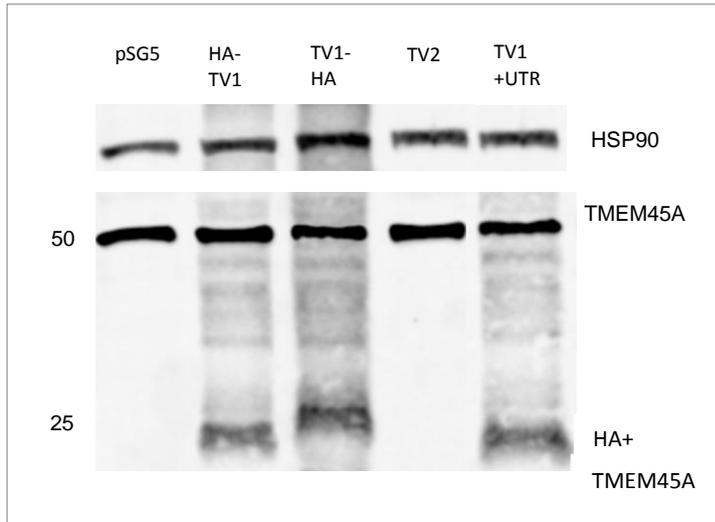


Abb. 36: Überexpression der unterschiedlichen Spleissvarianten von TMEM45a

Hela-Zellen wurden mit vier unterschiedlichen Überexpressionsplasmiden und dem Leervektor (pSG5) transfiziert. Nach 48h wurden die Zellen geerntet, Zellextrakt hergestellt und auf die Anwesenheit von HA, TMEM45a (Antikörper: TMEM45A-C) und das Referenzprotein HSP90 überprüft.

Die Sequenzierung der verschiedenen cDNAs zeigte unter anderem auch eine noch nicht publizierte Sequenz (Transkriptvariante NEU; Abb. 37). Ein Versuch, auch diese Transkriptvariante (TV) in ein Plasmid zu Überexpressionszwecken zu klonieren war jedoch nicht erfolgreich. Abbildung 49 (Siehe Anhang 7.1) zeigt ein Alignment der bereits publizierten und der neuen Transkriptvarianten. Das erste Exon ist allen vier Varianten gemeinsam, der neuen Variante fehlt jedoch im Gegensatz zur TV2 das zweite Exon, ist aber ansonsten mit dieser identisch. Ebenso waren die TMEM45a-(Aminosäure- und Nukleotid-) Sequenzen aus HeLa-Zellen, normalen Keratinozyten und CC10-Zellen identisch und zeigten keinerlei Mutationen.

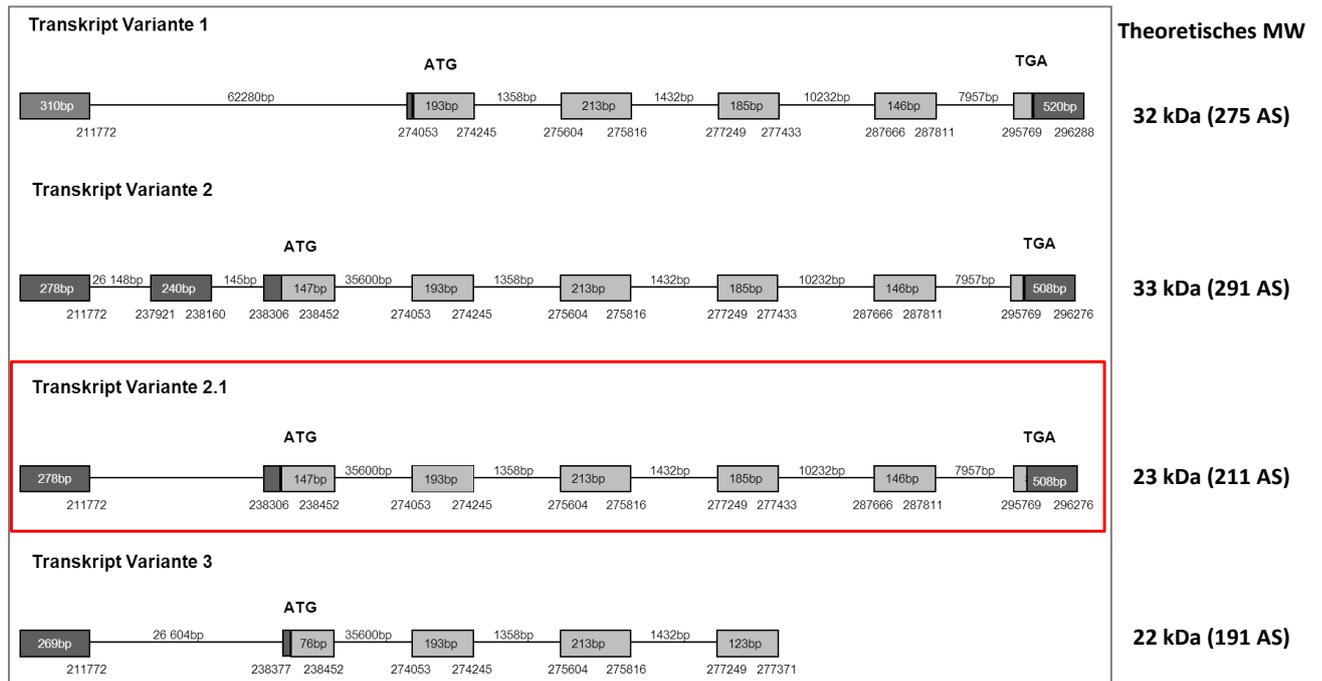


Abb.37: Schema der verschiedenen Transkriptvarianten von TMEM45a und theoretisches Molekulargewicht

Mit Hilfe durch RT PCR identifizierte TMEM45a Varianten. Die drei bereits beschriebenen Varianten unterscheiden sich in den ersten drei Exons. Der bisher noch nicht beschriebenen Transkriptvariante (NEU, 291 AS) fehlt im Gegensatz zur TV2 das zweite Exon, beide Varianten sind sonst komplett identisch.

4.4.3 TMEM45a mRNA- und Proteinmengen in HPV-negativem und HPV-positivem Zellkulturmaterial

Da die Expression von TMEM45a in HPV16-positivem im Vergleich zu HPV16-negativem Abstrichmaterial der Jungen Dänischen Kohorte erhöht ist, wurde die TMEM45a Transkript- und Proteinmenge in HPV-negativen und HPV-haltigen Zelllinien bestimmt. Es zeigte sich überraschenderweise, dass die Transkriptmengen in HPV-negativen humanen Keratinozyten bis zu 5-fach höher sind als in HeLa-Zellen (HPV18), CC7 und CC10 (HPV16), den 16E6/E7 exprimierenden Zellen (42-16E6/E7) und den mit HPV18 immortalisierten Keratinozyten (25-18; Abb. 38).

Ebenso wurde die Proteinmenge von TMEM45a in unterschiedlichen HPV-negativen und HPV-haltigen Zellen untersucht. Es zeigte sich im Gegensatz zur mRNA Menge keine Korrelation zwischen HPV-Positivität und der Menge an TMEM45a Protein. In den untersuchten Zelllinien besaßen die Zelllinien NHK, C33A, SiHa, Caski, HeLa, CC7 und CC10 eine vergleichbare Menge an Protein, während in HPV16E6/E7 oder HPV18 immortalisierten Keratinozyten kein TMEM45a nachweisbar war (Abb. 39).

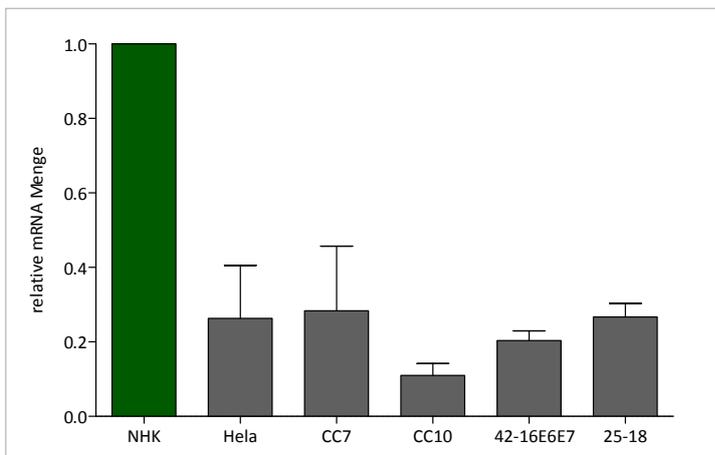


Abb.38: Bestimmung der relativen TMEM45a mRNA Mengen durch qRT PCR.

Die gemittelten Ergebnisse basieren auf mindestens drei unabhängigen Experimenten. Das geometrische Mittel von vier unterschiedlichen NHK Linien und der Referenzwert Aktin wurden für die Berechnung der relativen TMEM45a mRNA Menge verwendet. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler.

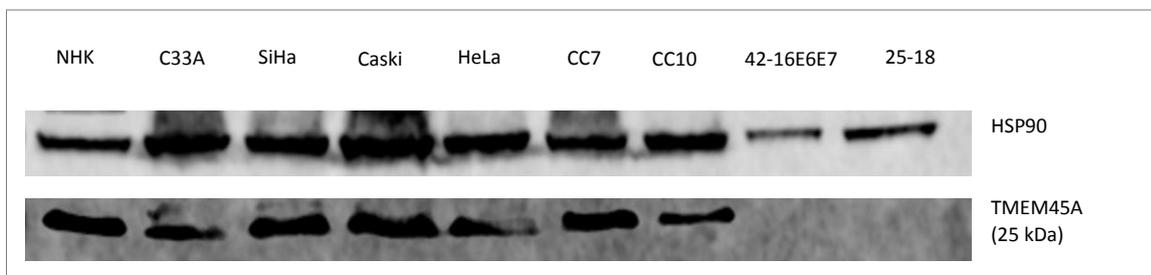


Abb.39: Analyse der TMEM45a Proteinmenge in verschiedenen Zelllinien. Die Zellen wurden ausgesät, nach 24 Stunden geerntet, Zellextrakte hergestellt und diese im SDS Puffer aufgetrennt. Der Nachweis der Proteine erfolgte mittels spezifischer Antikörper (TMEM45a-C und HSP90). HSP90 wurde als Referenzprotein verwendet.

4.4.4 TMEM45a mRNA wird in HPV-positiven Zellen durch Hypoxie induziert

Es wurde bereit beschrieben das sich die mRNA Menge von TMEM45a durch Hypoxie induzieren lässt (Martin-Rendon et al. 2007; Benita et al. 2009). Der TMEM45a Promotor besitzt eine HIF-1-DNA Bindestelle, welche zwischen dreizehn unterschiedlichen Spezies hoch konserviert ist. Flamant et al. (2012) zeigte, dass TMEM45a essentiell für die durch Hypoxie induzierte Chemoresistenz in Brust- und Leberkrebszellen ist. Um herauszufinden, ob die Anwesenheit von HPV einen Einfluss auf die Induktion von TMEM45a hat, wurde versucht mittels DFO (Desferrioxamin), einem HIF1 Stabilisator, die Expression von TMEM45a zu induzieren. Als Positivkontrolle für die Hypoxie wurde die Induktion von VEGF mittels qRT PCR bestimmt. VEGF (*vascular endothelial growth factor*) ist ein Signalmolekül der Angiogenese und gehört zu den Genen die durch Hypoxie induziert werden können. HeLa-Zellen wurden über unterschiedliche Zeiträume mit 100 μ M DFO behandelt (1h-9h). Nach 9 Stunden wurde das mit DFO versetzte Medium gewechselt und 1, 2 und 3 Stunden im Anschluss ebenfalls Proben entnommen. Die Analyse der mRNA Mengen für VEGF und TMEM45a mittels qRT PCR zeigte eine zeitabhängige Induktion der Expression beider Gene (9 Stunden Wert: TMEM45A: 11,8-fach; VEGF: 8,9-fach). Nach dem Entfernen von DFO im Medium nahm die mRNA Menge wieder bis auf 1,4 (VEGF) und 3,6 (TMEM45a) ab (Abb. 40).

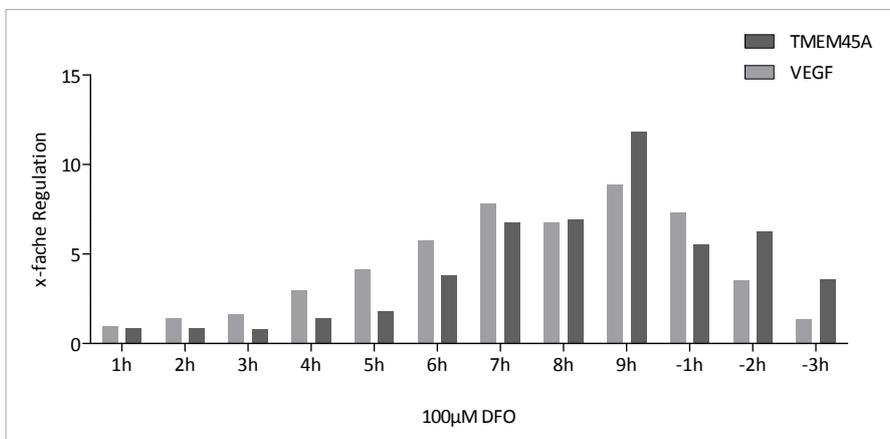


Abb. 40: Induktion von VEGF und TMEM45a durch DFO.

HeLa-Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit 100 μ M DFO behandelt. Nach der Ernte der Zellen wurde RNA extrahiert, cDNA synthetisiert und die mRNA Mengen von VEGF und TMEM45a mittels qRT PCR bestimmt. Normalisiert wurde auf das Referenzgen Aktin und den Wert t=0.

Um die Induktion von TMEM45a weiter zu untersuchen wurde eine weitere Methode zur Induktion der Hypoxie verwendet. Eine Hypoxie Inkubationskammer (*Stemcell Technologies*) wurde mit einem definierten Gasmisch (1% O₂, 5% CO₂, 94% N₂) gefüllt und zusammen mit den sich darin befindenden Zellen im normalen Brutschrank für 16 Stunden inkubiert (Abb. 41).



Abb.41: Hypoxische Inkubationskammer.
Die Zellen wurden in einer mit einem Gasgemisch (1% O₂, 5% CO₂, 94% N₂) gefüllten Hypoxie-Inkubationskammer bei 37°C für 16 Stunden inkubiert.

Um die Effektivität der DFO Behandlung im Vergleich zur Hypoxiekammer zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen und CC10-Zellen entweder mit 100 µM DFO oder in der Hypoxiekammer für 16 Stunden inkubiert. Nach der RNA Extraktion der geernteten Zellen und folgender cDNA Synthese wurde die mRNA Menge mittels qRT PCR bestimmt und die relative mRNA Menge berechnet. In den HeLa-Zellen war die Induktion von VEGF und TMEM45a unter DFO und in der Hypoxiekammer vergleichbar (VEGF DFO: 3,9, VEGF 1% O₂: 3,5 / TMEM45a DFO: 9,7, TMEM45a 1%O₂: 9,5; Abb. 45). Im Unterschied dazu zeigten die CC10-Zellen die in der Hypoxiekammer inkubiert wurden eine 23,9-fache Induktion von TMEM45a, wohingegen die Induktion bei der Behandlung mit DFO nur bei 4,2 lag. CC10-Zellen jedoch besitzen auch eine geringere Basalmenge der TMEM45a mRNA (Abb. 38). Ein geringfügiger aber bei weitem nicht so ausgeprägter Unterschied konnte für die Induktion von VEGF festgestellt werden (DFO: 3,0 / 1% O₂: 4,7; Abb. 42).

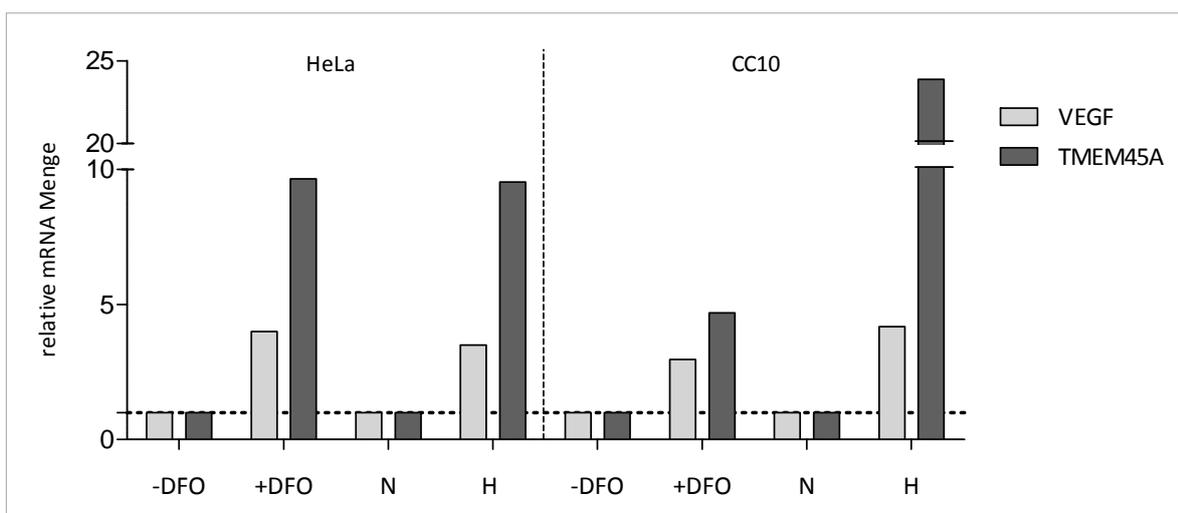


Abb. 42: Induktion von VEGF und TMEM45a durch DFO und 1% Sauerstoff. HeLa- und CC10-Zellen wurden für 16 Stunden mit 100 µM DFO behandelt, im Inkubator unter normoxischen Bedingungen (N) oder in der Hypoxiekammer bei 1% Sauerstoff (H) inkubiert. Nach der Ernte der Zellen wurde RNA extrahiert, cDNA synthetisiert und die mRNA Mengen von VEGF und TMEM45a mittels qRT PCR bestimmt. Normalisiert wurde auf das Referenzgen Aktin und den Referenzwert für die Behandlung mit DMSO und unter normalen Sauerstoffbedingungen (Normoxie).

Da bisher alle Versuche eine Induktion von TMEM45a nachzuweisen auf der Zunahme von mRNA basierten, wurden im selben Versuchsaufbau auch entsprechende Proben für die Proteinbestimmung genommen. Abbildung 43 zeigt den Immunoblot der Proben des gleichen Versuchsansatzes wie der oben beschriebenen mRNA Analyse. Als Positivkontrolle wurde neben dem Referenzprotein HSP90 die Stabilisierung des HIF1 α Proteins unter DFO oder 1% Sauerstoff gemessen. Die Proteinmenge von TMEM45a zeigte im Vergleich zur mRNA Menge keine Zunahme unter DFO oder Hypoxie. Eine Diskrepanz zwischen RNA Menge und Proteinmenge konnte aber bereits bei der Analyse der unterschiedlichen Zelllinien beobachtet werden (Abb. 38 und 39).

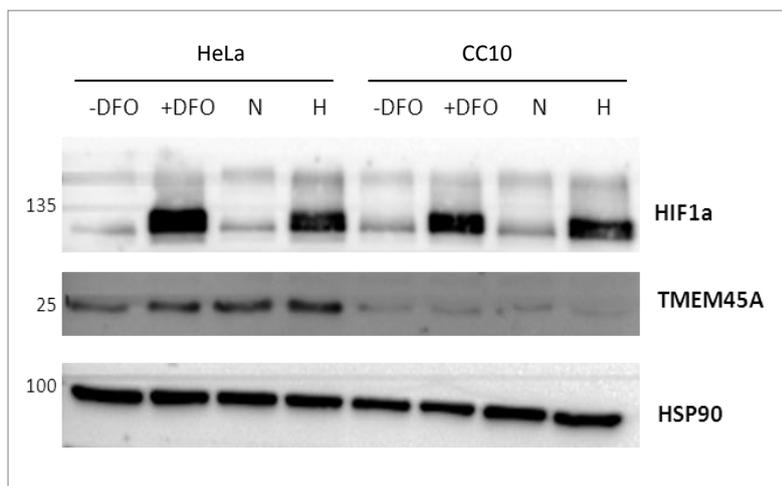


Abb. 43: Analyse der TMEM45a Proteinmenge nach DFO Behandlung und Inkubation unter hypoxischen Bedingungen. Die Zellen wurden ausgesät und nach 24 Stunden für 16 Stunden behandelt. Nach der Ernte wurden Zellextrakte hergestellt und diese im SDS Puffer aufgetrennt. Der Nachweis der Proteine erfolgte mittels spezifischer Antikörper (HIF1 α , TMEM45a-C (25 kDa) und HSP90). HSP90 wurde als Referenzprotein verwendet, die Stabilisierung von HIF1 α als Positivkontrolle für Hypoxie.

Da eine Induktion der TMEM45a Expression in HPV-positiven Zellen (HeLa und CC10) gezeigt wurde, sollte im folgenden Versuch untersucht werden, ob eine Induktion auch in HPV-negativen Zellen zu beobachten ist. Hierfür wurden HPV-negative humane Keratinozyten zweier unterschiedlicher Spender (NHK #1 und NHK #2) mit HPV18 immortalisierten Keratinozyten (25-18), HeLa-Zellen (HPV18) und CC10-Zellen (HPV16) in mindestens vier unabhängigen Experimenten mit DFO behandelt oder 16 Stunden unter hypoxischen Bedingungen (Hypoxie Inkubationskammer) gehalten. Nach der Ernte wurde die RNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Mittels qRT PCR wurde die Induktion der TMEM45a mRNA, ebenso wie die der Positivkontrolle VEGF, bestimmt. Unabhängig von der Methode zur Stabilisierung von HIF-1 α (DFO oder Hypoxiekammer) konnte bei den HPV-negativen Keratinozyten keine Zunahme der TMEM45a mRNA festgestellt werden (Abb. 44). Alle HPV-positiven Zelllinien zeigten im Gegensatz dazu die erwartete Zunahme der Transkripte, ebenso zeigten alle Zelllinien eine Zunahme der VEGF Transkripte. Wie in den vorangegangenen

Experimenten konnte die stärkste Induktion bei der HPV16-positiven Zervixkarzinomzelllinie CC10 beobachtet werden. Während bei den CC10-Zellen und 25-18 Zellen die Induktion von TMEM45a durch die Hypoxiekammer (CC10: 21,8; 25-18: 9,5) höher war als durch DFO-Behandlung (CC10: 15,9; 25-18: 3,3) wurde bei den HeLa-Zellen durch DFO (Mittelwert: 13,23) eine stärkere Induktion gemessen (Hypoxiekammer Mittelwert: 7,9).

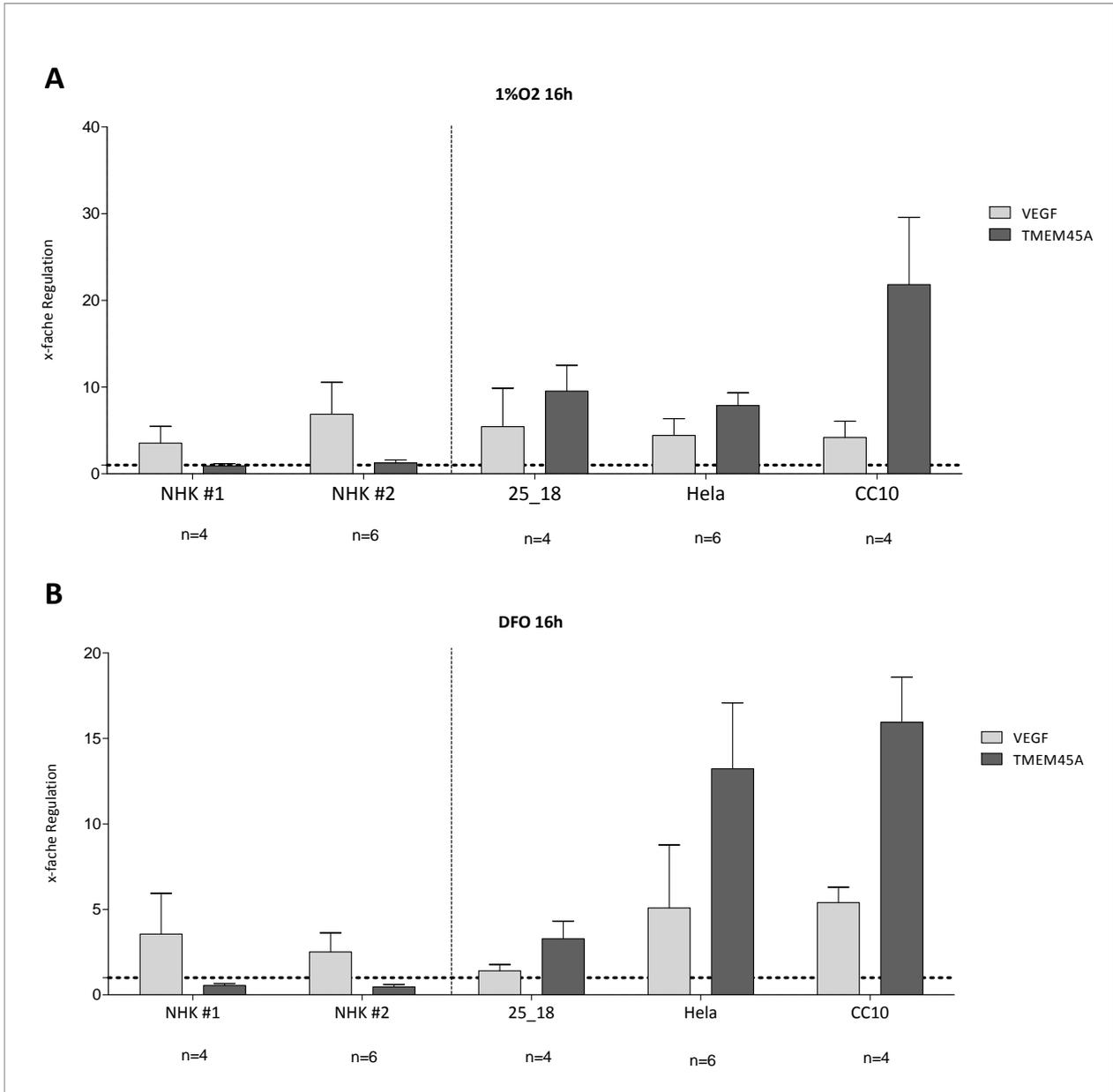


Abb.44: mRNA Mengen HPV-negativer und HPV-positiver Zelllinien nach DFO-Behandlung oder Inkubation mit 1% Sauerstoff. 24 Stunden nach dem Aussäen wurden die Zellen für 16 Stunden entweder mit 100 µM DFO behandelt oder in der Hypoxiekammer inkubiert. Die mRNA Menge wurde im Anschluss mittels qRT PCR ermittelt. Als Referenz dienten das Referenzgen Aktin sowie die Ausgangswerte zum Zeitpunkt 0. Die Balken präsentieren die Mittelwerte aus mindestens vier unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler.

4.4.5 Der „Knock-down“ von TMEM45a führt zu morphologischen Veränderungen, Ablösung und Tod von Zellen

Wie bereits im Abschnitt 4.4.1 in Abb.29 beschrieben, zeigte die TMEM45a siRNA 3 die stärkste Reduktion der mRNA sowie der Proteinmenge. Im Laufe dieser Versuche wurde beobachtet, dass sich die HeLa-Zellen, die mit zeitlichem Abstand zweimal mit si-TMEM45a-3 transfiziert wurden, morphologisch verändern, ablösen und sterben (Abb. 45). Da die Induktion von TMEM45a durch Hypoxie bzw. DFO Behandlung in HPV-negativen Zellen nicht möglich ist, sollte überprüft werden ob die Transfektion von siRNA gegen TMEM45a auf HPV-negative Zellen die gleichen Auswirkungen hat.

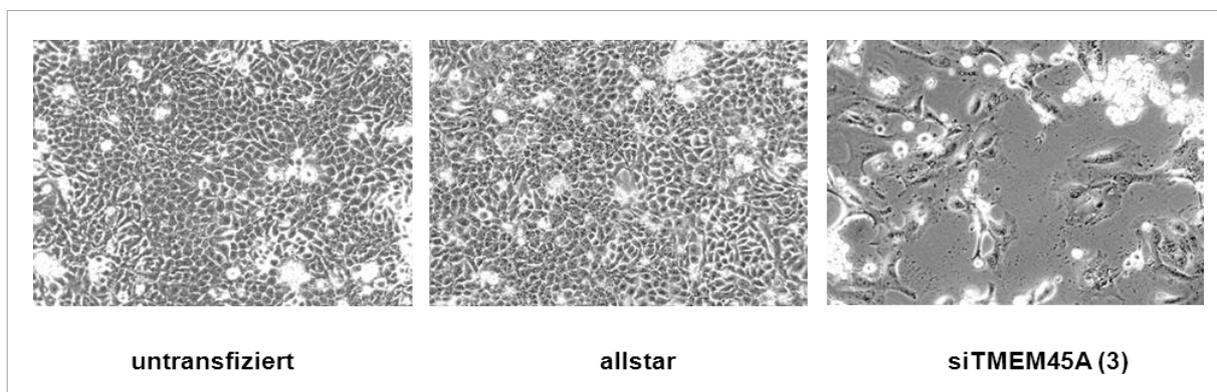
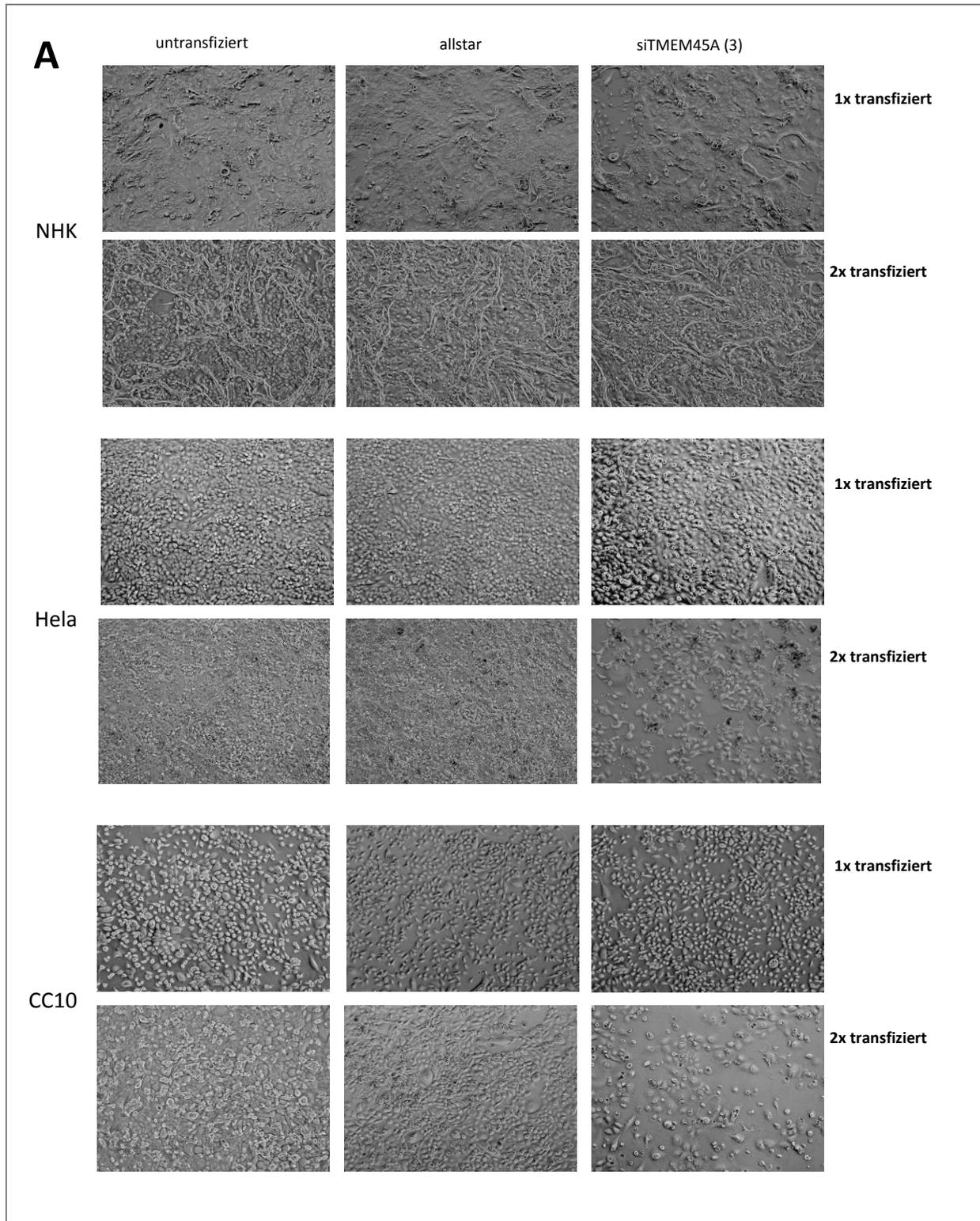


Abb.45: RNA Interferenz gegen TMEM45a

Morphologie von HeLa-Zellen nach zweifacher siRNA Transfektion (20 nM). Die Zellen wurden 24 Stunden nach dem Aussäen das erste Mal transfiziert, nach weiteren 48 Stunden wurde die Transfektion mit der gleichen Menge an siRNA wiederholt (Kontroll siRNA: Allstar). Die Bilder wurden mit einem Zeiss Axiovert 200M Mikroskop aufgenommen (100-fache Vergrößerung).

Normale humane Keratinozyten (NHK), HeLa- und CC10-Zellen wurden im doppelten Ansatz ausgesät und 24 Stunden später mit 20 nM siRNA transfiziert. 48 Stunden nach der ersten Transfektion wurden mit Hilfe des Zeiss Axiovert (100-fache Vergrößerung) Bilder gemacht und die Zellen anschließend geerntet. Die Probe wurde geteilt, die Hälfte für die RNA Extraktion in RLT Puffer aufgenommen und von der anderen Hälfte wurden Zellextrakte hergestellt. Der zweite Teil der ausgesäten und bereits einmal transfizierten Zellen wurde nach 48 Stunden ein zweites Mal transfiziert. Nach weiteren 48 Stunden wurden wiederum Bilder aufgenommen und Proben für RNA Extraktion und Proteinanalyse entnommen. Aus der Hälfte der entnommenen Proben wurde RNA extrahiert und die mRNA Menge von TMEM45a und dem Referenzgen Aktin mittels qRT PCR bestimmt. Aus dem zweiten Teil der Probe wurden Zellextrakte hergestellt und diese mittels Immunoblot auf die Anwesenheit von TMEM45a untersucht. Die aufgenommenen Bilder in Abbildung 46A zeigen, dass die morphologischen Veränderungen erst mit dem Verschwinden des Proteins auftraten (Abb.46B). Erst die zweite Transfektion zeigt eine Reduktion der Proteinmenge,

während die mRNA Menge nach der ersten Transfektion schon reduziert ist, jedoch keinen Einfluss auf die Zellen hat (Abb. 46). Unabhängig von der Tatsache, dass der „Knock-down“ in den Keratinozyten nicht so effektiv war wie der bei den HPV positiven Zellen (HeLa-Zellen und CC10), konnten keine morphologischen Veränderungen der Keratinozyten beobachtet werden obwohl eine Reduktion von mRNA- und Proteinmenge nachweisbar war.



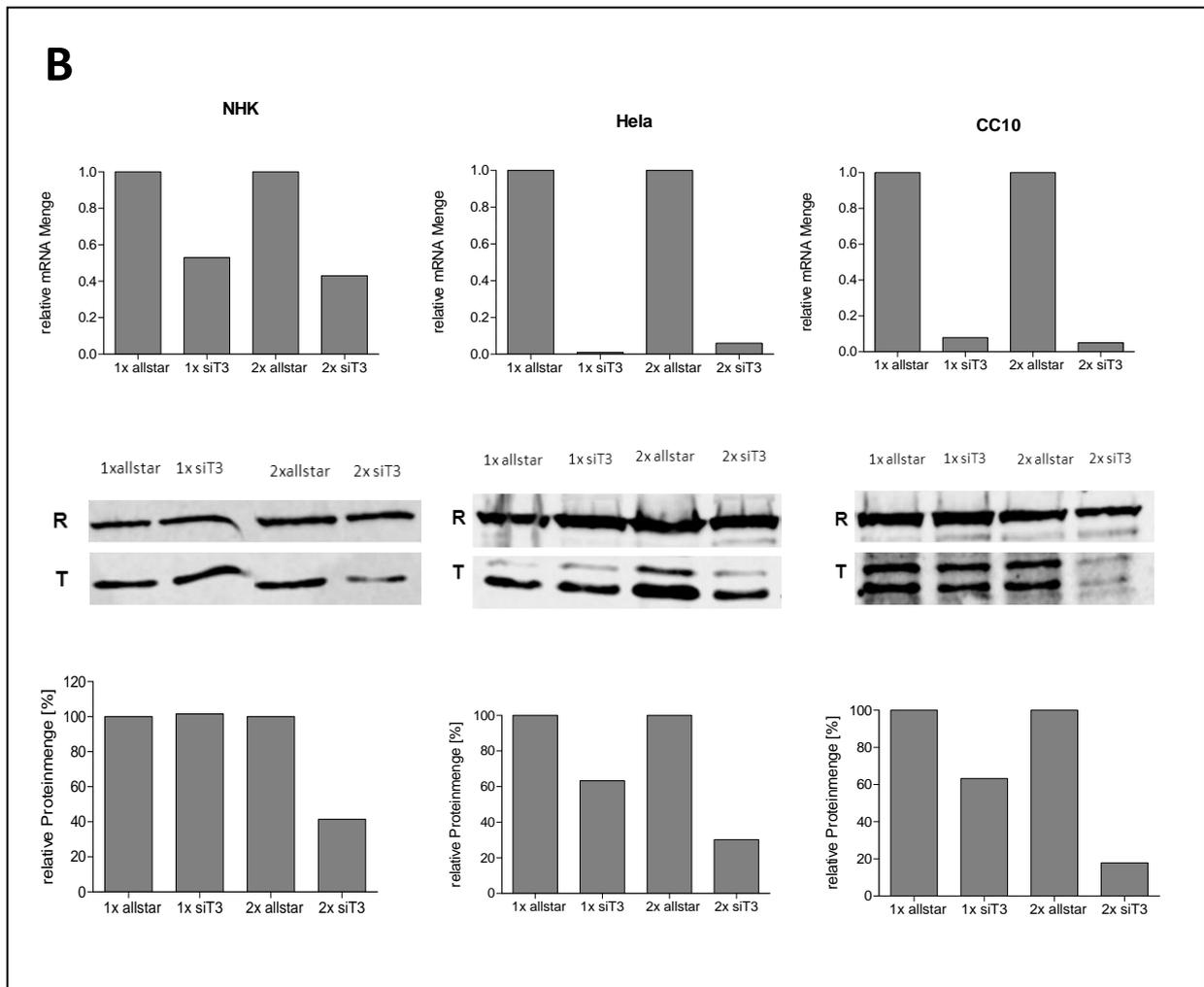


Abb.46A: Morphologie nach einfacher und zweifacher Transfektion mit siRNA (20 nM): Ausgesäte Zellen wurden nach 24 Stunden (1x transfiziert) und ein weiteres Mal mit zeitlichem Abstand (2x transfiziert) mit siRNA gegen TMEM45a (siT3) und Kontroll-siRNA (allstar) transfiziert. Bilder wurden jeweils mit einem Zeiss Axiovert 200M Mikroskop 48 Stunden nach erster und zweiter Transfektion aufgenommen (100-fache Vergrößerung).

B: mRNA- und Proteinmenge nach einfacher und zweifacher Transfektion mit siRNA (20 nM): Ausgesäte Zellen wurden nach 24 Stunden (1x transfiziert) und ein weiteres Mal mit zeitlichem Abstand (2x transfiziert) mit siRNA gegen TMEM45a (siT3) und Kontroll-siRNA (allstar) transfiziert. Zellen wurden geerntet, aus der einen Hälfte RNA extrahiert und mittels qRT PCR die mRNA Mengen bestimmt. Normalisiert wurde auf das Referenzgen Aktin und die Kontroll-siRNA Allstar. Aus der zweiten Hälfte wurden Zellextrakte hergestellt und diese mittels Immunoblot auf die Anwesenheit von TMEM45a (T, TMEM45A-C, 25 kDa) und HSP90 (R) untersucht. Die Quantifizierung erfolgte mit der ImageLab Software der Firma LiCor. Die Proteinmengen wurden auf das Referenzprotein HSP90 (R) normiert und relativ zur Transfektionskontrolle (allstar =100%) dargestellt.

4.4.6 TMEM45a ist im Golgi-Apparat und in Vesikeln lokalisiert

Bisher sind keine Daten über die Lokalisation von TMEM45a veröffentlicht, einzig durch Sequenzanalysen konnte vorhergesagt werden, dass es sich um ein Membranprotein handeln könnte. Ein Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, wo TMEM45a in der Zelle lokalisiert ist. Hierfür wurde zuerst die HA-markierte TMEM45a Sequenz in HeLa-Zellen überexprimiert. Mittels indirekter Immunfluoreszenzanalyse konnte gezeigt werden, dass die Signale für TMEM45a und HA übereinstimmen (Abb. 47). Gefärbt wurden kleine Vesikel, die sich über das gesamte Zytoplasma verteilten und in Bereichen nahe dem Zellkern vermehrt auftraten.

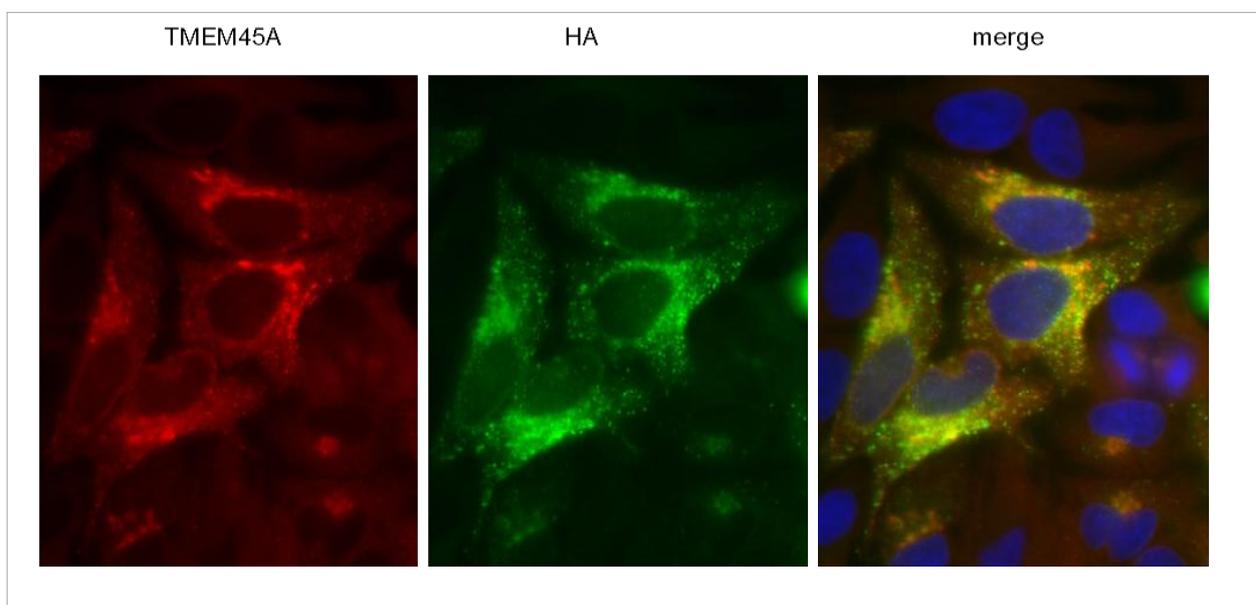
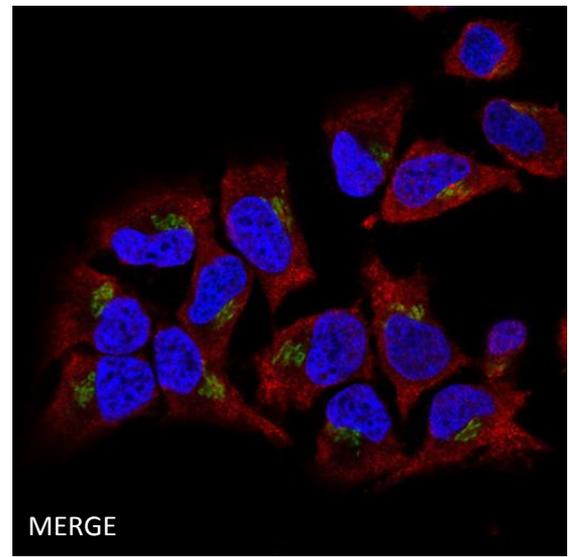
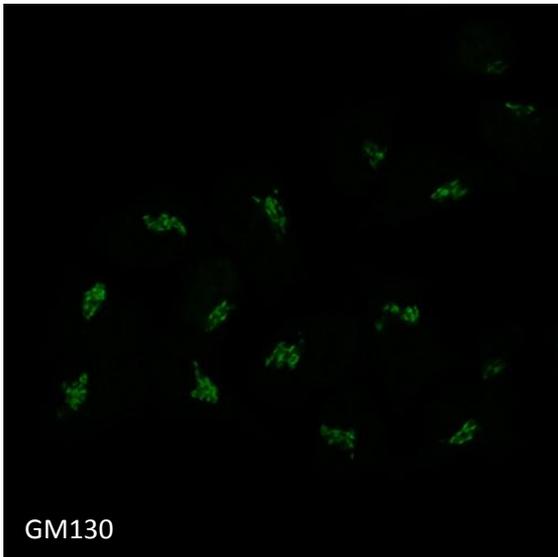
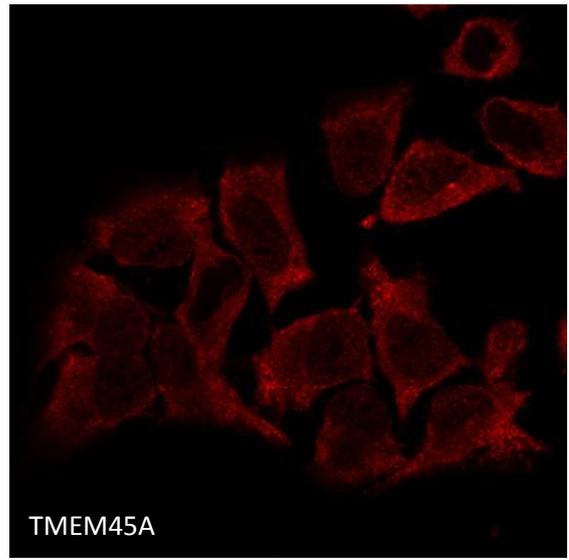
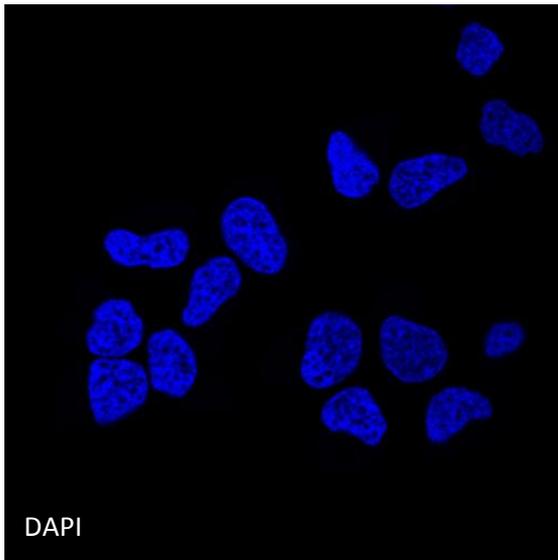


Abb. 47: Immunfluoreszenz zum Nachweis der Ko-lokalisierung von TMEM45a und HA in HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden transient mit TMEM45a mit HA Epitop am N-Terminus transfiziert. Die Zellen wurden 48 Stunden nach Transfektion fixiert und gefärbt. Für die Darstellung der Proteine wurden spezifische Primärantikörper gegen TMEM45a und HA sowie Alexa488 bzw. 555-gekoppelte Sekundärantikörper verwendet. Die Markierung der Kerne erfolgte mit dem DNA-Farbstoff DAPI.

Um diese Bereiche genauer zu definieren wurden HeLa-Zellen zusätzlich zu TMEM45a mit unterschiedlichen Markern bestimmter Zellorganellen gefärbt: Das Protein GM130 (*Golgi matrix protein*) wurde als Marker für den Golgi-Apparat verwendet, zusätzlich wurden Mikrotubuli mit einem Antikörper gegen Tubulin gefärbt. HeLa-Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät und nach 24 Stunden fixiert und permeabilisiert (siehe Abschnitt 3.2.5.5). Nach der Färbung von TMEM45a und den zwei unterschiedlichen Zellorganell-Markern erfolgte eine Kernfärbung mit dem blau fluoreszierenden Nukleinsäure-Farbstoff DAPI. In Abbildung 48A ist zu sehen dass die Antikörper gegen GM130 und TMEM45a zwar teilweise überlappen, jedoch auch zusätzliche vesikuläre Strukturen angefärbt werden. Diese Vesikel befinden sich teilweise in unmittelbarer Nähe zu den in Abb. 48B gefärbten Mikrotubuli.

A



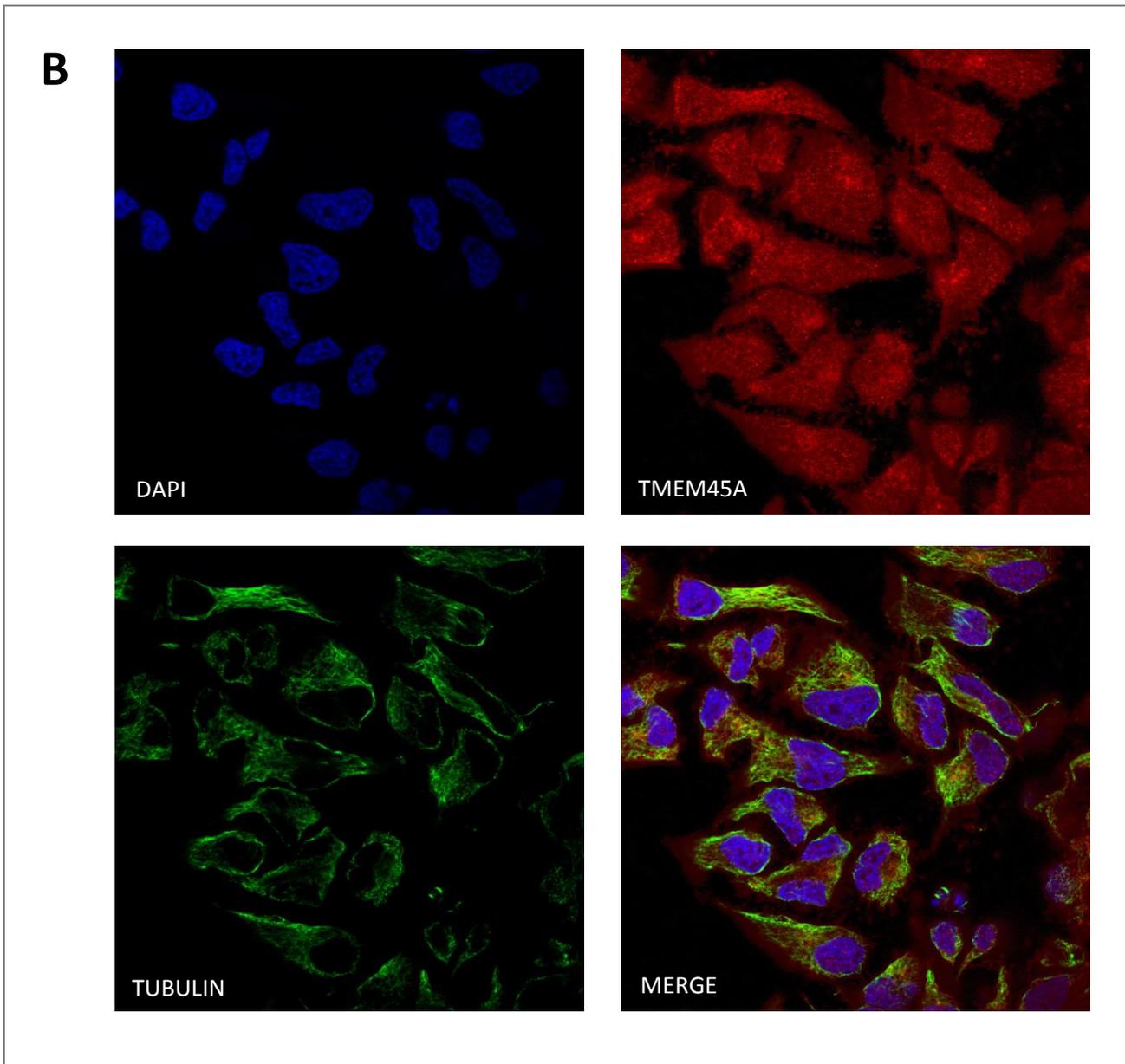


Abb. 48: Lokalisation des endogenen TMEM45a Proteins in HeLa-Zellen. Nachgewiesen wurde endogenes TMEM45a und verschiedene Organell-Marker (**A:** GM130 und **B:** Tubulin) mittels indirekter konfokaler Immunfluoreszenz. Die Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät, nach 24 Stunden fixiert und gefärbt. Für die Darstellung der Proteine wurden spezifische Primärantikörper gegen TMEM45a, GM130 und Tubulin sowie Alexa488 bzw. 555-gekoppelte Sekundärantikörper verwendet. Die Markierung der Kerne erfolgte mit dem DNA-Farbstoff DAPI. Die Aufnahmen wurden mit einer Vergrößerung von 630-fach in Verbindung mit dem Multiphotonenmikroskop Zeiss LSM 710 NLO gemacht.

5 DISKUSSION

Eine Infektion mit bestimmten HPV-Typen kann zur Entstehung von Gebärmutterhalskrebs führen. Zervixkarzinome werden zu über 99% durch eine persistente Infektion mit 13 Hochrisiko (HR)-HPV Typen verursacht (Schiffman et al. 2009). Im Gegensatz zu der Tatsache, dass Infektionen mit HPV bei jüngeren Frauen sehr häufig sind, entwickelt nur ein vergleichsweise kleiner Teil dieser infizierten Frauen eine Krebsvorstufe (CIN2/3), welche zu einem invasiven Zervixkarzinom progredieren kann. Das weist darauf hin, dass neben der zeitlichen Komponente noch andere Faktoren zur Progression einer HPV-Infektion und somit zur Entstehung eines Zervixkarzinoms beitragen. Ko-Faktoren wie z.B. Rauchen, langjährige Kontrazeptiva Einnahme, mehrere Geburten und Infektionen mit Chlamydien oder dem Herpes Simplex Virus, sowie eine HIV-Infektion erhöhen das Risiko für die Entstehung eines Zervixkarzinoms (Franco and Harper 2005; Lowy 2008). Aktuelle diagnostische Bestimmungsmethoden haben einen niedrigen Vorhersagegehalt und die daraus folgende Notwendigkeit mehrerer nachfolgender Tests, resultiert in einer großen sozialen und ökonomischen Belastung. Hinzu kommt, dass eine wiederholte Untersuchung, um eine persistente Infektion mit einem HR-HPV-Typ festzustellen, nicht einfach durchzuführen ist. Die betroffenen Frauen müssen verstehen, dass eine transiente HPV-Infektion harmlos ist und erst mit Hilfe eines zweiten Tests nach ca. 18 Monaten eine persistente Infektion bestätigt werden kann. Da der erste positive HR-HPV Test nicht mit dem Zeitpunkt des Erwerbs einer HPV-Infektion übereinstimmt, könnte ein wiederholter HPV-Test eine Identifikation bereits vorliegender persistierender Infektionen verzögern. Ziel ist es daher, neue diagnostische Methoden zu entwickeln, die eine genaue Risiko-Vorhersage nach einer einzigen Untersuchung ermöglichen. Dies erfordert die Identifizierung zusätzlicher Marker um das individuelle Risiko einer Patientin einzuschätzen. Solche Marker könnten für die individuelle Risikostratifizierung genutzt werden um somit die wirtschaftliche Belastung zu reduzieren und die Lebensqualität infizierter Frauen zu verbessern.

5.1 Viruslast und Integrationsstatus

Die Viruslast und der Integrationsstatus in den Proben der Jungen Dänischen Kohorte wurden mit Hilfe einer quantitativen Real Time PCR für HPV16E6 und E2 und einer zusätzlichen Normalisierung auf die Zellzahl in jeder Probe ermittelt. Diese Methode ist den semi-quantitativen Messungen der Viruslast durch z.B. die RLU-Werte der Hybrid Capture Methode überlegen, denn zum einen ist die eingesetzte Zellzahl beim HC2 nicht bekannt und multiple Infektionen können eine Viruslast

verursachen die nicht eindeutig einem HPV-Typ zuzuordnen sind (Gravitt et al. 2003). In der Jungen Dänischen Kohorte konnte gezeigt werden, dass HPV16-positive Frauen mit einer persistenten Infektion eine signifikant niedrigere Viruslast hatten ($p=0,0003$) als Frauen, die in der Lage waren die Infektion auszuheilen. Eine niedrige Viruslast könnte somit möglicherweise als diagnostischer Marker fungieren. Eine Kombination eines HPV-Tests, Genotypisierung und der Bestimmung der Viruslast könnte helfen diejenigen Frauen zu identifizieren, welche ein erhöhtes Risiko besitzen an Gebärmutterhalskrebs zu erkranken, denn die Persistenz einer HPV-Infektion ist neben dem HPV-Typ ein wichtiger Risikofaktor für die Progression (Kjaer et al. 2010). Die infizierten Zellen der Frauen mit einer geringen Viruslast könnten bereits integrierte Genome enthalten, welches zu einer reduzierten Virusreplikation führt. Von den 91 Frauen welche die Infektion ausgeheilt haben, besaßen 3,3% integrierte Genome, 86,81% eine Mischung der Genomformen und 9,89% episomale Genome, während die Frauen mit einer persistenten Infektion 7,59% integrierte, 92,41% gemischte und keine episomalen Genome enthielten (Tab. 15). Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Integration ein frühes Ereignis darstellt, denn bereits in einem großen Teil der Frauen (44%) mit einer normalen Zytologie konnten integrierte HPV16 Genome nachgewiesen werden (Boulet et al. 2009, Kulmala et al. 2006). Das Risiko dieser Frauen eine persistente Infektion zu bekommen, könnte möglicherweise darauf zurückzuführen sein, dass weniger virale E1 oder v.a. E2 Epitope (Brandsma et al. 2004) dem Immunsystem präsentiert werden. Episomale und daher potentiell produktive Infektionen werden wahrscheinlich eher durch das zellvermittelte Immunsystem eliminiert. Die transformierenden Gene E6 und E7 werden weiterhin in den Zellen mit integriertem Genom exprimiert, jedoch scheint dies vom Immunsystem toleriert zu werden. Es wurde bereits gezeigt, dass die fehlende Antwort auf E6 durch die zellvermittelte Immunität ein wichtiger Faktor für die Persistenz einer HPV16 Infektion ist (Nakagawa et al. 2000). Da es jedoch eine sehr große Überschneidung der Viruslast zwischen Frauen mit persistenter und transienter Frauen gibt, ist eine Definition eines Cut-offs für die Risikobewertung sehr schwierig. Die Verwendung der Viruslast als Marker für die Persistenz in einem diagnostischen Test, ist daher aufgrund nicht ausreichender Sensitivität bzw. Spezifität, nicht sinnvoll. Ein Unterschied der Viruslast zwischen Frauen die während der Nachverfolgungszeit entweder ein CIN3+ entwickelt hatten oder zytologisch keine Auffälligkeiten zeigten, konnte nicht festgestellt werden. Eine fehlende Korrelation zwischen einer hohen Viruslast und dem Auftreten hochgradiger zervikaler Läsionen wurde bereits beschrieben, jedoch sind ebenfalls entgegengesetzte Daten veröffentlicht (Nindl et al. 1997; Swan et al. 1999; Heard et al. 2000; Lillo et al. 2005). In dieser Arbeit wurden nur Proben derjenigen Frauen untersucht, die ein positives HC2 Ergebnis hatten, denn HC2 negative Frauen haben ein vernachlässigbares Risiko ein CIN3+ innerhalb von sechs Jahren Nachverfolgungszeit zu entwickeln (Dillner et al. 2008). Im Gegensatz dazu ist es möglich, dass andere Studien, welche eine sensitivere Methode ohne klinisch validierten Cut-off verwendeten,

deswegen eine stärkere Korrelation zwischen einer hohen Viruslast und einer hochgradigen Läsion detektieren (Josefsson et al. 2000; Ylitalo et al. 2000; van Duin et al. 2002; Cricca et al. 2007). Bei Berechnung des E2/E6 Quotienten als Surrogatmarker für den Integrationsstatus des HPV-Genoms wurden Quotienten $\leq 0,15$ als Indikator für integrierte und ein Verhältnis $> 0,9$ als Indikator für episomale Genome verwendet. Jedoch kann bei einem Quotient von $> 0,9$ nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um viele integrierte „head-to-tail“ Genome handelt. Es zeigte sich, dass Frauen mit einer persistenten Infektion einen signifikant niedrigeren E2/E6 Quotienten hatten als die Frauen mit einer transienten Infektion. Das ist dadurch zu erklären, dass wie bereits gezeigt wurde, 29-89% der zytologisch normalen Proben integrierte virale Kopien zu finden sind (Briolat et al. 2007; Saunier et al. 2008; Boulet et al. 2009).

Zur Validierung der Ergebnisse der Jungen Dänischen Kohorten Studie, wurden Viruslast und Integrationsstatus in persistent und transient HPV16-infizierten Frauen der LBC Kohorte bestimmt. Um die benötigte Probenmenge für die Analyse zu reduzieren und die Genauigkeit zu verbessern wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Multiplex PCR etabliert, welche die simultane Bestimmung der E2 und E6 Kopien sowie der Zellzahl erlaubt. Von den zum ersten Untersuchungszeitpunkt HPV16-positiven Frauen wiesen 285 Frauen bei der zweiten Untersuchung ebenfalls ein positives HPV16 Ergebnis auf (persistente Infektion), 350 Frauen hatten im HC2 ein RLU-Wert < 1 und wurden somit als HPV-negativ betrachtet (transiente Infektion). Mit Hilfe der Multiplex PCR konnte festgestellt werden, dass in dieser Gruppe 21 Frauen ein HPV16 E2 und E6 Signal besaßen und wurden somit in die Gruppe der Frauen mit persistenter Infektion umgruppiert.

Entgegen der Resultate der Jungen Dänischen Kohorte wurde in der LBC-Kohorte kein signifikanter Unterschied der Viruslast zwischen den beiden untersuchten Gruppen festgestellt ($p=0,06$), im Gegensatz zur Jungen Dänischen Kohorte wurde hierbei die höhere Viruslast in der Gruppe der persistent infizierten Frauen gemessen (Abb. 18 und 19). Vergleicht man die Mediane der Viruslast der beiden Studien miteinander zeigten sich vielfach höhere Werte in der Jungen Dänischen Kohorte. In beiden Fällen wurden zwar die gleichen Oligonukleotid-Sequenzen für die Detektion von HPV16E2 und E6 verwendet, aber es wurde eine anderes Referenzgen und andere Reagenzien verwendet. Um Vergleichsanalysen anzustellen wurden 45 Proben der Jungen Dänischen Kohorte zufällig ausgewählt und mit Hilfe der Multiplex wurden Viruslast und Integrationsstatus erneut bestimmt. Der Vergleich beider Methoden zeigte keine auffälligen Unterschiede, außer einem extrem erniedrigten E2/E6 Quotienten in zwei Proben (zurückzuführen auf ein verändertes E2 Signal), was möglicherweise auf die lange Lagerungszeit der Proben zwischen den beiden Messungen zurückzuführen ist (1. Messung 2009, 2. Messung 2013). Somit können die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Kohorten nicht

auf die Unterschiede der Methode zur Bestimmung der viralen Kopien und des Referenzgens zurückgeführt werden.

Die Bestimmung des Integrationsstatus in der LBC-Kohorte ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen Frauen mit einer persistenten oder einer transienten HPV16-Infektion. Dieser große Unterschied zwischen beiden Kohorten kann möglicherweise auf die unterschiedliche Altersverteilung der eingeschlossenen Frauen zurückgeführt werden. In die Junge Dänische Kohorte wurden Frauen zwischen 20 und 29 Jahren eingeschlossen, während die LBC-Kohorte Frauen im Alter von 14 bis 96 (Median 37 Jahre) enthält. Eine höhere Viruslast jüngerer Frauen wurde bereits mehrmals beschrieben (van Duin et al. 2002; Ho et al. 2004; Xu et al. 2009; Ramanakumar et al. 2010). Daher würde eine altersstratifizierte Analyse zeigen, ob Viruslast und Integrationsstatus eventuell nur in jungen Frauen als möglicher Marker für die Persistenz in Betracht gezogen werden könnte. Weitere Unterschiede zwischen den Studien beruhen auf dem verwendeten Abstrichpuffer sowie in der DNA-Extraktion mit unterschiedlichen Geräten.

5.2. TMEM45A und p16/CDKN2A als neue potentielle Marker für die Persistenz und Progression einer HPV16 Infektion

Mehrere Studien haben sich auf die Klassifizierung und Diagnose von Karzinomen mit Hilfe der Mikroarray Technologie fokussiert. Diese Daten stammen jedoch meist aus Vergleichen normaler Zellen mit Krebszelllinien oder nicht infiziertem, normalem Gewebe und HPV-positivem Tumorgewebe. In dieser Arbeit wurde diese Technologie dazu verwendet, Genexpressionsmuster mit einem prädiktiven Wert für die Persistenz und die Progression einer HPV16-Infektion zu identifizieren. Mit Hilfe einer einzigartigen großen dänischen Kohorte, welche für fast 13 Jahre nachverfolgt wurde, ist die Identifikation dieser prädiktiven Marker theoretisch möglich. Ein wesentlicher Vorteil dieser Studie ist, dass die Proben zu einem Zeitpunkt entnommen wurden, an dem die Frauen zwar bereits HPV16-positiv waren, aber noch keinerlei zytologische Veränderungen gezeigt hatten. Aufgrund der langen Nachverfolgungszeit und der prospektiven Untersuchung der Proben ist es möglich, Unterschiede im zellulären Expressionsmuster vor dem Auftreten einer zytologischen Veränderung zu finden. Es konnten fünf Gene identifiziert werden, die mit der Prävalenz oder Persistenz (TMEM45a, TNFAIP6, CD44, CCRL2 und p16/CDKN2A) und der Progression einer HPV16-Infektion assoziiert sind (TMEM45a und p16/CDKN2A).

Die Untersuchungen ergaben eine verminderte Expression der Gene CD44, CCRL2 und TNFAIP-6 in HPV-positiven Zellen. Alle drei Gene spielen bei Entzündungsreaktionen eine Rolle. CD44 ist ein Oberflächenmolekül welches wichtig für Zell-Zell-Interaktionen, Zelladhäsion und Migration ist. In vielen unterschiedlichen Tumorarten kann eine Überexpression von CD44 Isoformen beobachtet

werden, was mit einem ungünstigen Ausgang in Zusammenhang gebracht wird. Im Gegensatz dazu werden in Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereiches eine bis mehrerer CD44 Isoformen vermindert exprimiert (Bahar et al. 1997; Kunishi et al. 1997; Soukka et al. 1997). Eine Reduktion der CD44 mRNA verleiht Tumorzellen möglicherweise einen Wachstumsvorteil und maligne Eigenschaften. TNFAIP-6 (oder *TSG-6*) ist ein durch proinflammatorische Zytokine wie TNF- α und Interleukin-1 induzierbares Gen, welches in normalem Gewebe nicht konstitutiv exprimiert, aber als Antwort auf Entzündungssignale produziert wird (Wisniewski and Vilcek 1997). CCRL2 (*Chemokine (CC motif) receptor-like 2*) bindet Chemerin, welches positiv chemotaktisch auf Leukozyten wirkt (Zabel et al. 2005; Zabel et al. 2006). Die Expression kann durch pro-inflammatorische Signalmoleküle wie z.B. TNF- α , IFN- γ , IFN- β , LPS und poly(I:C), über den NF- κ B Signalweg gesteigert werden (Monnier et al. 2012). Es wurde bereits eine verminderte Expression von IFN- γ in CIN- und Zervixkarzinom-Gewebe (Pao et al. 1995; Scott et al. 2009), sowie von IFN-regulierten Genen in Zelllinien durch HPV16 und HPV31 (Chang and Laimins 2000; Wan et al. 2008) beschrieben. Möglicherweise ist der negative Einfluss der Onkoproteine E6 und E7 auf die Interferon-Signalwege und die Expression von IFN-regulierten Genen eine mögliche Erklärung für die hier beobachtete, verminderte Expression.

Einer weiterer potentieller Marker ist das Gen CDKN2A, welches für die Transkripte p14^{ARF} und p16^{INK4a} kodiert. p16^{INK4a} ist ein zyklin-abhängiger Kinase-Inhibitor, welcher die Aktivität der zyklin-abhängigen Kinasen 4 und 6 reguliert und in vielen Karzinomen durch genetische Deletion oder Hypermethylierung inaktiviert ist (Klaes et al. 2002). In nicht-HPV-assoziierten Tumoren führt diese Inaktivierung zu erhöhten zyklin-abhängigen Kinase-Aktivität und Inaktivierung von pRb, während in HPV-assoziierten Tumoren die p16^{INK4a} Menge erhöht ist. Mehrere Untersuchungen belegen, dass p16^{INK4a} nicht nur in CINs, sondern auch in Zervixkarzinomen überexprimiert wird (Nakao et al. 1997; Sano et al. 1998; Keating et al. 2001; Klaes et al. 2002) und dass die Menge an p16^{INK4a} mit zunehmender Schwere der Läsionen zunimmt (Benevolo et al. 2006). Dies lässt vermuten, dass eine p16^{INK4a} Überexpression mit hochgradigen präkanzerösen Läsionen und Zervixkarzinomen assoziiert ist und dass die immunhistochemische Detektion von p16^{INK4a} ein nützlicher Biomarker für die Identifikation von HR-HPV in niedrig-gradigen Läsionen sein kann. Durch die Kombination der p16^{INK4a} Detektion mit dem Proliferationsmarker Ki-67 konnte die Sensitivität und v.a. die Spezifität des alleinigen p16^{INK4a} Nachweises signifikant erhöht werden (CINtec[®] Plus p16 Ki67-Test; CINtec1Cytology, mtm laboratories, Westborough, MA). Damit ist die immunhistochemische Färbung von p16^{INK4a} der bekannteste Biomarker für die Detektion von zervikalen intraepithelialen Neoplasien. Im Gegensatz dazu sind wenige Daten vorhanden, welche die Transkriptmenge von p16/CDKN2A mit der Persistenz oder der Progression einer HPV-Infektion in Verbindung bringen. Eine Assoziation zwischen einer HPV-Infektion und einer Überexpression von p14^{ARF} und p16^{INK4a}

Transkripten in Zervixkarzinomen und Dysplasien wurde von Khleif et al. (Khleif et al. 1996) beschrieben. Keyserling et al. (von Keyserling et al. 2012) konnten eine signifikant erhöhte Expression von p14^{ARF} und p16^{INK4a} mRNA in Abstrichen mit diagnostizierter HSIL (*high-grade squamous intraepithelial lesions*) gegenüber Abstrichen mit normaler Zytologie beobachten. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die p16/CDKN2A mRNA Menge zwischen HPV-negativen und HPV16 persistent infizierten Frauen signifikant erhöht ist. Ebenso wurde ein signifikanter Unterschied der p16/CDKN2A mRNA Menge zwischen HPV16 persistent infizierten Frauen mit oder ohne Progression zu CIN3+ festgestellt. Somit stellt die Erhöhung der CDKN2A mRNA nicht nur einen Surrogatmarker für die Anwesenheit von HPV16 in zervikalen Abstrichen dar, sondern auch einen potentiellen prädiktiven Marker für die Entstehung von schweren, zervikalen Dysplasien oder höher-gradigen Verläufen (CIN3+) auf der Grundlage einer persistenten HPV16-Infektion.

Bisher wurden keine Daten veröffentlicht die eine Assoziation von TMEM45A und HPV Prävalenz, Persistenz oder Zervixkarzinomen beschreiben. Interessanterweise ist TMEM45A auf dem Chromosom 3q lokalisiert, welches in 90% aller Zervixkarzinomen in mehreren Kopien vorliegt (Heselmeyer-Haddad et al. 2005). Diese Akkumulation bildet die Grundlage für einen kommerziell erhältlichen Test auf Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung („FISH“)-Basis um HPV-assoziierte Krebszellen in Abstrichmaterial zu detektieren (*oncoFISH® cervical test*, *Ikonisys Clinical Laboratories*). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die TMEM45A Menge in HPV16-positivem Abstrichmaterial im Vergleich zu HPV-negativen Proben signifikant erhöht ist. Weiterhin konnte eine erhöhte TMEM45A Transkriptmenge in den HPV16 persistent infizierten Proben gefunden werden, die während der Nachverfolgungszeit schwere Dysplasien, CIS (*Carcinoma in situ*) oder ein Karzinom entwickelt haben. Flamant et al. (2012) hat gezeigt, dass eine erhöhte TMEM45A Expression mit einer schlechten Prognose für Brustkrebspatienten assoziiert ist und möglicherweise ein Indikator für eine potentielle Resistenz gegenüber Krebstherapien sein könnte. Weitere Untersuchungen sind nötig, um das Potential von TMEM45A als potentieller Biomarker für eine HPV-Infektion, einschätzen zu können.

5.3 Charakterisierung von TMEM45A

Es wurde bereits gezeigt, dass TMEM45A unter Hypoxie in CD133+ Nabelschnurblutzellen hochreguliert ist (Martin-Rendon et al. 2007). Hypoxie bezeichnet die Unterversorgung von Gewebe (oder des gesamten Körpers) mit Sauerstoff. Der wichtigste Transkriptionsfaktor ist HIF-1 (*hypoxia-inducible factor 1*), ein Heterodimer bestehend aus einer α - (von der 3 Isoformen existieren: 1 α , 2 α und 3 α) und einer β -Untereinheit. Unter normoxischen Bedingungen wird die HIF-1 α Untereinheit

hydroxyliert und durch das pVHL (*von Hippel-Lindau*) Protein erkannt. pVHL bildet zusammen mit den Proteinen Elongin C, Elongin B, Cullin-2 und Rbx1 den VCB-Cul2 E3 Ligase Komplex (Ivan und Kaelin 2001). Bindet HIF-1 an diesen E3 Komplex führt dies zur Polyubiquitinierung und dem anschließenden Abbau durch das Proteasom (Kamura et al. 2000). Unter hypoxischen Bedingungen wird die Hydroxylase durch das Fehlen des Co-Substrats Sauerstoff gehemmt. Die α -Untereinheit des HIF-1 Proteins wird somit stabilisiert und gelangt vom Zytoplasma in den Zellkern, wo sie mit der β -Untereinheit assoziiert. Der Transkriptionsfaktor HIF-1 (*hypoxia-inducable factor 1*) interagiert mit Ko-Aktivatoren wie zum Beispiel CBP/p300 und bindet an ein Konsensus Sequenzelement (5'-RCGTG-3') in den proximalen Promotoren von Hypoxie regulierten Genen. HIF induziert so zusammen mit weiteren Transkriptionsfaktoren zur Expression Hypoxie-regulierter Gene wie z.B. VEGF, die zur Anpassung der Zelle an eine mangelnde Sauerstoffversorgung erforderlich sind. Zusammen kontrollieren diese Gene zelluläre Prozesse wie z.B. den Wechsel von oxidativem zu glykolytischem Metabolismus, Inhibition der Zellproliferation und die Stimulation der Sauerstoffversorgung durch Erythropoese und Angiogenese (Wenger et al. 2005). Eine Induktion von TMEM45A in Kolonkarzinomzellen durch Zink, welches den hypoxischen Signalweg induziert, wurde von Sheffer et al. (2011) beschrieben. Eine Kombination aus computerbasierten und experimentellen Ergebnissen hat TMEM45A als potentielles HIF-1 α Zielgen identifiziert (Benita et al. 2009). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Induktion der TMEM45A Expression vom HPV-Status der untersuchten Zelllinien abhängt. In HPV-negativen Zellen konnte weder unter hypoxischen Bedingungen (1% Sauerstoff) noch unter DFO-Behandlung eine Zunahme der TMEM45A Transkripte beobachtet werden, es war eher eine leichte Abnahme der Transkriptmenge zu verzeichnen. Interessanterweise kann in HPV-positiven Karzinomzellen eine durch Hypoxie induzierte, verlängerte Aktivierung des NF- κ B Signalwegs beobachtet werden, was durch eine Inaktivierung des NF- κ B Inhibitors *CYLD* durch E6 unter Hypoxie erklärt werden könnte (An et al. 2008). Möglicherweise trägt die erhöhte TMEM45A Menge, ebenso wie die durch NF- κ B induzierten Gene zum Überleben, der Proliferation und Angiogenese bei und erlauben somit dem Virus eine Anpassung an hypoxische Bedingungen, welche mit aggressivem Tumorwachstum assoziiert sind (Zhong et al. 1999; Zagzag et al. 2000). HPV-positive Zellen zeigen eine verstärkte Induktion von HIF-1 α nach Behandlung mit DFO als HPV-negative Zellen (Nakamura et al. 2009). Dies ließ sich auf eine Stabilisierung des Proteins zurückführen, was im Anschluss zu einer gesteigerten Expression einiger, aber nicht aller HIF-1 α Zielgene führte. Möglicherweise aktivieren HPV-positive Zellen *in vivo* Angiogenesefaktoren bevor es zur Entstehung von hochgradigen Karzinomen kommt, denn in zervikalem Gewebe können Charakteristiken einer chronischen Hypoxie, wie eine Stabilisierung von HIF-1 α und VEGF Expression, auch unter normalen Bedingungen beobachtet werden (Smith-McCune et al. 1997; Mayer et al. 2004; Lee et al. 2008). Die Veränderung der HIF-1 α Menge in HPV-positiven Zellen kann in zwei

unabhängigen Schritten geschehen: Zum einen kann E7 die HIF-1-abhängige Transkription durch Interaktion mit HDACs und der folgenden Reduktion des inhibitorischen Effekts der HDACs auf die HIF-1 abhängigen Transkription modulieren. Weiterhin kann E6 die inhibitorischen Effekte von p53 auf die HIF-1 Aktivität blockieren (Bodily et al. 2011). Eine ausschließlich HPV-abhängige Induktion von TMEM45A unter Hypoxie kann jedoch ausgeschlossen werden, denn Benita et al. (2009) konnte zeigen, dass eine Induktion der TMEM45A mRNA (durchschnittlich 21,6-fach) auch in unterschiedlichen HPV-negativen Karzinomzelllinien möglich ist.

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen haben gezeigt, dass in HPV-positiven Proben die TMEM45A mRNA Menge im Vergleich zu den HPV-negativen Proben erhöht ist. Jedoch konnten in HPV-positiven Zelllinien stets geringere mRNA Mengen als in HPV-negativen Keratinozyten nachgewiesen werden. Möglicherweise könnten diese Unterschiede dadurch erklärt werden, dass in zervikalen Abstrichen, im Gegensatz zum Zellkulturmaterial, eine Mischung verschiedener Zelltypen vorliegt, welche die gemessene TMEM45A Transkriptmenge beeinflussen können.

Lee et al. (2012) postulierten, dass durch den „knock-down“ von TMEM45A mittels shRNAs die Progression eines Xenograft-Modells von einem duktalem Carcinoma in situ (DCIS) zu einem invasivem Brustkarzinom dramatisch gesteigert werden kann. Dies führte zu der Hypothese, dass TMEM45A normalerweise die Tumorerkrankung unterdrückt. Gegen diese Hypothese sprechen jedoch die Ergebnisse der siRNA Experimente, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden. Nach zweifacher Transfektion der siRNA und der damit verbundenen Reduktion der TMEM45A mRNA und Proteinmenge konnten morphologische Veränderungen, sowie das Ablösen von Zellen und Zellsterben beobachtet werden. Dieser Effekt war in HPV-haltigen Zelllinien deutlicher ausgeprägt als in HPV-negativen Zelllinien, was durch die höhere Menge an TMEM45A Transkripten in den HPV-negativen Zellen erklärt werden kann. Flamant et al. beschreibt eine anti-apoptotische Funktion von TMEM45A (Flamant et al. 2012), welche durch unsere Ergebnisse unterstützt wird. Dabei ist jedoch der genaue Mechanismus über den die anti-apoptotische Funktion vermittelt wird, nicht bekannt. Aufgrund der Tatsache, dass TMEM45A in differenzierten Keratinozyten stark exprimiert wird (Flamant et al. 2012), könnte es möglicherweise in den wachstumsarretierten Epithelzellen diese Funktion übernehmen.

Der Nachweis von TMEM45A mittels Immunoblotanalyse war aufgrund der vielen unterschiedlichen Bandenmuster die auftraten, erschwert (Abb. 26). Mehrere Banden zeigten nach siRNA Transfektion eine reduzierte Signalintensität, jedoch konnte durch eine Überexpression gezeigt werden, dass sich allein in der 25 kDa Bande eine Zunahme der Proteinexpression zeigte. Aufgrund dieser Tatsache wurden die folgenden Versuche im Rahmen dieser Arbeit mit demjenigen Antikörper durchgeführt,

der das endogene TMEM45A (25 kDa) erkennt. In der Literatur finden sich keine Angaben über die tatsächliche Größe von TMEM45A. Eine entsprechende Bande, die nach siRNA Transfektion reduziert wird konnte auch bei Flamant et al., auch nicht durch unterschiedlichste Versuchsbedingungen, detektiert werden. Jedoch wurden die Zellen nur einfach transfiziert, während in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass eine zweite Transfektion notwendig ist, um eine Reduktion der Banden zu erlangen. Weiterhin konnte die Arbeitsgruppe von Flamant (Flamant et al. 2012) erfolgreich TMEM45A aus post-konfluenten Keratinozyten Proteinextrakten immunpräzipitieren. Die daraus resultierenden Banden zwischen 64 und 98 kDa wurden im Massenspektrometer analysiert und als TMEM45A Protein identifiziert. Zusätzlich wurde die TMEM45A Sequenz mit einem HA-Tag markiert und in MCF-7 Zellen überexprimiert. Eine anschließende Immunfluoreszenzfärbung mit einem anti-HA und dem für die Immunpräzipitation verwendeten anti-TMEM45A Antikörper zeigte, dass beide Antikörper die gleichen vesikulären Strukturen in der Zelle erkennen. Mit Hilfe unterschiedlicher Organellmarker konnte im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls eine Lokalisation von TMEM45A im Golgi-Apparat sowie in Vesikeln beobachtet werden. Eine weiterführende Analyse mit zusätzlichen Marker ist nötig um TMEM45A genauer zu lokalisieren. Interessanterweise ist die Epitopsequenz des von Flamant et al. verwendeten Sigma Antikörpers identisch mit der Peptidsequenz mit welcher der Antikörper im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurde. Auch dieser Antikörper zeigt eine Bande bei ca. 70 kDa, jedoch konnte keine erfolgreiche Immunpräzipitation durchgeführt werden. Diese Bande konnte durch eine Behandlung mit MG132 verstärkt werden, was gleichzeitig zu einer Abschwächung der leichteren Banden führte. Dies konnte jedoch nach Inhibition verschiedenster Proteasen mit einem Protease-Inhibitor-Cocktail, nicht beobachtet werden. Aufgrund der Tatsache, dass MG132 die Degradation von ubiquitin-konjugierten Proteinen inhibiert, kann man daraus schließen, dass TMEM45A möglicherweise ubiquitiniert wird. Beispiele für die Degradation ubiquitinerter Proteine finden sich bei Zellzyklus-Regulatoren und Transkriptionsfaktoren und Membranproteinen (Geng et al. 2012). Es liegt nahe, dass es sich auch bei der 70 kDa schweren Proteinbande um TMEM45A handeln könnte, jedoch konnte nicht eindeutig geklärt werden, welche Rolle den übrigen Banden zugeschrieben werden kann. Die starke Abweichung des beobachteten Molekulargewichts (70 kDa) von der berechneten Größe (32 kDa) könnte eine starke posttranslationale Modifikation des Proteins sein. Eine Abweichung des berechneten vom tatsächlichen Molekulargewicht durch N-Glykosylierung (Anheftung eines Zuckermoleküls an den Stickstoff der Seitenkette eines Asparaginrests) kann jedoch ausgeschlossen werden, da keine Verschiebung der Bandengröße nach einem PNGase F Verdau zu erkennen waren. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass es sich um eine O-Glykosylierung (Verknüpfung über den Sauerstoff der Seitenkette eines Serin- bzw. Threoninrests) handelt. Möglicherweise ist TMEM45A auch mit sich selbst oder anderen Proteinen durch kovalente Bindungen vernetzt, was dann in einer schwereren Proteinbande resultieren würde. Diese

kovalenten Bindungen können das Aufkochen in Probenpuffer für die SDS-PAGE überstehen, jedoch auch der Zusatz von reduzierenden Reagenzien wie β -Mercaptoethanol (im Urea-Puffer) oder DTT (im RIPA-Puffer) zeigten keine Unterschiede der detektierten Bandengrößen. Trotzdem kann eine Multimerisierung als Ursache der schwereren Proteinbande nicht ausgeschlossen werden. Eine weitere Möglichkeit ist eine unspezifische Bindung des Antikörpers an weitere Proteine. Dies könnte erklären, warum auch nach einer Überexpression von TMEM45A nur eine Zunahme der 25 kDa Bande zu sehen war.

5.4 Fazit

Mit Hilfe des einzigartigen Studiendesigns der Jungen dänische Kohorte konnten fünf potentielle Biomarker (TMEM45A, TNFAIP6, CD44, CCRL2 und p16/CDKN2A) für die Prävalenz oder Persistenz einer HPV16-Infektion, sowie zwei potentielle Biomarker für die Progression einer persistenten HPV16-Infektion identifiziert werden (TMEM45A und p16/CDKN2A). Aufgrund inkonsistenter Daten ist die Verwendung der Viruslast sowie des Integrationsstatus als prädiktiver Marker für eine persistente HPV16-Infektion fraglich. Die Resultate dieser Arbeit erbrachten weiterhin keine Evidenz dafür, dass man anhand der Viruslast oder Integrationsstatus das Risiko für einen progredierenden Verlauf einer persistenten HPV16 Infektion einschätzen könnte. Weitere Experimente sind nötig um die Rolle von TMEM45A in HPV-positiven Zellen sowie im Verlauf einer HPV-Infektion zu klären, jedoch lassen die bisherigen Daten darauf schließen, dass ein Zusammenhang zwischen der Expression von TMEM45A und der Präsenz von HPV besteht.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Adams, P. D. and W. G. Kaelin, Jr. (1996). "The cellular effects of E2F overexpression." Curr Top Microbiol Immunol **208**: 79-93.
- Agoff, S. N., et al. (2003). "p16(INK4a) expression correlates with degree of cervical neoplasia: a comparison with Ki-67 expression and detection of high-risk HPV types." Mod Pathol **16**(7): 665-673.
- An, J., et al. (2008). "Inactivation of the CYLD deubiquitinase by HPV E6 mediates hypoxia-induced NF-kappaB activation." Cancer Cell **14**(5): 394-407.
- Arbyn, M., et al. (2008). "Pooled analysis of the accuracy of five cervical cancer screening tests assessed in eleven studies in Africa and India." Int J Cancer **123**(1): 153-160.
- Baak, J. P., et al. (2006). "Dynamic behavioural interpretation of cervical intraepithelial neoplasia with molecular biomarkers." J Clin Pathol **59**(10): 1017-1028.
- Bahar, R., et al. (1997). "CD44 variant 6 (CD44v6) expression as a progression marker in benign, premalignant and malignant oral epithelial tissues." Int J Oral Maxillofac Surg **26**(6): 443-446.
- Benevolo, M., et al. (2006). "Immunohistochemical expression of p16(INK4a) is predictive of HR-HPV infection in cervical low-grade lesions." Mod Pathol **19**(3): 384-391.
- Benita, Y., et al. (2009). "An integrative genomics approach identifies Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1)-target genes that form the core response to hypoxia." Nucleic Acids Res **37**(14): 4587-4602.
- Bodily, J. M., et al. (2011). "Human papillomavirus E7 enhances hypoxia-inducible factor 1-mediated transcription by inhibiting binding of histone deacetylases." Cancer Res **71**(3): 1187-1195.
- Bosch, F. X., et al. (1995). "Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group." J Natl Cancer Inst **87**(11): 796-802.
- Boulet, G. A., et al. (2009). "Human papillomavirus 16 load and E2/E6 ratio in HPV16-positive women: biomarkers for cervical intraepithelial neoplasia ≥ 2 in a liquid-based cytology setting?" Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **18**(11): 2992-2999.
- Boyer, S. N., et al. (1996). "E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway." Cancer Res **56**(20): 4620-4624.
- Boyle, P., et al. (2000). "Update on cancer control in women." Int J Gynaecol Obstet **70**(2): 263-303.
- Branca, M., et al. (2005). "Survivin as a marker of cervical intraepithelial neoplasia and high-risk human papillomavirus and a predictor of virus clearance and prognosis in cervical cancer." Am J Clin Pathol **124**(1): 113-121.
- Brandsma, J. L., et al. (2004). "Vaccination of rabbits with an adenovirus vector expressing the papillomavirus E2 protein leads to clearance of papillomas and infection." J Virol **78**(1): 116-123.
- Briolat, J., et al. (2007). "HPV prevalence, viral load and physical state of HPV-16 in cervical smears of patients with different grades of CIN." Int J Cancer **121**(10): 2198-2204.
- Carozzi, F., et al. (2013). "Risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia during follow-up in HPV-positive women according to baseline p16-INK4A results: a prospective analysis of a nested substudy of the NTCC randomised controlled trial." Lancet Oncol **14**(2): 168-176.
- Castle, P. E., et al. (2005). "Human papillomavirus type 16 infections and 2-year absolute risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytologic abnormalities." J Natl Cancer Inst **97**(14): 1066-1071.
- Castle, P. E., et al. (2002). "A prospective study of high-grade cervical neoplasia risk among human papillomavirus-infected women." J Natl Cancer Inst **94**(18): 1406-1414.

- Chang, Y. E. and L. A. Laimins (2000). "Microarray analysis identifies interferon-inducible genes and Stat-1 as major transcriptional targets of human papillomavirus type 31." *J Virol* **74**(9): 4174-4182.
- Clifford, G., et al. (2006). "Chapter 3: HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases." *Vaccine* **24 Suppl 3**: S3/26-34.
- Collins, S., et al. (2002). "High incidence of cervical human papillomavirus infection in women during their first sexual relationship." *BJOG* **109**(1): 96-98.
- Collins, S. I., et al. (2009). "Disruption of the E2 gene is a common and early event in the natural history of cervical human papillomavirus infection: a longitudinal cohort study." *Cancer Res* **69**(9): 3828-3832.
- Corden, S. A., et al. (1999). "The integration of HPV-18 DNA in cervical carcinoma." *Mol Pathol* **52**(5): 275-282.
- Cricca, M., et al. (2007). "Viral DNA load, physical status and E2/E6 ratio as markers to grade HPV16 positive women for high-grade cervical lesions." *Gynecol Oncol* **106**(3): 549-557.
- Cricca, M., et al. (2009). "Molecular analysis of HPV 16 E6I/E6II spliced mRNAs and correlation with the viral physical state and the grade of the cervical lesion." *J Med Virol* **81**(7): 1276-1282.
- Crow, J. M. (2012). "HPV: The global burden." *Nature* **488**(7413): S2-3.
- Dalstein, V., et al. (2003). "Persistence and load of high-risk HPV are predictors for development of high-grade cervical lesions: a longitudinal French cohort study." *Int J Cancer* **106**(3): 396-403.
- Danos, O., et al. (1982). "Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among papovaviridae." *EMBO J* **1**(2): 231-236.
- David M Knipe; Peter M Howley; Bernard N Fields et al. (2007). *Field's Virology*, Lippincott Williams & Wilkins.
- Day, N. E. (1984). "Effect of cervical cancer screening in Scandinavia." *Obstet Gynecol* **63**(5): 714-718.
- de Villiers, E. M., et al. (2004). "Classification of papillomaviruses." *Virology* **324**(1): 17-27.
- Desaintes, C., et al. (1997). "Expression of the papillomavirus E2 protein in HeLa cells leads to apoptosis." *EMBO J* **16**(3): 504-514.
- DGGG, D. G. f. G. u. G.-. (2008) "Prävention, Diagnostik und Therapie der HPV-Infektion und präinvasiver Läsionen des weiblichen Genitale."
- DGGG, Interdisziplinäre S2k-Leitlinie für die Prävention, Diagnostik und Therapie der HPV-Infektion und präinvasiver Läsionen des weiblichen Genitale AWMF 015/027
- Dillner, J., et al. (2008). "Long term predictive values of cytology and human papillomavirus testing in cervical cancer screening: joint European cohort study." *BMJ* **337**: a1754.
- Doorbar, J. (2006). "Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer." *Clin Sci (Lond)* **110**(5): 525-541.
- Doorbar, J., et al. (1990). "Detection of novel splicing patterns in a HPV16-containing keratinocyte cell line." *Virology* **178**(1): 254-262.
- Dowhanick, J. J., et al. (1995). "Suppression of cellular proliferation by the papillomavirus E2 protein." *J Virol* **69**(12): 7791-7799.
- Dray, M., et al. (2005). "p16(INK4a) as a complementary marker of high-grade intraepithelial lesions of the uterine cervix. I: Experience with squamous lesions in 189 consecutive cervical biopsies." *Pathology* **37**(2): 112-124.
- Dyson, N., et al. (1989). "The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product." *Science* **243**(4893): 934-937.
- Flamant, L., et al. (2012). "TMEM45A is essential for hypoxia-induced chemoresistance in breast and liver cancer cells." *BMC Cancer* **12**: 391.
- Forslund, O., et al. (2007). "Cutaneous human papillomaviruses found in sun-exposed skin: Beta-papillomavirus species 2 predominates in squamous cell carcinoma." *J Infect Dis* **196**(6): 876-883.
- Franceschi, S., et al. (2006). "Variations in the age-specific curves of human papillomavirus prevalence in women worldwide." *Int J Cancer* **119**(11): 2677-2684.

- Franco, E. L., et al. (2001). "Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection." CMAJ **164**(7): 1017-1025.
- Franco, E. L. and D. M. Harper (2005). "Vaccination against human papillomavirus infection: a new paradigm in cervical cancer control." Vaccine **23**(17-18): 2388-2394.
- Frattini, M. G. and L. A. Laimins (1994). "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**(26): 12398-12402.
- Friedl, F., et al. (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**(2): 543-545.
- Funk, J. O., et al. (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**(16): 2090-2100.
- Gagneux, S., et al. (2006). "Impact of bacterial genetics on the transmission of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*." PLoS Pathog **2**(6): e61.
- Geng, F., Wenzel S., and Tansey W. (2012). "Ubiquitin and Proteasomes in Transcription." Annual Review of Biochemistry **81**: 177-201.
- Gey, G. O., W. D. Coffman, and M. T. Kubicek (1952). "Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium." Cancer Res **12**: 264-265.
- Golbang, P., et al. (1997). "Investigation of 100 consecutive negative cone biopsies." Br J Obstet Gynaecol **104**(1): 100-104.
- Grassmann, K., et al. (1996). "Identification of a differentiation-inducible promoter in the E7 open reading frame of human papillomavirus type 16 (HPV-16) in raft cultures of a new cell line containing high copy numbers of episomal HPV-16 DNA." J Virol **70**(4): 2339-2349.
- Gravitt, P. E., et al. (2003). "A comparison between real-time polymerase chain reaction and hybrid capture 2 for human papillomavirus DNA quantitation." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **12**(6): 477-484.
- Griesser, H., et al. (2004). "Correlation of immunochemical detection of HPV L1 capsid protein in pap smears with regression of high-risk HPV positive mild/moderate dysplasia." Anal Quant Cytol Histol **26**(5): 241-245.
- Gundimeda, U., et al. (2009). "Negation of the cancer-preventive actions of selenium by over-expression of protein kinase Cepsilon and selenoprotein thioredoxin reductase." Carcinogenesis **30**(9): 1553-1561.
- Gustafsson, L., et al. (1997). "International incidence rates of invasive cervical cancer after introduction of cytological screening." Cancer Causes Control **8**(5): 755-763.
- Hall, S., et al. (1996). "Human papillomavirus DNA detection in cervical specimens by hybrid capture: correlation with cytologic and histologic diagnoses of squamous intraepithelial lesions of the cervix." Gynecol Oncol **62**(3): 353-359.
- Hawley-Nelson, P., et al. (1989). "HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes." EMBO J **8**(12): 3905-3910.
- Heard, I., et al. (2000). "Increased risk of cervical disease among human immunodeficiency virus-infected women with severe immunosuppression and high human papillomavirus load(1)." Obstet Gynecol **96**(3): 403-409.
- Helt, A. M., et al. (2002). "Inactivation of both the retinoblastoma tumor suppressor and p21 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is necessary to inhibit cell cycle arrest in human epithelial cells." J Virol **76**(20): 10559-10568.
- Heselmeyer-Haddad, K., et al. (2005). "Genomic amplification of the human telomerase gene (TERC) in pap smears predicts the development of cervical cancer." Am J Pathol **166**(4): 1229-1238.
- Ho, G. Y., et al. (1998). "HPV 16 and cigarette smoking as risk factors for high-grade cervical intra-epithelial neoplasia." Int J Cancer **78**(3): 281-285.
- Ho, G. Y., et al. (2004). "Natural history of human papillomavirus type 16 virus-like particle antibodies in young women." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **13**(1): 110-116.

- Hudelist, G., et al. (2004). "Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade." Gynecol Oncol **92**(3): 873-880.
- Huh, K., et al. (2007). "Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with the cullin 2 ubiquitin ligase complex, which contributes to degradation of the retinoblastoma tumor suppressor." J Virol **81**(18): 9737-9747.
- Huibregtse, J. M., et al. (1991). "A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18." EMBO J **10**(13): 4129-4135.
- Hummel, M., et al. (1992). "Differentiation-induced and constitutive transcription of human papillomavirus type 31b in cell lines containing viral episomes." J Virol **66**(10): 6070-6080.
- Hwang, E. S., et al. (1996). "Activation of the endogenous p53 growth inhibitory pathway in HeLa cervical carcinoma cells by expression of the bovine papillomavirus E2 gene." Oncogene **12**(4): 795-803.
- Hwang, E. S., et al. (1993). "Inhibition of cervical carcinoma cell line proliferation by the introduction of a bovine papillomavirus regulatory gene." J Virol **67**(7): 3720-3729.
- Iftner, T., et al. (2010). "Prevalence of low-risk and high-risk types of human papillomavirus and other risk factors for HPV infection in Germany within different age groups in women up to 30 years of age: an epidemiological observational study." J Med Virol **82**(11): 1928-1939.
- Jana, R., et al. (2012). "Palladium(II)-catalyzed enantio- and diastereoselective synthesis of pyrrolidine derivatives." Org Lett **14**(16): 4074-4077.
- Janerich, D. T., et al. (1995). "The screening histories of women with invasive cervical cancer, Connecticut." Am J Public Health **85**(6): 791-794.
- Jeckel, S., et al. (2003). "Identification of the E9/E2C cDNA and functional characterization of the gene product reveal a new repressor of transcription and replication in cottontail rabbit papillomavirus." J Virol **77**(16): 8736-8744.
- Jensen, K. E., et al. (2012). "Risk for cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or worse in relation to smoking among women with persistent human papillomavirus infection." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **21**(11): 1949-1955.
- Jeon, S. and P. F. Lambert (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**(5): 1654-1658.
- Johung, K., et al. (2007). "Human papillomavirus E7 repression in cervical carcinoma cells initiates a transcriptional cascade driven by the retinoblastoma family, resulting in senescence." J Virol **81**(5): 2102-2116.
- Jones, D. L. and K. Munger (1996). "Interactions of the human papillomavirus E7 protein with cell cycle regulators." Semin Cancer Biol **7**(6): 327-337.
- Josefsson, A. M., et al. (2000). "Viral load of human papilloma virus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study." Lancet **355**(9222): 2189-2193.
- Kalantari, M., et al. (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**(2): 146-153.
- Kamura, T., et al. (2000). "Activation of HIF1alpha ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor complex." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(19): 10430-10435.
- Kanaya, T., et al. (1997). "The 5' region of the human papillomavirus type 31 upstream regulatory region acts as an enhancer which augments viral early expression through the action of YY1." Virology **237**(1): 159-169.
- Karstensen, B., et al. (2006). "Gene expression profiles reveal an upregulation of E2F and downregulation of interferon targets by HPV18 but no changes between keratinocytes with integrated or episomal viral genomes." Virology **353**(1): 200-209.
- Keating, J. T., et al. (2001). "Ki-67, cyclin E, and p16INK4 are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia." Am J Surg Pathol **25**(7): 884-891.

- Khan, M. J., et al. (2005). "The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice." *J Natl Cancer Inst* **97**(14): 1072-1079.
- Khleif, S. N., et al. (1996). "Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(9): 4350-4354.
- Kjaer, S., et al. (2006). "The absolute risk of cervical abnormalities in high-risk human papillomavirus-positive, cytologically normal women over a 10-year period." *Cancer Res* **66**(21): 10630-10636.
- Kjaer, S. K., et al. (2008). "Population-based prevalence, type- and age-specific distribution of HPV in women before introduction of an HPV-vaccination program in Denmark." *Int J Cancer* **123**(8): 1864-1870.
- Kjaer, S. K., et al. (2010). "Long-term absolute risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or worse following human papillomavirus infection: role of persistence." *J Natl Cancer Inst* **102**(19): 1478-1488.
- Kjaer, S. K., et al. (2002). "Type specific persistence of high risk human papillomavirus (HPV) as indicator of high grade cervical squamous intraepithelial lesions in young women: population based prospective follow up study." *BMJ* **325**(7364): 572.
- Klaes, R., et al. (2002). "p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia." *Am J Surg Pathol* **26**(11): 1389-1399.
- Klaes, R., et al. (2001). "Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri." *Int J Cancer* **92**(2): 276-284.
- Klaes, R., 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**(24): 6132-6136.
- Kruse, A. J., et al. (2001). "Ki-67 immunoquantitation in cervical intraepithelial neoplasia (CIN): a sensitive marker for grading." *J Pathol* **193**(1): 48-54.
- Kulmala, S. M., et al. (2006). "Early integration of high copy HPV16 detectable in women with normal and low grade cervical cytology and histology." *J Clin Pathol* **59**(5): 513-517.
- Kunishi, M., et al. (1997). "Down-regulated expression of CD44 variant 6 in oral squamous cell carcinomas and its relationship to regional lymph node metastasis." *Int J Oral Maxillofac Surg* **26**(4): 280-283.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-685.
- Lee, S., et al. (2012). "Differentially expressed genes regulating the progression of ductal carcinoma in situ to invasive breast cancer." *Cancer Res* **72**(17): 4574-4586.
- Lee, W. Y., et al. (2008). "Roles for hypoxia-regulated genes during cervical carcinogenesis: somatic evolution during the hypoxia-glycolysis-acidosis sequence." *Gynecol Oncol* **108**(2): 377-384.
- Lillo, F. B., et al. (2005). "Determination of human papillomavirus (HPV) load and type in high-grade cervical lesions surgically resected from HIV-infected women during follow-up of HPV infection." *Clin Infect Dis* **40**(3): 451-457.
- Lo Muzio, L., et al. (2005). "p63 overexpression associates with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma." *Hum Pathol* **36**(2): 187-194.
- Lowy, D. (2008). "Human papillomavirus, cervical cancer prevention, and more." *Vaccine* **26 Suppl 10**: iii-iv.
- Man, S. (1998). "Human cellular immune responses against human papillomaviruses in cervical neoplasia." *Expert Rev Mol Med* **1998**: 1-19.
- Manawapat, A. (2009). Identifizierung von potentiellen molekularen Markern für die Progression und Persistenz einer HPV16-Infektion.
- Manawapat, A., et al. (2012). "Physical state and viral load as predictive biomarkers for persistence and progression of HPV16-positive cervical lesions: results from a population based long-term prospective cohort study." *Am J Cancer Res* **2**(2): 192-203.

- Martin-Rendon, E., et al. (2007). "Transcriptional profiling of human cord blood CD133+ and cultured bone marrow mesenchymal stem cells in response to hypoxia." *Stem Cells* **25**(4): 1003-1012.
- Masterson, P. J., et al. (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**(9): 7407-7419.
- Mayer, A., et al. (2004). "Lack of correlation between expression of HIF-1alpha protein and oxygenation status in identical tissue areas of squamous cell carcinomas of the uterine cervix." *Cancer Res* **64**(16): 5876-5881.
- McCrary, D. C., et al. (1999). "Evaluation of cervical cytology." *Evid Rep Technol Assess (Summ)*(5): 1-6.
- McLaughlin-Drubin, M. E., et al. (2011). "Human papillomavirus E7 oncoprotein induces KDM6A and KDM6B histone demethylase expression and causes epigenetic reprogramming." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(5): 2130-2135.
- Michnov, O., et al. (2012). "Knock down of p53 or its ubiquitin ligase E6AP does not affect the sensitivity of human papillomavirus-positive cervical cancer cells to cisplatin." *Am J Cancer Res* **2**(3): 309-321.
- Monnier, J., et al. (2012). "Expression, regulation, and function of atypical chemerin receptor CCRL2 on endothelial cells." *J Immunol* **189**(2): 956-967.
- Moscicki, A. B., et al. (2006). "Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer." *Vaccine* **24 Suppl 3**: S3/42-51.
- Munger, K., et al. (2004). "Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis." *J Virol* **78**(21): 11451-11460.
- Munger, K., et al. (2001). "Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein." *Oncogene* **20**(54): 7888-7898.
- Munger, K., et al. (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**(10): 4417-4421.
- Munoz, N., et al. (2003). "Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer." *N Engl J Med* **348**(6): 518-527.
- Munoz, N., et al. (2006). "Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer." *Vaccine* **24 Suppl 3**: S3/1-10.
- Munoz, N., et al. (2009). "Safety, immunogenicity, and efficacy of quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, 18) recombinant vaccine in women aged 24-45 years: a randomised, double-blind trial." *Lancet* **373**(9679): 1949-1957.
- Munoz, N., et al. (2004). "Incidence, duration, and determinants of cervical human papillomavirus infection in a cohort of Colombian women with normal cytological results." *J Infect Dis* **190**(12): 2077-2087.
- Murphy, N., et al. (2003). "p16INK4A as a marker for cervical dyskaryosis: CIN and cGIN in cervical biopsies and ThinPrep smears." *J Clin Pathol* **56**(1): 56-63.
- Naeger, L. K., et al. (1999). "Bovine papillomavirus E2 protein activates a complex growth-inhibitory program in p53-negative HT-3 cervical carcinoma cells that includes repression of cyclin A and cdc25A phosphatase genes and accumulation of hypophosphorylated retinoblastoma protein." *Cell Growth Differ* **10**(6): 413-422.
- Nakagawa, M., et al. (2000). "Persistence of human papillomavirus type 16 infection is associated with lack of cytotoxic T lymphocyte response to the E6 antigens." *J Infect Dis* **182**(2): 595-598.
- Nakamura, M., et al. (2009). "Hypoxia-specific stabilization of HIF-1alpha by human papillomaviruses." *Virology* **387**(2): 442-448.
- Nakao, Y., et al. (1997). "Induction of p16 during immortalization by HPV 16 and 18 and not during malignant transformation." *Br J Cancer* **75**(10): 1410-1416.
- Negri, G., et al. (2004). "p16INK4a expression and progression risk of low-grade intraepithelial neoplasia of the cervix uteri." *Virchows Arch* **445**(6): 616-620.

- Nielsen, A., et al. (2012). "The importance of low-risk HPV infection for the risk of abnormal cervical cytology/histology in more than 40 000 Danish women." *Sex Transm Infect* **88**(8): 627-632.
- Nielsen, A., et al. (2010). "Persistence of high-risk human papillomavirus infection in a population-based cohort of Danish women." *J Med Virol* **82**(4): 616-623.
- Nindl, I., et al. (1997). "Human papillomavirus distribution in cervical tissues of different morphology as determined by hybrid capture assay and PCR." *Int J Gynecol Pathol* **16**(3): 197-204.
- Noya, F., et al. (2001). "p21cip1 Degradation in differentiated keratinocytes is abrogated by costabilization with cyclin E induced by human papillomavirus E7." *J Virol* **75**(13): 6121-6134.
- Ostor, A. G. (1993). "Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review." *Int J Gynecol Pathol* **12**(2): 186-192.
- Pao, C. C., et al. (1995). "Differential expression of cytokine genes in cervical cancer tissues." *Biochem Biophys Res Commun* **214**(3): 1146-1151.
- Park, J. S., et al. (1997). "Physical status and expression of HPV genes in cervical cancers." *Gynecol Oncol* **65**(1): 121-129.
- Parkin, D. M., et al. (2005). "Global cancer statistics, 2002." *CA Cancer J Clin* **55**(2): 74-108.
- Pattillo, R. A., et al. (1977). "Tumor antigen and human chorionic gonadotropin in CaSki cells: a new epidermoid cervical cancer cell line." *Science* **196**(4297): 1456-1458.
- Peitsaro, P., et al. (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**(3): 886-891.
- Petry, K. U., et al. (2003). "Inclusion of HPV testing in routine cervical cancer screening for women above 29 years in Germany: results for 8466 patients." *Br J Cancer* **88**(10): 1570-1577.
- Pett, M. R., et al. (2004). "Acquisition of high-level chromosomal instability is associated with integration of human papillomavirus type 16 in cervical keratinocytes." *Cancer Res* **64**(4): 1359-1368.
- Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." *Nucleic Acids Res* **29**(9): e45.
- Ramanakumar, A. V., et al. (2010). "Human papillomavirus (HPV) types 16, 18, 31, 45 DNA loads and HPV-16 integration in persistent and transient infections in young women." *BMC Infect Dis* **10**: 326.
- Reiser, J., et al. (2011). "High-risk human papillomaviruses repress constitutive kappa interferon transcription via E6 to prevent pathogen recognition receptor and antiviral-gene expression." *Journal of virology* **85**(21): 11372-11380.
- Rheinwald, J. G. and H. Green (1975). "Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells." *Cell* **6**(3): 331-343.
- Rice, G., et al. (2007). "Clinical and molecular phenotype of Aicardi-Goutieres syndrome." *Am J Hum Genet* **81**(4): 713-725.
- Richardson, H., et al. (2003). "The natural history of type-specific human papillomavirus infections in female university students." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **12**(6): 485-490.
- Ruesch, M. N., et al. (1998). "Activation of papillomavirus late gene transcription and genome amplification upon differentiation in semisolid medium is coincident with expression of involucrin and transglutaminase but not keratin-10." *J Virol* **72**(6): 5016-5024.
- Sano, T., et al. (1998). "Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions." *Am J Pathol* **153**(6): 1741-1748.
- Sasieni, P. D., et al. (1996). "Estimating the efficacy of screening by auditing smear histories of women with and without cervical cancer. The National Co-ordinating Network for Cervical Screening Working Group." *Br J Cancer* **73**(8): 1001-1005.
- Saunier, M., et al. (2008). "Analysis of human papillomavirus type 16 (HPV16) DNA load and physical state for identification of HPV16-infected women with high-grade lesions or cervical carcinoma." *J Clin Microbiol* **46**(11): 3678-3685.
- Scheffner, M., et al. (1993). "The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53." *Cell* **75**(3): 495-505.

- Scheffner, M., et al. (1991). "The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(13): 5523-5527.
- Schiffman, M., et al. (2009). "Classification of weakly carcinogenic human papillomavirus types: addressing the limits of epidemiology at the borderline." *Infect Agent Cancer* **4**: 8.
- Schiffman, M., et al. (2005). "A study of the impact of adding HPV types to cervical cancer screening and triage tests." *J Natl Cancer Inst* **97**(2): 147-150.
- Schneider, A., et al. (2000). "Screening for high-grade cervical intra-epithelial neoplasia and cancer by testing for high-risk HPV, routine cytology or colposcopy." *Int J Cancer* **89**(6): 529-534.
- Scott, M. E., et al. (2009). "Diminished IFN-gamma and IL-10 and elevated Foxp3 mRNA expression in the cervix are associated with CIN 2 or 3." *Int J Cancer* **124**(6): 1379-1383.
- Sedman, J. and A. Stenlund (1996). "The initiator protein E1 binds to the bovine papillomavirus origin of replication as a trimeric ring-like structure." *EMBO J* **15**(18): 5085-5092.
- Serrano, M., et al. (1997). "Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a." *Cell* **88**(5): 593-602.
- Sheffer, M., et al. (2011). "Genome-wide analysis discloses reversal of the hypoxia-induced changes of gene expression in colon cancer cells by zinc supplementation." *Oncotarget* **2**(12): 1191-1202.
- Smith-McCune, K., et al. (1997). "Cross-species comparison of angiogenesis during the premalignant stages of squamous carcinogenesis in the human cervix and K14-HPV16 transgenic mice." *Cancer Res* **57**(7): 1294-1300.
- Smith, J. S., et al. (2007). "Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update." *Int J Cancer* **121**(3): 621-632.
- Soukka, T., et al. (1997). "Regulation of CD44v6-containing isoforms during proliferation of normal and malignant epithelial cells." *Cancer Res* **57**(11): 2281-2289.
- Spalholz, B. A., et al. (1987). "Bovine papillomavirus transcriptional regulation: localization of the E2-responsive elements of the long control region." *J Virol* **61**(7): 2128-2137.
- Stevaux, O. and N. J. Dyson (2002). "A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function." *Curr Opin Cell Biol* **14**(6): 684-691.
- Stubenrauch, F., et al. (2000). "The E8E2C protein, a negative regulator of viral transcription and replication, is required for extrachromosomal maintenance of human papillomavirus type 31 in keratinocytes." *J Virol* **74**(3): 1178-1186.
- Stubenrauch, F. and L. A. Laimins (1999). "Human papillomavirus life cycle: active and latent phases." *Semin Cancer Biol* **9**(6): 379-386.
- Stubenrauch, F., et al. (2007). "The E8 repression domain can replace the E2 transactivation domain for growth inhibition of HeLa cells by papillomavirus E2 proteins." *Int J Cancer* **121**(10): 2284-2292.
- Swan, D. C., et al. (1999). "Human papillomavirus (HPV) DNA copy number is dependent on grade of cervical disease and HPV type." *J Clin Microbiol* **37**(4): 1030-1034.
- Syrjanen, S., et al. (2005). "Factors predicting persistence of high-risk human papillomavirus (HPV) infections in women prospectively followed-up in three New Independent States (NIS) of the former Soviet Union." *Eur J Gynaecol Oncol* **26**(5): 491-498.
- Thomas, N. S., et al. (1998). "p130, p107, and pRb are differentially regulated in proliferating cells and during cell cycle arrest by alpha-interferon." *J Biol Chem* **273**(37): 23659-23667.
- Tonon, S. A., et al. (2001). "Physical status of the E2 human papilloma virus 16 viral gene in cervical preneoplastic and neoplastic lesions." *J Clin Virol* **21**(2): 129-134.
- Trochez, R. D., et al. (2005). "Fetal monitoring in labor: are accelerations good enough?" *J Matern Fetal Neonatal Med* **18**(5): 349-352.
- Turek, L. P. (1994). "The structure, function, and regulation of papillomaviral genes in infection and cervical cancer." *Adv Virus Res* **44**: 305-356.
- Ustav, E., et al. (1993). "The bovine papillomavirus origin of replication requires a binding site for the E2 transcriptional activator." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(3): 898-902.

- Ustav, M., et al. (1991). "Identification of the origin of replication of bovine papillomavirus and characterization of the viral origin recognition factor E1." *EMBO J* **10**(13): 4321-4329.
- V. Simanaviciene¹, V. P., Z. Gudleviciene³, S. Armalyte¹, A. Kirkutyte¹, E. Shikova⁴ and A. Zvirbliene¹ (2011). "STUDIES ON THE EXPRESSION OF p16INK4A mRNA IN CERVICAL DYSPLASIAS." *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **26**(1).
- van Duin, M., et al. (2002). "Human papillomavirus 16 load in normal and abnormal cervical scrapes: an indicator of CIN II/III and viral clearance." *Int J Cancer* **98**(4): 590-595.
- von Keyserling, H., et al. (2012). "p16INK(4)a and p14ARF mRNA expression in Pap smears is age-related." *Mod Pathol* **25**(3): 465-470.
- Walboomers, J. M., et al. (1999). "Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide." *J Pathol* **189**(1): 12-19.
- Waldstrom, M., et al. (2013). "Evaluation of p16(INK4a)/Ki-67 dual stain in comparison with an mRNA human papillomavirus test on liquid-based cytology samples with low-grade squamous intraepithelial lesion." *Cancer Cytopathol* **121**(3): 136-145.
- Wan, F., et al. (2008). "Gene expression changes during HPV-mediated carcinogenesis: a comparison between an in vitro cell model and cervical cancer." *Int J Cancer* **123**(1): 32-40.
- Wells, S. I., et al. (2000). "Papillomavirus E2 induces senescence in HPV-positive cells via pRB- and p21(CIP)-dependent pathways." *EMBO J* **19**(21): 5762-5771.
- Wenger, R. H., et al. (2005). "Integration of oxygen signaling at the consensus HRE." *Sci STKE* **2005**(306): re12.
- Wentzensen, N. and S. J. Klug (2009). "Cervical cancer control in the era of HPV vaccination and novel biomarkers." *Pathobiology* **76**(2): 82-89.
- Wentzensen, N. and M. von Knebel Doeberitz (2007). "Biomarkers in cervical cancer screening." *Dis Markers* **23**(4): 315-330.
- Wisniewski, H. G. and J. Vilcek (1997). "TSG-6: an IL-1/TNF-inducible protein with anti-inflammatory activity." *Cytokine Growth Factor Rev* **8**(2): 143-156.
- Xu, Y., et al. (2009). "High grade cervical intraepithelial neoplasia and viral load of high-risk human papillomavirus: significant correlations in patients of 22 years old or younger." *Int J Clin Exp Pathol* **2**(2): 169-175.
- Ylitalo, N., et al. (2000). "Consistent high viral load of human papillomavirus 16 and risk of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study." *Lancet* **355**(9222): 2194-2198.
- Zabel, B. A., et al. (2005). "Chemokine-like receptor 1 expression and chemerin-directed chemotaxis distinguish plasmacytoid from myeloid dendritic cells in human blood." *J Immunol* **174**(1): 244-251.
- Zabel, B. A., et al. (2006). "Chemoattractants, extracellular proteases, and the integrated host defense response." *Exp Hematol* **34**(8): 1021-1032.
- Zagzag, D., et al. (2000). "Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in brain tumors: association with angiogenesis, invasion, and progression." *Cancer* **88**(11): 2606-2618.
- Zerfass, K., et al. (1995). "Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation." *J Virol* **69**(10): 6389-6399.
- Zhang, Y., et al. (1998). "ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways." *Cell* **92**(6): 725-734.
- Zhong, H., et al. (1999). "Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases." *Cancer Res* **59**(22): 5830-5835.
- zur Hausen, H. (2006). "Perspectives of contemporary papillomavirus research." *Vaccine* **24 Suppl 3**: S3/iii-iv.

7 ANHANG

7.1 Sequenzvergleich der TMEM45a Transkriptvarianten

Das „Alignment“ wurde mit der Software *Vector NTI Advance10* erstellt.

		Section 1											
	(1)	1	10	20	30	40	50	60	70	77			
Spleissvariante 1 (ENST00000323523)	(1)	GAAGCACATCTGGACAGCTGTGCGCCTCCTC	CGGGCCGA	CGTCAGCCGAGCACGTC	CCCCACGTCCTCTCCTTCT								
Spleissvariante 2 (ENST00000403410)	(1)	-----	CGGGCCGA	CGTCAGCCGAGCACGTC	CCCCACGTCCTCTCCTTCT								
Spleissvariante 4 (ENST00000449609)	(1)	-----	CGGGCCGA	CGTCAGCCGAGCACGTC	CCCCACGTCCTCTCCTTCT								
Spleissvariante NEU	(1)	-----	CGGGCCGA	CGTCAGCCGAGCACGTC	CCCCACGTCCTCTCCTTCT								
Consensus	(1)	-----	CGGGCCGA	CGTCAGCCGAGCACGTC	CCCCACGTCCTCTCCTTCT								
		Section 2											
	(78)	78	90	100	110	120	130	140	154				
Spleissvariante 1 (ENST00000323523)	(78)	CGCCACTTATTTATTTCGTTTTCCCAAAGGCGACTAGGGACCCAAGTTTAAAAATTCCTCCCCACCCAATG											
Spleissvariante 2 (ENST00000403410)	(46)	CGCCACTTATTTATTTCGTTTTCCCAAAGGCGACTAGGGACCCAAGTTTAAAAATTCCTCCCCACCCAATG											
Spleissvariante 4 (ENST00000449609)	(37)	CGCCACTTATTTATTTCGTTTTCCCAAAGGCGACTAGGGACCCAAGTTTAAAAATTCCTCCCCACCCAATG											
Spleissvariante NEU	(46)	CGCCACTTATTTATTTCGTTTTCCCAAAGGCGACTAGGGACCCAAGTTTAAAAATTCCTCCCCACCCAATG											
Consensus	(78)	CGCCACTTATTTATTTCGTTTTCCCAAAGGCGACTAGGGACCCAAGTTTAAAAATTCCTCCCCACCCAATG											
		Section 3											
	(155)	155	160	170	180	190	200	210	220	231			
Spleissvariante 1 (ENST00000323523)	(155)	CGAGACGTGGCCAGATCCCATCCAACACACGGTTTAAATTTTCATGGGGCTCTGGGATCAAAAAGAACAGAAACAGCAA											
Spleissvariante 2 (ENST00000403410)	(123)	CGAGACGTGGCCAGATCCCATCCAACACACGGTTTAAATTTTCATGGGGCTCTGGGATCAAAAAGAACAGAAACAGCAA											
Spleissvariante 4 (ENST00000449609)	(114)	CGAGACGTGGCCAGATCCCATCCAACACACGGTTTAAATTTTCATGGGGCTCTGGGATCAAAAAGAACAGAAACAGCAA											
Spleissvariante NEU	(123)	CGAGACGTGGCCAGATCCCATCCAACACACGGTTTAAATTTTCATGGGGCTCTGGGATCAAAAAGAACAGAAACAGCAA											
Consensus	(155)	CGAGACGTGGCCAGATCCCATCCAACACACGGTTTAAATTTTCATGGGGCTCTGGGATCAAAAAGAACAGAAACAGCAA											
		Section 4											
	(232)	232	240	250	260	270	280	290	308				
Spleissvariante 1 (ENST00000323523)	(232)	CAACAAAAGCCAGCCGCTGTCTGATTTAAAGCTGGCAAAGTGGGAAAAATAAAGTGTGAGTAAACAGACCAAGTT											
Spleissvariante 2 (ENST00000403410)	(200)	CAACAAAAGCCAGCCGCTGTCTGATTTAAAGCTGGCAAAGTGGGAAAAATAAAGTGTGAGTAAACAGACCAAGTT											
Spleissvariante 4 (ENST00000449609)	(191)	CAACAAAAGCCAGCCGCTGTCTGATTTAAAGCTGGCAAAGTGGGAAAAATAAAGTGTGAGTAAACAGACCAAGTT											
Spleissvariante NEU	(200)	CAACAAAAGCCAGCCGCTGTCTGATTTAAAGCTGGCAAAGTGGGAAAAATAAAGTGTGAGTAAACAGACCAAGTT											
Consensus	(232)	CAACAAAAGCCAGCCGCTGTCTGATTTAAAGCTGGCAAAGTGGGAAAAATAAAGTGTGAGTAAACAGACCAAGTT											
		Section 5											
	(309)	309	320	330	340	350	360	370	385				
Spleissvariante 1 (ENST00000323523)	(309)	GG	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----				
Spleissvariante 2 (ENST00000403410)	(277)	GGG	GCTATGGCCAGGTTTCTGAAAGTTGGTGGAGTGGAGGCCACCGGCAGTGAGTACAAACCCAGGGGAAGC										
Spleissvariante 4 (ENST00000449609)	(268)	GG	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----				
Spleissvariante NEU	(277)	GG	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----				
Consensus	(309)	GG	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----				
		Section 6											
	(386)	386	400	410	420	430	440	450	462				
Spleissvariante 1 (ENST00000323523)	(311)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----				
Spleissvariante 2 (ENST00000403410)	(354)	ATGTGAGTGGGAGGAAGAAAGAGAGTTTTCTGGAGCTGTTGCAATGTGTATGCTGGTGAATCTACTTGGAGCATT											
Spleissvariante 4 (ENST00000449609)	(270)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----				
Spleissvariante NEU	(280)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----				
Consensus	(386)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----				
		Section 7											
	(463)	463	470	480	490	500	510	520	539				
Spleissvariante 1 (ENST00000323523)	(311)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----				
Spleissvariante 2 (ENST00000403410)	(431)	AGCAGTATCTCCAGCATTGTTAGCTACTGAGTGGCACATCTTCAGTACGCATGATTCTGGGGACTCAGGCAGAG											
Spleissvariante 4 (ENST00000449609)	(270)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----				
Spleissvariante NEU	(280)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----				
Consensus	(463)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----				
		Section 8											
	(540)	540	550	560	570	580	590	600	616				
Spleissvariante 1 (ENST00000323523)	(311)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----				
Spleissvariante 2 (ENST00000403410)	(508)	GTAAGAAGTGTGA	AACTTTTCAGCATTACCTAAGAAGCAAAGGCTCAATTTTGGCTGCTTCATTCTTATCTCTCTG										
Spleissvariante 4 (ENST00000449609)	(270)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----				
Spleissvariante NEU	(280)	-----	AACTTTTCAGCATTACCTAAGAAGCAAAGGCTCAATTTTGGCTGCTTCATTCTTATCTCTCTG										
Consensus	(540)	-----	AACTTTTCAGCATTACCTAAGAAGCAAAGGCTCAATTTTGGCTGCTTCATTCTTATCTCTCTG										
		Section 9											
	(617)	617	630	640	650	660	670	680	693				
Spleissvariante 1 (ENST00000323523)	(311)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----				
Spleissvariante 2 (ENST00000403410)	(585)	CACAGTCTAACGTGCCTGATCTACTGAGACCAAGGATGACCAATGACTCAGAAGGGAAAAATGGGATTTAAACACCC											
Spleissvariante 4 (ENST00000449609)	(270)	-----	TTCTAACGTGCCTGATCTACTGAGACCAAGGATGACCAATGACTCAGAAGGGAAAAATGGGATTTAAACACCC										
Spleissvariante NEU	(345)	CACAGTCTAACGTGCCTGATCTACTGAGACCAAGGATGACCAATGACTCAGAAGGGAAAAATGGGATTTAAACACCC											
Consensus	(617)	CACAGTCTAACGTGCCTGATCTACTGAGACCAAGGATGACCAATGACTCAGAAGGGAAAAATGGGATTTAAACACCC											
		Section 10											
	(694)	694	700	710	720	730	740	750	760	770			
Spleissvariante 1 (ENST00000323523)	(311)	-----	ATCATGGGGAATTT	CAGAGGTCATGCCCTCCCTGGAACCTTCTTTTTTATTATTTGGTCTTTGGTGGGTACAA									
Spleissvariante 2 (ENST00000403410)	(662)	AAAGATCATGGGGAATTT	CAGAGGTCATGCCCTCCCTGGAACCTTCTTTTTTATTATTTGGTCTTTGGTGGGTACAA										
Spleissvariante 4 (ENST00000449609)	(342)	AAAGATCATGGGGAATTT	CAGAGGTCATGCCCTCCCTGGAACCTTCTTTTTTATTATTTGGTCTTTGGTGGGTACAA										
Spleissvariante NEU	(422)	AAAGATCATGGGGAATTT	CAGAGGTCATGCCCTCCCTGGAACCTTCTTTTTTATTATTTGGTCTTTGGTGGGTACAA										
Consensus	(694)	AAAGATCATGGGGAATTT	CAGAGGTCATGCCCTCCCTGGAACCTTCTTTTTTATTATTTGGTCTTTGGTGGGTACAA										
		Section 11											
	(771)	771	780	790	800	810	820	830	847				
Spleissvariante 1 (ENST00000323523)	(384)	AGAGTATTCTGAAGTATATCTGCAAAAAGCAAAGCGAACCTGCTATCTTGGTTCCAAAACATATTCTATCGATTG											
Spleissvariante 2 (ENST00000403410)	(739)	AGAGTATTCTGAAGTATATCTGCAAAAAGCAAAGCGAACCTGCTATCTTGGTTCCAAAACATATTCTATCGATTG											
Spleissvariante 4 (ENST00000449609)	(419)	AGAGTATTCTGAAGTATATCTGCAAAAAGCAAAGCGAACCTGCTATCTTGGTTCCAAAACATATTCTATCGATTG											
Spleissvariante NEU	(499)	AGAGTATTCTGAAGTATATCTGCAAAAAGCAAAGCGAACCTGCTATCTTGGTTCCAAAACATATTCTATCGATTG											
Consensus	(771)	AGAGTATTCTGAAGTATATCTGCAAAAAGCAAAGCGAACCTGCTATCTTGGTTCCAAAACATATTCTATCGATTG											
		Section 12											
	(848)	848	860	870	880	890	900	910	924				
Spleissvariante 1 (ENST00000323523)	(461)	GAAATTTTGGAGGGAATTACAATAGTTGGCATGGCTTTAACTGGCATGGCTGGGGAGCAGTTTATTCCTGGAGGGCC											
Spleissvariante 2 (ENST00000403410)	(816)	GAAATTTTGGAGGGAATTACAATAGTTGGCATGGCTTTAACTGGCATGGCTGGGGAGCAGTTTATTCCTGGAGGGCC											
Spleissvariante 4 (ENST00000449609)	(496)	GAAATTTTGGAGGGAATTACAATAGTTGGCATGGCTTTAACTGGCATGGCTGGGGAGCAGTTTATTCCTGGAGGGCC											
Spleissvariante NEU	(576)	GAAATTTTGGAGGGAATTACAATAGTTGGCATGGCTTTAACTGGCATGGCTGGGGAGCAGTTTATTCCTGGAGGGCC											
Consensus	(848)	GAAATTTTGGAGGGAATTACAATAGTTGGCATGGCTTTAACTGGCATGGCTGGGGAGCAGTTTATTCCTGGAGGGCC											

ANHANG

		Section 13
	(925) 925 930 940 950 960 970 980 990	1001
Spleissvariante 1 (ENST00000323523)	(538) ECATCTGATGTTATATGACTATAAACAAAGTCACTGGAATCAACTCCTGGGCTGGCATCATTTCCACCATGATTTC	
Spleissvariante 2 (ENST00000403410)	(893) ECATCTGATGTTATATGACTATAAACAAAGTCACTGGAATCAACTCCTGGGCTGGCATCATTTCCACCATGATTTC	
Spleissvariante 4 (ENST00000449609)	(573) CCATCTGATGTTATATGACTATAAACAAAGTCACTGGAATCAACTCCTGGGCTGGCATCATTTCCACCATGATTTC	
Spleissvariante NEU	(653) CCATCTGATGTTATATGACTATAAACAAAGTCACTGGAATCAACTCCTGGGCTGGCATCATTTCCACCATGATTTC	
Consensus	(925) CCATCTGATGTTATATGACTATAAACAAAGTCACTGGAATCAACTCCTGGGCTGGCATCATTTCCACCATGATTTC	
		Section 14
	(1002) 1002 1010 1020 1030 1040 1050 1060	1078
Spleissvariante 1 (ENST00000323523)	(615) FCTTTGGGCTGTTGGGTGGGAGATATCTTATGTTTACCACATCAGTTCACTTCCTGGTCTTAAACCAAGTAAATG	
Spleissvariante 2 (ENST00000403410)	(970) FCTTTGGGCTGTTGGGTGGGAGATATCTTATGTTTACCACATCAGTTCACTTCCTGGTCTTAAACCAAGTAAATG	
Spleissvariante 4 (ENST00000449609)	(650) FCTTTGGGCTGTTGGGTGGGAGATATCTTATGTTTACCACATCAGTTCACTTCCTGGTCTTAAACCAAGTAAATG	
Spleissvariante NEU	(730) FCTTTGGGCTGTTGGGTGGGAGATATCTTATGTTTACCACATCAGTTCACTTCCTGGTCTTAAACCAAGTAAATG	
Consensus	(1002) FCTTTGGGCTGTTGGGTGGGAGATATCTTATGTTTACCACATCAGTTCACTTCCTGGTCTTAAACCAAGTAAATG	
		Section 15
	(1079) 1079 1090 1100 1110 1120 1130 1140	1155
Spleissvariante 1 (ENST00000323523)	(692) TTGTCAAATGCCTTATTTGGGAGGCCCTTATCTTCTACAACCACACTCATGGCCGGGAAATGCTGGACATCTTTGT	
Spleissvariante 2 (ENST00000403410)	(1047) TTGTCAAATGCCTTATTTGGGAGGCCCTTATCTTCTACAACCACACTCATGGCCGGGAAATGCTGGACATCTTTGT	
Spleissvariante 4 (ENST00000449609)	(727) TTGTCAAATGCCTTATTTGGGAGGCCCTTATCTTCTACAACCACACTCATGGCCGGGAAATGCTGGACATCTTTGT	
Spleissvariante NEU	(807) TTGTCAAATGCCTTATTTGGGAGGCCCTTATCTTCTACAACCACACTCATGGCCGGGAAATGCTGGACATCTTTGT	
Consensus	(1079) TTGTCAAATGCCTTATTTGGGAGGCCCTTATCTTCTACAACCACACTCATGGCCGGGAAATGCTGGACATCTTTGT	
		Section 16
	(1156) 1156 1170 1180 1190 1200 1210 1220	1232
Spleissvariante 1 (ENST00000323523)	(769) GCACCAGCTGCTGGTTTGGTCTGCTTTCTGACAGGCCCTCGTTGCCTTCTAGAGTTCCTTGTTCGGAAACAATGTAC	
Spleissvariante 2 (ENST00000403410)	(1124) GCACCAGCTGCTGGTTTGGTCTGCTTTCTGACAGGCCCTCGTTGCCTTCTAGAGTTCCTTGTTCGGAAACAATGTAC	
Spleissvariante 4 (ENST00000449609)	(804) GCACCAGCTGCTGGTTTGGTCTGCTTTCTGACAGGCCCTCGTTGCCTTCTAGAGTTCCTTGTTCGGAAACAATGTAC	
Spleissvariante NEU	(884) GCACCAGCTGCTGGTTTGGTCTGCTTTCTGACAGGCCCTCGTTGCCTTCTAGAGTTCCTTGTTCGGAAACAATGTAC	
Consensus	(1156) GCACCAGCTGCTGGTTTGGTCTGCTTTCTGACAGGCCCTCGTTGCCTTCTAGAGTTCCTTGTTCGGAAACAATGTAC	
		Section 17
	(1233) 1233 1240 1250 1260 1270 1280 1290	1309
Spleissvariante 1 (ENST00000323523)	(846) TTCTGGAGCTATTCGCGTCAAGTCTCATTTCTGCTTCAAGGGAGCTGGTTCCTTCAGATTGGATTGTCTGTATCCC	
Spleissvariante 2 (ENST00000403410)	(1201) TTCTGGAGCTATTCGCGTCAAGTCTCATTTCTGCTTCAAGGGAGCTGGTTCCTTCAGATTGGATTGTCTGTATCCC	
Spleissvariante 4 (ENST00000449609)	(875) TTCTGGAGCTATTCGCGTCAAGTCTCATTTCTGCTTCAAGGGAGCTGGTTCCTTCAGATTGGATTGTCTGTATCCC	
Spleissvariante NEU	(961) TTCTGGAGCTATTCGCGTCAAGTCTCATTTCTGCTTCAAGGGAGCTGGTTCCTTCAGATTGGATTGTCTGTATCCC	
Consensus	(1233) TTCTGGAGCTATTCGCGTCAAGTCTCATTTCTGCTTCAAGGGAGCTGGTTCCTTCAGATTGGATTGTCTGTATCCC	
		Section 18
	(1310) 1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370	1386
Spleissvariante 1 (ENST00000323523)	(923) CCCAGTGGAGGTCCTGCATGGGATCTGATGGATCATGAAAATATTTGTTTCTACCATATGCTTTTGTGGCATT	
Spleissvariante 2 (ENST00000403410)	(1278) CCCAGTGGAGGTCCTGCATGGGATCTGATGGATCATGAAAATATTTGTTTCTACCATATGCTTTTGTGGCATT	
Spleissvariante 4 (ENST00000449609)	(875) CCCAGTGGAGGTCCTGCATGGGATCTGATGGATCATGAAAATATTTGTTTCTACCATATGCTTTTGTGGCATT	
Spleissvariante NEU	(1038) CCCAGTGGAGGTCCTGCATGGGATCTGATGGATCATGAAAATATTTGTTTCTACCATATGCTTTTGTGGCATT	
Consensus	(1310) CCCAGTGGAGGTCCTGCATGGGATCTGATGGATCATGAAAATATTTGTTTCTACCATATGCTTTTGTGGCATT	
		Section 19
	(1387) 1387 1400 1410 1420 1430 1440 1450	1463
Spleissvariante 1 (ENST00000323523)	(1000) TGCAGTAAACCATTGTCACTCGTTGGAATGAATATGCTTTCATTAACCTGGTTGGTTAAATCTAGACTTAAGAGGCTCT	
Spleissvariante 2 (ENST00000403410)	(1355) TGCAGTAAACCATTGTCACTCGTTGGAATGAATATGCTTTCATTAACCTGGTTGGTTAAATCTAGACTTAAGAGGCTCT	
Spleissvariante 4 (ENST00000449609)	(875) TGCAGTAAACCATTGTCACTCGTTGGAATGAATATGCTTTCATTAACCTGGTTGGTTAAATCTAGACTTAAGAGGCTCT	
Spleissvariante NEU	(1115) TGCAGTAAACCATTGTCACTCGTTGGAATGAATATGCTTTCATTAACCTGGTTGGTTAAATCTAGACTTAAGAGGCTCT	
Consensus	(1387) TGCAGTAAACCATTGTCACTCGTTGGAATGAATATGCTTTCATTAACCTGGTTGGTTAAATCTAGACTTAAGAGGCTCT	
		Section 20
	(1464) 1464 1470 1480 1490 1500 1510 1520 1530	1540
Spleissvariante 1 (ENST00000323523)	(1077) BCTCCTCAGAAAGTGGACTTCTGAAAATGCTGAACGAGAACAGAAATCAGAAAGAAATGTGACTTTGATGAGCT	
Spleissvariante 2 (ENST00000403410)	(1432) BCTCCTCAGAAAGTGGACTTCTGAAAATGCTGAACGAGAACAGAAATCAGAAAGAAATGTGACTTTGATGAGCT	
Spleissvariante 4 (ENST00000449609)	(875) BCTCCTCAGAAAGTGGACTTCTGAAAATGCTGAACGAGAACAGAAATCAGAAAGAAATGTGACTTTGATGAGCT	
Spleissvariante NEU	(1192) BCTCCTCAGAAAGTGGACTTCTGAAAATGCTGAACGAGAACAGAAATCAGAAAGAAATGTGACTTTGATGAGCT	
Consensus	(1464) BCTCCTCAGAAAGTGGACTTCTGAAAATGCTGAACGAGAACAGAAATCAGAAAGAAATGTGACTTTGATGAGCT	
		Section 21
	(1541) 1541 1550 1560 1570 1580 1590 1600	1617
Spleissvariante 1 (ENST00000323523)	(1154) FCCAGTTTTCTAGATAAACCTTTCTTTTTTACATGTTCTTGGTTTTGTTTCTCGATCTTTTGTGGGAAACAG	
Spleissvariante 2 (ENST00000403410)	(1509) FCCAGTTTTCTAGATAAACCTTTCTTTTTTACATGTTCTTGGTTTTGTTTCTCGATCTTTTGTGGGAAACAG	
Spleissvariante 4 (ENST00000449609)	(875) FCCAGTTTTCTAGATAAACCTTTCTTTTTTACATGTTCTTGGTTTTGTTTCTCGATCTTTTGTGGGAAACAG	
Spleissvariante NEU	(1269) FCCAGTTTTCTAGATAAACCTTTCTTTTTTACATGTTCTTGGTTTTGTTTCTCGATCTTTTGTGGGAAACAG	
Consensus	(1541) FCCAGTTTTCTAGATAAACCTTTCTTTTTTACATGTTCTTGGTTTTGTTTCTCGATCTTTTGTGGGAAACAG	
		Section 22
	(1618) 1618 1630 1640 1650 1660 1670 1680	1694
Spleissvariante 1 (ENST00000323523)	(1231) TTGGCTAAGGATGACTCTAAGTGTACTGTTTGCATTTCCAATTTGGTTAAAGTATTGAAATTTAAATATTTCTTTT	
Spleissvariante 2 (ENST00000403410)	(1586) TTGGCTAAGGATGACTCTAAGTGTACTGTTTGCATTTCCAATTTGGTTAAAGTATTGAAATTTAAATATTTCTTTT	
Spleissvariante 4 (ENST00000449609)	(875) TTGGCTAAGGATGACTCTAAGTGTACTGTTTGCATTTCCAATTTGGTTAAAGTATTGAAATTTAAATATTTCTTTT	
Spleissvariante NEU	(1346) TTGGCTAAGGATGACTCTAAGTGTACTGTTTGCATTTCCAATTTGGTTAAAGTATTGAAATTTAAATATTTCTTTT	
Consensus	(1618) TTGGCTAAGGATGACTCTAAGTGTACTGTTTGCATTTCCAATTTGGTTAAAGTATTGAAATTTAAATATTTCTTTT	
		Section 23
	(1695) 1695 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760	1771
Spleissvariante 1 (ENST00000323523)	(1308) TAGCTTTGAAAATATTTGGGTGATACCTTTCATTTGACACATCATGCACATCATGGTATTTCAGGGCTAGAGTGAT	
Spleissvariante 2 (ENST00000403410)	(1663) TAGCTTTGAAAATATTTGGGTGATACCTTTCATTTGACACATCATGCACATCATGGTATTTCAGGGCTAGAGTGAT	
Spleissvariante 4 (ENST00000449609)	(875) TAGCTTTGAAAATATTTGGGTGATACCTTTCATTTGACACATCATGCACATCATGGTATTTCAGGGCTAGAGTGAT	
Spleissvariante NEU	(1423) TAGCTTTGAAAATATTTGGGTGATACCTTTCATTTGACACATCATGCACATCATGGTATTTCAGGGCTAGAGTGAT	
Consensus	(1695) TAGCTTTGAAAATATTTGGGTGATACCTTTCATTTGACACATCATGCACATCATGGTATTTCAGGGCTAGAGTGAT	
		Section 24
	(1772) 1772 1780 1790 1800 1810 1820 1830	1848
Spleissvariante 1 (ENST00000323523)	(1385) TTTTTCCAGATTATCTAAAGTTGGATGCCACACTATGAAAGAAATATTTGTTTTATTTGCCCTATAGATATGCTCA	
Spleissvariante 2 (ENST00000403410)	(1740) TTTTTCCAGATTATCTAAAGTTGGATGCCACACTATGAAAGAAATATTTGTTTTATTTGCCCTATAGATATGCTCA	
Spleissvariante 4 (ENST00000449609)	(875) TTTTTCCAGATTATCTAAAGTTGGATGCCACACTATGAAAGAAATATTTGTTTTATTTGCCCTATAGATATGCTCA	
Spleissvariante NEU	(1500) TTTTTCCAGATTATCTAAAGTTGGATGCCACACTATGAAAGAAATATTTGTTTTATTTGCCCTATAGATATGCTCA	
Consensus	(1772) TTTTTCCAGATTATCTAAAGTTGGATGCCACACTATGAAAGAAATATTTGTTTTATTTGCCCTATAGATATGCTCA	
		Section 25
	(1849) 1849 1860 1870 1880 1890 1900 1910	1925
Spleissvariante 1 (ENST00000323523)	(1462) AGGTTACTGGGCTTGCTACTATTGTAACCTCTTGACCATGGAATATACTGTTTATCTTGTGCAATGAGAA	
Spleissvariante 2 (ENST00000403410)	(1817) AGGTTACTGGGCTTGCTACTATTGTAACCTCTTGACCATGGAATATACTGTTTATCTTGTGCAATGAGAA	
Spleissvariante 4 (ENST00000449609)	(875) AGGTTACTGGGCTTGCTACTATTGTAACCTCTTGACCATGGAATATACTGTTTATCTTGTGCAATGAGAA	
Spleissvariante NEU	(1577) AGGTTACTGGGCTTGCTACTATTGTAACCTCTTGACCATGGAATATACTGTTTATCTTGTGCAATGAGAA	
Consensus	(1849) AGGTTACTGGGCTTGCTACTATTGTAACCTCTTGACCATGGAATATACTGTTTATCTTGTGCAATGAGAA	
		Section 26
	(1926) 1926 1940 1954	
Spleissvariante 1 (ENST00000323523)	(1539) ATAAATGAATGTATGTA TTTGGTGCAGA	
Spleissvariante 2 (ENST00000403410)	(1894) ATAAATGAATGTATGTA	
Spleissvariante 4 (ENST00000449609)	(875) ATAAATGAATGTATGTA	
Spleissvariante NEU	(1654) ATAAATGAATGTATGTA	
Consensus	(1926) ATAAATGAATGTATGTA	

Abb. 49: Sequenzvergleich der TMEM45a Transkriptvarianten Das „Alignment“ wurde mit der Software *Vector NTI Advance10* erstellt

8 AKADEMISCHER LEBENSLAUF

- 04/2009 – 06/2013** **Promotion, Universitätsklinikum Tübingen, Institut für Medizinische Virologie Sektion Experimentelle Virologie**
- Titel: " Identifikation und Charakterisierung von potentiellen Biomarkern für die Persistenz und Progression einer HPV16-Infektion“
-
- 03/2008 - 03/2009** **Diplomarbeit, Universitätsklinikum Tübingen, Institut für Medizinische Virologie Sektion Experimentelle Virologie**
- Titel: "Identifizierung von potentiellen molekularen Markern für die Progression und Persistenz einer HPV16-Infektion“
- (Note 1,0)
-
- 10/2003 - 01/2008** **Studium der Biologie Eberhard Karls Universität Tübingen**
- Hauptfächer:
- Virologie
 - Zellbiologie/Immunologie
 - Parasitologie
- Abschluss: Diplom (Note 1,0)
-
- 09/1995 – 06/2003** **Besuch des Montfort Gymnasiums Tettngang**
- Abschluss: Abitur (Note 2,5)

9 PUBLIKATIONEN

Manawapat et al. "Physical state and viral load as predictive biomarkers for persistence and progression of HPV16-positive cervical lesions: results from a population based long-term prospective cohort study" Am J Cancer Res. 2012; 2(2):192-203. Epub 2012 Feb 15.

Manawapat-Klopper et al. "Identification of predictive novel biomarkers for the risk of developing cervical high grade lesions in women persistently infected with high risk HPV types" (manuscript in preparation)

Manawapat-Klopper et al. "Characterization of TMEM45A –a membrane protein and its role in HPV positive cells" (manuscript in preparation)

Manawapat-Klopper et al. "Viral load and physical state in a population based long-term cohort study" (manuscript in preparation)

10 DANKSAGUNGEN

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben. Vielen Dank, besonders

Prof. Dr. rer. nat. Thomas Iftner für die Möglichkeit am Institut für medizinische Virologie und Epidemiologie, Sektion Experimentelle Virologie, diese Arbeit anfertigen zu können. Vielen Dank für die Betreuung der Arbeit, die vielen Denkanstöße und Diskussionen die zur Erstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. rer. nat. Hans-Georg Rammensee für die Betreuung dieser Arbeit durch die Fakultät für Biologie und die Übernahme der Tätigkeit als Erstgutachter.

Prof. Dr. rer. nat. Frank Stubenrauch für die nette Betreuung, für seine hilfreichen Ratschläge und Diskussionen und nicht zuletzt für die Hilfestellung beim Verfassen dieser Arbeit.

Ein herzlicher Dank an **Elke Straub, Jasmin Fertey, José Hurst und Suki Balendran**, die mir mit ihrem Wissen, ihren nützlichen Ratschlägen, ihrem Optimismus und den vielen Diskussionen stets geholfen haben. Sie haben mich nicht nur tatkräftig unterstützt, sondern mich immer aufgebaut, motiviert und für die erforderliche Abwechslung gesorgt.

Danke an **alle Kollegen** die mich während dieser Zeit in jeglicher Art unterstützt haben! Nicht zu vergessen die vielen lustigen Stunden, Mittags- und Kaffeepausen und die aufmunternden Worte in Krisenzeiten.

Ein besonderer Dank an meinen Mann **Tim**, der immer für mich da ist, mit mir bedingungslos alle Höhen und Tiefen durchlebt und mich in Allem unterstützt!

Zuletzt möchte ich **meinen Eltern** danken die immer an mich glauben, immer hinter mir stehen und mich in jeder Hinsicht unterstützten! Danke auch an meine Geschwister und den Rest der Familie, die mir immer lächelnd und aufmunternd mit Rat und Tat zur Seite stehen.