Veränderungen der Wirtszellgenexpression in Keratinozyten durch karzinogene humanpathogene Papillomaviren

der Fakultät für Biologie

der EBERHARD KARLS UNIVERSITÄT TÜBINGEN

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

von

Bernd Karstensen

aus Niebüll

vorgelegte

D i s s e r t a t i o n

2010

Tag der mündlichen Prüfung:	10. November 2010
Dekan:	Prof. Dr. W. Rosenstiel
1. Berichterstatter:	PD. Dr. F. Stubenrauch
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. H.-G. Rammensee

1 ZUSAMMENFASSUNG 7

2 EINLEITUNG 8

3 MATERIAL UND METHODEN 14

3.1 Häufig verwendete Abkürzungen 14

3.2 Material 15

3.2.1 Geräte 15
3.2.2 Kleingeräte/ Materialien 16
3.2.3 Software 16
3.2.4 Chemikalien 17
3.2.5 Fertige Reagenziensysteme 17
3.2.6 Radioaktive Nukleotide 18
3.2.7 Enzyme 18
3.2.7.1 Restriktionsendonukleasen 18
3.2.7.2 Sonstige Enzyme 18
3.2.8 Antikörper 19
3.2.9 Marker 19
3.2.9.1 DNA-Längenstandards 19
3.2.9.2 Protein-Größenstandards 19
3.2.10 Oligonukleotide 19
3.2.10.1 Primer 19
3.2.10.2 Taqmansonden 21
3.2.10.3 Assays on Demand und Kontroll Kits 21
3.2.11 Modifizierte DNA, Plasmide und Vektoren 21
3.2.12 Bakterienstämme 23
3.2.13 Eukaryonte Zellen 23
3.2.14 Medien für Bakterienkultur 23
3.2.15 Medien für Zellkultur 23
3.2.16 Standardpuffer 24

3.3 Methoden 25

3.3.1 Mikrobiologische Methoden 25
3.3.1.1 Kulturen für Plasmidisolierungen 25

3.3.1.2 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien 25
3.3.2 RNA-Methoden 25
3.3.2.1 RNA-Präparation mittels Qiagen RNeasy-Kit 25
3.3.2.2 RNA Qualitätskontrolle 26
3.3.2.3 Microarray Analyse 26
3.3.2.4 Datenanalyse und verwendete statistische Methoden 26
3.3.2.5 RNase-Protektionsanalyse 27
3.3.3 Herstellung von cDNA 28
3.3.3.1 Ein Schritt RT-PCR 28
3.3.4 DNA-Methoden 30
3.3.4.1 Standardmethoden 30
3.3.4.2 Präparative Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien 30
3.3.4.3 Fragmentelution aus Agarosegelen 30
3.3.4.4 Ligation von DNA-Fragmenten 30
3.3.4.5 Herstellung doppelsträngiger Oligonukleotide 31
3.3.4.6 Polymerasekettenreaktion (PCR) 31
3.3.4.7 Klonierung von PCR-Produkten für die quantitative PCR 31
3.3.4.8 Quantitative PCR 32
3.3.4.9 Formel zur Berechnung der Standardabweichung 34
3.3.5 Bewertungskriterien der Polymerasekettenreaktionen 34
3.3.5.1 Sequenzierung von DNA 34
3.3.5.2 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden 35
3.3.5.3 Isolation von gesamtgenomischer DNA 35
3.3.5.4 DNA-Transfer nach Southern (Southern-Blot-Analyse) 36
3.3.5.5 Hybridisierung membrangebundener DNA mit radioaktiv markierten Sonden 36
3.3.6 Zellkultur-Methoden 37
3.3.6.1 Kultivierung von Säugerzellen und Arbeiten mit Säugerzellen 37
3.3.6.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen 38
3.3.6.3 Mitomycin C-Behandlung von NIH3T3-J2 Zellen 38
3.3.6.4 Transfektion von Humanzellen mit Liposomen 38
3.3.7 Protein-Methoden 39
3.3.7.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten durch Sonifizierung 39
3.3.7.2 Herstellung von Gesamtzellextrakten durch chemische Lyse 39
3.3.7.3 Protein-Konzentrationsbestimmung 39
3.3.7.4 SDS-PAGE 39
3.3.7.5 SDS-PAGE mit Glucose 40

3.3.7.6 Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose-Membran (Western-Blot) 40
3.3.7.7 Immunologischer Nachweis transferierter Proteine 40

4 ERGEBNISSE 42

4.1 Bestimmung des physikalischen Status des viralen Genoms in transfizierten humanen Keratinozyten 42

4.2 Bestimmung der Viruskopienzahl in unterschiedlichen HPV18-positiven Zelllinien durch quantitative PCR 43

4.3 Bestimmung der viralen HPV18E6/E7-Transkripte 44

4.4 Bestimmung der viralen HPV18E7/E2-Transkripte 45
4.4.1 Nachweis von HPV18 E8^E2C-Transkripten 46
4.4.2 Nachweis von viralen E1^E4-Transkripten 47

4.5 Vergleichende Transkriptionsanalyse von normalen Keratinozyten, HPV18wt und HPV18E1 positiven Keratinozyten 48
4.5.1 Vergleich der NHK-HPV18wt und der NHK-HPV18E1 mit der NHK Gen-expression 48
4.5.2 Gruppierung der Affymetrix Microarray Datensätze 49
4.5.3 Vergleichende Analyse der durch HPV18-Genome hervorgerufenen Veränderungen mit bekannten HPV-Zielgenen 53
4.5.4 Vergleich der Transkriptionsprofile von HPV18wt- mit HPV18E1mt-haltigen Zellen .. 77

4.6 Immunologischer Nachweis ausgewählter deregulierter Gene 77

4.7 Validierung der veränderten Expression ausgewählter Gene durch quantitative Echtzeit-PCR 78
4.7.1 Validierung der veränderten Genexpression des Vergleichs von NHK-HPV18E1 mit NHK-HPV18wt 78
4.7.2 Validierung differentiell exprimierter Gene zwischen HPV18-positiven und -negativen Zelllinien durch qPCR 79
4.7.3 Untersuchung der differentiellen Expression weiterer Gene durch qPCR Analysen .. 81
4.7.4 Veränderungen der relativen hTERT Expression 83
4.7.5 Herstellung und Charakterisierung von E1/E2/E4/E5-negativen HPV18-haltigen Zelllinien. 84
4.7.6 Herstellung und Charakterisierung von HPV18 E6/E7 exprimierenden Keratinozyten 85

5 DISKUSSION 88

5.1 Veränderungen der zellulären Genexpression durch komplette extrachromosomale HPV18 wildtyp Genome 88

5.2 Veränderungen der viralen und zellulären Genexpession in Zelllinien mit integrierten HPV18E1mt Genomen 90

5.2.1 Deregulierte zelluläre Gene 90

5.2.2 Die Integration der HPV18E1mt-DNA hatte keine Erhöhung der E6/E7 Expression zu Folge 90

5.4 Die Analyse von Zelllinien mit deletierten Virusgenomen 92

5.5 Generelle Bedeutung dieser Arbeit 93

6 DANKSAGUNG 94

7 LITERATURVERZEICHNIS 95

8 Lebenslauf 110

Zusammenfassung

Persistierende Infektionen mit den high risk HPV-Typen 16 und 18 weisen das höchste Risiko für die Entstehung eines Zervixkarzinoms auf. Da jedoch mehr als die Hälfte der persistenten Infektionen nicht entarten, stellt sich die Frage nach weiteren Kofaktoren. Zahlreiche Publikationen belegen, dass sich mit einer Entartung von HPV-positiven Läsionen häufig der physikalische Status der viralen DNA verändert. Insbesondere findet man in HPV18-positiven Zervixkarzinomen ausschliesslich in das Wirtsgenom integrierte Virus-DNA, welche häufig Deletionen der viralen Gene E1, E2, E4, E5 und L2 aufweist. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, welchen Einfluss die Integration der HPV18-DNA auf die virale und zelluläre Genexpression besitzt. Hierzu wurden mehrere humane Keratinozyten-Zelllinien erzeugt, welche extrachromosomale HPV18wt- oder integrierte HPV18 E1mt-Genome enthalten. Überraschenderweise wurde die Expression von viralen Transkripten für die E6 und E7 Onkoproteine durch das Integrationsereignis verringert. Globale Transkriptionsanalysen mittels Affymetrix U133A Microarrays zeigten, dass HPV18 die Genexpression von humanen Keratinozyten stark beeinflusst. Es waren 327 zelluläre Gene durch HPV18wt und 418 Gene durch HPV18E1mt in ihrer Expression mehr als 2-fach verändert.

Ca. 80 dieser Gene stellen Zielgene des RB/E2F-Signaltransduktionswegs dar, was vermutlich auf der Inaktivierung des RB-Proteins durch das HPV18 E7 Onkoprotein beruht. Weiterhin war die Expression von p53- und NFkB -regulierten Genen verändert.

Beim Vergleich von HPV18wt-Zellen mit HPV18E1mt-Zellen konnte nur die differentielle Expression eines Gens (ITM2A) validiert werden. Daher wurden zusätzlich Zelllinien erzeugt, welche HPV18-Genome ohne E2, E4 und E5 Gene und einem partiellen E1 Gen besitzen. In diesen Zellen war die Expression von DLG7, EIF5A, GRIP2, LTBP1, SMAD3, und TERT gegenüber HPV18wt und HPV18E1mt Zellen verändert. Dies könnte bedeuten, dass v.a. der Verlust von E1, E2, E4 oder E5 weitere Veränderungen in HPV18-infizierten Zellen bewirkt, welche die Progression begünstigen könnten. Die in dieser Arbeit identifizierten Gene könnten mögliche Biomarker zur Abschätzung des Progressionsrisikos von high risk HPV-infizierten Individuen darstellen.

1 Einleitung

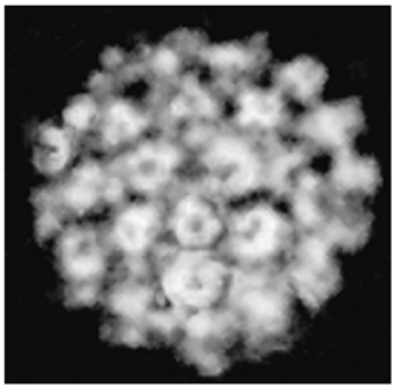


Abbildung 1 (www.virology.net)

Humane Papillomviren (HPV) sind kleine, doppelsträngige DNA-Viren, die zusammen mit den animalen Papillomviren die Familie der Papillomaviridae bilden. Die nicht umhüllten, ikosaedrischen Viruspartikel (Abbildung 1, elektronenmikroskopische Aufnahme eines HPV) haben einen Durchmesser von ca. 55 nm und umschließen einen zirkulären DNA-Strang von ca. 8 kB Länge (Howley, P. M., 1996).

Bisher konnten über 130 verschiedene HPV-Typen identifiziert werden, die einen strikten Gewebetropismus für die verhornende Haut oder Schleimhaut besitzen (Laimins, L. A., 1996). Infektionen mit Papillomaviren führen zu gutartigen Tumoren der Haut und Schleimhaut, wie Warzen, Kondylomen, Larynx- oder Konjunktivpapillomen (Howley, P. M., 1996; Laimins, L. A., 1993; Lowy, D. R. et al., 1994; zur, H. H. et al., 1994a; zur, H. H. et al., 1994b). Eine persistierende Papillomavirus-Infektion kann zu einer Progression des Primärtumors über intraepitheliale Neoplasien bis hin zum invasiven Karzinom führen (Walboomers, J. M. et al., 1994). Die kausale Rolle von humanen Papillomaviren bei der Krebsentstehung zeigt die Anwesenheit von HPV-DNA in über 99,7% der Zervixkarzinome (Walboomers, J. M. et al., 1999b). Der häufigste HPV-Typ in diesen Tumoren ist HPV16 (ca. 50% der Fälle), gefolgt von HPV18, 45 und 31 (Walboomers, J. M. et al., 1999a). Im Gegensatz dazu sind die HPV-Typen 6 und 11 hauptsächlich mit gutartigen Läsionen des Genitalbereichs und niedriggradigen intraepithelialen Neoplasien assoziiert (Walboomers, J. M. et al., 1994; Renshaw, A. A., 2002). Dieses unterschiedliche karzinogene Potential führte zur Klassifizierung in eine Gruppe mit niedrigem ("low risk") und in eine Gruppe mit hohem Risiko ("high risk") für die Entstehung von Tumoren (Stubenrauch, F. et al., 1999a).

Die Genome humaner Papillomviren sind sehr ähnlich aufgebaut und bestehen aus einer kodierenden und einer nichtkodierenden Region (Abb. 2). Die kodierende Region enthält die offenen Leserahmen für die frühen ("early", E) Proteine, die bedeutende Funktionen bei der Zelltransformation (E6, E7), der Replikation der viralen DNA (E1, E2) und der Regulation der viralen Promotoren (E2) besitzen. Daneben gibt es späte ("late", L) Proteine, der Strukturproteine für die Kapsidbildung (L1, L2). Die nichtkodierende Region ("non coding region", NCR oder "upstream regulatory region", URR) spielt eine zentrale Rolle für die *cis*-Regulation der viralen Transkription und Replikation. Sie enthält eine Enhancer-Region mit zahlreichen Bindungsstellen für zelluläre und virale Transkriptionsfaktoren sowie den viralen Replikationsursprung (Kanaya, T. et al., 1997; Laimins, L. A., 1996; Ustav, M. et al., 1991; Sen, E. et al., 2002)

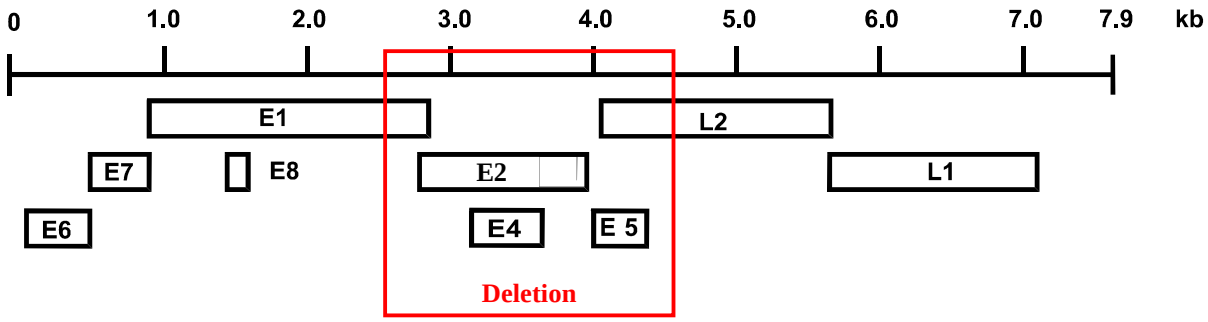


Abbildung 2

Die Genomorganisation von HPV18.
Die Grafik zeigt im oberen Teil das HPV18 Genom in linearer Form mit den offenen Leserahmen für die frühen ("early", E) und späten ("late", L) viralen Proteine. Charakteristisch ist die überlappende Lage der offenen Leserahmen in den drei verschiedenen Leserastern. Der rote Bereich zeigt den Bereich des viralen Genoms, der oft in Karzinomen deletiert ist.

Das HPV-Genom kodiert nur 8-10 Proteine und ist deshalb auf zelluläre Faktoren angewiesen um die virale Transkription und Replikation zu regulieren. Diese Interaktion der viralen Proteine mit den Wirtszellfaktoren ist deshalb essentiell für den produktiven Replikationszyklus der Papillomaviren.

Einige Papillomavirusproteine können direkt die virale Transkription aktivieren, während andere indirekt über die Beeinflussung der Aktivität von zellulären Faktoren wirken. Zur ersten Gruppe gehört das virale Protein E2. Das E2 Protein humaner Papillomaviren wirkt als positiver und negativer Regulator der viralen Transkription (Demeret, C. et al., 1997; Dong, X. P. et al., 1994; Stubenrauch, F. et al., 1996; Tan, S. H. et al., 1994). Als Beispiel sei die direkte Interaktion von E2 mit dem basalen Transkriptions-Initiationskomplex genannt (Hou, S. Y. et al., 2000) E2 spielt hier eine essentielle Rolle bei der Etablierung und bei der Stabilisierung der episomalen Replikation von HPV (Stubenrauch, F. et al., 1998). E2 reguliert zudem die Transkription der viralen Onkoproteine E6 und E7. E6 und E7 spielen eine entscheidende Rolle bei der Karzinogenese durch Papillomaviren, aber auch in der späten Phase des viralen Lebenszyklus. Im späten viralen Lebenszyklus der karzinogenen Papillomaviren ermöglicht die Expression von E6 und E7 in differenzierten Keratinozyten eine Reaktivierung des Zellzyklus und der DNA-Synthese, welche die Amplifikation der viralen DNA erlaubt (Laimins, L. A., 1996). In HPV-positiven Zervixkarzinomen kann eine kontinuierliche Expression der E6/E7-Gene nachgewiesen werden (Jeon, S. et al., 1995c; Schwarz, E. et al., 1985b). Die Expression von E6 und E7 der hoch karzinogenen HPV-Typen ermöglichen zudem die Immortalisierung von primären Vorhaut-Keratinozyten (Hawley-Nelson, P. et al., 1989). Diese Eigenschaft der viralen Onkoproteine beruht unter anderem auf ihrer Fähigkeit, mit essentiellen Funktionen bei der Regulation des Zellzyklus zu interferieren (Mantovani, F. et al., 2001; Munger, K. et al., 2001; Thomas, J. T. et al., 1998b). E7 bindet die Proteine der Rb-Familie

und inaktiviert die zyklinabhängigen Proteinkinaseinhibitoren p21 und p27, was in einer veränderten Regulation der E2F-induzierten Gene resultiert und so die S-Phase einleitet (Cheng, S. et al., 1995; Dyson, N. et al., 1989; Martin, L. G. et al., 1998; Munger, K. et al., 1989; Thomas, J. T. et al., 1998a). Die Inaktivierung von p21 und p27 durch E7 führt zu einer Aufhebung des durch diese Inhibitoren vermittelten G1/S-Phase-Arrests (Funk, J. O. et al., 1997; Zerfass-Thome, K. et al., 1996). Freies E2F würde zu einer Induktion der p53-abhängigen Apoptose führen. E6 bindet eine zelluläre Ubiquitinligase, die dann p53 der Proteasomen vermittelten Degradation zuführt und gewährleistet im Zusammenspiel mit E7 eine kontinuierliche Proliferation der infizierten Zellen.

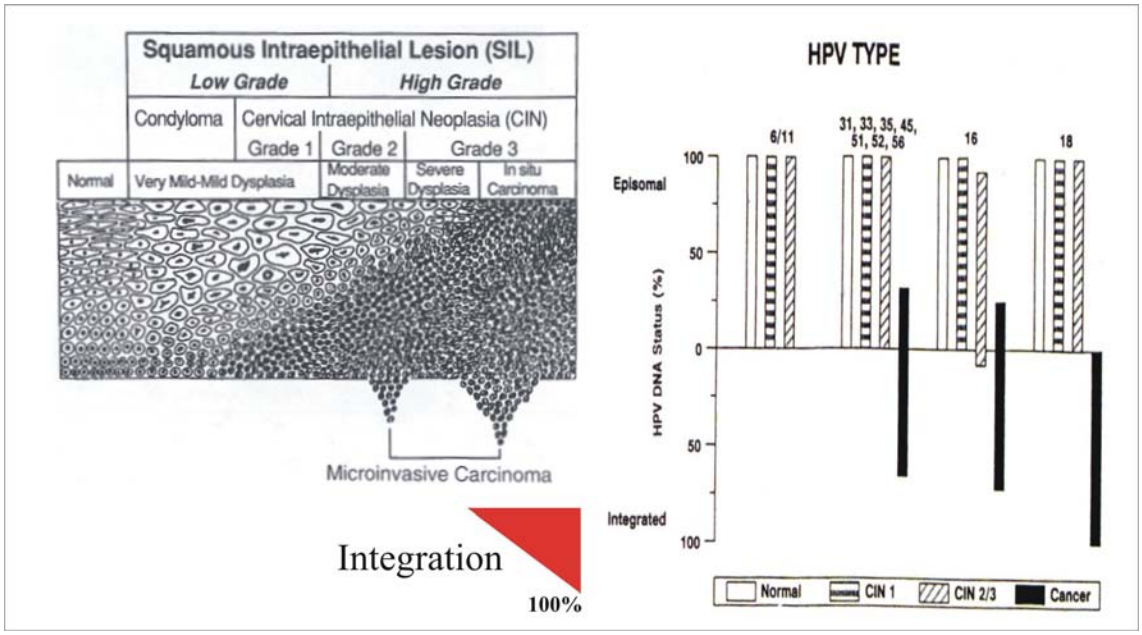


Abbildung 3 (modifiziert nach (Keeti , V. S. et al., 1996; Cullen, A. P. et al., 1991c)

Zervixkarzinomzellen enthalten oft chromosomal integrierte HPV-DNA oder eine Mischung aus integrierter und episomaler Virus-DNA (Alazawi, W. et al., 2002e; Badaracco, G. et al., 2002e; Choo, K. B. et al., 1996a; Choo, K. B. et al., 1987c; Corden, S. A. et al., 1999a; Das, B. C. et al., 1992b; Jeon, S. et al., 1995b; Jeon, S. et al., 1995d; Luft, F. et al., 2001b; Park, J. S. et al., 1997a). Die Integration der Virus-DNA unterbricht oftmals den E2-Leserahmen und kann dadurch zu einer unkontrollierten Expression der E6/E7-Onkoproteine beitragen (Alazawi, W. et al., 2002d; Badaracco, G. et al., 2002d; Choo, K. B. et al., 1996c; Choo, K. B. et al., 1987b; Corden, S. A. et al., 1999b; Das, B. C. et al., 1992a; Jeon, S. et al., 1995a; Jeon, S. et al., 1995e; Luft, F. et al., 2001a; Park, J. S. et al., 1997b; Cullen, A. P. et al., 1991b; Schneider-Maunoury, S. et al., 1987; Kurman, R. J. et al., 1988; Choo, K. B. et al., 1988; Stenlund A., 1996). Die Initiation der DNA- Replikation humaner Papillomaviren erfordert das virale E1-Protein (Stenlund A., 1996). E1 besitzt eine ATP-abhängige Heli-

kase- Aktivität und rekrutiert die zelluläre Replikationsmaschinerie durch Interaktion mit Replikationsproteinen wie DNA-Polymerase α/Primase (Park, J. S. et al., 1994; Stenlund A., 1996). E1 erkennt den viralen Replikationsursprung spezifisch, aber mit relativ geringer Affinität. Die Interaktion von E2 mit E1 ermöglicht eine effizientere Bindung von E1 und damit eine wesentlich höhere Replikation der viralen DNA (Frattini, M. G. et al., 1994; Mohr, I. J. et al., 1990; Yang, L. et al., 1991; Stenlund A., 1996).

Humane Papillomaviren replizieren im Gegensatz zur zellulären chromosomalen DNA nicht nur einmal pro Zellzyklus. Die Aufrechterhaltung der konstanten viralen Genom-Kopienzahl während der nicht-produktiven Phase der Infektion erfordert eine Kopienzahl-Kontrolle, deren exakter Mechanismus weitestgehend unklar ist (Gilbert, D. M. et al., 1987; Piirsoo, M. et al., 1996).

Die Expression der Strukturproteine und die Produktion infektiöser Viruspartikel ist an den Differenzierungsgrad des Epithels gekoppelt (Laimins, L. A., 1996). In den basalen Epithelzellschichten werden nur die frühen viralen Gene exprimiert, die zu einer Etablierung der viralen DNA mit 10 bis 100 episomalen Genom-Kopien pro Zelle beitragen (Stenlund A., 1996; Stubenrauch, F. et al., 1999b). Mit zunehmender Differenzierung des Epithels (Abbildung 3) kommt es schließlich zur Amplifikation der viralen DNA und zu einer starken Expression der späten Gene, was in der Bildung infektiöser Viruspartikel resultiert (Laimins, L. A., 1996; Stubenrauch, F. et al., 1999c).

Nur eine Minderheit der HR-HPV Infektionen führen zu Krebs. Daher wird postuliert, dass in HR-HPV infizierten Zellen zusätzliche Ereignisse stattfinden, welche die Progression zu invasiven Karzinomen begünstigen.

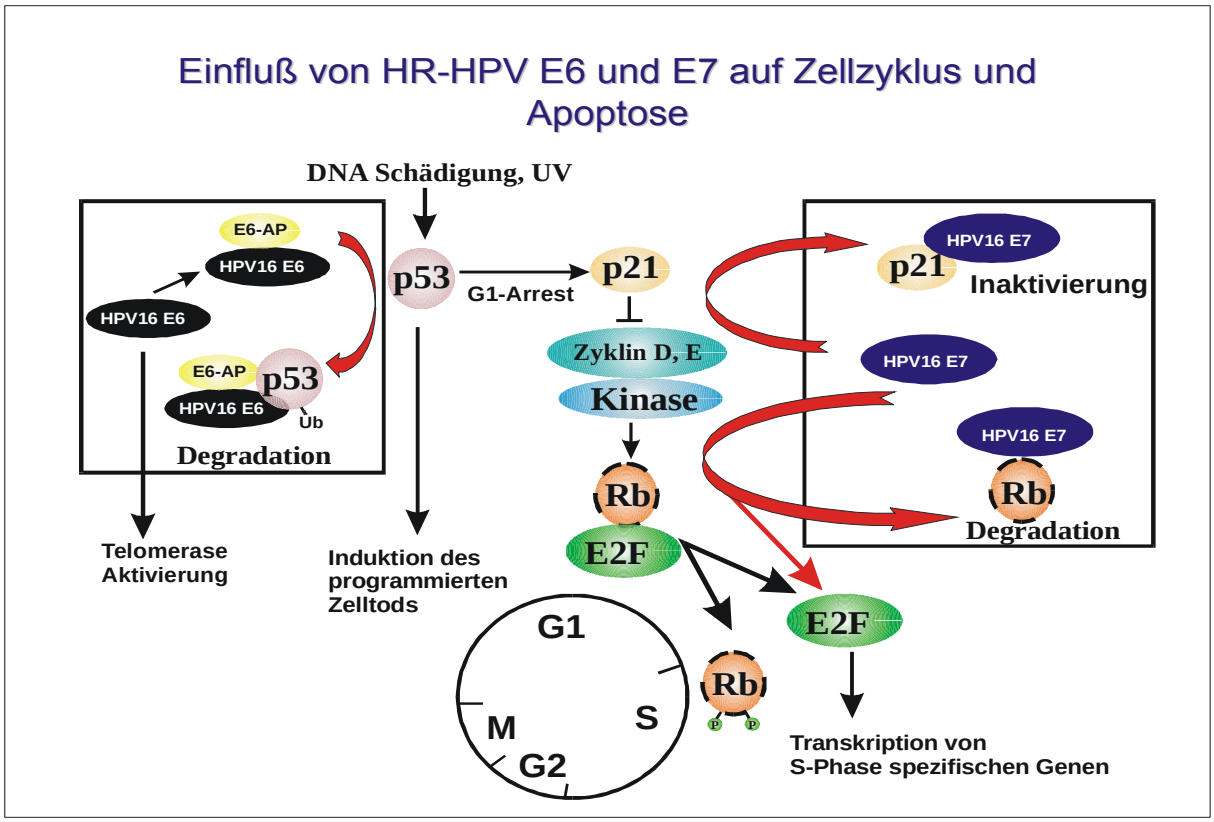


Abbildung 4

Eine häufige Beobachtung in Karzinomen ist die Integration des viralen Genoms in das Wirtszell-Genom (Gissmann, L. et al., 1978; Yiu, K. C. et al., 1990; Cooper, K. et al., 1992; Badaracco, G. et al., 2002c; Thorland, E. C. et al., 2003). Eine Frage ist daher, ob und wenn ja, wie die Integration zur Karzinogenese beiträgt. Neuere Arbeiten weisen daraufhin, dass eine Deregulation der Integrationsstelle benachbarter zellulärer Gene kein genereller Mechanismus bei der HPV-Vermittelten Karzinogenese darstellt (Kalantari, M. et al., 2001). Alternativ dazu besteht die Möglichkeit, dass durch die Integration das Gleichgewicht zwischen viralen Proteinen verschoben wird und es so zu Veränderungen der zellulären Genexpression kommt, welche die maligne Progression begünstigen könnte (Contreras-Paredes, A. et al., 2009; McLaughlin-Drubin, M. E. et al., 2005; Cho, N. H. et al., 2006).

Es ist nahe liegend, dass HPV-Infektionen zu Veränderungen in der zellulären Genexpression führen. Viele der vorhergehenden Studien haben die Funktionen der viralen Proteine isoliert und nicht im Zusammenhang mit dem gesamten viralen Genom untersucht und reflektieren damit nicht physiologische Konzentrationen wie bei einer Virusinfektion. Außerdem wurden in vielen Studien maligne Gebärmutterhalskarzinom-Zelllinien verwendet, die integrierte HPV-Genome beinhalten, aber nicht die Virus-Zell-Interaktionen einer normalen Infektion widerspiegeln. Um die HPV18-induzierten Veränderungen nach dem Integrationsereignis zu untersuchen, wurde ein replikations-defizientes HPV18-Genom generiert, indem mehrere

Stop-Codons in das E1 Replikationsgen eingefügt wurden (HPV18E1). Ein Ziel dieser Promotionsarbeit war es, Unterschiede zwischen normalen Keratinozyten (NHKs) und Keratinozyten, welche HPV18wt oder HPV18 Mutantengenome enthielten, zu charakterisieren, um so mehr über die Veränderungen zu erfahren, die durch die Integration entstehen. Ein weiteres Ziel war es, die Auswirkungen der in Karzinomzellen gefundenen Deletionen im Virusgenom zu untersuchen. Alle Veränderungen sollten zudem mit den publizierten Ergebnissen vorhergehender Microarray Analaysen von HPV11-(Thomas, J. T. et al., 2001b), HPV16E6/E7-(Nees, M. et al., 2001h), HPV31-(Chang, Y. E. et al., 2000b), HPV33-(Ruutu, M. et al., 2002d), HPV18E6/E7-(Garner-Hamrick, P. A. et al., 2004c) und HPV16E6/E7-(Duffy, C. L. et al., 2003c; Ruutu, M. et al., 2002c; Schwarze, S. R. et al., 2002b) haltigen Zellen verglichen werden.

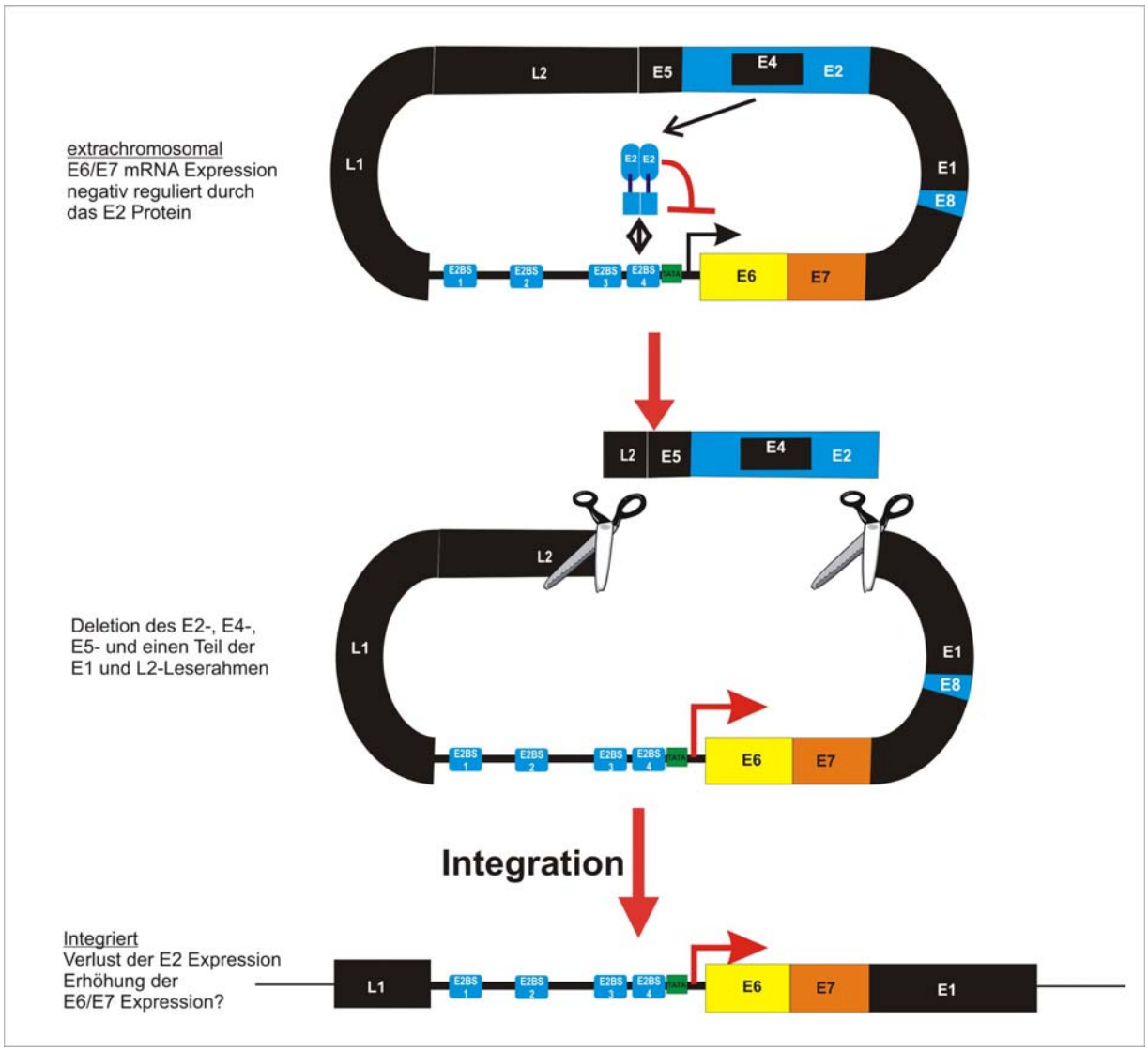


Abbildung 5, Modell der HPV Integration und veränderten viralen Genexpression

2 Material und Methoden

2.1 Häufig verwendete Abkürzungen

A	Ampere
AMPS	Ammoniumpersulfat
ATCC	"American Tissue Type Culture Collection"
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
BPV	Rinderpapillomavirus
BSA	Rinderserum-Albumin
CAPS	Cyclohexylaminopropansulfonsäure
Ci	Curie
cpm	Zerfälle pro Minute ("counts per minute")
CS	Kälberserum
CT	Cycle Threshold
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco´s modifiziertes, minimal essentielles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ds	Doppelstrang, doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGTA	Ethylenglykoltetraacetat
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm bzw. Erdbeschleunigung
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N´-2-Ethansulfonsäure
HPV	Humanes Papillomavirus
HRPO	Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase
IPTG	Isopropyl-ß-D-Thiogalaktosid
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
luc	Luziferase-Gen
µ	micro
M	Molar
MG	Molekulargewicht
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
N	Normal
NHK	Normale humane Keratinozyten
Nt	Nukleotid
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PS	Polystyren
qPCR	Realtime PCR / quantitative PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SA	3'-Spleiß-Stelle (Acceptor-Stelle)
SD	5'-Spleiß-Stelle (Donator-Stelle)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLR	Signal Log Ratio
TEMED	N,N,N´,N´-Tetramethylethylendiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Einheit der Enzymaktivität
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
V/V	Volumen-/Volumenverhältnis
W/V	Gewichts-/Volumenverhältnis
WT	Wildtyp

2.2 Material

2.2.1 Geräte

Gerät	***Bezeichnung***	***Hersteller***
Blotkammer, klein	Transblot	BioRad
Blotkammer, gross	Transblot	BioRad
CO_2-Inkubator		Kendro
CO_2-Inkubator	US Airflow	NuAire
Durchlichtmikroskop	DM IRB	Leica
Feinwaage	GJ und 770	Kern
Horizontal-EP-Kammer (DNA-Gele)	Sub Cell GT; Mini-Sub Cell GT ; Wide Mini-Sub Cell GT	BioRad
Hybridisierungsofen	Mini 10	Hybaid
Inkubator	Inkubator C 200	Labotect
Kamerasystem (DNA-Gele)	Gel Doc 2000	BioRad
Kamerasystem (Proteingele)	Fluor-S Multi Imager	BioRad
Kamerasystem (DNA-Gele)	Vilber Lourmat	PeqLab
Luminometer	Lumat LB 9507	EG & G Berthold
PCR-Maschine	PTC 200	MJ Research
pH-Meter	pH 526	WTW
Photometer	Bio Photometer	Eppendorf
Phosphoimager	Fujifilm BAS-1800	Fuji
Pipetten	Pipetman 10, 20, 200, 1000	Gilson
Realtime PCR Maschine	GeneAmp® 5700 Sequence Detection System	Applied Biosystems
Schüttelinkubator	Certomat IS	B. Braun Biotech International
Schüttler	Thermomixer 5436 ThermoStat Plus Rocky 3D	Eppendorf Eppendorf
Sequenzer	ABI Prism 310 Genetic Analyser	Perkin-Elmer
Sonifizierer	SonoPuls	Bandelin
Spannungsversorgung	PowerPac 200, PowerPac 3000	BioRad
Sterile Werkbank	HeraSafe	Heräus
Speedvac	Concentrator 5301	Eppendorf
Szintillationszähler	1409 Liquid Scintillation Counter	Wallac
Vakuum-Geltrockner	Model 583 Gel Dryer	BioRad
Vertikal-EP-Kammer (Proteingele)	Mini Protean 3 Cell	BioRad
Vakuum-Absaugvorrichtung	VacuSafe	IBS
Wasserbad	WB 10	Memmert
Zentrifugen	5810R, 5417R und 5417C	Eppendorf
	Sorvall	Du Pont-Instruments

Tabelle 1

2.2.2 Kleingeräte/ Materialien

Kleingeräte/ Materialien	***Bezeichnung***	***Hersteller***
Faltenfilter	MN 403¼; 11cm ∅	Macherey&Nagel
Gel-Blotting-Papier	Blotting Paper	Schleicher&Schüll
	P-7921 15*15	Sigma
Kryoröhrchen	Cellstar Cryo.s	Greiner
Nitrocellulose-Membran	Protran 0,2 µm	Schleicher&Schüll
Nylon-Membran	GeneScreenPlus	NEN
Optische Klebefolie für Realtime PCR	ABI PRISM™ Optical Adhesive Covers	Applied Biosystems
PCR-Platten	Thermo-Fast 96 PCR Plate Schwarz, dünnwandig	Peqlap
PCR-Reaktionsgefässe	PCR-Softtubes 0,2ml, FD	Biozym
Plastikküvetten	UVette	Eppendorf
Plastikpipetten	2, 5, 10, 25, 50 ml	Becton/Dickinson
PS-Röhrchen steril	55*12mm; 3,5ml	
Reaktionsgefässe	1,5 ml, 2 ml	Eppendorf
Sterilfilter	0,2 µm	Millipore
Zählkammer	Neubauer; 0,100mm Tiefe; 0,0025mm²	Assistent
Zellkulturplatten	6x 35mm	Becton/Dickinson
Zellkulturschalen	35 mm	Nunc
	60 mm, 100 mm	Becton/Dickinson
Zentrifugenröhrchen	15 ml, 50 ml	Becton/Dickinson

Tabelle 2

2.2.3 Software

Programm	***Verwendungszweck***	***Hersteller***
Primer Express V.2	Primer und Sondendesign	Applied Biosystems
GeneAmp® 5700 SDS Software V. 1.3	Analysesoftware	Applied Biosystems
JMP 4.0.5	Statistik und Auswertung	SAS Institute Inc.
Affymetrix® Micro DB™	Datenbank	Affymetrix
Affymetrix® Microarray Suite™	Analysesoftware	Affymetrix
Affymetrix® Data Mining Tool™	Auswerte und Filterprogramm	Affymetrix
Affymetrix® GeneChip Human Genome U133 Set Library Files	Affymetrix Referenzdaten	Affymetrix
Affymetrix® NetAffx	Internet gestütztes Auswertungstool und Datenbank	Affymetrix
Significance Analysis of Microarrays (SAM)	Auswerte und Filterprogramm	Stanford University
NEB Cutter	Restriktionsanalysen Tool	New England Biolabs

Tabelle 3

2.2.4 Chemikalien

Die Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

- Applied Biosystems
- BioRad
- Biozym
- Calbiochem
- Eurogentec
- Fluka
- Invitrogen
- Merck
- Peqlab
- Roche
- Roth
- Sigma

2.2.5 Fertige Reagenziensysteme

- Access RT-PCR System (Promega)
- b-Actin Endogenous Control Kit (Eurogentec, Seraing, Belgien)
- BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin-Elmer)
- DNA-Ligation Kit Ver. II (Takara)
- DNA Quick Ligation Kit (Fermentas, Roche)
- ECL™-Chemilumineszenz-Kit (Amersham Pharmacia)
- Micro BCA™ Protein Assay Reagent Kit (Pierce)
- NucTrap Probe Purification Columns (Stratagene)
- Oligotex mRNA Purification System (Qiagen)
- Plasmid Mini Kit (Qiagen)
- Plasmid Midi Kit (Qiagen)
- Plasmid Maxi Kit (Qiagen)
- Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen)
- Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen)
- qPCR™ Mastermix for SYBR® Green I (Eurogentec, Seraing, Belgien)
- qPCR™ Mastermix (Eurogentec, Seraing, Belgien)
- Riboprobe Combination System-SP6/T7 (Promega)
- Rotiload 2® (reduzierender Proteinladepuffer, Roth)
- RPA III™-Kit (Ambion)

- SuperSignal West Dura (Pierce)
- SuperSignal West Femto (Pierce)
- Superscript™ II RNaseH⁻ Reverse Transkriptase (Invitrogen, Karlsruhe)
- SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK)
- TopoTA Cloning Kit (Invitrogen, Karlsruhe)
- Trifast bzw. Trizol (DNA- /RNA- /Proteine-Isolation; Peqlab bzw. Invitrogen)
- Taqman® Mastermix (Applied Biosystems, Warrington, UK)

2.2.6 Radioaktive Nukleotide

Folgende radiaktive Nukleotide wurden von Amersham Pharmacia bezogen:

- α-^{32}P-dCTP, 10 mCi/ml
- α-^{32}P-UTP, 10 mCi/ml

2.2.7 Enzyme

2.2.7.1 Restriktionsendonukleasen

Restriktionsenzyme wurden von den folgenden Firmen bezogen:

- Invitrogen
- MBI Fermentas
- New England Biolabs

2.2.7.2 Sonstige Enzyme

- AmpliTaq Gold-Polymerase (Perkin Elmer, Weiterstadt)
- Alkalische Phosphatase (New England Biolabs)
- Calf Intestinal alkalische Phosphatase (NEB, Frankfurt)
- Klenow-Fragent der E. coli DNA-Polymerase (Invitrogen)
- Proteinase K (Roche)
- Pyrobest DNA-Polymerase (Takara)
- RNase A (Roche)
- SP6 RNA Polymerase (Promega, Mannheim)
- Superscript™ II RNaseH⁻ Reverse Transkriptase (Invitrogen, Karlsruhe)
- T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas)
- T7 RNA Polymerase (Promega, Mannheim)
- T4-Polynukleotidkinase (Invitrogen)
- Vent DNA-Polymerase (New England Biolabs)

2.2.8 Antikörper

Käuflich erworben wurden folgende Erstantikörper:

- CDC2 (Santa Cruz ; sc-8395;1:1000)
- MCM7 (Santa Cruz; sc-9966;1:1000)
- $p16^{INK4A}$ (PharMingen International; G175-405; 1:1500)
- Stat1 (Santa Cruz; sc-346; 1:1500)
- α-Tubulin (Oncogene; Ab-1, 1:1000)

Käuflich erworben wurden folgende Zweitantikörper:

- Meerrettich Peroxidase (HRPO) konjugierter Zweitantikörper (1:10000)
- Kaninchen anti-Maus IgG [Jackson ImmunoResearch Laboratories, INC.;315-005-003] (1:5000)
- Schwein anti Kaninchen IgG [DAKO; P 0399] (1:2500)
- Ziege anti Kaninchen IgG [DAKO; P-0448]. (1:5000)

2.2.9 Marker

2.2.9.1 DNA-Längenstandards

- 50 bp-DNA-Leiter (New England Biolabs)
- 1 kb-DNA-Leiter (Invitrogen)
- λ-*Hind*III-Fragmente (Invitrogen)

2.2.9.2 Protein-Größenstandards

- Kaleidoscope Prestained Standards (BioRad)
- SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen)

2.2.10 Oligonukleotide

2.2.10.1 Primer

Die folgenden Oligonukleotide wurden von Invitrogen oder Eurogentec synthetisiert.

Tabelle 4

Bezeichnung	Sequenz
18E6-RI	CACACCAGAATTCTATGGCGCGC
18E7-RI	CAGCCATGAATTCTTACTGCTG
Adam 8 286F	TGAAGTCGACACCCGTGATG
Adam 8 550R	GACAATGCAGAGTTCCAGATGCT
Cystatin A F	CCCGTCAGCTCGTCATCCTT
Cystatin A R	CCAAACCCGCCACTCCAG

Bezeichnung	Sequenz
Desmocolin 1F	CAAATACCGAAGCACCTGG
Desmocolin 1R	GGTCTGGTGTCCTTTCATC
GRIP2-1213F	AAAGCCGATCCTTGTCTTCAACT
GRIP2-1201F	CTGGCCAGGACCAAAGCC
GRIP2-1382R	GGCTAGCGACAACGAGCTCTT
GRIP2-1387R	CTGGAGGCTAGCGACAACGA
hBD1 AS 201F	TCTATTCTGCCTGCCCGATCT
hBD1 AS 288R	TGGTCACTCCCAGCTCACTTG
hDKK 1 AS 1315F	GAGTTCAAGGTGGCGCTCA
hDKK 1 AS 1471R	TTGCAAAGTGACGGTCATTTTC
hDlg 7 F UTR	CTTCTTGATTCACCAGGTCTAAACTG
hDlg 7 R UTR	ATCAGGTTACCACCAAAAGAAATGT
hHPRT 499F	CACTGGCAAAACAATGCAGACT
hHPRT 589R	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCTT
HPV18 E6 214F	CAGTATTGGAACTTACAGAGGTATTTGAATT
HPV18 E6 420R	TGTATAACCCAGTGTTAGTTAGTTTTTCCA
HPV18 E7 548F	ACGACTCCAACGACGCAGAG
HPV18 E7 655R	CGGAATTTCATTTTGGGGCT
HPV18 E8 1324F	GCTGTTCTGAAGTGGAAGCAACA
HPV18 E1 1376 F	CATGGCGGCAATGTATGTAGTG
HPV18-1378F	TGGCGGCAATGTATGTAGTGG
HPV18E1-1571 F	GACACATATGGGCTATCATTTACAGA
HPV18-1574F	GCAGTATTTAAAGACACATATGGGC
HPV18-1742F	CAATGTCTAGACTGTAAATGGGGAG
HPV18E1-1745 F	TGGGGAGTATTAATATTAGCCCTGT
HPV18E1-1932 F	TGGGAGACACACCTGAGTGGAT
HPV18E1-2143 F	AGATTGTGCCACAATGTGCAAA
HPV18E1-2360 F	TGTGGACCAGCAAATACAGGAA
HPV18 E2 3076R	CAAGGCCTTGTAGGGCCATT
HPV18 E2 3379R	ATTCCCAAAATGTACTTCCCACG
HPV18-3561R	ACGTCTGGCCGTAGGTCTTTG
HPV18-3761R	GCTATGTTTTCGCAATCTGTACCG
HPV18E4 4003R	CCATGCATACGCACACATACAG
HPV18 4271F	AAACGGGCTTCGGTAACTGA
HPV18 4462R	GCCCACCCAATGGAATGTAC
HPV18L1-5959F	GCCTTAGTGGGCATCCATTTT
HPV18L1-6125R	TTTAGCCCAGTGTTCCCCAAT
Baker hTERT-F	TGACACCTCACCTCACCCAC
Baker hTERT-R	CACTGTCTTCCGCAAGTTCAC
KIAA0101F UTR	GCATTGTTTGGTTTCTTTTYCCAA
KIAA0101R UTR	GGCAGCAGTACAACAATCTAAGCA
KIAA0136F UTR	AGCTTTTCAGGTTGCCCCTAA
KIAA0136R UTR	ACATTTCCATTTGTATTATGGCATAGC
KIAA1754F UTR	TTCAACGGGAAGCTGGTTTG
KIAA1754R UTR	CTCAGGGTCCACAGCGTGTT
STK 6 322F	TCTCATCATGCATCCGACCTT
STK 6 446R	TGGAGAGCTTAAAATTGCAGATTTT
MCM 7 1553F	TCCCGGTTTGACCTCCTCT
MCM 7 1652R	GCCGGCTGTGCTGGTG
SEPP 1 194F	AGGCATCTAAATTAGAAGACCTGCG
SEPP1 475R	CATATGGGAAAGTTAGGAAGGAAAAA
STOP1	GACTAGTTAACGTGA
STOP2	TCACGTTAACTAGTC
VRK1 1105F	AACCTGGTGTTGAAGATACGGAAT
VRK1 1190R	CTGGACTCTCTTTCTGGTTCTTGAA
WNT5A-571F	TCTTGGTGGTCGCTAGGTATGAA
WNT5A-836R	CGGCTGCCTATCTGCATCA

2.2.10.2 Taqmansonden

Bezeichnung	Sequenz
hDKK 1 AS 1362T	Fam-CGCCGCTACCATCGCGACAAAG-Tamra
HPV18 E6 264T	Fam-GTGGTGTATAGAGACAGTATACCCCATGCTGCATG-Tamra
HPV18 E7 594T	Fam-ATGGACCTAAGGCAACATTGCAAGACATTGTAT-Tamra
HPV18L1-6001T	Fam-AAAGTTCCCATGCCGCCACGTCTAAT-Tamra
Baker hTERT-T (Fu, B. et al., 2003b)	Fam-ACCCTGGTCCGAGGTGTCCCTGAG-Tamra

Tabelle 5

2.2.10.3 Assays on Demand und Kontroll Kits

Gen	Bezeichnung und Herstellerfirma
β-actin	B-Actin Endogenous Control Kit; Eurogentec; RT-QP73-bactin
EIF5A	HS00739474_g1, 250µl 20x Mix, Applied Biosystems
ITMA2A	HS00191609_ml, 250µl 20x Mix, Applied Biosystems
LTBP1	Hs00386448_ml, 250µl 20x Mix, Applied Biosystems
MADH3	Hs00232219_ml, 250µl 20x Mix, Applied Biosystems

Tabelle 6

Reaktionsansatz:

	Reaktions-volumen	qPCR Mastermix	Farbstoff	Primer	cDNA	H_2O
Sybr-green	20 µl	10 µl Sybr Green I Mastermix Eurogentec	0,6 µl Sybr®green I solution	300 nM	30 ng	ad 20 µl
Taqman-Sonde	20 µl	10 µl qPCR Masetermix Eurogentec	200-250 nM Taq-man sonde	900 nM	30 ng	ad 20 µl
Assays on Demand	20 µl	10 µl qPCR Masetermix Eurogentec		1 µl 20x Assay on Demand	30 ng	ad 20 µl

Tabelle 7

2.2.11 Modifizierte DNA, Plasmide und Vektoren

- *Wildtyp HPV18*: Die Wildtyp HPV18 DNA (Cole, S. T. et al., 1987)
- *HPV18E1 Mutante*: Das replikationsdefiziente HPV18-Genom wurde durch das Einbringen eines Stopp-Codons in den E1-Leserahmen generiert (HPV18E1). Hierzu wurden die Stopp-Codons beinhaltenden Oligonukleotide STOP1 (GACTAGT-TAACGTGA) und STOP2 (TCACGTTAACTAGTC) synthetisiert. Sie haben zwei Stoppcodons in unterschiedlichen Leserahmen und eine SpeI und eine HpaI Schnittstelle, um die positiven Klone zu identifizieren. Die Oligonukleotide wurden hybridisiert und in die mit HpaI geschnittene HPV18wt Genom-DNA ligiert. Die positiven Klone wurden sequenziert, um die Klonierung zu verifizieren.
- *HPV18 E6/E7 im retroviralen Expressionsvektor pBabe$_{neo}$*: Zur Herstellung des HPV18 E6/E7^pBabe$_{neo}$ Vektors wurde das HPV18wt Fragment von Position 214-655 durch PCR aus dem HPV18wt-Genom im pGem Plasmid mit den “Mismatch”-

Oligonukleotiden 18E6-RI (CACACCAG*AATTCTATGGCGCGC) und 18E7-RI (CAGCCATG*AATTCTTACTGCTG) amplifiziert. Das Amplikon wurde mit EcoRI verdaut und dann in den retroviralen Expressionsvektor kloniert. Die positiven Klone wurden über eine BamHI und EcoRI Restriktionsanalyse identifiziert. Die positiven Klone wurden sequenziert, um PCR-bedingte Mutationen ausschließen zu können. (*EcoRI Schnittstelle)

- *HPV18 5172-2172 DNA*: Das HPV18 5172-2172 DNA-Fragment wurde aus dem religierten HPV18wt-Genom durch Verdau mit Fau I und Hpa I freigesetzt. 10 µg HPV18wt-Genom wurde als erstes mit Fau I (40U) bei 55°C für 2,5h verdaut, anschließend wurde umgepuffert und 2,5h bei 37°C mit Hpa I (40U) verdaut. Der Reaktionsansatz wurde auf einem 0,8% präparativen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die größte Bande mit 5158 bp wurde schnell auf dem UV-Schirm ausgeschnitten. Bei dieser DNA waren die DNA-Ausbeuten mit dem Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen) verschwindend gering, deshalb wurde die DNA mit einer Kombination aus Elektroeluation und Phenol/Chloroform Extraktion aus dem Agarosegel gewonnen.
- *HPV18 5096-2440 DNA*: Das HPV18 5096-2440 DNA-Fragment wurde aus dem mit EcoR I linearisierten HPV18wt-Genom isoliert, indem 10 µg HPV18wt-Genom mit Stu I (40U) bei 37°C für 5 h verdaut wurde. Der Reaktionsansatz wurde auf einem 0,8% präparativen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die größte Bande mit 5234 bp wurde schnell auf dem UV-Schirm ausgeschnitten und die DNA mit dem Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen) aus dem Gelfragment isoliert. Die DNA-Menge wurde photometrisch bestimmt.
- *HPV18 5096-3070 DNA*: Das HPV18 5096-3070 DNA-Fragment wurde aus dem religierten HPV18wt-Genom isoliert, indem 10 µg HPV18wt-Genom mit Stu I (40U) bei 37°C für 5 h verdaut wurde. Der Reaktionsansatz wurde auf einem 0,8% präparativen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die größte Bande mit 5832 bp wurde schnell auf dem UV-Schirm ausgeschnitten. Um die Ausbeute zu erhöhen wurde die DNA mit einer Kombination aus Elektroelution und Phenol/Chloroform Extraktion aus dem Agarosegel isoliert. Die verbliebende DNA im Gelfragment wurde mit dem Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen) aus dem Gelfragment isoliert. Beide Eluate wurden getrennt photometrisch vermessen und anschließend vereinigt.
- *pCR®2.1-Topo (Invitrogen, Karlsruhe):* Dieser 3,9 kbp Vektor liegt linearisiert mit einem T-Überhang vor, an dessen Enden eine Topoisomerase gekoppelt ist. Die T-Überhänge mit der Topoisomerase erlauben eine einfache Klonierung von PCR-Produkten. Zusätzlich verfügt dieser Vektor über einen T7-Bakteriophagenpromotor, der die in vitro Transkription ermöglicht.

- *pDrive (QIAGEN):):* Dieser 3,8 kbp Vektor liegt linearisiert mit einem T-Überhang vor, an dessen Enden eine Topoisomerase gekoppelt ist. Die T-Überhänge mit der Topoisomerase erlauben eine einfache Klonierung von PCR-Produkten. Zusätzlich verfügt dieser Vektor über einen T7- und SP6-Bakteriophagenpromotor auf je einer Seite der Insertionsstelle und ermöglicht so die in vitro Transkription.
- *pSP72 (Promega, Mannheim):* Der pSP72-Vektor (Größe 2,4 kbp) ermöglicht durch die Bakteriophagenpromotoren T7 und SP6 die in vitro Synthese von RNA von klonierten Fragmenten.
- *pSV2-neo* : pSV2-neo enthält das Neomycinresistenzgen (Schmitt et al., 1994)
- *β-Actin-, HPRT-pDrive*: Diese Vektoren enthalten die jeweiligen RT-PCR-Produkte mit RNA und den jeweiligen Primern aus Tabelle 1. Sie wurden als Kopienzahl- Standards für die quantitative RT-PCR verwendet.

2.2.12 Bakterienstämme

- E. coli DH5α (Clontech)

2.2.13 Eukaryonte Zellen

- HeLa: HPV18-positive Zervixkarzinom-Zelllinie (Gey et al., 1952)
- Normale humane Keratinozyten (NHK): Isolate aus Vorhäuten (Ruesch et al., 1998)
- NIH3T3-J2: murine Fibroblasten-Zelllinie (Rheinwald und Green, 1975)

2.2.14 Medien für Bakterienkultur

- LB-Medium (Luria-Bertani-Medium): 20g LB Broth Base (Invitrogen) auf 1 Liter H_2O
- SOC-Medium: 2 % (w/v) Bacto-Trypton, 0,5 % (w/v) Bacto-Yeast Extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $MgSO_4$, 20 mM Glukose
- LB-Agar (Luria-Bertani-Agar): 32 g Lennox L Agar (Invitrogen) auf 1 Liter H_2O
- Einfriermedium: 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM $MgSO_4$, 50 % (v/v) Glycerin

2.2.15 Medien für Zellkultur

- KGM: Keratinocyte Growth Medium (Clonetics) für NHK
- DMEM: Dulbecco´s Modified Eagle Medium + 50 mg/l Gentamycin (Invitrogen)
    - mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS; Seromed) für HeLa
    - mit 10 % Kalbsserum (CS; Invitrogen) für NIH3T3-J2
- E-Medium: Adenin (1,8 x 10^{-3} M), Hydrocortison (417 µg/ml), Insulin (50 µg/ml), Transferrin (50 µg/ml), T_3 (2 x 10^{-11} M), Choleratoxin (1 x 10^{-8} M), 50 % DMEM Pulver, 50 % DMEM/Ham´s F12 1:1 Pulver, 3,07 mg/ml $NaHCO_3$, 0,41 µl/ml HCl konz., 10 µl/ml Penicillin/Streptomycin

  - mit 5 % definiertem fötalem Kälberserum (HC-FKS; HyClone) für NHK
- OptiMEM (Invitrogen): Serum- und Antibiotika-freies Medium für Transfektionen
- Trypsin-EDTA (Invitrogen): 0,5 g Trypsin (1:250) und 0,2 g EDTA pro Liter modifizierter Puck´s Salzlösung A

2.2.16 Standardpuffer

- PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH_2PO_4, pH 7,2
- 50x TAE Puffer: 2 M Tris, 1 M Essigsäure, 0,1 M EDTA
- 10x TBE Puffer: 0,89 M Tris, 0,89 M Borsäure, 20 mM EDTA
- 1x TBS Puffer: 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 137 mM NaCl
- 1x TE Puffer pH 7,5: 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA
- 10x RNA-Ladepuffer: Formamid (deionisiert) 250 µl; 37% Formaldehyd, 83 µl;10x MOPS-Laufpuffer 50 µl; 1% Bromphenolblau 4 µl; 10 mg/ml Ethidiumbromid, 7µl; bi-dest DEPC-H_2O, 8 µl
- 5x DNA-Ladepuffer: 50 % (v/v) Glycerol, 25 mM EDTA, 0,25 % (v/v) Bromphenolblau
- 5x SDS-Probenpuffer: 10 % (w/v) SDS, 25 % (v/v) 2-Mercaptoethanol, 50 % (v/v) Glycerin, 5 mM EDTA, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau, 312,5 mM Tris/HCl pH 6,8
- 20x SSC: 3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat x 2 H_2O, pH 7,0 mit HCl
- Hybridisierungslösung (Southern Blot):
- Lösung A: 2x SSC, 0,1% SDS
- Lösung B: 0,1x SSC, 0,1% SDS
- Lösung C: 0,1x SSC, 1% SDS

2.3 Methoden

2.3.1 Mikrobiologische Methoden

2.3.1.1 Kulturen für Plasmidisolierungen

Zur Vermehrung der in vitro rekombinierten Plasmid-DNA wurde der E. coli Stamm DH5α verwendet. Die in dieser Arbeit benutzten Plasmid-Konstrukte enthielten entweder ein Ampicillin- oder ein Kanamycin-Resistenzgen. Die Selektion plasmidhaltiger Stämme erfolgte daher auf LB-Agar-Platten bzw. in LB-Flüssigmedium mit einem Zusatz von 100 µg/ml Ampicillin oder 30 µg/ml Kanamycin. 3 ml Übernachtkulturen in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum dienten zur Isolation kleiner DNA-Mengen (Mini-Präp) sowie als Vorkultur für präparative Plasmidisolierungen. Zur Extraktion größerer DNA-Mengen wurden 150 ml (Midi-Präp) oder 300 ml (Maxi-Präp) des entsprechenden LB-Mediums mit jeweils 50 µl einer Übernachtkultur angeimpft und bei 37°C 16-18 h im Schüttelinkubator inkubiert. Für die Langzeit-Lagerung wurden 500 µl Bakteriensuspension mit 500 µl Bakterien-Einfriermedium versetzt und bei -80°C eingefroren.

2.3.1.2 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien

Die Fähigkeit zur Aufnahme zirkulärer Plasmid-DNA (Kompetenz) von E. coli wurde durch eine Behandlung mit $CaCl_2$, $RbCl_2$ und $MnCl_2$ erreicht (Ausubel et al., 1990). Die Transformation kompetenter Bakterien erfolgte durch eine Hitzeschock-Behandlung. Dazu wurden 90 µl kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut, mit 10 µl Ligationsansatz oder verdünnter Plasmid-DNA gemischt und für 10 min. auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 1 min. bei 42°C wurde der Ansatz 1 min. auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 900 µl SOC-Medium zugegeben und die Bakteriensuspension 30-60 min. bei 37°C geschüttelt. Je 50-200 µl des Transformationsansatzes wurden auf Antibiotika-haltige Agar-Nährböden ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die resultierenden Kolonien wurden in Übernachtkulturen vermehrt und auf rekombinante DNA untersucht.

2.3.2 RNA-Methoden

2.3.2.1 RNA-Präparation mittels Qiagen RNeasy-Kit

Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und dann mit dem Qiagen RLT+ ß-ME-Puffer lysiert. Der Qiagen RLT-Puffer enthält hoch-denaturierendes Guanidinium-Isocyanat (GITC), das RNasen inaktiviert und der Degradierung der RNA entgegen wirkt. Der EtOH sorgt für die richtigen Bindungskonditionen der zu isolierenden RNA an der Silica Gel Matrix der Säule. Das Lysat wurde direkt auf die „QIAshredder spin column®“ gegeben und durch 2 minütiges Zentrifugieren homogenisiert. Die Suspension wurde 3 min zentrifugiert, der Überstand in ein frisches Eppendorfgefäß mit 700 µl 70% EtOH überführt und durch invertieren

gemischt. Der Ansatz wurde auf die RNeasy Zentrifugensäule (spin column) gegeben und 15s bei 10000 rpm zentrifugiert. Dabei bindet die RNA an die Silica Gel Matrix. Anschließend wurde mit 700 µl RW-Puffer einmal und mit 500 µl Qiagen RPE-Puffer zweimal gewaschen und dann 15 s bei 13000 rpm zentrifugiert ohne die RNA von der Matrix zu lösen. Um die Silica Gel Matrix vollständig zu trocknen wurde die Säule ohne Flüssigkeit 2 min bei 15000 rpm zentrifugiert. Die Elution erfolgte durch Zugabe von 40 µl DEPC-H_2O auf die Säule. Es genügte eine Wartezeit von 3 Minuten, um die RNA von der Säule zu lösen. Durch eine Zentrifugation von 1 min bei 13000 rpm wurde die RNA in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß eluiert.

2.3.2.2 RNA Qualitätskontrolle

Die Qualität der RNA wurde doppelt untersucht. Zum einen wurde die RNA auf einem nukleasefreien Agarosegel aufgetrennt und das Verhältnis der drei RNA-Formen zueinander abgeschätzt und über die Integrität der Banden wurde der Degradationsgrad abgeschätzt. 5 µl der RNA wurden dazu in 5 µl RNA-Probenpuffer (RNA Ladepuffer) aufgenommen und auf einem 2,5 % Agarosegel mit 1 x TAE-Puffer aufgetrennt. Zur Konzentrationsbestimmung der RNA wurde eine 10-fache Verdünnung in H_2O hergestellt und bei OD_{260} gemessen. Eine OD_{260} von 1 entspricht 40 µg/ml ssRNA. Die RNA wurde aliquotiert bis zur weiteren Verwendung bei –80°C gelagert.

Zusätzlich wurde die Qualität der RNA, die für die Microarray Analyse verwendet wurde, von der Microarray Facility des Universitätsklinikums Tübingen mit dem Bioanalyzer Agilent bestimmt. Nur die RNAs, welche die Qualitätskriterien der Tübinger Microarray Facility erreichten, wurden für weitere Analysen verwendet.

2.3.2.3 Microarray Analyse

Ein Aliquot der Gesamt-RNA wurde zur weiteren Analyse an die Microarray Facility des Universitätsklinikums Tübingen gesandt. Die weiteren Analysen umfassten die cDNA-Synthese, die lineare Amplifikation, die Markierung mit Biotin, die Hybridisation mit dem Affymetrix U133A Genchip (ca. 18000 humane Gene) und einer ersten Datenanalyse mit Qualitätskontrolle der Rohdaten anhand der internen Kontrollen.

2.3.2.4 Datenanalyse und verwendete statistische Methoden

Die Fluoresenzintensität der markierten cDNAs auf dem Affymetrix Gen Chip (NHK, NHK-HPV18wt und –E1mt) wurde automatisch korrigiert. Die Qualität dieser 12 Chips wurde mit Hilfe der „Image Files“ und durch die internen Standards bestimmt. Durch den Vergleich der Image Files lässt sich eine Aussage über die Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Hybridisierungen treffen, die eine möglichst gleichmäßige Helligkeitsverteilung im Hintergrund zeigen sollten. Nachdem alle Chips diese Kontrolle passiert hatten, wurden die Signaldatensät-

ze aller NHK-HPV18wt, NHK-18E1 mit Hilfe des Statistikmoduls (T-Test and Mann-Whitney) der Affymetrix Data Mining Tool Software mit den Signaldatensätzen aller NHK verglichen und auf ihre statistische Signifikanz geprüft. Die Filtereinstellungen wurden so gewählt, dass nur Gene, die ein Signal/log Verhältnis größer/kleiner +/-1 (log 2) und eine Standardabweichung kleiner +/-0,5 (log 2) aufwiesen in die weiteren Betrachtungen einbezogen wurden. Zur Kontrolle der Sensitivität der Hybridisierung und um einen minimalen Grenzwert für die Signalstärke zu erhalten, wurden die Signale der endogenen „Spiked Controls" AFFX-BioB-3_at und AFFX-BioB-5_at innerhalb einer Zelllinie gemittelt. Die Werte für AFFX-BioB-3_at zu AFFX-BioB-5_at stiegen um den Faktor 1,5 bei allen drei verschiedenen Zelllinien und sprachen damit für eine gute Sensitivität der Hybridisierung. Zudem ist AFFX-BioB-3_at der Marker für die unterste Detektionsgrenze auf dem Chip, deshalb wurde die Signalstärke von AFFX-BioB-3_at der NHK-RNA als kleinster Wert (64,25) definiert. Alle hochregulierten Gene, deren Signale auf den NHK-HPV18wt- und NHK-HPV18E1-Chips kleiner 64,25 waren, wurden nicht in die Analyse mit einbezogen. Alle herunterregulierten Gene, deren Signale auf den NHK-Chips kleiner 64,25 waren, wurden nicht weiter analysiert. Die Veränderungen der Gene, die auf dem Chip mit verschiedenen Proben IDs (Affymetrix code) repräsentiert waren, wurden gemittelt.

Die aktuellen Annotationen dieser Gene wurden aus dem Onlinemodul NETAFFX von der Affymetrix Website heruntergeladen und zugeordnet. Die Gene wurden nach der Annotation „Biological Process" in verschiedene Gruppen sortiert. Außerdem wurden diese Daten mit den veröffentlichten Mikroarraydaten ausgewählter relevanter Publikationen verglichen.

2.3.2.5 RNase-Protektionsanalyse

Die Expression der viralen Onkogene HPV18E6/E7 wurde im gesamtgenomischen Kontext von HPV18 mittels RNase-Protektionsanalysen untersucht.

Die Gesamt-RNA Isolation erfolgte mit Trizol-Reagenz (Invitrogen) nach dem Protokoll des Herstellers. Die Konzentration der Gesamt-RNA wurde spektrophotometrisch bestimmt. Gegenstrang-RNA-Sonden wurden mit dem Riboprobe Kombination System-SP6/T7 (Promega) nach den Anweisungen des Herstellers synthetisiert. Zur Detektion von E6/E7-Transkripten wurden pDrive HPV18 214-567 Plasmide als Matrize eingesetzt. Die Gegenstrang-Sonde wurde mittels SP6-RNA-Polymerase aus 1 μg *NotI*-linearisierter, aufgereinigter Plasmid-DNA hergestellt und mit 50 μCi α-^{32}P-UTP markiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA durch Zugabe von 1 U RNase-freier DNase für 15 min. bei 37°C verdaut. Die radioaktiv markierte RNA-Sonde wurde einmal mit Phenol/Chloroform und einmal mit Chloroform extrahiert. Die Fällung der Sonde erfolgte mit 400 mM LiCl und 2,5 Vol. 100 % Ethanol für 30 min. bei 20000x g und 4°C. Das Pellet wurde einmal mit 75% Ethanol gewaschen und getrocknet. Danach wurde das RNA-Pellet in 100 μl DEPC-H_2O resuspendiert und ein Aliquot im Szintil-

lationszähler gemessen. Die Integrität der Sonde wurde mit einem 5 %-igen Harnstoff-Minigel analysiert. Zwei µl der Sonde wurden in 8 µl Gel-Ladepuffer (RPA III™-Kit, Ambion) resuspendiert, 5 min. bei 80°C erhitzt und für 30 min. bei 25 mA in 1x TBE auf dem Harnstoffgel aufgetrennt. Das Gel wurde im Phosphoimager analysiert. Die RNase-Protektionsanalyse wurde mit dem RPA III™-Kit nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Eingesetzt wurden 10 µg Gesamt-RNA bzw. 10 µg Hefe-Gesamt-RNA als Negativkontrolle. Die RNA-Proben wurden mit 100000 cpm der Sonde gemischt und wie vorgeschrieben copräzipitiert und hybridisiert. Der RNase-Verdau erfolgte mit einem 1:300 verdünnten RNase A/RNase T1-Gemisch. Die verdauten RNA-Proben wurden auf ein 5 %-iges Harnstoffgel (2,8 g Harnstoff, 830 µl 40 % Acrylamid (19:1), 1340 µl 5x TBE, 3 µl TEMED, 33 µl 10 % AMPS, 2127 µl H_2O) aufgetragen und 1,5 h bei 25 mA in 1x TBE aufgetrennt. Das Gel wurde getrocknet, exponiert und im Phosphoimager ausgewertet.

2.3.3 Herstellung von cDNA

Zur cDNA-Synthese wurde das Enzym Superscript II-Reverse Transkriptase (Invitrogen) verwendet. Hierzu wurden 5µg RNA, 2 µl Random Hexamer Primer und 2µl dNTP-Mix in einem Gesamtvolumen von 30µl H_2O in ein 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß zugegeben und im Heizblock 5 min bei 65°C denaturiert. Anschließend wurde der Ansatz 5 min auf Eis gestellt und währenddessen der Mastermix angesetzt. Dieser enthielt je Reaktion 6,0 µl 10x RT Reaktionspuffer, 12 µl 25mM $MgCl_2$, 6µl 0,1 M DTT, 1µl RNAse Inhibitor und 4 µl H_2O. Nach Mischen und Zentrifugieren wurden zu jedem Reaktionsansatz 29 µl des Mastermixes zugegeben, gemischt, kurz herunter zentrifugiert und für 2min bei 25°C in den PCR-Cycler gestellt. Nach Ablauf der zwei Minuten wurde das Programm auf Pause gesetzt und 1 µl Superscript II zugegeben, gemischt, kurz herunter zentrifugiert und der PCR-Cycler wieder eingeschaltet. Die Reverse Transkription erfolgte bei den folgenden Bedingungen: 10 min bei 25°C, 50 min bei 42°C (Ablauf der eigentlichen Reversen Transkription), 15 min bei 70°C (Denaturierung der M-MLV-Reversen Transkriptase) und dann Abkühlen auf 4°C. Anschließend wurde 1µl RNaseH zugegeben und für 20min bei 37°C inkubiert. Die cDNA wurde auf 6ng/µl mit Wasser verdünnt und bei -20°C gelagert.

2.3.3.1 Ein Schritt RT-PCR

Ein µg RNA wurde mit dem Access RT-PCR System (Promega) mit je 200 ng HPV18 E7 548F-, 200ng HPV18 E8 1324F- und 200ng HPV18 E2 3076R-Primer revers transkribiert. Als erstes wurde der Reaktionsmix auf Eis in einem dünnwandigen 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß zusammen pipettiert, der aus nukleasefreiem Wasser, AMV/ Tfl 1x Reaktionspuffer, 1 µl dNTP Mix und je 2 µl des entsprechenden spezifischen „upstream“ und „downstream“ Primers [100µM=200ng] und 25mM $MgSO_4$ bestand. Der Reaktionsmix wurde durch pipettieren gemischt. Anschließend wurde je 1µl AMV Reverse Transkriptase und Tfl

DNA Polymerase zur Reaktion pipettiert und vorsichtig für 10 sec gemischt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von bis zu 5 µg (1 µg) Gesamt-RNA gestartet und kurz herunter zentrifugiert. Das “One Step RT-PCR Programm" wurde, wie vom Hersteller empfohlen, mit einer Annealing-Temperatur von 58°C verwendet. Die PCR-Produkte wurden auf einem 2% Agarosegel aufgetrennt. Es wurden 40% der Gesamtreaktion geladen. Die Reaktionsprodukte wurden im Ethidiumbromid haltigen Gel angefärbt, auf dem UV-Schirm sichtbar gemacht und fotografiert

2.3.4 DNA-Methoden

2.3.4.1 Standardmethoden

Folgende Methoden wurden nach Protokollen, die bei Ausubel et al., 1990 beschrieben sind, durchgeführt:

- Aufreinigung der DNA mittels Phenol/Chloroform
- Dephosphorylierung der 5´-Enden von DNA-Fragmenten
- Erzeugung glatter Enden ("blunt ends") mittels Klenow-Fragment der E. coli DNA-Polymerase
- Ethanolfällung von DNA und RNA
- Gelelektrophorese von Nukleinsäuren (Agarosegele)
- Identifizierung der Fragment-tragenden Plasmide durch Ausstreichen der Klone auf IPTG/ X-Gal enthaltenden LB-Platten.
- Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren
- Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase
- Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

2.3.4.2 Präparative Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien in verschiedenen Größenordnungen erfolgte mit "Plasmid Mini-", "Midi-" oder "Maxi-Kits" (QIAGEN) nach der Anleitung des Herstellers. Die DNA wurde in 50-300 µl H_2O resuspendiert und die DNA-Konzentration mit Hilfe eines Spektralphotometers (Eppendorf BioPhotometer) bestimmt.

2.3.4.3 Fragmentelution aus Agarosegelen

Die Elution und 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.

2.3.4.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten mit linearisierten Vektoren erfolgte mit dem DNA-Ligation-Kit Ver. II (Takara) und dem Quick DNA-Ligation-Kit (Roche, Fermentas) nach den Angaben der Hersteller. Zur Religation von HPV18-Genomen wurde das HPV18-Genom aus dem Plasmid pGem2^HPV18 wg s freigespalten und aus präparativen Agarosegelen isoliert. Zur Förderung der intramolekularen Religation wurde der Ligationsansatz auf eine DNA-Konzentration von 10 µg/ml eingestellt. Die Religation erfolgte mit 4 µg linearisierter Plasmid-DNA, 10 U T4 DNA-Ligase und T4 DNA-Ligase-Puffer (1x; 50 mM Tris pH 7,5, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 25 µg/ml BSA) über Nacht bei 16°C. Anschließend wurde die religierte DNA durch eine Ethanolfällung konzentriert und in 20 µl sterilem TE Puffer re-suspendiert. Die Ligationseffizienz wurde mit einem 0,8 %-igen analytischen Agarosegel

kontrolliert. Die religierten HPV18wt und HPV18mt Genome wurden direkt in die weiteren Experimente eingesetzt.

2.3.4.5 Herstellung doppelsträngiger Oligonukleotide

Doppelsträngige Oligonukleotide wurden aus den entsprechenden komplementären einzelsträngigen Oligonukleotiden hergestellt. Jeweils 10 µg der einzelsträngigen Oligonukleotide wurden mit 50 mM NaCl in einem Gesamtvolumen von 50 µl aufgenommen und 3 min. bei 100°C in der PCR-Maschine denaturiert. Zur Hybridisierung der komplementären Oligonukleotidstränge wurde der Ansatz in der PCR-Maschine langsam auf RT abgekühlt.

2.3.4.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Eine PCR ermöglicht die spezifische Amplifikation eines DNA-Fragments, das zwischen zwei bekannten Sequenzen liegt (Saiki et al., 1986). Die PCR-Reaktion wurde, wenn nicht anders beschrieben, durch die Taq-DNA-Polymerase katalysiert. Ein PCR-Ansatz setzte sich bei einem Gesamtvolumen von 50 µl aus 20 ng Plasmid-DNA, 5 µl 10 x PCR-Puffer, je 0,3 µM Primer, 200 µM dNTPs und 1 U Taq-Polymerase zusammen. Um einen Volumenverlust durch Verdampfen zu vermeiden, wurde ein PCR-Gerät mit Deckelheizung (MJ Research PTC-200, Biozym, Hess. Oldendorf) verwendet. In der Regel wurden 30 bis 40 Amplifikationszyklen mit den Schritten Denaturierung (96°C, 20 s), Primer-Hybridisierung (50-60°C, 20s) und Elongation (72°C, 40s) durchgeführt. Vor Beginn der Amplifikation wurde die Matrizen-DNA durch Erhitzen auf 96°C für 5 min denaturiert. Zum Schluss wurde die PCR-Reaktion für 5 min bei 72°C inkubiert. Die Effizienz der PCR-Reaktion wurde durch gelelektrophoretische Auftrennung von 1/10 Volumen des Reaktionsansatzes überprüft.

2.3.4.7 Klonierung von PCR-Produkten für die quantitative PCR

Hierzu wurden aus humaner Keratinozyten-RNA mit Hilfe der jeweiligen Primerpaare für die entsprechenden zellulären Gene durch RT-PCR Fragmente hergestellt. Die PCR-Produkte wurden jeweils unter Verwendung des TOPO TA Cloning-Kits bzw. des QIAGEN® PCR Cloning Kits in den Vektor pCR®2.1-TOPO bzw. pDrive kloniert. Hierbei wird die terminale Transferase-Aktivität der Taq-Polymerase ausgenutzt, welche 3´-Adenosinüberhänge produziert. Der pCR®2.1-TOPO- bzw. der pDrive-Vektor besitzt an seinen Enden 3´-Thymidinüberhänge, so dass er mit dem PCR-Produkt hybridisieren kann. Die Ligation wird durch das Enzym Topoisomerase katalysiert, welches kovalent an die Phosphatgruppen der terminalen 3´-Thymidine des Vektor gebunden vorliegt (Shuman, 1994). Die so hergestellten rekombinanten Plasmide wurden für die quantitative PCR als Standards zur Quantifizierung von zellulären Transkripten eingesetzt.

2.3.4.8 Quantitative PCR

Die quantitative PCR im GeneAmp® 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) kann auf zwei verschiedene Weisen durchgeführt werden.

Zum einen wurden sequenzspezifische fluoreszenzmarkierte Sonden (Taqmanprobe) verwendet. Zum anderen kann eine quantitative PCR mit sequenzspezifischen Primern und SYBR Green erfolgen.

Das Design der Primer und Sonden erfolgte mit Hilfe der Primer Express Software (Applied Biosystems) und die Synthese der Primer und der fluoreszenzmarkierten Sonden erfolgte durch die Firma Invitrogen (Karlsruhe) und Eurogentec (Seraing/Belgien). Die Taqmansonden sind am 5'-Ende mit dem Fluorophor Fam markiert und am 3'-Ende mit dem Quencher Tamra gekoppelt. Während der Amplifikation wird die Taqmansonde durch die Taq-Polymerase abgebaut. Durch diesen Abbau verliert der Quencher seinen Einfluss auf das Fluorophor, das die Anregungsenergie als sichtbares Licht abgibt. Die PCR erfolgte im GeneAmp® 5700 Sequence Detection System unter folgenden Bedingungen: 2 min bei 50°C, Denaturierung bei 95°C für 10 min, anschließend erfolgte die Amplifikation für 40-42 Zyklen mit 15 s Denaturierung bei 95°C und 1 min Primer-Hybridisierung/Elongation bei 60°C.

Die quantitative PCR mit sequenzspezifischen Primern und SYBR® Green erfolgt über die Anlagerung des SYBR® Green-Farbstoffes in der „minor groove" doppelsträngiger DNA. Durch diese Bindung wird die emittierte Fluoreszenz bei gleicher Anregungsintensität um ein Vielfaches verstärkt. Im GeneAmp® 5700 Sequence Detection System wird während der PCR-Amplifikation nach jedem Zyklus am Ende der Elongationsphase die Fluoreszenz gemessen. Die Intensität des Fluoreszenzsignals ist direkt proportional zu der Menge an doppelsträngiger DNA. Durch Vergleich der Fluoreszenzsignale der Proben und den Fluoreszenzsignalen von Template-DNAs definierter Konzentrationen oder von Referenzgenen (hprt) erhält man eine direkte quantitative Aussage. Die quantitative PCR mit SYBR Green wurde mit Hilfe des SYBR Green I PCR Master Mix (AppliedBiosystems) bzw. qPCR™ Mastermix for SYBR Green I (Eurogentec), 300 nM jedes sequenzspezifischen Primers in einem 20 µl Gesamtansatz durchgeführt. Zur Quantifizierung wurde bei jeder PCR eine Standardkurve mit einer 10-fach Verdünnungsreihe mit amplikonenthaltenden Plasmiden erstellt. Um die Spezifität der Amplikons zu überprüfen, wurde zusätzlich im Anschluss eine Schmelzkurve bestimmt und darüber mit den gemessenen Standards verglichen. Die Temperatur wird hierbei sukzessiv erhöht und gleichzeitig kontinuierlich die Fluoreszenz gemessen. Schmilzt der DNA-Doppelstrang, fällt die Intensität des SYBR-Green-Fluoreszenzsignals stark ab. Auf diese Weise kann das Verhältnis von spezifischem Produkt zu unspezifischen Amplifikaten und Primer-Dimeren abgeschätzt werden. Die quantitativen PCRs wurden mindestens zweimal mit jeder DNA-Präparation durchgeführt. Die Auswertung erfolgte über die $\Delta\Delta$CT-Methode, die im Folgenden erläutert wird.

Auswertung der Taqman Analyse

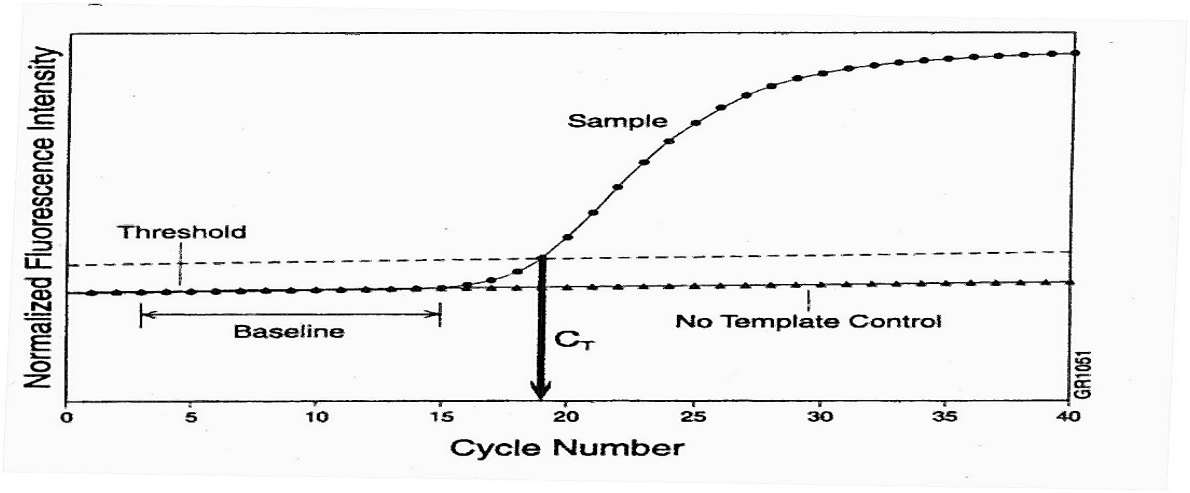


Abbildung 6 (Applied Biosystems, 1999)

2.3.4.8.1 Berechnung des relativen RNA-Spiegel eines Gens

Die Berechnung der relativen RNA-Spiegel erfolgte im Bezug auf die gemittelten Cycle-Threshold (CT)-Werte der verschiedenen „Housekeeping-Gens".
Zur Berechnung verwendet man die Formel (Applied Biosystems, 1999):

$$\boxed{2^{-\Delta\Delta CT}}$$

Diese Formel ergibt sich aus folgenden Betrachtungen.
Der ***ΔCT***-Wert berechnet sich aus der Differenz vom dem CT-Wert des zu untersuchenden Gens und dem gemittelten C_T-Wertes des Haushaltergens.

$$CT_{(Virushaltig)\ Gen\ X} - CT_{House} = \underline{\Delta CT_X}$$

bzw.

$$CT_{(Virusfrei)\ Gen\ 0} - CT_{House} = \underline{\Delta CT_0}$$

Der ***ΔΔCT***-Wert ist die Differenz vom CT-Wertes eines Genes zum CT-Wert der Kontrolle desselben Genes.

$$\Delta CT_X - \Delta CT_0 = \underline{\Delta\Delta CT}$$

Beide Werte, ***ΔCT***-Wert und ***ΔΔCT***-Wert, werden mit negativen Vorzeichen zum Exponenten erhoben. Der ***ΔΔCT***-Wert kann halblogarithmisch dargestellt werden. Der ***ΔCT***-Wert zeigt die relativen Werte, die noch in Bezug zum Kontrollwert gebracht werden müssen, um eine halblogarithmische Darstellung zu ermöglichen.

2.3.4.9 Formel zur Berechnung der Standardabweichung

Die Standardabweichung der Differenz wird berechnet aus der Standardabweichung des untersuchten Gens und der des „Housekeeping-Gens“ mittels der folgenden Formel (Applied Biosystems, 1999):

$$s = \sqrt{s_{Gene}^2 + s_{House}^2}$$

s = std dev

2.3.5 Bewertungskriterien der Polymerasekettenreaktionen

- ΔC_T der Trippelansätze, $\Delta C_T \leq 1{,}0$. Bei einem Reaktionsvolumen von mindestens 20µl bleiben die Schwankungen im Bereich der Genauigkeit dieser Methode. Werte, die darüber hinausgehen, sollten nicht in die Berechnung einfließen oder wiederholt werden.
- Die Amplifikationsstärke zeigt die Qualität und Quantität der cDNA und der Reaktion an.
- Primerdimerisierungen wurden vor allem bei der Detektion mit SYBR® Green durch die optimale Wahl der Primerkonzentration und durch geschicktes Primerdesign reduziert.
- Gelauswertung. Es sollte nur eine Bande entsprechend der Größe des Amplikons zu sehen sein. Signale im Bereich < 50 bp sprechen für Primerdimere und Sekundärstrukturen der Primer.

Außer den gemessenen Werten wurde auch das Volumen der Reaktion ausgewertet, denn es hatte sich gezeigt, dass die verwendeten optischen Deckelstreifen (*capstrips*) leicht verkanten und dann nicht richtig schließen, deshalb wurden die Reaktionen mit ABI PRISM™ Optical Adhesive Covers verschlossen. Darauf hin traten diese Probleme nicht mehr auf. Des Weiteren wurden die Steilheit und der Verlauf der Reaktion ausgewertet, da sie den Hintergrund der gesamten Platte beeinflussen und eine Aussage über die Effizienz der Reaktion erlauben.

Alle auffälligen und falschen Reaktionen wurden im Probenblatt auf „*not in use*“ umgestellt und wurden in der wiederholten Analyse nicht mehr berücksichtigt

2.3.5.1 Sequenzierung von DNA

Sequenzanalysen rekombinanter Plasmid-DNA wurden nach der Didesoxynukleotid-Terminationsmethode (Sanger et al., 1977) mit dem "BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit" (Perkin-Elmer) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Mit dieser Methode werden fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide in einer PCR in die neu synthetisierte DNA eingebaut. Durch die Kopplung der unterschiedlichen Basen mit verschiedenen Fluoreszenz-

farbstoffen konnte die Sequenzierreaktion in einem Ansatz durchgeführt werden. 1 µg Plasmid-DNA wurde mit 50 ng des entsprechenden Sequenzierprimers und 2 µl "BigDye Reaction Mix" in einem Gesamtvolumen von 10 µl vereint. Die Reaktion wurde in einer PCR-Maschine durchgeführt und bestand aus 30 Amplifikationszyklen mit den Schritten Denaturierung (96°C, 10 sec.), Primer-Hybridisierung (50°C, 5 sec.) und Elongation (60°C, 4 min.). Nach der Amplifikation erfolgte die Präzipitation der PCR-Produkte mit 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat pH 4,8 und 2,5 Vol. 100 % Ethanol. Die resultierenden Pellets wurden in 20 µl "Template Suppression Reagent" (TSR, Perkin-Elmer) resuspendiert und 2 min. bei 90°C erhitzt. Anschließend wurde die Nukleotidabfolge durch Anregung der fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide in einem "ABI Prism 310 Genetic Analyser" (Perkin-Elmer) bestimmt.

2.3.5.2 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Die radioaktive Markierung von DNA-Sonden erfolgte durch eine Auffüllreaktion mit dem Klenow-Fragment der E. coli DNA-Polymerase I und α-^{32}P-dCTP. Für die Hybridisierung mit HPV18-Genomen diente das gesamte, mit *Eco*RI linearisierte HPV18-WT-Genom, welches aus pGem2^HPV18 wg s isoliert wurde, als Matrize.

Zwanzig bis 40 ng linearisierte DNA wurden für 10 min. bei 95°C denaturiert, 1 min. auf Eis abgekühlt und anschließend mit Hilfe des "DNA Labelling Kits" (Amersham Pharmacia) nach den Anweisungen des Herstellers radioaktiv markiert. Die Aufreinigung des markierten Oligonukleotids von freiem α-^{32}P-dCTP erfolgte über eine Gelfiltrationssäule (NucTrap Probe Purification Columns, Stratagene) nach den Anweisungen des Herstellers. Die Aktivität der aufgereinigten DNA-Sonde wurde mit einem Szintillationszähler gemessen.

2.3.5.3 Isolation von gesamtgenomischer DNA

Die Isolation genomischer DNA aus transfizierten Säugerzellen erfolgte über die Phenol / Chloroform Extraktion. Die transfizierten Zellen wurden zur Ernte einmal mit 10 ml kaltem PBS gewaschen, mit einem Zellschaber abgeschabt und für 45 sec. bei 14000 rpm in 1,5 ml kaltem PBS abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml Lysepuffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM EDTA, 400 mM NaCl) resuspendiert und nach Zugabe von 0,2 % SDS sowie 40 µg Proteinase K für 5 h bei 55°C verdaut. Der Reaktionsansatz wurde einmal mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol und einmal mit Chloroform extrahiert. Danach folgte ein RNase A-Verdau der wässrigen Phase für eine Stunde bei 55°C. Dieser Ansatz wurde zweimal mit Phenol-Chloroform aufgereinigt. Danach erfolgte die Fällung der gesamt genomischen DNA mit 2,5x Vol. eiskaltem 100 % Ethanol für mindestens eine Stunde bei –20°C. Anschließend wurde eine Stunde bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Pellets wurden zweimal mit 1,5 ml 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl H_2Odd resuspendiert. Die Proben wurden bei –20°C gelagert.

2.3.5.4 DNA-Transfer nach Southern (Southern-Blot-Analyse)

Der Transfer von DNA-Fragmenten auf eine positiv geladene Nylonmembran erfolgte nach der Methode von Southern. Als Transferpuffer diente NaOH, die gleichzeitig zur Denaturierung und zur Fixierung der DNA auf der Membran beitrug.

Jeweils 15 µg der linearisierten DNA-Proben wurden auf einem 0,8%-igen Agarosegel aufgetragen und bei 65 V über Nacht aufgetrennt. Als Längenstandards dienten λ-*Hind*III-DNA sowie 100 pg der entsprechenden linearisierten Plasmid-DNA. Am folgenden Tag wurde das Gel mit einem Lineal fotografiert. Zur Depurinierung wurde das Gel 30 min. langsam mit 2 l 0,25 M HCl geschüttelt und anschließend einmal mit H_2O gewaschen. Überschüssige Gelreste außerhalb des Bereichs der replizierten DNA wurden oberhalb der 23 kb Markerbande und 13 cm unterhalb mit einem Skalpell entfernt. Eine GeneScreenPlus-Nylonmembran wurde auf die Größe 13x15 cm zurechtgeschnitten, in H_2O befeuchtet und für 10-15 min. in 0,4M NaOH äquilibriert. Der Aufbau des Blots erfolgte auf einer Wanne, die mit 0,4M NaOH als Transferpuffer gefüllt und mit einer Platte als Unterlage für den Blot bedeckt wurde. 2 Gel-Blotting-Papiere wurden als Transferpapier zurechtgeschnitten, mit NaOH befeuchtet und mit den Enden in den Transferpuffer getaucht. Darauf wurden zwei 13x15 cm große Gel-Blotting-Papiere gelegt und mit NaOH befeuchtet. Der Aufbau wurde nun luftblasenfrei ausgerollt. Das Gel wurde für einen effizienten Transfer der DNA umgedreht und auf die Papiere gelegt. Es folgten die äquilibrierte Membran und zwei weitere 13x15 cm große Gel-Blotting-Papiere, die mit NaOH befeuchtet wurden. Der Blot wurde nun nochmals luftblasenfrei ausgerollt. Auf diesen Aufbau wurden 10 saugfähige Blotting-Papiere, gefolgt von einer Lage Zellstoff, gelegt. Der Blot wurde mit vollen 500 ml-Flasche beschwert und die DNA wurde für 5 h transferiert. Nach dem Abbauen des Blots wurde die Membran einmal mit 2x SSC gewaschen und in einem Hybridisierungsofen zur Fixierung der DNA bei 50-60°C für 30 min. getrocknet. Die Membran konnte anschließend bei RT aufbewahrt oder direkt zur Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde eingesetzt werden. Um den Transfer zu überprüfen, wurde das Gel nach dem Transfer nochmals auf dem UV-Schirm fotografiert.

2.3.5.5 Hybridisierung membrangebundener DNA mit radioaktiv markierten Sonden

Die Hybridisierungslösung wurde auf 42°C vorgewärmt. Zur Prähybridisierung wurde die Membran mit den zu untersuchenden DNA-Proben in einer Hybridisierungsröhre mit 20 ml Hybridisierungslösung sowie 200 µl hitzedenaturierter (15 min. 95°C, 10 min. auf Eis) Lachssperma-DNA versetzt und für 1 h im Hybridisierungsofen bei 42°C inkubiert. In der Zwischenzeit erfolgte die radioaktive Markierung der Sonde. Zu der Sonde mit 10^7 cpm wurden 200 µl Lachssperma-DNA beigefügt, für 15 min. bei 95°C denaturiert und 10 min. auf Eis gekühlt. Die Prähybridisierungslösung wurde entfernt und durch 10 ml Hybridisierungslösung mit der denaturierten Sonde ersetzt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42°C. Am

nächsten Tag wurde die Hybridisierungslösung entfernt, die Membran in der Hybridisierungsröhre mit 50 ml Lösung A gewaschen und in eine Wanne mit 500 ml Lösung A überführt. Das Dextransulfat wurde mechanisch mit den Fingern entfernt und dann die Wanne 15 min. bei RT auf einem Taumler bewegt. Danach wurde die Membran auf dem Taumler 2x 15 min. in jeweils 500 ml Lösung B bei RT und zweimal 30 min. in einem Wasserbad bei 50°C mit jeweils 500 ml Lösung C gewaschen. Abschließend wurde die Membran nochmals kurz in 2x SSC gewaschen um überschüssiges SDS zu entfernen, kurz auf Gel-Blotting-Papier getrocknet und in Frischhaltefolie gewickelt. Die Detektion der hybridisierten Sonde erfolgte mit dem Phosphoimager.

2.3.6 Zellkultur-Methoden

2.3.6.1 Kultivierung von Säugerzellen und Arbeiten mit Säugerzellen

Normale humane Keratinozyten (NHK), HeLa und NIH3T3-J2-Zellen wurden als "Monolayer"- Kultur bei 37°C, 5 % CO_2 und humidifizierter Atmosphäre in Plastik-Gewebekulturschalen kultiviert. Bis zur Transfektion wurden die NHK in serumfreiem KGM-Medium kultiviert. Anschließend wurden die NHK-Zellen genauso wie die HPV18-haltigen Zellen in E-Medium gehalten. Zum Teilen konfluenter Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 2ml Trypsin-Lösung gewaschen. Durch eine kurze Inkubation mit 2 ml Trypsin-Lösung im Brutschrank wurden die Zellen von der Kulturschale abgelöst. Das Trypsin wurde durch Zugabe von 8 ml serumhaltigem Zellkulturmedium (DMEM mit 10 % CS oder FKS und Gentamycin) inaktiviert und die Zellen nach der Aufnahme und Vereinzelung in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden bei 20°C für 5 min. bei 250x g abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 10 ml KGM resuspendiert. NHK wurden maximal im Verhältnis 1:5 geteilt und bis zu Passage 5 weiter kultiviert. HeLa-Zellen wurden in DMEM mit 10 % FKS und Gentamicin kultiviert. Zum Teilen konfluenter Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 10 ml sterilem PBS kurz gewaschen. Die Zellen wurden durch eine kurze Inkubation mit 2 ml Trypsin-Lösung im Brutschrank von der Kulturschale abgelöst. Anschließend wurde das Trypsin durch Zugabe von 8 ml DMEM/10 % FKS inaktiviert, die Zellen aufgenommen und vereinzelt. HeLa-Zellen wurden maximal im Verhältnis 1:10 geteilt und weiter kultiviert. NIH3T3-J2 wurden in DMEM mit 10% CS und Gentamicin kultiviert. Die Zellen wurden mit Trypsin geteilt, in DMEM/10 % CS aufgenommen und maximal im Verhältnis 1:5 geteilt. NIH3T3-J2 wurden bis Passage 25 in Kultur gehalten. Die HPV18-Zelllinien wurden in E-Medium mit 5 % HC-FKS auf einer "Feeder"-Zellschicht von Mitomycin C behandelten NIH3T3-J2 Fibroblasten gehalten. Die Zellen wurden mit Trypsin geteilt, in E-Medium/5 % HC-FKS aufgenommen und maximal im Verhältnis 1:5 geteilt.

2.3.6.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur langfristigen Lagerung wurden konfluent gewachsene Zellen bei -196°C in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dazu wurden die primären Keratinozyten oder Zelllinien von einer 10cm Zellkulturschale mit Trypsin abgelöst und nach Zugabe des entsprechenden Zellkulturmediums bei RT 5 min. bei 250x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 3 ml kaltem Einfriermedium (NHK: KGM mit 10 % HC-FKS und 20 % Glycerin; HPV18-Zelllinien: E-Medium mit 15 % HC-FKS und 20 % Glycerin; Hela: DMEM mit 20 % FKS und 10 % DMSO; NIH3T3-J2: DMEM mit 20 % CS und 10 % DMSO) resuspendiert und auf 3 Einfrierampullen verteilt, die zunächst in einer Einfrierbox auf -80°C eingefroren wurden. Nach 24 h wurden die Zellen auf -196°C gebracht.

Für das Auftauen der Zellen wurde der Inhalt der Einfrierampulle mit 1 ml Medium aufgenommen und in einer 10 cm Zellkulturschale mit 10 ml äquilibriertem Medium ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel.

2.3.6.3 Mitomycin C-Behandlung von NIH3T3-J2 Zellen

NIH3T3-J2 Zellen wurden zur Aussaat als "Feeder"-Zellschicht mit dem Zytostatikum Mitomycin C behandelt. Das Zellkulturmedium einer konfluenten 10 cm-Schale wurde durch 5 ml frisches DMEM/10 % CS ersetzt. Daraufhin wurden 100 µl Mitomycin C (400 µg/ml in PBS; Medac) in das Medium gegeben, die Platte geschwenkt und für 1 h im Brutschrank inkubiert. Die arretierten Zellen wurden 3x mit je 10 ml sterilem PBS gewaschen und als "Feeder"-Zellen benutzt.

2.3.6.4 Transfektion von Humanzellen mit Liposomen

Die Transfektion von Humanzellen erfolgte mit dem kationischen Liposomenbildner Lipofectamin (Invitrogen). Die Zellen wurden am Tag vor der Transfektion geteilt und in Plastik-Gewebekulturschalen ausgesät (Zelldichte bei Aussaat: $1{,}5x10^5$ pro 35 mm-Schale, $5x10^5$ pro 60 mm-Schale, $1{,}5x10^6$ pro 100 mm-Schale). Eine Stunde vor der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel mit frischem Zellkulturmedium. Die zu transfizierenden DNAs wurden gegebenenfalls mit sterilem TE pH 7,5 verdünnt. Pro Transfektionsansatz wurden zwei sterile PS-Röhrchen mit jeweils 100 µl OptiMEM (35 mm-Schale; 250 µl für 60 mm; 500 µl für 100 mm) vorbereitet. In das erste Röhrchen wurde die DNA in der entsprechenden Menge, in das zweite Röhrchen 5 µl Lipofectamin (35 mm-Schale; 15 µl für 60 mm; 40 µl für 100 mm) pipettiert. Nach der Vorbereitung aller Ansätze wurde das Liposomengemisch zum DNA-Gemisch gegeben, nochmals durchmischt und 30 min. bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen 2x mit OptiMEM gewaschen. Nach der Inkubationszeit wurde das Gesamtvolumen der Transfektion durch Zugabe von OptiMEM auf 1 ml erhöht (35 mm-Schale; 3 ml für 60 mm, 6 ml für 100 mm) und das Liposomengemisch zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden nun mit den Liposomen für 5h im Brutschrank inkubiert. Anschlie-

ßend wurde die gleiche Menge des normalen Zellkulturmediums mit der doppelten Serumkonzentration zu den Zellen gegeben (bei NHK: nur KGM). Etwa 18 bis 20 h nach der Transfektion wurde das Transfektionsgemisch abgezogen und durch frisches Medium ersetzt. Die Zellen wurden je nach Anwendung weiter inkubiert oder auf 100 mm-Schalen ausgesät.

2.3.7 Protein-Methoden

2.3.7.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten durch Sonifizierung

Das Kulturmedium wurde entfernt und je 10 cm-Kulturschale 1 ml PBS zugegeben. Die Zellen wurden abgeschabt, 1 min bei 500 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 150 µl PBS und 150 µl Rotiload 2® (Roth) resuspendiert und mit fünf Impulsen á 2 sec mit 40% der maximalen Geräteleistung sonifiziert. Anschließend wurde das Lysat für 10 min bei 95°C denaturiert und bis zum Laden auf das Proteingel auf Eis gelagert. Die Hälfte wurde sofort aliquotiert und bei –80°C gelagert.

2.3.7.2 Herstellung von Gesamtzellextrakten durch chemische Lyse

Das Kulturmedium wurde entfernt und je 10 cm-Kulturschale 1 ml PBS zugegeben. Die Zellen wurden abgeschabt, 1 min bei 500 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet von ca. drei 10 cm-Kulturschalen wurde in 1 ml kaltem RIPA- Puffer (150mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% Natrium Deoxycholate 0,1% SDS, 50 mM Tris pH 8) durch mehrfaches „Schnippen" des Reaktionsgefäßes resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Unlösliche Bestandteile wurden durch 10-minütige Zentrifugation bei 20.000 g und 4 °C entfernt.

2.3.7.3 Protein-Konzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte mit dem Micro BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce). Die Proteinlysate (z.B. aus der Trizolpräparation) wurden nach den Angaben des Herstellers mit frischem BCA Working Reagent vermischt. Danach wurde gemäß den Angaben des Herstellers weiterverfahren. Die Proteinkonzentration wurde photometrisch bestimmt. Die eingestellten Proteinkonzentrationen wurden zusätzlich mit den detektierten β-Actin Mengen der Proben aus der Western Blot Analyse abgeglichen.

2.3.7.4 SDS-PAGE

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte in diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen (Laemmli, 1970). Die 15 %-ige Trenngel-Lösung (1,88 ml 1 M Tris-HCl pH 8,8, 25 µl 20 % SDS, 2,5 ml 30 % Acrylamid/ 2 % Bisacrylamid, 2,5 µl TEMED, 25 µl 10 % AMPS, 568 µl H_2O) wurde direkt nach der Zugabe des Polymerisationsstarters AMPS zwischen zwei vertikale Glasplatten gegossen und mit 2-Propanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das 2-Propanol entfernt und das Sammelgel (625 µl 1 M Tris-HCl pH 6,8, 25 µl 20 % SDS,

665 µl 30 % Acrylamid/ 2 % Bisacrylamid, 5 µl TEMED, 25 µl 10 % AMPS, 3,65 ml H_2O) überschichtet.
Die Proben wurden zur Denaturierung und Absättigung der Proteine mit SDS für 5 min. bei 95°C in SDS-Probenpuffer erhitzt, auf Eis abgekühlt, kurz bei 14000 rpm abzentrifugiert und auf das SDS-Polyacrylamidgel geladen. Als Größenstandard diente ein farbmarkierter Protein-Molekulargewichtsstandard (Bio-Rad oder Invitrogen). Die Elektrophorese erfolgte in SDS-PAGE-Laufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS) bei 200 V für 45 min.

2.3.7.5 SDS-PAGE mit Glucose

Es wurde auch eine modifizierte Variante der SDS-Page verwendet, in der im Trenngel 2,5% Glucose zugegeben wird. Durch die Glucose verändert sich die Dichte und Viskosität des flüssigen Trenngels. Die veränderte Dichte ermöglicht es, das Sammelgel, direkt nach dem Gießen des Trenngels, langsam auf das polymerisierende Trenngel zu geben, ohne es erst mit 2-Propanol zu überschichten und die Auspolymerisation des Trenngels abzuwarten. Die Lauf- und Trenneigenschaften werden nicht beeinflusst. Der einzige Nachteil war die schlecht erkennbare Grenze zwischen Trenn- und Sammelgel beim Entfernen des Sammelgels. Alle weiteren Prozesse entsprachen dem normalen Protokoll SDS-Page.

2.3.7.6 Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose-Membran (Western-Blot)

Für die nachfolgende Immunreaktion wurden die über SDS-PAGE aufgetrennten Proteine im Tank-Blot-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Vier Gel-Blotting-Papiere (Schleicher & Schüll) und eine Nitrocellulose-Membran wurden auf die Größe des Trenngels zurechtgeschnitten. Das Sammelgel wurde nach dem Gellauf entfernt. Die Membran wurde kurz in H_2O befeuchtet und anschließend zusammen mit dem Papier für 10 min. in CAPS-Puffer pH 10,3 (10 mM CAPS, 10% (v/v) Methanol) äquilibriert. Das Trenngel wurde nur kurz in CAPS-Puffer gewaschen. Auf die Kathode der Blotapparatur wurden zwei Lagen Gel-Blotting-Papier, darauf das Trenngel und die Nitrocellulose-Membran sowie zwei weitere Lagen Gel-Blotting-Papier gelegt. Der ganze Aufbau wurde luftblasenfrei ausgerollt. Der Transfer erfolgte für 1h bei konstant 70 V in einer Tank-Blotkammer mit Kühlschleife.

2.3.7.7 Immunologischer Nachweis transferierter Proteine

Die gesuchten Polypeptide wurden nach dem Transfer auf der Nitrocellulosemembran mit einem für die jeweiligen Proteine spezifischen Erstantikörper sowie einem gegen den Erstantikörper gerichteten Zweitantikörper nachgewiesen. Das an den Zweitantikörper gekoppelte Enzym Meerrettich-Peroxidase erzeugte in Anwesenheit seines Substrats eine Chemilumineszenz. Alle Inkubationen und Waschschritte erfolgten bewegt.
Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran mindestens 1 h bei RT bis über Nacht bei 4°C in Blockmilch (5 % Magermilchpulver, 0,1 % Tween-20 in TBS) inkubiert. Die Erstantikörper wurden wie unter Abschnitt 3.2.7 angegeben in Blockmilch verdünnt

und für 1 h bei RT mit der Membran inkubiert. Danach wurde die Membran 2x 5 min. und 1x 15 min. mit TBS-T (0,1 % Tween-20 in TBS) gewaschen. Der Zweitantikörper wurde wie unter Abschnitt 3.2.7 angegeben in Blockmilch verdünnt und für 1 h bei RT mit der Membran inkubiert. Nach der Wiederholung der Waschschritte erfolgte die Detektion wie in den Legenden der Abbildungen angegeben mit dem ECL™-Chemilumineszenz-Kit (Amersham Pharmacia) oder SuperSignal West Dura oder -Femto (Pierce). Um die Markerbanden auch auf dem Chemolumineszenzbild zu erkennen, wurde entweder mit einem Überlagerungsbild (Hellfeld und Lumineszenzbild) gearbeitet oder die Markerbanden mit einer Fluoreszenzpaste (handelsübliche Fluoreszenzstifte) markiert.

3 Ergebnisse

3.1 Bestimmung des physikalischen Status des viralen Genoms in transfizierten humanen Keratinozyten

Um ein replikations-defizientes HPV18-Genom herzustellen, wurden die Mutationen (E1CTTL, Deletionen ganzer Leserahmen) in die Virus–DNA eingefügt. Anschließend wurden die verschiedenen Virus DNAs (HPV18wt, HPV18mt) vom prokaryonten Vektor separiert, isoliert und intramolekular religiert. Diese ringförmigen Virusgenome wurden zusammen mit einem Selektionsvektor (pSV 2_{neo}) mittels Liposomen-vermittelter Transfektion in primäre Keratinozyten kotransfiziert. Anschließend wurde mit G418 selektioniert und so stabile Zelllinien erzeugt.

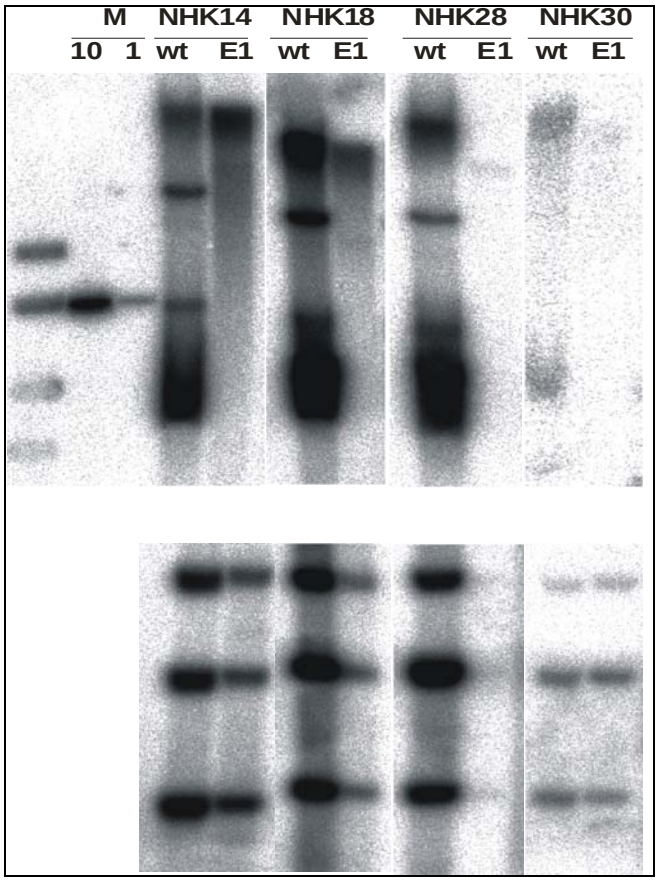


Abb. 7: Southern Blot Analyse der vier verschiedenen NHK-HPV18 Zelllinien (14, 18, 28, 30). 20 µg Genomische DNA wurde einmal mit Bgl II (oberer Teil) und Ban II (unterer Teil) geschnitten und auf einem 0,8% Agarosegel aufgetrennt und auf eine GeneScreen Nylon Membran transferiert. Diese Membranen wurden mit linearisierten ^{32}P-markierten HPV18-Gesamtgenom-Sonden hybridisiert.

Abbildung 7

Um den physikalischen Status der viralen HPV18-DNA (HPV18wt, HPV18E1) zu bestimmen, wurden aus den Zelllinien die gesamte genomische DNA isoliert, mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut und in einer Southern Blot Analyse aufgetrennt, mit spezifischen radioaktiven Sonden markiert und sichtbar gemacht. Abbildung 4 zeigt das normale Bandenmuster extrachromosomaler und integrierter HPV18-DNA. Der obere Teil zeigt das Bandenmuster nach einem Verdau mit dem HPV18 „non cutter“-Enzym Bgl II. Bei allen HPV18wt-Zelllinien sind die typischen drei Banden zu erkennen, welche die drei unterschiedlichen

Formen (linear, ringförmig, geknäuelt ringförmig) extrachromosomaler DNA kennzeichnen. Dieses Bandenmuster fehlt bei den HPV18E1-Zelllinien, was nahe legt, dass die HPV18wt-DNA extrachromosomal und die HPV18E1-DNA in das Wirtszellgenom integriert vorlag. Der Ban II-Verdau ist im unteren Teil der Abbildung dargestellt. Ban II ist ein dreifach schneidendes Restriktionsenzym im HPV18 Genom (Nukleotid 729, 2329, 4772). Interessanterweise zeigen die HPV18wt- und HPV18E1-DNAs das gleiche Bandenmuster. Diese Phänomen zeigt sich häufig bei integrierten HPV-Genomen und liegt an einer Integration mehrerer Virus-Genome in Folge (Choo, K. B. et al., 1987a).

3.2 Bestimmung der Viruskopienzahl in unterschiedlichen HPV18-positiven Zelllinien durch quantitative PCR

Die Bestimmung der Viruslast pro Zelle wurde durch quantitative PCR des “single-copy-Gens” humanen Dickkopf 1 (hDKK1) und des viralen Onkogens E6 bestimmt. Die Zellzahl ergab sich aus der Annahme, dass pro diploidem Genom zwei hDKK1-Kopien vorhanden sind. Anschließend wurde die Anzahl der E6-Gene in der genomischen DNA bestimmt und durch die Zellzahl geteilt. Die Daten sind in Abbildung 8 gezeigt und zeigen dass die extrachromosomalen HPV18wt-Zelllinien zwischen 20-250 Viruskopien pro Zelle beinhalteten. Die integrierten HPV18E1-Zelllinien hatten deutlich weniger Viruskopien pro Zelle, sie bewegten sich zwischen 1-60 Viruskopien /Zelle.

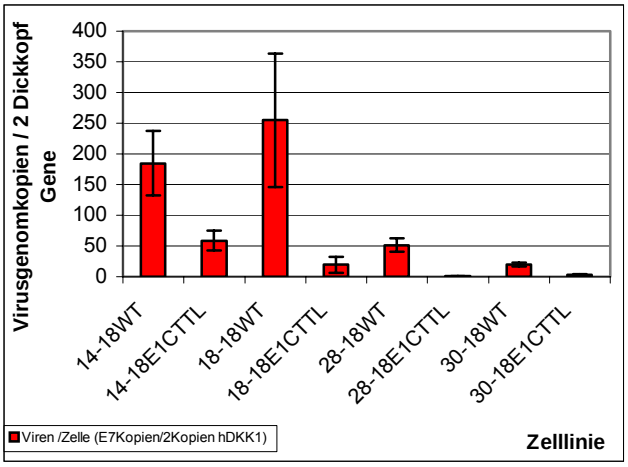
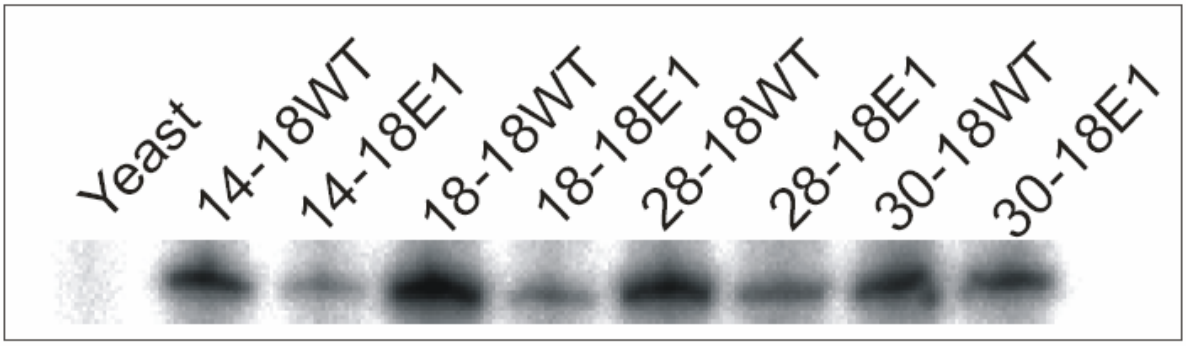


Abbildung 8: **Viruskopien Zahl/Zelle:** Zell- und Viruszahl wurde durch Realtime PCR mit den hDKK1- und HPV18E7-Primersätzen ermittelt. Absolute Kopienzahl wurden anhand von Verdünnungen mit Plasmiden bestimmt (HPV18wt Genom und hDKK1-1315-1471^pDrive). Die Amplifikation erfolgte nach dem empfohlenen Standardprotokoll von Applied Biosystems. Angegeben sind die Viruskopien / 2 hDKK1 Gene.

3.3 Bestimmung der viralen HPV18E6/E7-Transkripte

Der “RNase-Protections-Assay”(RPA) wurde verwendet, um die Transkriptionsmengen der viralen Onkogene E6 und E7 zu bestimmen. Der RPA wurde mit 20µg Gesamt-RNA der verschiedenen HPV18wt- und HPV18E1-Zelllinien durchgeführt. Die verwendete Sonde detektierte alle Transkripte, die die Sequenz von Position 214 bis 655 des HPV18-Genoms enthielten. Die RPA-Experimente wurden drei Mal durchgeführt (Abb. 9B). Abbildung 9A zeigt einen representativen Ausschnitt des PAA Gels. Zusammen mit den Abbildungen 9B und 9C zeigt sich, dass in allen HPV18wt-Zelllinien eine höhere Expression der viralen Onkogene E6 und E7 gefunden wurde als in den HPV18E1-Zelllinien.

A. RPA-Produkte auf dem PAA-Gel



B. Relative Werte von 3 unabhängigen Experimenten bezogen auf 14-18E1.

Abb. 8C	RPA1	RPA2	RPA3	
Zelllinie (NHK-HPV)	Faktor	Faktor	Faktor	Mittel
14-18wt	6,8	3,1	31,0	13,6
14-18E1	1,0	1,0	1,0	1,0
18-18wt	15,5	20,3	53,1	29,6
18-18E1	1,7	3,6	8,2	4,5
28-18wt	9,9	22,4	28,2	20,2
28-18E1	2,3	3,3	3,8	3,1
30-18wt	7,3	3,5	37,3	16,0
30-18E1	4,8	8,1	4,7	5,9

C. Gemittelte Werte aus Tabelle B einschließlich Standardabweichung

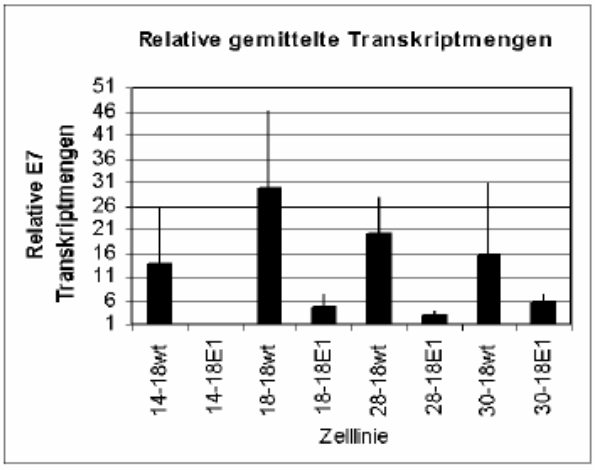
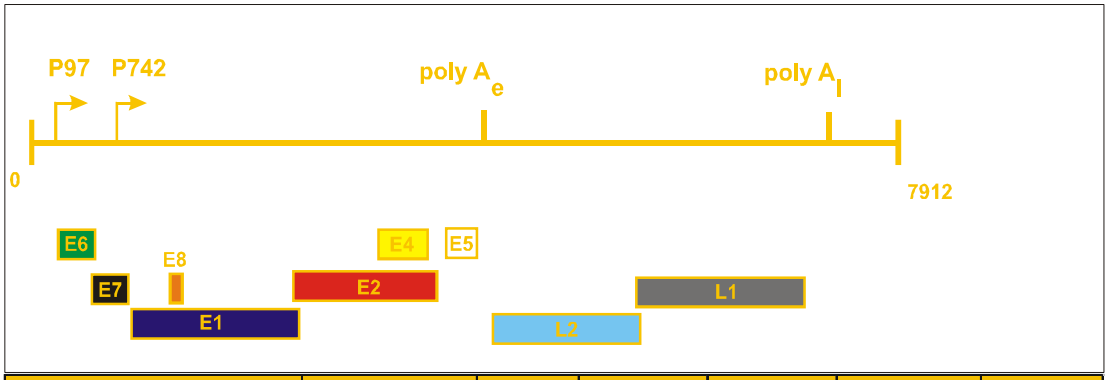


Abbildung 9: RNAse Protektionsanalyse. Die RPAs wurden mit der Gesamt-RNA der vier verschiedenen NHK-HPV18 Zelllinien (14, 18, 28, 30) durchgeführt. 20 µg der Gesamt-RNA wurde mit in-vitro-transkribierter UTP[α-^{32}P] markierter Sonde hybridisiert. Die Sonde enthielt die Sequenz von Base 214 bis 655 des HPV18 Genoms. Nach der Hybridisierung der Sonde an die einzelsträngige RNA wurde mit RNase verdaut und die Produkte in einem 5% Harnstoff/TBE Gel elektrophoretisch aufgetrennt. (A) Das getrocknete Gel wurde mit einem Phosphor-Imager analysiert. Hefe-RNA (Yeast) diente als negative Kontrolle. Tabelle 9B und Abbildung 9C repräsentieren eine quantitative Analyse mit der Ray Test AIDA-Detektionssoftware. Alle Werte sind relativ zur Menge an spez. RNA in NHK14-HPV18E1 dargestellt.

3.4 Bestimmung der viralen HPV18E7/E2-Transkripte

Die Überprüfung der Transkriptionsmuster der HPV18-haltigen Zelllinien sollte zeigen, ob durch die Integration qualitative Unterschiede in der viralen Transkription entstehen. Hierzu wurde das E7/E2-Transkript ausgewählt, da das E2-Protein die virale DNA-Replikation und die virale Genexpression reguliert. Zudem fällt der E2-Leserahmen in den Bereich, welcher bei der Integration ins Wirtsgenom häufig deletiert wird (Abb.10).



Autor	Jahr der Veröffentlichung	Virus Typ	1. Bruchstelle	2. Bruchstelle	Lokalisation im viralen Genom	Herkunft
Sang & Barbosa	1992	HPV18	2472	5144	E2	in vitro
Badaracco et al.	2002	HPV18			nach E2	CxCA
					nach E1	
Jeon et al.	1995	HPV16	3732	4865	E2	in vitro
Ziegert et al.	2003	HPV18	1319		E1	CxCa
			1733		E1	
			2241		E1	
			2438		E1	
			2466		E1	
			2772		E1	
			2946		E1/E2	
			3220		E2/E4	
Luft et al.	2001	HPV18		5442	L1/L2	Zelllinien
			2952		E2	
			2643		E1	
			3419		E2/E4	
			2497		E1	
			3100		E2	
				5736	L1	
			2096		E1	CxCA
			2213		E1	
			2892		E2	
			1988		E1	

Abbildung 10: Genomorganisation von HPV18. In der unteren Tabelle sind bisher beschriebene Deletionen aufgeführt. CxCA steht für Cervix Carzinom.

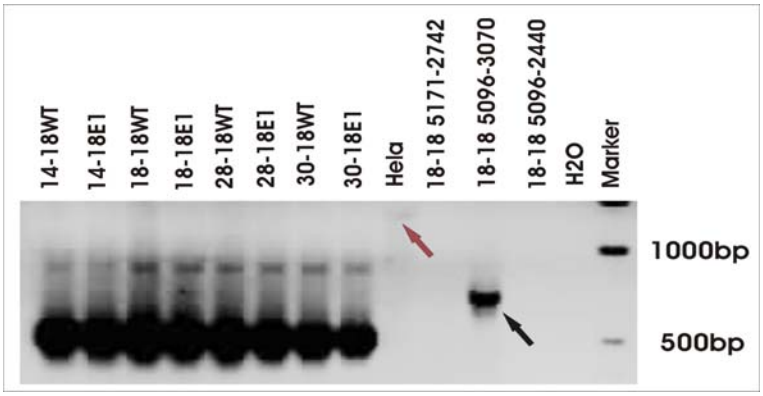


Abbildung 11; RT-PCR Analyse der HPV18E7/E2 Transkripte. 1 µg Gesamt RNA der verschiedenen Zelllinien wurden mit den Oligo-nukleotiden HPB18E7 (548) und HPV18E2 (3076) in mehreren RT PCRs analysiert. Die Produkte wurden auf einem 2% Agarose Gel elektrophoretisch aufgetrennt, und über eine Ethidiumbromidfärbung detektiert.

Die gelelektrophoretische Analyse der RT-Produkte zeigte mehrere Banden mit Größen von 900bp, 500bp und 650bp welche spezifisch sind, da sie in Zelllinien, welche nicht den E2-Leserahmen besitzen (Hela, 18-18 5171-2742, 18-18 5096-3070, 18-18 5096-2440) nicht nachweisbar sind. Unerwartet bei der Bestimmung der E7/E2-Transkripte waren die zwei bis drei verschiedenen Banden oder E7^E2-Transkripte. Andere Studien beschrieben nur ein Transkript für HPV18 E2 (Meyers, C. et al., 1997a). Das von Meyers et al beschriebene Transkript sollte eine Größe von 650bp haben (Meyers, C. et al., 1997b). Das größere Transkript könnte ein neues Transkript sein, das einen potentiellen Spleißakzeptor an Position 2499 im HPV18-Genom nutzt. Der rote Pfeil markiert eine sehr schwache Bande mit 1500 bp in der Hela-Probe, ebenso ist ein Amplifikat (schwarzer Pfeil) in der NHK18-HPV18 5096-3070-Probe bei zika 750bp zu erkennen. Bei beiden Banden ist nicht klar, ob es sich um neue unbekannte Transkripte handelt, oder ob es sich um ein „Missannealing“ in der Einschritt RT-PCR-Reaktion handelt. Dieses Experiment zeigte, dass virale E2-Transkripte gleichermaßen in den HPV18wt- und auch in den HPV18E1-Linien exprimiert werden und somit E2 möglicherweise die E6/E7-Expression beeinflusst. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen, dass in allen Zelllinien komplette HPV18-Genome vorhanden sind.

3.4.1 Nachweis von HPV18 E8^E2C-Transkripten

Das E8^E2C-Protein besteht aus dem kleinen E8-ORF, bei HPV31 von nt 1204 bis 1297, mit einem einzelnen ATG Start-Kodon an Position 1259 und dem C-terminalen Teil des E2-ORF von nt 3295 bis 3836 (Stubenrauch, F. et al., 2000a). Das E8^E2C Protein von HPV31 reprimiert die DNA-Replikation und wirkt als Repressor des frühen Promotors P97, der für die Expression der viralen Onkogene E6 und E7 verantwortlich ist (Stubenrauch, F. et al., 2000b). Um zu untersuchen, ob HPV18 ebenfalls ein E8/E2C-Transkript exprimiert, und ob es Unterschiede zwischen HPV18wt- und HPV18mt-Zellen gibt, wurden ähnliche Strukturen im HPV18-Genom gesucht. Im E1-ORF wurde ein E8-ähnlicher Genomabschnitt gefunden: nt 1314 –1357 mit einem ATG an Position 1323. Zudem konnte im C-terminalen Teil von E2 eine 3’-Akzeptor-Stelle an Position 3434 gefunden werden. Gespleißt werden kann von der 5’-Donor-Stelle an nt 1357 bis zur 3’-Akzeptorstelle an nt 3434. Aus diesen Eckdaten wurde ein Primersatz hergestellt mit einem 5’-Primer im E8-ORF an Position 1324 bis 1350 und einen 3’-Primer im C-Terminus von E2 nach Nukleotid 3434 (siehe Material und Methoden). Die Agarose Gel Analyse der RT-Produkte (Abbildung 12) zeigte eine Bande mit ca. 600 bp Länge. Die Größe der Produkte entspricht einem Transkript mit 603 bp. Dieses Transkript war außer in der NHK30-HPV18wt Zelllinie in allen HPV18wt-Zelllinien präsent. Ebenso konnte in den HPV18E1-Zelllinien kein E8/E2C Transkript detektiert werden. Das Fehlen eines E8^E2C-Reaktionsproduktes in den HPV18E1-Zelllinien und der NHK30-HPV18wt Zelllinie könnte auf die geringen Kopienzahlen in diesen Zelllinien zurückzuführen sein.

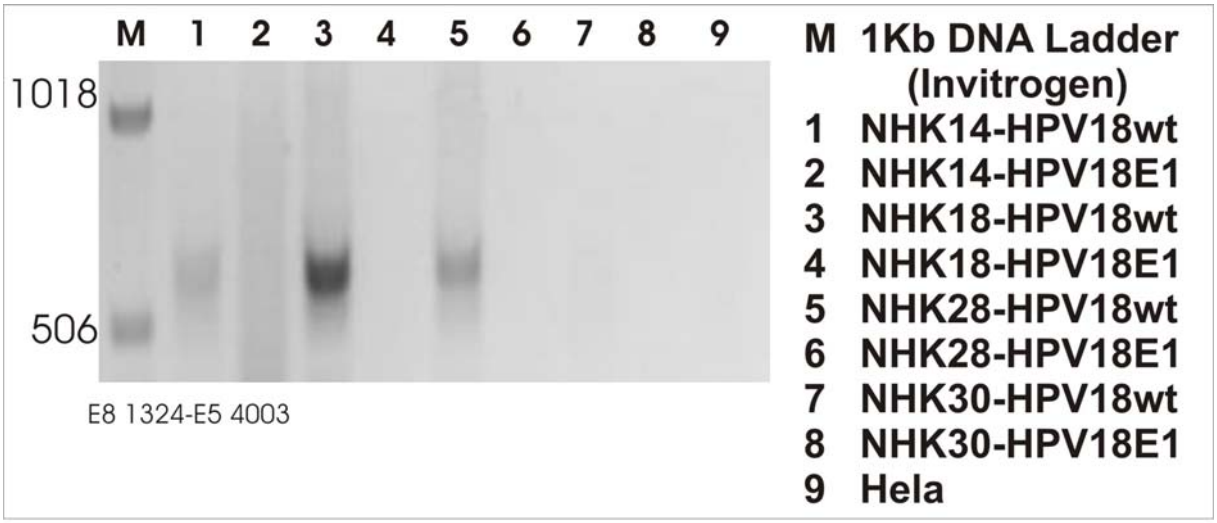


Abbildung 12: RT-PCR Analyse der HPV18 E8^E2C Transkripte. 1 µg Gesamt RNA der verschiedenen Zelllinien dieser Studie wurden mit den Oligonukleotiden HPV18E8 (1324 nt.) und HPV18E5 (4003 nt.) amplifiziert. Die Produkte wurden auf einem 2%gen Agarose Gel elektrophoretisch aufgetrennt und über eine Ethidiumbromidfärbung detektiert und fotografiert.

3.4.2 Nachweis von viralen E1^E4-Transkripten

Der Nachweis der viralen HPV18E1^E4-Transkripte sollte klären, ob der Verlust der E8^E2C-Expression auf der mangelnden Nutzung des Spleißakzeptors an Position 3434 beruht, der sowohl für E8^E2C als auch für die E1^E4-Expression benutzt wird. Bei Verwendung des Primerpaars E7-548/E5-4003 konnte in allen HPV18wt- und 18E1-Zelllinien eine Bande von zirka 900bp detektiert werden. Wenn das Primerpaar E7-548/E4-3603 verwendet wurde, konnte auch in Hela Zellen eine Bande (650bp) detektiert werden, die sich allerdings in der Größe von den anderen Zelllinien (500bp) unterschied und möglicherweise auf die Nutzung einer potentiellen alternativen Akzeptorstelle an Position 3293 zurückzuführen ist.

Diese Daten legen nahe, dass der Spleißakzeptor an Position 3434 in HPV18E1-Zelllinien genutzt wird und die fehlende Expression von E8^E2C in HPV18E1-Zelllinien auf etwas anderes zurück zuführen ist. Aufgrund der verschiedenen RT-Experimente zeigte sich auch, dass die Hela-Zelllinien keine Transkripte mehr bilden, die die Position 4003bp beinhalten, was in Einklang mit den publizierten Daten ist (Dowhanick, J. J. et al., 1995). Diese Daten lassen vermuten, dass Unterschiede zwischen Hela-Zelllinien aus Biopsiematerial (Hela) und in vitro hergestellten Zellen wie in den HPV18wt- und den HPV18E1-Zelllinien existieren.

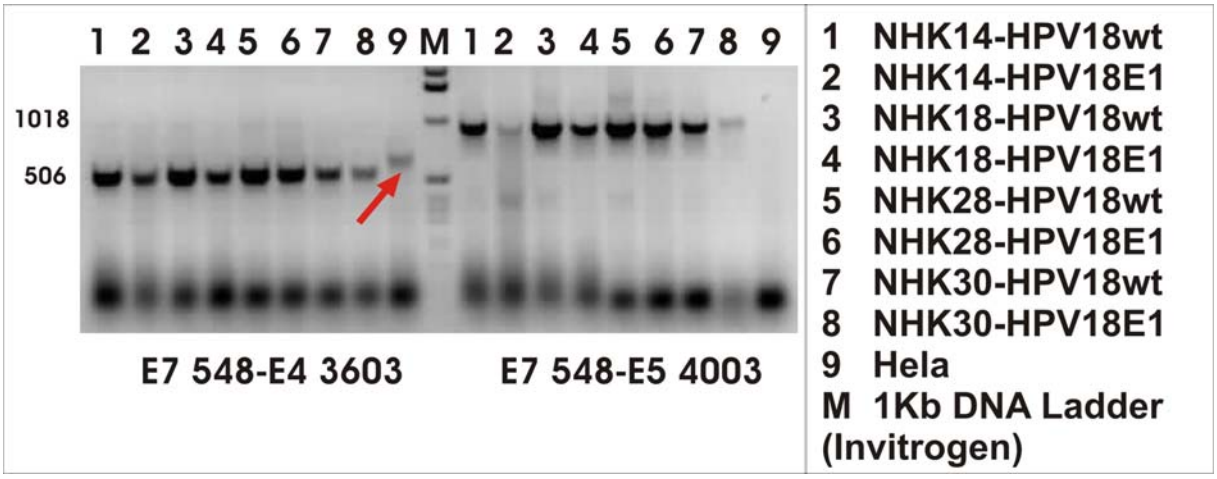


Abbildung 13

Abb.13 RT-PCR Analyse der HPV18E7/E1/E4 und HPV18E7/E5Transkripte. 1 µg Gesamt-RNA der verschiedenen Zelllinien wurden mit den HPV18E7 (548 bp) und HPV18E4 (3603) oder HPV18E5 (4003 bp) mit der One-Step –RT PCR Amplifikation (Promega Access RT-PCR System) amplifiziert.Die Produkte wurden auf einem 1,5% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und über eine Ethidiumbromid Färbung detektiert. Als Marker wurde der 1kb Ladder von Invitrogen verwendet. Der rote Pfeil markiert eine Bande mit einem Größenunterschied von ca. 130bp in der RT PCR der Hela E7/E1E4-Transkripte.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass in allen HPV18wt und HPV18E1mt haltigen Zelllinien E2 und E1^E4 Transkripte gebildet werden, dass aber E8^E2C Transkripte nur in 3 von 4 HPV18wt Zelllinien nachweisbar sind.

Die Kontroll-Hela Zellen können keine E5-Transkripte und auch keine E2-Transkripte (Schwarz, E. et al., 1985a) bilden. Der Bruch bzw. die Deletion der HPV18-Genome in den Hela-Zelllinien muss irgendwo nach dem E4-Leserahmen (nt. 3681) und nt. 4003 liegen, da ein HPV18E7 (548)/E4 (3603)-Transkript detektierbar war, aber kein Produkt bei Verwendung von E7 (548)-HPV18E5 (4003) (Abb.13).

3.5 Vergleichende Transkriptionsanalyse von normalen Keratinozyten, HPV18wt und HPV18E1 positiven Keratinozyten

3.5.1 Vergleich der NHK-HPV18wt und der NHK-HPV18E1 mit der NHK Gen-expression

Um die Veränderungen der zellulären Genexpression in Anwesenheit von HPV18-Genomen zu untersuchen, wurde Gesamt-RNA aus den verschiedenen Zelllinien (NHK, HPV18wt, HPV18E1mt) 48h nach Erreichen der Konfluenz isoliert. Nach Qualitätskontrollen durch die Microarray Facility Tübingen, wurde pro Zelllinie ein Affymetrix U133A Gene Array verwendet. Die vergleichende Analyse der NHK-HPV18wt und der NHK-HPV18E1 Mikroarray-Datensätze gegen die NHK Mikroarray-Datensätze mit denselben stringenten Filterbedingungen ergab eine signifikante Veränderung der Genexpression von 614 Genen. Genauer betrachtet zeigt dieser Vergleich 324 Gene, die in NHK-HPV18wt-Zelllinien hochreguliert und drei Gene, welche herunterreguliert waren. In den NHK-HPV18E1-Zelllinien wurden insge-

samt 415 Gene hochreguliert und ebenfalls die gleichen drei Gene herrunterreguliert. Von den hochregulierten Genen wurden 128 Gene in beiden Zelllinien (NHK-HPV18wt, NHK-HPV18E1) in ihrer Expression verändert gefunden, das heißt 196 bzw. 287 Gene wurden nur in den HPV18 wt- oder den HPV18E1-haltigen Zellen hochreguliert (siehe Abbildung 14)

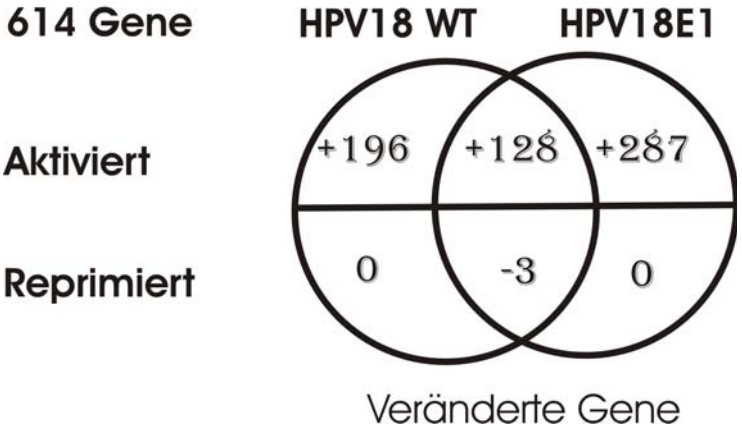


Abbildung 14: Schnittmengendiagramm der regulierten Gene in Gegenwart von HPV18 DNA bezogen auf die Genexpression in NHK.

Die absoluten Unterschiede der Expression bewegten sich von einem Signal-Log-Ratio (SLR) von -4,68 für TYRP1 (entspricht -18,22x,) bis zu einem SLR von 3,72 für CDKN2A (13,2x).

3.5.2 Gruppierung der Affymetrix Microarray Datensätze

Die Gruppierung der regulierten Gene erfolgte über die „Gene Ontology Biological Process Description“ des Affymetrix Netaffx und über die GeneMAPP MicroArray pathway profiler Software des Gladstone Institutes der Universität von California, San Francisco. Die biologischen Funktionen der Gene sind zum Teil sehr detailliert beschrieben, deshalb wurden 23 funktionelle Gruppen (Tabelle 8) gebildet. Gene, deren Funktion noch nicht geklärt ist, wurden hier nicht berücksichtigt, sie wurden aber in der Gesamtliste (Tabelle 10) aufgeführt.

Biologische Funktion	Gen Symbol
Signal Transduktion (101 Gene)	ABL2, ADAMTS13, ADCY9, ADMR, ARHGAP1, ARHGAP1, ARHGEF11, ARNTL2, ATP6V1C1, BLK, C11orf13, C20orf10, CAMK1, CARHSP1, CD5, CD44, CHAF1B, CHRNB1, CIT, CKLF, CSPG6, CTGF, CXCL2, CXCL10, DEPDC1, DLG3, DLG7, DUSP4, EDG1, EGFR, EPAS1, FLNB, FOXM1, G3BP2, GABRB2, GAS6, GJA7, GNB1, GNG4, GPR126, GPR161, GSK3B, GUCY1A3, HAN11, HNRPUL1, ICAM1, IL8, IQGAP1, IRS2, ITGA5, ITGB3, ITGB4, JAK2, KCNMB3, KIAA0450, MAPRE2, MEST, MITF, MS4A6A, MTA1, MYO9B, MYO9B, NMU, NR4A2, NRCAM, NXPH3, OPRL1, PASK, PIK3R3, PIP5K1A, PKP2, PLAU, PLAUR, PPP2R5D, PRKCH, PTPN11, PXN, RAB26, RAPGEF2, RASGRF1, RASL11B, RRAD, RRBP1, SEMA4F, SEPP1, SMURF1, SOCS2, SPHK1, STC1, STIP1, STK17B, STMN1, TCF7L1, TGFBR1, TNFRSF10B, TNFSF7, TNFSF7, TRA1, TREX2, YWHAE, YWHAH, ZF
Transport und Zytoskel-let (79 Gene)	ABCA2, ACTN4, AFURS1, ANKRD2, ARHGAP1, ARHGEF11, ATP6V1C1, CALD1, CENPJ, CHRNB1, CPT1A, CSPG5, CSPG6, CYP26B1, CYP27B1, CYP46A1, CYR61, DBN1, EGFR, FBN2, FLJ10618, FLNB, FOLR1, FOXE1, FXYD7, G3BP2, GABRB2, GENX-3414, GJA7, GJA7, GRIK5, GTSE1, HPCAL1, HSRG1, K-ALPHA-1, KCNMB3, KCNS1, KCTD12, KCTD14, KIF20A, KIF4A, KPNA2, KPNA4, KPNB1, LMAN1, MCAM, MCM3AP, MYO9B, NMU, NUP107, NUP43, NUP93, NUP98, OK/SW-cl.56, OSBP, PLEC1, SLC11A2, SLC13A3, SLC5A1, SLC5A6, SLC6A12, SLC7A1, SMC2L1, SMC4L1, SMTN, SOCS2, SOX13, TCOF1, TM4SF11, TM9SF4, TNFRSF10B, TOM1L2, TOM1L2, TPM1, WAS, WHSC1, XPO7, YKT6, YWHAH
Entwicklung und Diffe-renzierung (57Gene)	ADAMTS13, ADARB1, ANKRD2, ARHGEF11, ATP6V1C1, BRCA1, C20orf10, CALD1, CDC6, CDC7, CDKN2A, CDKN3, CSPG5, CTGF, CTGF, CUGBP1, CXCL10, CYP46A1, CYR61, DBN1, DEDD, DLG3, ENC1, EPAS1, ETS1, FHL1, FLNB, FLOT2, FMR2, FOXE1, FST, IL8, JAK2, L1CAM, LHX6, MAC30, MITF, NASP, NRCAM, PAPSS2, PPP2R5D, PSG3, PTGS1, PTTG1, SEMA4F, SMTN, SMURF1, SOCS2, TCL1A, TCOF1, TGFBR1, THBS1, TPM1, TPM1, TRAF4, WAS, YWHAH
Metabolismus (Bartsch, D. et al., 1992)	ABCA2, ACLY, ADAMTS13, AFURS1, AGPAT2, ALDH3B1, CA9, CPT1A, CXCL10, CYP27B1, CYP46A1, DHRS10, DHRS2, FBP1, GENX-3414, GK, GLS, GM2A, GNE, GSK3B, GUCY1A3, IDH2, IRS2, KIAA0179, KIAA0450, KIAA0828, LCT, MEST, NTHL1, OSBP, PAPSS2, PIP5K1A, PRPS1, PTGS1, RRM2, SLC7A1, SPHK1, TYRP1
Ubiquitin-Stoffwechsel (Kim, S. S. et al., 2000)	CDC20, ITCH, SMURF1, UBE2C, UBE2H, UBE3B, UCHL1, USP13, USP2
Immunantwort (Merrick, D. T. et al., 1996a)	BLM, CD22, CFLAR, CKLF, CLDN4, CXCL10, CXCL2, D2S448, ETS1, IFNA8, IL8, KIR3DL1, MAPRE2, NFATC4, NR4A2, OK/SW-cl.56, PMSCL1, PSG3, SAA2, SE-MA4F, TNFRSF10B, TNFSF7, WAS

Biologische Funktion	Gen Symbol
Zelladhesion, Motilität, Proliferation, Chemotaxis und Homöostase (59 Gene)	ABL2, ADAM15, ADAMTS13, C1QL1, CALR, CANX, CBFB, CD22, CD44, CDC25B, CKLF, COL4A2, CTGF, CXCL10, CXCL2, CYP27B1, CYR61, EGR4, EPB41L2, ETS1, EWSR1, FHL1, FLOT2, GNE, IL8, IRS2, ITGA5, ITGB3, ITGB4, JAK2, KCNMB3, L1CAM, LAMB1, LMAN1, MCAM, MT2A, MYB, MYH10, NRCAM, OPRL1, PLAU, PLAUR, PTPRF, PTTG1, PXN, SCAM-1, SCARB2, SET, SMURF1, STC1, STMN1, SYMPK, TACC3, TCL1A, THBS1, TROAP, TSPAN-1, UBE2C, ZNF278
Zellzyklus (67 Gene)	ARNTL2, AURKB, BIRC5, BRCA1, BRRN1, BUB1, BUB1B, CCNA2, CCNB1, CCNB2, CCND2, CCNE1, CDC2, CDC20, CDC25B, CDC25C, CDC45L, CDC6, CDC7, CDKN2A, CDKN3, CENPF, CHAF1A, CHAF1B, CHEK2, CKS2, CNAP1, CSPG6, DUSP4, ESPL1, FANCG, FZR1, GTSE1, HCAP-G, ILF3, JAK2, KIF22, KIF2C, KNSL7, KNTC1, KPNA2, MCM2, MCM5, MCM7, MKI67, MPHOSPH1, MRE11A, NEK2, NEK3, NOLC1, PCTK1, PLK1, PLK4, PMS1, PTTG1, RAD1, RAD21, SKB1, SKP2, SMC2L1, SMC4L1, STK6, TOPK, TP53, TPX2, UBE2C, YWHAH
Zellzyklus Arrest (5 Gene)	CDKN2A, CDKN3, IL8, MACF1, MPHOSPH1
Zytokinese (19 Gene)	ARHGEF11, CCNA2, CCNB1, CCNB2, CCND2, CCNE1, CDC2, CDC20, CDC25B, CDC25C, CDC6, CDC7, CKS2, ESPL1, FZR1, MYH10, NEK2, NEK3, UBE2C
Apoptose (19 Gene)	BAG2, BCL2L14, BIRC5, BRCA1, CFLAR, CFLAR, DEDD, ELMO2, ESPL1, RAD21, SAA2, STK17B, TNFAIP3, TNFRSF10B, TNFRSF6B, TNFSF7, TP53, TP73L, TRAF4
Chromatin und Chromosomen (Fujiwara, H. et al., 1995)	MRE11A, ARHGEF11, BAT8, BRCA1, BRRN1, BUB1, CENPA, CNAP1, CSPG6, ESPL1, H2AFX, HCAP-G, HMG20B, KIF11, KIFC1, MLL4, PTTG1, RAD21, RAD54B, SMC2L1, SMC4L1, SOX2, SUV39H1, TCF7L1, TNKS, TOP3A
DNA Replikation, Modifikation, Transkription, Biosynthese und Rekombination (119 Gene)	ARHGEF11, ARNTL2, ATF3, BLM, BLM, BRCA1, C11orf13, CALR, CARHSP1, CBFB, CDC45L, CDC6, CDC7, CENPA, CENPF, CHAF1A, CHAF1B, CSPG6, CTGF, DDX11, DEDD, EGR4, EIF5A, ENDOG, EPAS1, ETS1, EWSR1, FEN1, FOXE1, FOXM1, GABPB2, GNE, H2AFX, HMG20B, HMGB3, HMX1, HTATIP, HTATIP, IL8, ILF3, IRF6, KIF4A, KLHDC3, KPNA2, KPNA2, LHX6, MAFF, MCM2, MCM3AP, MCM4, MCM4, MCM5, MCM7, MITF, MLL4, MRE11A, MTA1, MYB, NAB1, NASP, NEK2, NFATC4, NFATC4, NMU, NR4A2, PAPSS2, Pfs2, PHTF1, PMS1, POLD1, POLR3K, POLR3K, POLR3K, PRIM1, PRIM1, PRIM2A, PRKDC, PTTG1, RAD21, RAD54B, RERE, RFC2, RFC3, RFC4, RFC5, RNASEH2A, RNPS1, RRM1, RRM2, SET, SFRS8, SHARP, SMARCA4, SOX13, SOX2, SSBP1, SSRP1, SUPT16H, SUV39H1, TAF5, TAZ, TCF7L1, TEAD4, TGIF2, THG-1, TK1, TNFAIP3, TOP3A, TP53, TP73L, TRIM28, TRIP13, WHSC1, YBX2, ZF, ZNF278, ZNF36, ZNF409, ZNF473

Biologische Funktion	Gen Symbol
Anti-Apoptose (5 Gene)	BIRC5, CFLAR, TNFAIP3, TNFRSF6B, YWHAH
DNA Reparatur (27 Gene)	BLM, BRCA1, C11orf13, CHAF1A, CHAF1B, CHEK2, CHEK2, CSPG6, DDX11, EXO1, FANCA, FANCG, FEN1, FLJ10858, GTSE1, MRE11A, MSH6, NTHL1, PMS1, POLD1, PRKDC, PTTG1, RAD21, RFC5, TP53, TP53RAD1, TREX2
RNA (Merrick, D. T. et al., 1996b)	ADARB1, C20orf14, C20orf27, CPSF1, CPSF1, CUGBP1, DHX38, HNRPH3, HNRPU, HNRPUL1, HPRP8BP, NOLC1, NUP107, PMSCL1, POLR3K, RENT1, RNASEH2A, RNPS1, SFRS7, SFRS8, SNRP70, U5-200KD, VARS2
Protein Metabolismus und Prozessierung (81 Gene)	ABL2, ADAM15, ADAM19, ADAM8, ADAMTS13, ADCY9, ADPRTL2, AGPAT2, ASMTL, ASPH, AURKB, BAG2, BLK, BUB1, BUB1B, CAMK1, CANX, CDC2, CDC25B, CDC25C, CDC7, CDKN3, CFLAR, CHAF1A, CHAF1B, CHEK2, CIT, DUSP4, DUSP5, EGFR, EIF4G1, EIF5A, ESPL1, FANCA, FKBP11, FKBP5, GCNT1, GSK3B, HIPK1, JAK2, KNTC1, LMAN1, LOX, MAP2K2, MELK, MTA1, MTMR1, MTMR4, NEK2, NEK3, PADI2, PASK, PCTK1, PIP5K1A, PLAU, PLK1, PLK4, PLOD2, PPM2C, PRKCH, PRKDC, PTPN11, PTPRF, RENT1, SCRN1, SENP3, SIAT7E, SRPK1, STK17B, STK6, SUPT16H, TGFBR1, TMPRSS6, TOPK, TRA1, TTK, TYRP1, UBE2M, UMPK, VARS2, WAS
UV Schutz (2 Gene)	FEN1, POLD1
Energiestoffwechsel (5 Gene)	ACLY, ADCY9, ATP6V1C1, GUCY1A3, SLC5A1
Endozytose, Phagocytose, Exocytose (Dick, F. A. et al., 2002)	BIN1, ELMO2, FOLR1, YKT6
Angiogenese (2 Gene)	EPAS1, IL8
Blutgerinnung (Thonemann, B. et al., 2000a)	ITGB3, LMAN1, TFPI2, THBS1, PLAU, PLAUR, WAS
Neurotransmission (Thonemann, B. et al., 2000b)	CHRNB1, FMR2, GABRB2, GRIK5, KCNMB3, NRCAM, RASGRF1

Tabelle 8

3.5.3 Vergleichende Analyse der durch HPV18-Genome hervorgerufenen Veränderungen mit bekannten HPV-Zielgenen

Ausgehend von einer Reihe experimenteller Studien, welche die Veränderungen der zellulären Genexpression in Anwesenheit von HPV-Genen untersucht haben, wurden Übereinstimmungen gesucht. Aufgrund der biochemischen Eigenschaften der E6- und E7-Onkoproteine von „high risk“ HPV ist zu erwarten, dass die Expression von Rb-/E2F regulierten (Ishida, S. et al., 2001a; Markey, M. P. et al., 2002b; Polager, S. et al., 2002a; Ren, B. et al., 2002a; Stanelle, J. et al., 2002b; Vernell, R. et al., 2003a), p53-regulierten (Kannan, K. et al., 2001a; Kannan, K. et al., 2001f), IFN-regulierten (Chang, Y. E. et al., 2000a; Nees, M. et al., 2001g; Higashi, K. et al., 2003) und NFκB-regulierten Genen (Nees, M. et al., 2001f; Ruutu, M. et al., 2002b) verändert wird. Der Vergleich mit publizierten Zielgenen von Rb/E2F, p53, NFκB und von HPV-Genomen, sowie Zellen welche nur E6 und/oder E7 exprimieren ergab, dass HPV-Genome 77 E2F-regulierte Gene verändert werden (Tabelle 9). Weiterhin konnten 4 NFκB- und 4 p53-regulierte Gene identifiziert werden. Insgesamt wurden 141 Gene gefunden, welche auch in anderen Publikationen als durch HPV deregulierte beschrieben waren. Besonders hervorzuheben ist der Vergleich mit der Studie (Garner-Hamrick, P. A. et al., 2004b), welche HPV18 E6/E7 haltige Keratinozyten im organotypischen Gewebekultursystem analysierte. Die Studie enthielt 109 deregulierte Gene, die auch in der vorliegenden Arbeit gefunden wurden.

	Gen Symbol	**Referenzen**
77 E2F-regulierte Gene	ASF1B, , AURKB, BARD1, BID, BRCA1, BUB1, BUB1B, CALD1, CCNA2, CCNB1, CCNB2, CCNE1, CDC2, CDC20, CDC25B, CDC45L, CDC7, CDCA3, CDKN3, CENPA, CENPE, CENPJ, CHAF1A, CHAF1B, CKS2, CTGF, FEN1, FST, HMMR, KIAA0101, KIF4A, KIFC1, KPNA2, LAMB1, MCM2, MCM4, MCM5, MCM7, MELK, MKI67, MYB, NEK2, NUP107, OK/SW-cl.56, PLK1, PLK4, PMSCL1, POLD1, PRC1, PRIM1, PTTG1, RFC3, RFC4, RFC5, RRBP1, RRM1, RRM2, SKP2, SMC2L1, SMC4L1, SPHK1, STK6, STMN1, SYNGR3, Spc25, TACC3, TCOF1, TEAD4, TK1, TMPO, TOP2A, TP53, TPM1, TROAP, TTK,TUBB2,TYMS	Ishida et al. 2001; Markey et al. 2002; Müller et al. 2002; Polager et al. 2002; Ren et al. 2002; Stanelle et al. 2002; Vernell et al. 2003;

	Gen Symbol	Referenzen
109 HPV18-regulierte Gene	211725_s_at, 215329_s_at, 215708_s_at, 216971_s_at, ACTN1, ADAM15, ADAM19, ADARB1, ADPRTL2, AG-PAT2, ARHGEF11, ATP1B1, BID, BIRC5, BUB1, C11orf13, CCNA2, CCNB1, CCNB2, CCNE1, CDC2, CDC45L, CDC6, CDKN2A, CDKN3, CENPA, CENPE, CHAF1A, CIT, CSPG6, DBN1, DUSP4, EIF5A, EPB41L2, FEN1, FLJ10697, FLOT2, FOXM1, GAS6, H2AV, HMMR, HNRPH3, ITGB3, KCNS1, KIF2C, KNTC1, KPNA2, KRT18, MAGP2, MCM2, MCM5, MCM7, MELK, MKI67, MPHOSPH1, MSH6, MYO9B, NAB1, NASP, NEK2, NFATC4, NMU, NTHL1, PASK, PCTK1,PLOD2, PMS1, POLG, PRIM1, PRKDC, PTTG1, RAD1, RENT1, RFC2, RFC3, RFC4, RFC5, RRAD, RRM1, RRM2, SERPINB9, SLC11A2, SLC5A1, SLC7A1, SMC2L1, SMC4L1, SOD2, SPAG5, SPTBN1, STC1, STK3, STK6, TCL1A, THG-1, TNFRSF10B, TNFSF7, TNKS, TP53, TPM1, TSPAN-1, TTK, TYMS, UBE2M, USP13, WHSC1, YKT6, YW-HAE,YWHAH, hnRNPA3,	Garner-Hamrick et al.; 2004a, HPV18 E6/E7 Zellen in der organotypischen Gewebekultur
32 durch HPV-beeinflusste Gene	BARD1, BIRC5, BUB1, CCNA2, CCNB1, CDC2, CDC20, CDC25B, CDKN2A, CDKN3, CENPA, CENPE, CENPF, CKS2, DLG7, FOXM1, FST, HMMR, IL8, MCM2, NEK2, PLAUR, PLK1, RFC3, STK6, TACC3, TNFSF7, TOP2A, TRIP13, TTK, TYRP1, UBE2C	Ruutu et al., 2002, HPV33wt; Alazawi et al., 2002, HPV16wt Chang et al., 2000, HPV31wt, Thomas et al., 2001, HPV11wt; Schwarz et al., 2002, HPV16E7, Nees et al. 2001, HPV16E6E7; Duffy et al., 2003, HPV16E6
4 NFkB-regulierte Gene	CXCL2, IL8, SAA2, TNFAIP3	Hinata et al., 2003; Pahl et al., 1999
4 p53-regulierte Gene	BRCA1, CDC6, GADD45B, TP53	Kannan et al. 2001

Tabelle 9

In Tabelle 10 sind alle 614 deregulierten Gene mit den entsprechenden Genexpressionsveränderungen als Signal Log Ratios (SLR) und als Faktor der Genexpressionsveränderung (Faktor) aufgeführt. Die signifikanten Veränderungen wurden der entsprechenden Zelllinie zugeordnet (Tab. 10, Spalte zwei und drei). Bei genauerer Betrachtung fällt auf, dass einige Gene in einer Zelllinie als nicht verändert galten (kein Eintrag in Spalte 2 und 3), obwohl das SLR (Spalte 5 oder 6) deutlich größer 1 war. Diese Gene besaßen Signalstärken unterhalb der definierten minimalen Signalstärke (Spikecontrol 64,25) und wurden somit als nicht reguliert gewertet. Die in Spalte 7 oder 8 aufgeführten Faktoren entsprechen der absoluten Genexpressionsveränderung des jeweiligen Gens. Innerhalb der 614 Gene schwanken die Veränderungen der Genexpressionen, bezogen auf die Genexpression der NHKs, von 13,23 fach/12,82fach (E1/wt) bei p16/CDKN2A bis zu –17,96fach/-18,22fach (E1/wt) bei TYRP1 (tyrosinase related protein 1). Abbildung 15 verdeutlicht, dass diese starken Veränderungen eher die Ausnahme bilden.

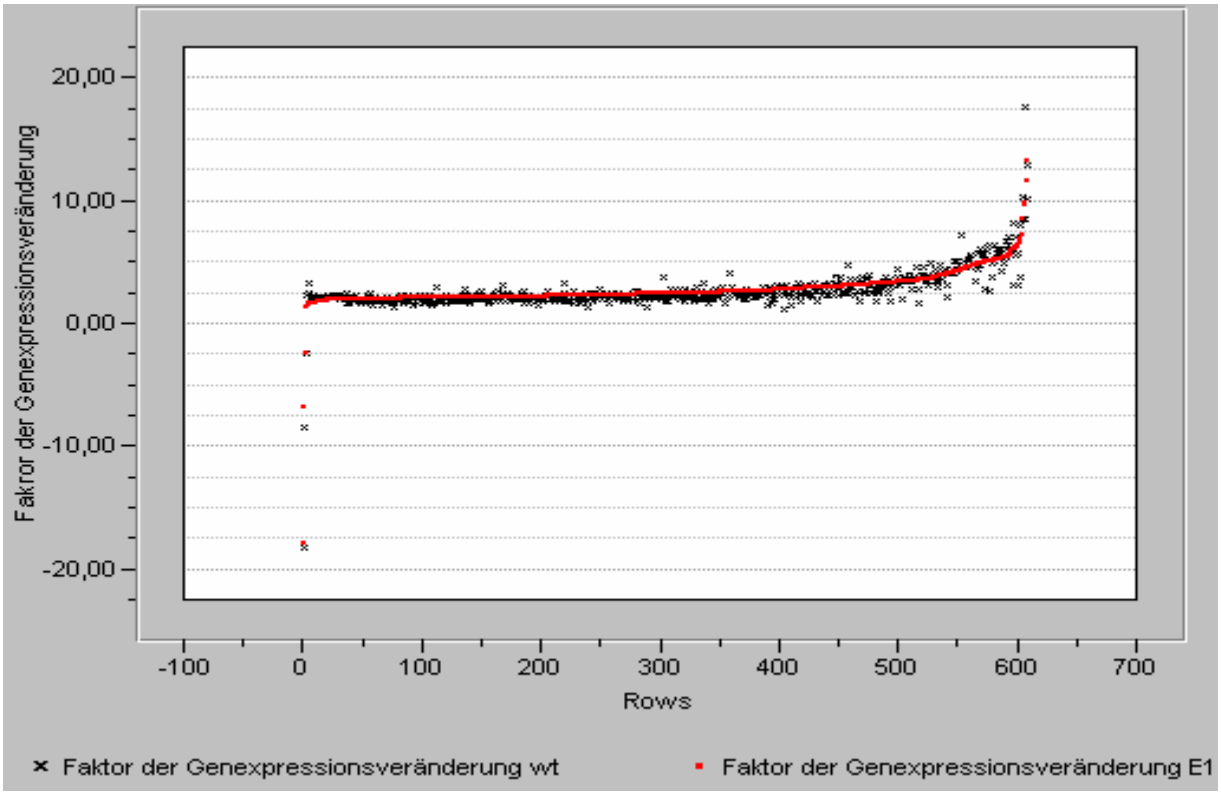


Abbildung 15

Probe set ID	NHK-HPV18E1	NHK-HPV18wt	Gen Bezeichnung	MW SLR E1	MW SLR wt	Faktor* E1	Faktor* wt
210678_s_at	E1		1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 2 (lysophosphatidic acid acyltransferase, beta)	1,33	0,69	2,51	1,61
217007_s_at	E1		a disintegrin and metalloproteinase domain 15 (metargidin)	1,3	0,82	2,47	1,76
210625_s_at	E1		A kinase (PRKA) anchor protein 1	1	0,94	2	1,92
209394_at	E1		acetylserotonin O-methyltransferase-like	1,11	0,87	2,16	1,82
208103_s_at	E1		acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member E	1,44	1,32	2,71	2,5
208637_x_at	E1		actinin, alpha 1	1,12	1,04	2,17	2,06
200601_at	E1		actinin, alpha 4	1,08	0,84	2,11	1,79
208710_s_at	E1		adaptor-related protein complex 3, delta 1 subunit	1,32	0,93	2,5	1,9
207999_s_at	E1		adenosine deaminase, RNA-specific, B1 (RED1 homolog rat)	1,08	0,77	2,11	1,7
208750_s_at	E1		ADP-ribosylation factor 1	1,22	0,86	2,33	1,82
211935_at	E1		ADP-ribosylation factor-like 6 interacting protein	1,46	1,32	2,75	2,5
214506_at	E1		adrenomedullin receptor	1	0,93	2	1,91
221643_s_at	E1		arginine-glutamic acid dipeptide (RE) repeats	1,16	0,98	2,23	1,97
210337_s_at	E1		ATP citrate lyase	1,31	1,05	2,48	2,08
219558_at	E1		ATPase family homolog up-regulated in senescence cells	1,36	1,28	2,57	2,43
212772_s_at	E1		ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 2	1,06	0,91	2,09	1,88
209464_at	E1		aurora kinase B	2,07	2,32	4,21	5
210934_at	E1		B lymphoid tyrosine kinase	1,02	0,92	2,03	1,89
202094_at	E1		baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)	1,62	1,72	3,08	3,29
209406_at	E1		BCL2-associated athanogene 2	1,31	1,54	2,49	2,91
205733_at	E1		Bloom syndrome	1,23	1,25	2,35	2,38
202931_x_at	E1		bridging integrator 1	1,31	0,8	2,49	1,74
207993_s_at	E1		calcium binding protein P22	1,02	0,86	2,03	1,82
204392_at	E1		calcium/calmodulin-dependent protein kinase I	1,05	0,7	2,07	1,63
208853_s_at	E1		calnexin	1,17	0,73	2,25	1,66
200756_x_at	E1		calumenin	1,19	1,05	2,28	2,07
205199_at	E1		carbonic anhydrase IX	2	1,64	4	3,12
221887_s_at	E1		CASK-interacting protein CIP98	1,81	0,75	3,52	1,68
210916_s_at	E1		CD44 antigen (homing function and Indian blood group system)	1,05	0,61	2,07	1,53
204170_s_at	E1		CDC28 protein kinase regulatory subunit 2	2,18	2,18	4,53	4,52
221520_s_at	E1		cell division cycle associated 8	2,62	2,82	6,13	7,07

Probe set ID	NHK-HPV18E1	NHK-HPV18wt	Gen Bezeichnung	MW SLR E1	MW SLR wt	Faktor* E1	Faktor* wt
204962_s_at	E1		centromere protein A, 17kDa	1,71	1,75	3,28	3,36
220885_s_at	E1		centromere protein J	1,12	1,17	2,18	2,25
221648_s_at	E1		CGI-146 protein	1,15	1,23	2,22	2,35
204470_at	E1		chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)	1,84	2,21	3,57	4,63
39966_at	E1		chondroitin sulfate proteoglycan 5 (neuroglycan C)	1,61	1,52	3,06	2,87
209257_s_at	E1		chondroitin sulfate proteoglycan 6 (bamacan)	1,12	1,2	2,17	2,29
204775_at	E1		chromatin assembly factor 1, subunit B (p60)	1,63	1,38	3,1	2,6
40359_at	E1		chromosome 11 open reading frame 13	1,04	0,73	2,06	1,66
207482_at	E1		chromosome 20 open reading frame 10	1,19	0,94	2,28	1,91
208879_x_at	E1		chromosome 20 open reading frame 14	1,21	1,01	2,31	2,02
50314_i_at	E1		chromosome 20 open reading frame 27	1,14	0,96	2,2	1,94
222045_s_at	E1		chromosome 20 open reading frame 67	1,63	0,87	3,1	1,83
218741_at	E1		chromosome 22 open reading frame 18	1,54	1,41	2,91	2,65
201774_s_at	E1		chromosome condensation-related SMC-associated protein 1	1,44	1,58	2,72	2,99
33132_at	E1		cleavage and polyadenylation specific factor 1, 160kDa	1,07	0,82	2,11	1,77
217749_at	E1		coatomer protein complex, subunit gamma	1,04	0,6	2,05	1,52
211966_at	E1		collagen, type IV, alpha 2	1,12	0,95	2,17	1,93
216879_at	E1		Consensus includes gb:X91103.1 /DEF=H.sapiens mRNA for Hr44 protein. /FEA=mRNA /GEN=hr44 /DB_XREF=gi:1054775 /UG=Hs.102131 Hr44 antigen	1,77	1,03	3,4	2,04
215329_s_at	E1		Contains the alternatively spliced gene for Matrix Metalloproteinase in the Female Reproductive tract MIFR1, -2, MMP2122A, -B and -C, a novel gene,	1,08	0,84	2,12	1,8
206788_s_at	E1		core-binding factor, beta subunit	1,41	1,13	2,65	2,18
204113_at	E1		CUG triplet repeat, RNA binding protein 1	1,2	0,98	2,3	1,98
212514_x_at	E1		DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, X-linked	1,18	0,81	2,27	1,76
205001_s_at	E1		DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, Y-linked	1,27	0,79	2,41	1,73
214017_s_at	E1		DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 34	1,18	0,42	2,27	1,34
209178_at	E1		DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 38	1,13	1,04	2,18	2,05
211255_x_at	E1		death effector domain containing	1,01	0,71	2,01	1,63
219000_s_at	E1		defective in sister chromatid cohesion homolog 1 (S. cerevisiae)	1,95	2,24	3,86	4,72
219113_x_at	E1		dehydrogenase/reductase (SDR family) member 10	1,66	1,36	3,15	2,56

Probe set ID	NHK-HPV18E1	NHK-HPV18wt	Gen Bezeichnung	MW SLR E1	MW SLR wt	Faktor* E1	Faktor* wt
214079_at	E1		dehydrogenase/reductase (SDR family) member 2	1,75	2,13	3,36	4,39
203764_at	E1		discs, large homolog 7 (Drosophila)	2,39	2,6	5,24	6,05
209927_s_at	E1		DKFZP547E1010 protein	1,17	1,05	2,24	2,07
217025_s_at	E1		drebrin 1	1,18	0,96	2,26	1,94
209675_s_at	E1		E1B-55kDa-associated protein 5	1,52	1,63	2,86	3,1
215458_s_at	E1		E3 ubiquitin ligase SMURF1	1,22	0,97	2,33	1,96
220363_s_at	E1		engulfment and cell motility 2 (ced-12 homolog, C. elegans)	2,34	1,34	5,06	2,54
201768_s_at	E1		enthoprotin	1,3	1,11	2,47	2,16
221056_x_at	E1		epidermal growth factor receptor substrate EPS15R	1,25	0,75	2,38	1,68
208624_s_at	E1		eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 1	1,12	0,89	2,18	1,86
201123_s_at	E1		eukaryotic translation initiation factor 5A	1,25	0,42	2,38	1,34
210011_s_at	E1		Ewing sarcoma breakpoint region 1	1,04	0,81	2,06	1,75
208459_s_at	E1		exportin 7	1,15	0,94	2,22	1,92
204817_at	E1		extra spindle poles like 1 (S. cerevisiae)	1,86	1,94	3,62	3,83
203564_at	E1		Fanconi anemia, complementation group G	2,05	2,34	4,15	5,08
204560_at	E1		FK506 binding protein 5	1,39	0,97	2,62	1,96
211299_s_at	E1		flotillin 2	1,33	1,06	2,51	2,09
202580_x_at	E1		forkhead box M1	2,47	2,56	5,56	5,88
206105_at	E1		fragile X mental retardation 2	1,17	0,91	2,26	1,88
206972_s_at	E1		G protein-coupled receptor 161	1,63	1,2	3,09	2,29
206173_x_at	E1		GA binding protein transcription factor, beta subunit 2, 47kDa	1,15	0,85	2,23	1,8
207352_s_at	E1		gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, beta 2	1,43	0,72	2,69	1,65
219704_at	E1		germ cell specific Y-box binding protein	1,32	0,97	2,49	1,96
219445_at	E1		glioma tumor suppressor candidate region gene 1	1,21	0,92	2,31	1,9
215794_x_at	E1		glutamate dehydrogenase 2	1,28	0,88	2,42	1,84
217509_x_at	E1		glutamate receptor, ionotropic, kainate 5	1,38	1,12	2,6	2,17
209945_s_at	E1		glycogen synthase kinase 3 beta	1	0,87	2	1,82
208473_s_at	E1		glycoprotein 2 (zymogen granule membrane)	1,31	1,05	2,48	2,07
33646_g_at	E1		GM2 ganglioside activator protein	1,13	0,63	2,19	1,54
202177_at	E1		growth arrest-specific 6	1,19	1	2,28	2
200744_s_at	E1		guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 1	1,03	0,82	2,05	1,77
221942_s_at	E1		guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3	1,03	1,11	2,05	2,16
217187_at	E1		H.sapiens (MAR11) MUC5AC mRNA for mucin (partial)	2,01	1,11	4,03	2,15

Probe set ID	NHK-HPV18E1	NHK-HPV18wt	Gen Bezeichnung	MW SLR E1	MW SLR wt	Faktor* E1	Faktor* wt
216971_s_at	E1		H.sapiens gene for plectin	1,42	0,63	2,67	1,55
217114_at	E1		H.sapiens gene for U5 snRNP-specific 200kD protein	1,01	0,62	2,02	1,54
202978_s_at	E1		HCF-binding transcription factor Zhangfei	2,24	1,78	4,73	3,45
211016_x_at	E1		heat shock 70kDa protein 4	1,18	1,05	2,27	2,07
210588_x_at	E1		heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3 (2H9)	1,18	1,07	2,26	2,1
205462_s_at	E1		hippocalcin-like 1	1,26	1,06	2,39	2,08
209192_x_at	E1		HIV-1 Tat interactive protein, 60kDa	1	0,81	2,01	1,75
208132_x_at	E1		HLA-B associated transcript 2	1,13	0,82	2,19	1,77
213318_s_at	E1		HLA-B associated transcript 3	1,06	0,74	2,09	1,67
202326_at	E1		HLA-B associated transcript 8	1,26	1,19	2,39	2,28
207353_s_at	E1		homeo box (H6 family) 1	1,35	1,13	2,54	2,19
212291_at	E1		homeodomain interacting protein kinase 1	1,49	0,88	2,81	1,84
210581_x_at	E1		Homo sapiens EWSZSG fusion protein long B isoform (EWSZSG fusion) mRNA, complete cds	1	0,73	1,99	1,66
207746_at	E1		Homo sapiens hypothetical LOC285283 (LOC285283), mRNA	1,18	0,85	2,27	1,81
220870_at	E1		Homo sapiens hypothetical protein PRO1598 (PRO1598)	1,59	1,39	3,01	2,63
206080_at	E1		Homo sapiens KIAA0450 gene product (KIA-A0450), mRNA	1,02	0,54	2,03	1,45
217369_at	E1		Homo sapiens partial IGVH3 gene for immu-noglobulin heavy chain V region, case 1	1,16	0,81	2,24	1,75
215780_s_at	E1		Homo sapiens, clone IMAGE:4420333, mRNA	1,01	0,89	2,01	1,86
216493_s_at	E1		Human DNA sequence from clone 497J21 on chromosome 6q26-27. C	1,7	1,38	3,24	2,61
217129_at	E1		Human DNA sequence from clone RP1-20N2 on chromosome 6q24. Contains the gene for a novel protein similar to yeast and bacterial cytosine deaminase, a possible pseudogene similar to part of Tubulin beta chain	1,7	1,33	3,25	2,51
217094_s_at	E1		Human DNA sequence from clone RP3-468O1 on chromosome 20 Contains ESTs, STSs, GSSs and CpG islands. Contains a gene for the atrophin 1 interacting protein 4 (AIP4), a ferredoxin 1 (FDX1) pseudogene	1,06	0,98	2,08	1,98
216952_s_at	E1		Human lamin B2 (LAMB2) gene and ppv1 gene sequence	1,73	1,55	3,32	2,93
217165_x_at	E1		Human metallothionein-If gene (hMT-If)	1,01	0,92	2,01	1,89
216855_s_at	E1		Human mRNA for tumor-associated 120 kDa nuclear protein p120, partial cds(carboxyl terminus).	1,56	1,17	2,95	2,25

Probe set ID	NHK-HPV18E1	NHK-HPV18wt	Gen Bezeichnung	MW SLR E1	MW SLR wt	Faktor* E1	Faktor* wt
204617_s_at	E1		hypothetical protein 24432	1,31	1,32	2,48	2,49
221849_s_at	E1		hypothetical protein BC002926	1,55	1,17	2,93	2,25
218815_s_at	E1		hypothetical protein FLJ10199	1,02	0,91	2,03	1,88
218073_s_at	E1		hypothetical protein FLJ10407	1,26	1,15	2,4	2,22
218787_x_at	E1		hypothetical protein FLJ10998	1,39	0,94	2,63	1,91
218051_s_at	E1		hypothetical protein FLJ12442	1,4	1,13	2,64	2,19
220730_at	E1		hypothetical protein FLJ12986	1,05	0,92	2,08	1,9
220283_at	E1		hypothetical protein FLJ13840	1,05	0,91	2,07	1,88
221685_s_at	E1		hypothetical protein FLJ20364	1,18	1,29	2,27	2,45
89977_at	E1		hypothetical protein FLJ20581	1,02	0,9	2,02	1,87
218749_s_at	E1		hypothetical protein FLJ22233	1,35	0,67	2,54	1,59
211823_s_at	E1		hypothetical protein FLJ23042	2,78	1,94	6,85	3,83
212529_at	E1		hypothetical protein FLJ30656	1,02	0,76	2,03	1,69
213548_s_at	E1		hypothetical protein H41	1,44	0,97	2,71	1,96
221435_x_at	E1		hypothetical protein HT036	1,21	1,25	2,32	2,38
213289_at	E1		hypothetical protein LOC340562	1,03	0,96	2,04	1,95
212279_at	E1		hypothetical protein MAC30	1,01	1,25	2,01	2,38
211767_at	E1		hypothetical protein MGC14799	1,27	1,09	2,41	2,12
219051_x_at	E1		hypothetical protein MGC2601	1,13	1,1	2,18	2,15
218903_s_at	E1		hypothetical protein MGC2731	1,29	1,23	2,44	2,35
219142_at	E1		hypothetical protein MGC2827	1,13	0,93	2,19	1,9
207458_at	E1		hypothetical protein MGC3113	1,04	0,74	2,06	1,67
203819_s_at	E1		IGF-II mRNA-binding protein 3	1,47	1,37	2,78	2,59
204626_s_at	E1		integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)	1,25	0,87	2,37	1,83
204989_s_at	E1		integrin, beta 4	1,53	1,04	2,89	2,05
211488_s_at	E1		integrin, beta 8	1,32	1,1	2,51	2,14
211405_x_at	E1		interferon, alpha 17	1,06	0,79	2,08	1,73
217805_at	E1		interleukin enhancer binding factor 3, 90kDa	1,09	0,94	2,13	1,92
210046_s_at	E1		isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+), mito-chondrial	1,07	0,9	2,1	1,87
209743_s_at	E1		itchy homolog E3 ubiquitin protein ligase (mouse)	1,09	0,93	2,13	1,9
201088_at	E1		karyopherin alpha 2 (RAG cohort 1, importin alpha 1)	1,76	1,8	3,38	3,47
209653_at	E1		karyopherin alpha 4 (importin alpha 3)	1,2	0,69	2,3	1,61
201596_x_at	E1		keratin 18	1,29	1,45	2,45	2,74
212832_s_at	E1		KIAA0097 gene product	1,3	1,24	2,46	2,36
212844_at	E1		KIAA0179	1,46	0,58	2,76	1,5
212776_s_at	E1		KIAA0657 protein	1,05	0,74	2,08	1,67

Probe set ID	NHK-HPV18E1	NHK-HPV18wt	Gen Bezeichnung	MW SLR E1	MW SLR wt	Faktor* E1	Faktor* wt
215672_s_at	E1		KIAA0828 protein	1,12	0,64	2,18	1,56
211410_x_at	E1		killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, long cytoplasmic tail, 5	1,72	0,82	3,31	1,76
202183_s_at	E1		kinesin family member 22	1,42	1,39	2,68	2,61
209680_s_at	E1		kinesin family member C1	2,12	2,84	4,35	7,17
206945_at	E1		lactase	1	0,76	2	1,69
202728_s_at	E1		latent transforming growth factor beta binding protein 1	1,45	0,13	2,74	1,1
219493_at	E1		likely ortholog of mouse Shc SH2-domain binding protein 1	2,22	2,47	4,65	5,54
215544_s_at	E1		likely ortholog of mouse ubiquitin conjugating enzyme 7 interacting protein 5	1,12	0,88	2,17	1,84
219884_at	E1		LIM homeobox 6	3,26	4,13	9,57	17,55
208190_s_at	E1		liver-specific bHLH-Zip transcription factor	1,12	0,96	2,17	1,94
202736_s_at	E1		LSM4 homolog, U6 small nuclear RNA associated (S. cerevisiae)	1,49	1,21	2,82	2,31
202107_s_at	E1		MCM2 minichromosome maintenance deficient 2, mitotin (S. cerevisiae)	1,86	1,96	3,64	3,9
215581_s_at	E1		MCM3 minichromosome maintenance deficient 3 (S. cerevisiae) associated protein	1,27	1,06	2,41	2,09
212141_at	E1		MCM4 minichromosome maintenance deficient 4 (S. cerevisiae)	1,67	1,67	3,18	3,18
219666_at	E1		membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6A	1,85	1,64	3,61	3,12
202016_at	E1		mesoderm specific transcript homolog (mouse)	1,53	1,73	2,89	3,32
202247_s_at	E1		metastasis associated 1	1,11	0,84	2,15	1,79
208633_s_at	E1		microtubule-actin crosslinking factor 1	1,07	0,79	2,09	1,73
202424_at	E1		mitogen-activated protein kinase kinase 2	1,14	0,8	2,2	1,74
211450_s_at	E1		mutS homolog 6 (E. coli)	1,9	1,77	3,73	3,4
203419_at	E1		myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 4	1,59	1,45	3,01	2,73
212365_at	E1		myosin IB	1,01	0,86	2,01	1,82
208452_x_at	E1		myosin IXB	1,04	0,84	2,05	1,79
214975_s_at	E1		myotubularin related protein 1	1,47	1,05	2,76	2,06
214268_s_at	E1		myotubularin related protein 4	1,09	0,96	2,13	1,95
221991_at	E1		neurexophilin 3	1,26	1,08	2,39	2,12
204105_s_at	E1		neuronal cell adhesion molecule	1,93	1,56	3,81	2,96
211139_s_at	E1		NGFI-A binding protein 1 (EGR1 binding protein 1)	1,21	1,06	2,32	2,08
201378_s_at	E1		NICE-4 protein	1,21	1,09	2,31	2,13
201969_at	E1		nuclear autoantigenic sperm protein (histone-binding)	1,12	0,98	2,17	1,98

Probe set ID	NHK-HPV18E1	NHK-HPV18wt	Gen Bezeichnung	MW SLR E1	MW SLR wt	Faktor* E1	Faktor* wt
205897_at	E1		nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 4	1,66	1,27	3,15	2,42
216248_s_at	E1		nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	1,29	1,4	2,45	2,64
205895_s_at	E1		nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1	1,13	1,04	2,19	2,05
203194_s_at	E1		nucleoporin 98kDa	1,1	1,01	2,14	2,01
206564_at	E1		opiate receptor-like 1	1,06	0,81	2,09	1,76
201799_s_at	E1		oxysterol binding protein	1,1	0,78	2,15	1,72
200906_s_at	E1		palladin	1	0,73	2	1,66
218045_x_at	E1		parathymosin	1,81	1,44	3,5	2,71
212092_at	E1		paternally expressed 10	1,68	1,67	3,19	3,17
207239_s_at	E1		PCTAIRE protein kinase 1	1,04	0,85	2,05	1,81
203096_s_at	E1		PDZ domain containing guanine nucleotide exchange factor (GEF) 1	1,08	0,99	2,11	1,98
209791_at	E1		peptidyl arginine deiminase, type II	1,31	0,99	2,49	1,99
211205_x_at	E1		phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type I, alpha	1,33	0,95	2,51	1,93
211580_s_at	E1		phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 3 (p55, gamma)	2,59	1,61	6,03	3,06
208447_s_at	E1		phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1	1,06	0,96	2,08	1,94
207717_s_at	E1		plakophilin 2	1,07	0,93	2,1	1,91
219510_at	E1		polymerase (DNA directed), theta	1,31	1,2	2,47	2,3
218866_s_at	E1		polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide K, 12.3 kDa	1,19	1,24	2,28	2,36
206099_at	E1		protein kinase C, eta	1,03	0,84	2,04	1,79
210543_s_at	E1		protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide	1,32	1,12	2,5	2,18
211159_s_at	E1		protein phosphatase 2, regulatory subunit B (B56), delta isoform	1,12	0,99	2,17	1,98
204521_at	E1		protein predicted by clone 23733	1,03	1,2	2,05	2,3
205868_s_at	E1		protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11 (Noonan syndrome 1)	1,22	0,96	2,33	1,95
200637_s_at	E1		protein tyrosine phosphatase, receptor type, F	1,27	0,95	2,41	1,93
202065_s_at	E1		protein tyrosine phosphatase, receptor type, f polypeptide (PTPRF), interacting protein (liprin), alpha 1	1,23	0,91	2,34	1,87
210191_s_at	E1		putative homeodomain transcription factor 1	1	0,85	2	1,81
215688_at	E1		Ras protein-specific guanine nucleotide-releasing factor 1	1,29	0,96	2,45	1,94
206383_s_at	E1		Ras-GTPase activating protein SH3 domain-binding protein 2	1,07	0,93	2,1	1,91
204802_at	E1		Ras-related associated with diabetes	1,56	1,24	2,95	2,35

Probe set ID	NHK-HPV18E1	NHK-HPV18wt	Gen Bezeichnung	MW SLR E1	MW SLR wt	Faktor* E1	Faktor* wt
211446_at	E1		regulator of G-protein signalling like 2	2,32	1,45	5	2,74
208947_s_at	E1		regulator of nonsense transcripts 1	1,08	0,83	2,11	1,78
204127_at	E1		replication factor C (activator 1) 3, 38kDa	1,74	1,87	3,34	3,66
216689_x_at	E1		Rho GTPase activating protein 1	1,05	0,73	2,07	1,66
202914_s_at	E1		Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 11	1,05	0,65	2,07	1,57
201204_s_at	E1		ribosome binding protein 1 homolog 180kDa (dog)	1,07	0,86	2,1	1,82
207939_x_at	E1		RNA binding protein S1, serine-rich domain	1,12	0,76	2,17	1,69
207223_s_at	E1		ROD1 regulator of differentiation 1 (S. pombe)	1,18	0,95	2,26	1,94
219499_at	E1		Sec61 alpha 2 subunit (S. cerevisiae)	1,14	1,04	2,21	2,05
215113_s_at	E1		sentrin/SUMO-specific protease 3	1,32	0,99	2,5	1,98
205214_at	E1		serine/threonine kinase 17b (apoptosis-inducing)	1,55	1,23	2,93	2,34
218711_s_at	E1		serum deprivation response (phosphatidylserine binding protein)	1,05	1,1	2,07	2,14
202199_s_at	E1		SFRS protein kinase 1	1,1	0,93	2,14	1,9
52940_at	E1		single Ig IL-1R-related molecule	1,15	1,03	2,22	2,04
217786_at	E1		SKB1 homolog (S. pombe)	1,02	0,94	2,03	1,91
201221_s_at	E1		small nuclear ribonucleoprotein 70kDa polypeptide (RNP antigen)	1,4	1,2	2,64	2,29
217785_s_at	E1		SNARE protein Ykt6	1,17	0,9	2,25	1,86
204087_s_at	E1		solute carrier family 5 (sodium-dependent vitamin transporter), member 6	1,08	1,23	2,12	2,34
206058_at	E1		solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, betaine/GABA), member 12	1,02	0,8	2,02	1,74
206566_at	E1		solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 1	1,16	0,91	2,24	1,87
208611_s_at	E1		spectrin, alpha, non-erythrocytic 1 (alpha-fodrin)	1,02	0,85	2,03	1,8
200672_x_at	E1		spectrin, beta, non-erythrocytic 1	1,12	0,93	2,17	1,9
219888_at	E1		sperm associated antigen 4	1,03	0,82	2,05	1,76
219257_s_at	E1		sphingosine kinase 1	1,53	1,34	2,88	2,52
201742_x_at	E1		splicing factor, arginine/serine-rich 1 (splicing factor 2, alternate splicing factor)	1,03	1	2,04	2
202775_s_at	E1		splicing factor, arginine/serine-rich 8 (suppressor-of-white-apricot homolog, Drosophila)	1,1	0,73	2,14	1,65
214178_s_at	E1		SRY (sex determining region Y)-box 2	1,14	0,96	2,2	1,95
204596_s_at	E1		stanniocalcin 1	1,15	0,91	2,22	1,88
212009_s_at	E1		stress-induced-phosphoprotein 1 (Hsp70/Hsp90-organizing protein)	1,43	1,18	2,69	2,26
200956_s_at	E1		structure specific recognition protein 1	1,09	1,07	2,12	2,11

Probe set ID	NHK-HPV18E1	NHK-HPV18wt	Gen Bezeichnung	MW SLR E1	MW SLR wt	Faktor* E1	Faktor* wt
201093_x_at	E1		succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)	1,14	1,13	2,2	2,2
203372_s_at	E1		suppressor of cytokine signaling 2	1,01	0,85	2,02	1,8
221845_s_at	E1		suppressor of potassium transport defect 3	1,67	1,28	3,19	2,43
217815_at	E1		suppressor of Ty 16 homolog (S. cerevisiae)	1,05	0,99	2,07	1,98
218619_s_at	E1		suppressor of variegation 3-9 homolog 1 (Drosophila)	1,05	0,87	2,07	1,83
215294_s_at	E1		SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 1	1,45	1,2	2,73	2,29
208793_x_at	E1		SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4	1,08	0,96	2,11	1,95
32402_s_at	E1		symplekin	1,47	1,18	2,77	2,26
217121_at	E1		tankyrase, TRF1-interacting ankyrin-related ADP-ribose polymerase	1,17	1,05	2,25	2,07
214840_at	E1		target of myb1-like 2 (chicken)	2,65	1,67	6,27	3,18
41037_at	E1		TEA domain family member 4	1,1	1,05	2,14	2,06
216262_s_at	E1		TGFB-induced factor 2 (TALE family homeobox)	1,11	1,14	2,16	2,21
209277_at	E1		tissue factor pathway inhibitor 2	1,34	1,57	2,54	2,96
203167_at	E1		tissue inhibitor of metalloproteinase 2	1,07	0,91	2,1	1,87
204946_s_at	E1		topoisomerase (DNA) III alpha	1,01	0,8	2,02	1,74
222301_at	E1		transcriptional activator of the c-fos promoter	1,04	0,89	2,06	1,86
202134_s_at	E1		transcriptional co-activator with PDZ-binding motif (TAZ)	1,18	0,75	2,26	1,69
206943_at	E1		transforming growth factor, beta receptor I (activin A receptor type II-like kinase, 53kDa)	1,26	0,99	2,39	1,98
212194_s_at	E1		transmembrane 9 superfamily protein member 4	1,1	0,81	2,14	1,75
218426_s_at	E1		TRIAD3 protein	1,03	0,68	2,05	1,61
200990_at	E1		tripartite motif-containing 28	1,02	0,86	2,03	1,82
206116_s_at	E1		tropomyosin 1 (alpha)	1,09	1,14	2,12	2,2
220341_s_at	E1		truncated calcium binding protein	1,27	1,28	2,41	2,42
208104_s_at	E1		TSC-22-like	1,31	1,02	2,49	2,03
209294_x_at	E1		tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	1,44	1,17	2,71	2,25
211300_s_at	E1		tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)	1,7	0,87	3,24	1,83
207382_at	E1		tumor protein p73-like	1,03	0,44	2,04	1,36
210317_s_at	E1		tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide	1,33	0,99	2,52	1,99

Probe set ID	NHK-HPV18E1	NHK-HPV18wt	Gen Bezeichnung	MW SLR E1	MW SLR wt	Faktor* E1	Faktor* wt
201020_at	E1		tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, eta poly-peptide	1,08	0,93	2,11	1,91
215905_s_at	E1		U5 snRNP-specific 40 kDa protein (hPrp8-binding)	1,23	1,02	2,35	2,03
201387_s_at	E1		ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 (ubiq-uitin thiolesterase)	1,01	1,05	2,02	2,07
213822_s_at	E1		ubiquitin protein ligase	1,02	0,89	2,03	1,85
208723_at	E1		ubiquitin specific protease 11	1,17	1,14	2,26	2,2
207211_at	E1		ubiquitin specific protease 2	1,23	1,09	2,34	2,13
203109_at	E1		ubiquitin-conjugating enzyme E2M (UBC12 homolog, yeast)	1,42	1,04	2,68	2,05
209825_s_at	E1		uridine monophosphate kinase	1,04	1	2,06	1,99
201796_s_at	E1		valyl-tRNA synthetase 2	1,55	0,85	2,92	1,81
214447_at	E1		v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 (avian)	1,58	1,17	3	2,25
201426_s_at	E1		vimentin	1,18	0,85	2,26	1,81
207788_s_at	E1		vinexin beta (SH3-containing adaptor mole-cule-1)	1,09	1,03	2,13	2,04
204798_at	E1		v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)	1,31	1,39	2,48	2,62
209592_s_at	E1		WD-repeat protein	1,19	0,96	2,28	1,95
217821_s_at	E1		WW domain binding protein 11	1,39	1,32	2,63	2,49
210301_at	E1		xanthine dehydrogenase	1,05	0,89	2,07	1,85
213124_at	E1		zinc finger protein 473	1,06	0,89	2,08	1,85
209428_s_at	E1		zinc finger protein-like 1	1,13	0,84	2,18	1,79
204752_x_at	E1	WT	ADP-ribosyltransferase (NAD+; poly(ADP-ribose) polymerase)-like 2	1,34	1,32	2,52	2,49
221232_s_at	E1	WT	ankyrin repeat domain 2 (stretch responsive muscle)	2,34	2,31	5,06	4,97
212020_s_at	E1	WT	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	1,53	1,64	2,88	3,11
218115_at	E1	WT	ASF1 anti-silencing function 1 homolog B (S. cerevisiae)	2,14	2,27	4,42	4,81
219918_s_at	E1	WT	asp (abnormal spindle)-like, microcephaly associated (Drosophila)	2,02	2,07	4,06	4,2
202873_at	E1	WT	ATPase, H+ transporting, lysosomal 42kDa, V1 subunit C, isoform 1	1,41	1,38	2,65	2,6
201242_s_at	E1	WT	ATPase, Na+/K+ transporting, beta 1 polypep-tide	1,04	1,23	2,06	2,34
209026_x_at	E1	WT	beta 5-tubulin	1,35	1,35	2,54	2,55
205345_at	E1	WT	BRCA1 associated RING domain 1	2,07	2	4,19	4,01
211851_x_at	E1	WT	breast cancer 1, early onset	1,36	1,52	2,56	2,86

Probe set ID	NHK-HPV18E1	NHK-HPV18wt	Gen Bezeichnung	MW SLR E1	MW SLR wt	Faktor* E1	Faktor* wt
209642_at	E1	WT	BUB1 budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog (yeast)	2,45	2,8	5,48	6,97
203755_at	E1	WT	BUB1 budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog beta (yeast)	2,29	2,59	4,88	6
221042_s_at	E1	WT	calmin (calponin-like, transmembrane)	1,1	1,36	2,15	2,56
200935_at	E1	WT	calreticulin	1,23	1,1	2,35	2,15
209939_x_at	E1	WT	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	1,32	1,27	2,5	2,41
202870_s_at	E1	WT	CDC20 cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)	2,41	2,57	5,31	5,94
203968_s_at	E1	WT	CDC6 cell division cycle 6 homolog (S. cerevisiae)	2,35	2,34	5,1	5,06
220295_x_at	E1	WT	cell cycle control protein SDP35	1,63	1,82	3,1	3,53
201853_s_at	E1	WT	cell division cycle 25B	1,73	1,77	3,32	3,42
221436_s_at	E1	WT	cell division cycle associated 3	2,18	2,37	4,54	5,18
205046_at	E1	WT	centromere protein E, 312kDa	3,07	3,37	8,41	10,31
207828_s_at	E1	WT	centromere protein F, 350/400ka (mitosin)	2,02	2,05	4,05	4,13
220026_at	E1	WT	chloride channel, calcium activated, family member 4	-1,24	-1,32	-2,37	-2,5
218542_at	E1	WT	chromosome 10 open reading frame 3	2,38	2,6	5,19	6,04
204047_s_at	E1	WT	chromosome 6 open reading frame 56	1,04	1,05	2,05	2,07
218662_s_at	E1	WT	chromosome condensation protein G	1,64	1,9	3,12	3,72
212801_at	E1	WT	citron (rho-interacting, serine/threonine kinase 21)	1,39	1,35	2,63	2,55
203418_at	E1	WT	cyclin A2	2,44	2,73	5,43	6,63
214710_s_at	E1	WT	cyclin B1	2,14	2,33	4,4	5,01
202705_at	E1	WT	cyclin B2	1,97	2,05	3,91	4,14
200952_s_at	E1	WT	cyclin D2	1,53	1,16	2,88	2,23
207039_at	E1	WT	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)	3,73	3,68	13,23	12,82
209714_s_at	E1	WT	cyclin-dependent kinase inhibitor 3 (CDK2-associated dual specificity phosphatase)	2	2,15	3,99	4,43
210764_s_at	E1	WT	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	1,26	1,05	2,4	2,07
219825_at	E1	WT	cytochrome P450 retinoid metabolizing protein	2,09	2,16	4,24	4,47
208149_x_at	E1	WT	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 11 (CHL1-like helicase homolog, S. cerevisiae)	1,15	1,18	2,21	2,27
207732_s_at	E1	WT	discs, large homolog 3 (neuroendocrine-dlg, Drosophila)	1,11	1,06	2,15	2,08
219502_at	E1	WT	DNA glycosylase hFPG2	1,59	1,88	3,01	3,69
204824_at	E1	WT	endonuclease G	1,31	1,22	2,49	2,33
201718_s_at	E1	WT	erythrocyte membrane protein band 4.1-like 2	2,28	2,15	4,85	4,44
204603_at	E1	WT	exonuclease 1	1,34	1,55	2,53	2,93

Probe set ID	NHK-HPV18E1	NHK-HPV18wt	Gen Bezeichnung	MW SLR E1	MW SLR wt	Faktor* E1	Faktor* wt
203805_s_at	E1	WT	Fanconi anemia, complementation group A	1,93	1,81	3,8	3,5
203184_at	E1	WT	fibrillin 2 (congenital contractural arachnodac-tyly)	1,36	1,43	2,56	2,69
204767_s_at	E1	WT	flap structure-specific endonuclease 1	1,79	1,84	3,46	3,58
209696_at	E1	WT	fructose-1,6-bisphosphatase 1	1,51	1,36	2,85	2,56
208460_at	E1	WT	gap junction protein, alpha 7, 45kDa (connexin 45)	1,62	1,54	3,07	2,9
212525_s_at	E1	WT	H2A histone family, member X	2,3	2,45	4,93	5,48
209113_s_at	E1	WT	high-mobility group 20B	1,72	1,3	3,3	2,46
202487_s_at	E1	WT	histone H2A.F/Z variant	1,57	1,56	2,97	2,95
220208_at	E1	WT	Homo sapiens chromosome 9 open reading frame 8 (C9ORF8), mRNA.	1,38	1,14	2,61	2,21
212126_at	E1	WT	Homo sapiens, clone IMAGE:5288883, mRNA	1,37	1,25	2,59	2,38
211725_s_at	E1	WT	Homo sapiens, clone MGC:4736, mRNA, complete cds	1,27	1,29	2,41	2,44
216548_x_at	E1	WT	Human DNA sequence from clone RP1-18C9 on chromosome 20	1,21	1,27	2,31	2,42
207165_at	E1	WT	hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM)	1,96	2,15	3,89	4,42
219611_s_at	E1	WT	hypothetical protein DKFZp434L0117	1,02	1,04	2,03	2,06
218726_at	E1	WT	hypothetical protein DKFZp762E1312	1,83	1,96	3,56	3,89
221591_s_at	E1	WT	hypothetical protein FLJ10156	1,71	1,79	3,28	3,45
213008_at	E1	WT	hypothetical protein FLJ10719	1,78	1,92	3,42	3,78
218814_s_at	E1	WT	hypothetical protein FLJ10874	1,27	1,18	2,41	2,26
219588_s_at	E1	WT	hypothetical protein FLJ20311	2,07	2,06	4,21	4,18
212925_at	E1	WT	hypothetical protein LOC126353	1,22	1,13	2,32	2,18
220011_at	E1	WT	hypothetical protein MGC2603	1,11	1,31	2,17	2,48
202859_x_at	E1	WT	interleukin 8	1,85	2,29	3,61	4,88
213446_s_at	E1	WT	IQ motif containing GTPase activating protein 1	1,17	1,02	2,24	2,02
202188_at	E1	WT	KIAA0095 gene product	1,78	1,77	3,44	3,42
202503_s_at	E1	WT	KIAA0101 gene product	1,56	1,68	2,96	3,19
204444_at	E1	WT	kinesin family member 11	1,97	2,08	3,91	4,23
206364_at	E1	WT	kinesin family member 14	1,92	2,12	3,78	4,33
221258_s_at	E1	WT	kinesin family member 18A	1,79	2	3,45	4
218755_at	E1	WT	kinesin family member 20A	2,38	2,5	5,21	5,64
209408_at	E1	WT	kinesin family member 2C	1,82	1,85	3,52	3,59
218355_at	E1	WT	kinesin family member 4A	1,85	1,93	3,6	3,81
219306_at	E1	WT	kinesin-like 7	1,55	1,65	2,94	3,14
218883_s_at	E1	WT	KSHV latent nuclear antigen interacting protein 1	1,7	1,6	3,25	3,02

Probe set ID	NHK-HPV18E1	NHK-HPV18wt	Gen Bezeichnung	MW SLR E1	MW SLR wt	Faktor* E1	Faktor* wt
204584_at	E1	WT	L1 cell adhesion molecule (hydrocephalus, stenosis of aqueduct of Sylvius 1, MASA (mental retardation, aphasia, shuffling gait and adducted thumbs) syndrome, spastic paraplegia 1)	2,32	2,62	5	6,13
210692_s_at	E1	WT	likely ortholog of mouse embryonic epithelial gene 1	1,56	1,64	2,95	3,12
204298_s_at	E1	WT	lysyl oxidase	1,55	1,42	2,94	2,67
210983_s_at	E1	WT	MCM7 minichromosome maintenance deficient 7 (S. cerevisiae)	1,89	1,9	3,71	3,74
203062_s_at	E1	WT	mediator of DNA damage checkpoint 1	1,57	1,55	2,97	2,92
213629_x_at	E1	WT	metallothionein 1F (functional)	1,02	1,02	2,03	2,03
204641_at	E1	WT	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 2	2,31	2,38	4,97	5,21
218039_at	E1	WT	nucleolar and spindle associated protein 1	2,38	2,51	5,2	5,68
216945_x_at	E1	WT	PAS domain containing serine/threonine kinase	1,41	1,48	2,66	2,79
209529_at	E1	WT	phosphatidic acid phosphatase type 2C	1,71	1,61	3,28	3,05
203554_x_at	E1	WT	pituitary tumor-transforming 1	1,48	1,52	2,8	2,87
202240_at	E1	WT	polo-like kinase (Drosophila)	1,65	1,7	3,14	3,26
203422_at	E1	WT	polymerase (DNA directed), delta 1, catalytic subunit 125kDa	1,69	1,5	3,23	2,83
213226_at	E1	WT	polymyositis/scleroderma autoantigen 1, 75kDa	2,26	2,51	4,79	5,7
207366_at	E1	WT	potassium voltage-gated channel, delayed-rectifier, subfamily S, member 1	1,45	1,62	2,74	3,08
205127_at	E1	WT	prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	1,53	1,25	2,88	2,38
218009_s_at	E1	WT	protein regulator of cytokinesis 1	2,54	2,6	5,82	6,08
204460_s_at	E1	WT	RAD1 homolog (S. pombe)	1,21	1,14	2,31	2,21
219494_at	E1	WT	RAD54B homolog	1,55	1,52	2,92	2,87
203696_s_at	E1	WT	replication factor C (activator 1) 2, 40kDa	1,45	1,35	2,74	2,56
203210_s_at	E1	WT	replication factor C (activator 1) 5, 36.5kDa	1,74	1,67	3,33	3,19
203022_at	E1	WT	ribonuclease H2, large subunit	1,84	1,84	3,58	3,58
201476_s_at	E1	WT	ribonucleotide reductase M1 polypeptide	1,25	1,21	2,38	2,31
210115_at	E1	WT	ribosomal protein L39-like	2,34	1,89	5,08	3,7
219143_s_at	E1	WT	RNase P protein subunit p25	1,48	1,56	2,79	2,95
220239_at	E1	WT	SBBI26 protein	1,34	1,44	2,53	2,7
201427_s_at	E1	WT	selenoprotein P, plasma, 1	-2,77	-3,09	-6,82	-8,53
204887_s_at	E1	WT	serine/threonine kinase 18	2,3	2,22	4,92	4,67
204092_s_at	E1	WT	serine/threonine kinase 6	2,43	2,43	5,39	5,39

Probe set ID	NHK-HPV18E1	NHK-HPV18wt	Gen Bezeichnung	MW SLR E1	MW SLR wt	Faktor* E1	Faktor* wt
201663_s_at	E1	WT	SMC4 structural maintenance of chromosomes 4-like 1 (yeast)	1,63	1,78	3,09	3,42
203125_x_at	E1	WT	solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 2	1,22	1,24	2,32	2,36
203145_at	E1	WT	sperm associated antigen 5	1,79	1,76	3,45	3,39
210567_s_at	E1	WT	S-phase kinase-associated protein 2 (p45)	1,84	1,8	3,59	3,47
213649_at	E1	WT	splicing factor, arginine/serine-rich 7, 35kDa	1,15	1,04	2,23	2,06
217714_x_at	E1	WT	stathmin 1/oncoprotein 18	1,57	1,72	2,98	3,28
212845_at	E1	WT	sterile alpha motif domain containing 4	1,4	1,29	2,65	2,44
205691_at	E1	WT	synaptogyrin 3	3,3	3,09	9,86	8,49
209114_at	E1	WT	tetraspan 1	1,1	1,04	2,15	2,05
213334_x_at	E1	WT	three prime repair exonuclease 2	1,28	1,27	2,43	2,41
201108_s_at	E1	WT	thrombospondin 1	1,42	1,52	2,68	2,87
202589_at	E1	WT	thymidylate synthetase	1,75	1,89	3,36	3,7
209753_s_at	E1	WT	thymopoietin	1,73	1,67	3,32	3,18
204033_at	E1	WT	thyroid hormone receptor interactor 13	1,71	1,89	3,28	3,72
219148_at	E1	WT	T-LAK cell-originated protein kinase	1,79	2,17	3,46	4,51
201291_s_at	E1	WT	topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa	2,31	2,51	4,95	5,68
210052_s_at	E1	WT	TPX2, microtubule-associated protein homolog (Xenopus laevis)	2,34	2,65	5,05	6,29
218308_at	E1	WT	transforming, acidic coiled-coil containing protein 3	3,53	3,34	11,54	10,1
218786_at	E1	WT	TU12B1-TY protein	1,03	1,09	2,05	2,13
212639_x_at	E1	WT	Tubulin, alpha, brain-specific	1,02	1,01	2,03	2,01
201090_x_at	E1	WT	tubulin, alpha, ubiquitous	1,16	1,12	2,24	2,18
208977_x_at	E1	WT	tubulin, beta, 2	1,15	1,15	2,22	2,22
206467_x_at	E1	WT	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6b, decoy	1,18	1,27	2,27	2,41
205694_at	E1	WT	tyrosinase-related protein 1	-4,17	-4,19	-17,96	-18,22
202779_s_at	E1	WT	ubiquitin carrier protein	2,09	2,26	4,25	4,79
205356_at	E1	WT	ubiquitin specific protease 13 (isopeptidase T-3)	1,11	1,26	2,16	2,4
202954_at	E1	WT	ubiquitin-conjugating enzyme E2C	2,23	2,23	4,69	4,7
220617_s_at	E1	WT	zinc finger protein	1,57	1,34	2,97	2,53
203059_s_at		WT	3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2	0,93	1,16	1,91	2,23
209765_at		WT	a disintegrin and metalloproteinase domain 19 (meltrin beta)	1,45	1,43	2,73	2,69
205180_s_at		WT	a disintegrin and metalloproteinase domain 8	2,42	2,3	5,35	4,92
202672_s_at		WT	activating transcription factor 3	1,34	1,23	2,53	2,35
209891_at		WT	AD024 protein	1,32	1,68	2,5	3,2

Probe set ID	NHK-HPV18E1	NHK-HPV18wt	Gen Bezeichnung	MW SLR E1	MW SLR wt	Faktor* E1	Faktor* wt
204498_s_at		WT	adenylate cyclase 9	1,72	1,71	3,29	3,27
205640_at		WT	aldehyde dehydrogenase 3 family, member B1	1,78	1,85	3,43	3,61
221134_at		WT	angiopoietin 4	1,16	1,72	2,23	3,29
206632_s_at		WT	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3B	2,86	3,09	7,26	8,51
221241_s_at		WT	apoptosis regulator BCL-G	1,45	1,47	2,73	2,77
220658_s_at		WT	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like 2	1,13	1,08	2,19	2,11
209135_at		WT	aspartate beta-hydroxylase	1,08	1,07	2,11	2,1
202685_s_at		WT	AXL receptor tyrosine kinase	1,05	1,6	2,08	3,02
212949_at		WT	barren homolog (Drosophila)	2,72	3,01	6,59	8,06
204493_at		WT	BH3 interacting domain death agonist	1,17	1,36	2,25	2,57
205575_at		WT	C1q-related factor	0,98	1,2	1,97	2,3
218384_at		WT	calcium regulated heat stable protein 1, 24kDa	1,75	1,66	3,36	3,16
201615_x_at		WT	caldesmon 1	0,74	1,03	1,67	2,04
203634_s_at		WT	carnitine palmitoyltransferase 1A (liver)	2,04	2,01	4,11	4,03
38521_at		WT	CD22 antigen	1,08	1,44	2,11	2,71
206485_at		WT	CD5 antigen (p56-62)	1,27	1,93	2,41	3,81
201896_s_at		WT	CDC28 protein kinase regulatory subunit 1B	1,32	1,43	2,49	2,69
204126_s_at		WT	CDC45 cell division cycle 45-like (S. cerevisiae)	2,45	2,68	5,46	6,41
204510_at		WT	CDC7 cell division cycle 7 (S. cerevisiae)	1,33	1,37	2,51	2,58
203213_at		WT	cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	2,34	2,56	5,05	5,91
205167_s_at		WT	cell division cycle 25C	1,45	1,47	2,73	2,77
209501_at		WT	cerebellar degeneration-related protein 2, 62kDa	1,35	1,32	2,55	2,5
213096_at		WT	cerebral protein 11	1,2	1,25	2,3	2,38
204533_at		WT	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	0,93	1,16	1,91	2,23
221058_s_at		WT	chemokine-like factor	1,18	1,29	2,27	2,45
210416_s_at		WT	CHK2 checkpoint homolog (S. pombe)	1,03	1,02	2,04	2,03
206703_at		WT	cholinergic receptor, nicotinic, beta polypeptide 1 (muscle)	1,41	1,22	2,66	2,33
203976_s_at		WT	chromatin assembly factor 1, subunit A (p150)	2,23	2,23	4,68	4,71
218094_s_at		WT	chromosome 20 open reading frame 35	1,38	1,24	2,6	2,36
201428_at		WT	claudin 4	1,57	1,64	2,97	3,12
209101_at		WT	connective tissue growth factor	1,26	1,31	2,39	2,48
213523_at		WT	cyclin E1	1,41	1,2	2,66	2,3
205676_at		WT	cytochrome P450, family 27, subfamily B, polypeptide 1	0,99	1,11	1,99	2,16

Probe set ID	NHK-HPV18E1	NHK-HPV18wt	Gen Bezeichnung	MW SLR E1	MW SLR wt	Faktor* E1	Faktor* wt
220331_at		WT	cytochrome P450, family 46, subfamily A, polypeptide 1	0,99	1,31	1,99	2,48
201678_s_at		WT	DC12 protein	1,15	1,07	2,22	2,1
221521_s_at		WT	DNA replication complex GINS protein PSF2	1,67	1,98	3,18	3,94
218758_s_at		WT	DNA segment on chromosome 21 (unique) 2056 expressed sequence	1,6	2,23	3,03	4,69
204014_at		WT	dual specificity phosphatase 4	0,99	1,2	1,99	2,3
209457_at		WT	dual specificity phosphatase 5	1,96	1,83	3,89	3,56
207767_s_at		WT	early growth response 4	1,2	1,33	2,3	2,51
201340_s_at		WT	ectodermal-neural cortex (with BTB-like domain)	1,12	1,25	2,17	2,38
204642_at		WT	endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 1	0,95	1,18	1,93	2,27
200879_s_at		WT	endothelial PAS domain protein 1	1,53	1,22	2,89	2,33
201984_s_at		WT	epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog, avian)	1,6	1,29	3,03	2,45
208614_s_at		WT	filamin B, beta (actin binding protein 278)	1,41	1,2	2,65	2,29
219117_s_at		WT	FK506 binding protein 11, 19 kDa	0,89	1,06	1,85	2,08
219544_at		WT	FLJ22624 protein	1,25	1,34	2,38	2,53
204437_s_at		WT	folate receptor 1 (adult)	0,97	1,08	1,96	2,11
204948_s_at		WT	follistatin	1,34	1,45	2,52	2,72
208782_at		WT	follistatin-like 1	1,16	1,31	2,23	2,48
206912_at		WT	forkhead box E1 (thyroid transcription factor 2)	1,44	1,61	2,71	3,05
210299_s_at		WT	four and a half LIM domains 1	0,99	1,1	1,99	2,14
220131_at		WT	FXYD domain containing ion transport regulator 7	1,58	1,94	2,99	3,84
211865_s_at		WT	Fzr1 protein	1,16	1,02	2,23	2,03
211040_x_at		WT	G-2 and S-phase expressed 1	1,51	1,55	2,86	2,92
203986_at		WT	genethonin 1	1,29	1,37	2,45	2,58
205042_at		WT	glucosamine (UDP-N-acetyl)-2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase	1,69	1,68	3,23	3,2
205505_at		WT	glucosaminyl (N-acetyl) transferase 1, core 2 (beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase)	1,61	1,33	3,05	2,51
203159_at		WT	glutaminase	1,03	1,05	2,04	2,07
215975_x_at		WT	glycerol kinase	1,59	1,81	3,01	3,51
210425_x_at		WT	golgin-67	1,03	1,01	2,04	2,01
213560_at		WT	growth arrest and DNA-damage-inducible, beta	1,18	1,31	2,27	2,48
205184_at		WT	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 4	1,29	1,21	2,45	2,31
218706_s_at		WT	HCV NS3-transactivated protein 2	1,79	1,51	3,46	2,85

Probe set ID	NHK-HPV18E1	NHK-HPV18wt	Gen Bezeichnung	MW SLR E1	MW SLR wt	Faktor* E1	Faktor* wt
211930_at		WT	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	1,22	1,13	2,33	2,19
215875_at		WT	Homo sapiens cDNA: FLJ23167 fis, clone LNG09902	0,85	1,01	1,8	2,01
213788_s_at		WT	Homo sapiens clone 23718 mRNA sequence	0,81	1,09	1,75	2,13
213839_at		WT	Homo sapiens mRNA, chromosome 1 specific transcript KIAA0500.	0,91	1,21	1,88	2,31
213378_s_at		WT	Homo sapiens similar to DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 11; DEAD/H box-11 (CHL1-related helicase gene-1); yeast CHL1 homolog (LOC338812), mRNA	1,1	1,21	2,14	2,31
215708_s_at		WT	Homo sapiens transcribed sequence with strong similarity to protein sp:P49643 (H.sapiens) PRI2_HUMAN DNA primase large subunit (DNA primase 58 kDa subunit) (P58)	1,7	1,43	3,25	2,69
215754_at		WT	Homo sapiens transcribed sequences	1,28	1,46	2,43	2,75
203644_s_at		WT	HSV-1 stimulation-related gene 1	0,98	1,04	1,97	2,06
213094_at		WT	Human DNA sequence from clone 287G14 on chromosome 6q23.1-24.3.	1,25	1,09	2,38	2,13
211538_s_at		WT	Human heat shock protein mRNA, complete cds	1,08	1,16	2,11	2,23
210987_x_at		WT	Human tropomyosin mRNA, complete cds	0,95	1,05	1,93	2,07
221823_at		WT	hypothetical gene supported by AF038182; BC009203	1,08	1,07	2,11	2,1
221031_s_at		WT	hypothetical protein DKFZp434F0318	1,3	1,46	2,46	2,75
218349_s_at		WT	hypothetical protein FLJ10036	1,66	1,93	3,16	3,81
222109_at		WT	hypothetical protein FLJ10613	0,95	1,13	1,93	2,19
201917_s_at		WT	hypothetical protein FLJ10618	1,19	1,14	2,29	2,2
218627_at		WT	hypothetical protein FLJ11259	1,19	1,02	2,28	2,03
215068_s_at		WT	hypothetical protein FLJ11467	1,24	1,14	2,36	2,2
220466_at		WT	hypothetical protein FLJ13215	1,21	1,22	2,31	2,33
218719_s_at		WT	hypothetical protein FLJ13912	1,16	1,24	2,23	2,36
219650_at		WT	hypothetical protein FLJ20105	1,49	1,74	2,81	3,34
219093_at		WT	hypothetical protein FLJ20701	1,37	1,2	2,58	2,3
220274_at		WT	hypothetical protein FLJ22527	0,9	1,05	1,87	2,07
219221_at		WT	hypothetical protein FLJ35036	1	1,05	2	2,07
219569_s_at		WT	hypothetical protein MGC3295	1	1,06	2	2,08
210054_at		WT	hypothetical protein MGC4701	0,89	1,01	1,85	2,01
217235_x_at		WT	Immunoglobulin light chain lambda variable region [Homo sapiens], mRNA sequence	1,38	1,34	2,6	2,53
213785_at		WT	importin 9	1,71	1,57	3,27	2,97
209184_s_at		WT	insulin receptor substrate 2	1,19	1,04	2,28	2,06
221004_s_at		WT	integral membrane protein 2C	1,25	1,26	2,38	2,39

Probe set ID	NHK-HPV18E1	NHK-HPV18wt	Gen Bezeichnung	MW SLR E1	MW SLR wt	Faktor* E1	Faktor* wt
201389_at		WT	integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)	1,34	1,09	2,53	2,13
215485_s_at		WT	intercellular adhesion molecule 1 (CD54), human rhinovirus receptor	1,11	1,61	2,16	3,04
202597_at		WT	interferon regulatory factor 6	1,12	1,07	2,17	2,1
205842_s_at		WT	Janus kinase 2 (a protein tyrosine kinase)	0,66	1,01	1,58	2,01
213574_s_at		WT	karyopherin (importin) beta 1	1,46	1,25	2,74	2,39
208784_s_at		WT	kelch domain containing 3	1,27	1,08	2,41	2,11
217124_at		WT	KIAA1023 protein	1,06	1,14	2,08	2,2
219763_at		WT	KIAA1608 protein	0,89	1,06	1,85	2,08
206316_s_at		WT	kinetochore associated 1	2,04	2,13	4,11	4,38
201505_at		WT	laminin, beta 1	1,12	1,05	2,17	2,07
203294_s_at		WT	lectin, mannose-binding, 1	1,19	1,48	2,28	2,79
203207_s_at		WT	likely ortholog of chicken chondrocyte protein with a poly-proline region	0,99	1,06	1,99	2,08
218574_s_at		WT	LIM and cysteine-rich domains 1	1,11	1,04	2,16	2,06
204825_at		WT	maternal embryonic leucine zipper kinase	1,77	1,86	3,41	3,63
220651_s_at		WT	MCM10 minichromosome maintenance deficient 10 (S. cerevisiae)	1,61	1,82	3,05	3,53
216237_s_at		WT	MCM5 minichromosome maintenance deficient 5, cell division cycle 46 (S. cerevisiae)	2,23	2,2	4,69	4,59
212012_at		WT	Melanoma associated gene	1,83	1,98	3,54	3,96
209086_x_at		WT	melanoma cell adhesion molecule	1,25	1,36	2,37	2,57
212858_at		WT	membrane-associated tyrosine- and threonine-specific cdc2-inhibitory kinase	1,41	1,34	2,66	2,54
213764_s_at		WT	Microfibril-associated glycoprotein-2	2,16	2,27	4,47	4,83
207233_s_at		WT	microphthalmia-associated transcription factor	1,01	1,07	2,01	2,1
202501_at		WT	microtubule-associated protein, RP/EB family, member 2	1,34	1,28	2,53	2,43
205235_s_at		WT	M-phase phosphoprotein 1	1,79	1,93	3,46	3,81
205395_s_at		WT	MRE11 meiotic recombination 11 homolog A (S. cerevisiae)	1,06	1,21	2,08	2,31
213067_at		WT	myosin, heavy polypeptide 10, non-muscle	0,9	1,01	1,87	2,01
202944_at		WT	N-acetylgalactosaminidase, alpha-	1,29	1,14	2,45	2,2
206023_at		WT	neuromedin U	2,11	2,21	4,32	4,63
213116_at		WT	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 3	1,08	1,22	2,11	2,33
209731_at		WT	nth endonuclease III-like 1 (E. coli)	0,99	1,03	1,99	2,04
218768_at		WT	nuclear pore complex protein	1,24	1,35	2,36	2,55
219007_at		WT	nucleoporin 43kDa	1,12	1,21	2,17	2,31
213568_at		WT	odd-skipped-related 2A protein	2,4	2,1	5,28	4,29

Probe set ID	NHK-HPV18E1	NHK-HPV18wt	Gen Bezeichnung	MW SLR E1	MW SLR wt	Faktor* E1	Faktor* wt
202759_s_at		WT	paralemmin 2	1,54	1,41	2,92	2,66
222185_at		WT	PBX/knotted 1 homeobox 2	0,72	1,16	1,65	2,23
215247_at		WT	pinch-2	1,45	1,53	2,73	2,89
211668_s_at		WT	plasminogen activator, urokinase	1,4	1,31	2,64	2,48
210845_s_at		WT	plasminogen activator, urokinase receptor	1,39	1,52	2,62	2,86
213677_s_at		WT	PMS1 postmeiotic segregation increased 1 (S. cerevisiae)	1,01	1,2	2,01	2,3
214443_at		WT	poliovirus receptor	1,14	1	2,2	2
213007_at		WT	polymerase (DNA directed), gamma	1,62	1,76	3,07	3,39
212188_at		WT	potassium channel tetramerisation domain containing 12	0,57	1,29	1,48	2,45
58916_at		WT	potassium channel tetramerisation domain containing 14	0,67	1,05	1,59	2,07
221125_s_at		WT	potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M beta member 3	0,41	1,19	1,33	2,28
215821_x_at		WT	pregnancy specific beta-1-glycoprotein 3	1,48	1,26	2,79	2,39
205053_at		WT	primase, polypeptide 1, 49kDa	0,98	1,16	1,97	2,23
202619_s_at		WT	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase (lysine hydroxylase) 2	1,3	1,34	2,46	2,53
207938_at		WT	protease inhibitor 15	1	1,09	2	2,13
218273_s_at		WT	protein phosphatase 2C, magnesium-dependent, catalytic subunit	1,04	1,12	2,06	2,17
50965_at		WT	RAB26, member RAS oncogene family	0,85	1,03	1,8	2,04
200607_s_at		WT	RAD21 homolog (S. pombe)	1,37	1,35	2,58	2,55
204023_at		WT	replication factor C (activator 1) 4, 37kDa	1,6	1,65	3,03	3,14
209773_s_at		WT	ribonucleotide reductase M2 polypeptide	2,37	2,68	5,17	6,41
204668_at		WT	ring finger protein 24	1,09	1,09	2,13	2,13
201462_at		WT	secernin 1	1,12	1,08	2,17	2,11
211157_at		WT	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cyto-plasmic domain, (semaphorin) 4F	0,75	1,05	1,68	2,07
209723_at		WT	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 9	1,12	1,42	2,17	2,68
204068_at		WT	serine/threonine kinase 3 (STE20 homolog, yeast)	1,1	1,05	2,14	2,07
208607_s_at		WT	serum amyloid A2	2,61	2,46	6,08	5,52
220979_s_at		WT	sialyltransferase 7 ((alpha-N-acetylneuraminyl-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetyl galactosa-minide alpha-2,6-sialyltransferase) E	1,41	1,52	2,66	2,87
214060_at		WT	single-stranded DNA binding protein 1	1,05	1,24	2,07	2,36
201996_s_at		WT	SMART/HDAC1 associated repressor protein	1	1,04	2	2,06

Probe set ID	NHK-HPV18E1	NHK-HPV18wt	Gen Bezeichnung	MW SLR E1	MW SLR wt	Faktor* E1	Faktor* wt
204240_s_at		WT	SMC2 structural maintenance of chromosomes 2-like 1 (yeast)	1,77	1,78	3,41	3,43
212926_at		WT	SMC5 structural maintenance of chromosomes 5-like 1 (yeast)	1,1	1,19	2,14	2,28
207390_s_at		WT	smoothelin	1,26	1,05	2,39	2,08
205243_at		WT	solute carrier family 13 (sodium-dependent dicarboxylate transporter), member 3	0,65	1,68	1,57	3,2
206628_at		WT	solute carrier family 5 (sodium/glucose co-transporter), member 1	1,25	1,16	2,38	2,23
209736_at		WT	SRY (sex determining region Y)-box 13	1,35	2,04	2,55	4,11
221477_s_at		WT	superoxide dismutase 2, mitochondrial	1,55	1,5	2,93	2,83
203019_x_at		WT	synovial sarcoma, X breakpoint 2 interacting protein	1,06	1,08	2,08	2,11
39318_at		WT	T-cell leukemia/lymphoma 1A	1,1	1,28	2,14	2,43
202338_at		WT	thymidine kinase 1, soluble	1,67	1,85	3,18	3,61
211899_s_at		WT	TNF receptor-associated factor 4	1,41	1,25	2,66	2,38
221016_s_at		WT	transcription factor 7-like 1 (T-cell specific, HMG-box)	1,2	1,15	2,3	2,22
217437_s_at		WT	transforming, acidic coiled-coil containing protein 1	1,37	1,39	2,58	2,62
209386_at		WT	transmembrane 4 superfamily member 1	1,3	1,34	2,46	2,53
204519_s_at		WT	transmembrane 4 superfamily member 11 (plasmolipin)	1,03	1,19	2,04	2,28
218477_at		WT	transmembrane protein 14A	1	1,18	2	2,27
214955_at		WT	transmembrane serine protease 6	1,29	1,32	2,45	2,5
202384_s_at		WT	Treacher Collins-Franceschetti syndrome 1	1,09	1,36	2,13	2,57
204649_at		WT	trophinin associated protein (tastin)	1,09	1,24	2,13	2,36
204822_at		WT	TTK protein kinase	2,2	2,43	4,59	5,39
206508_at		WT	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 7	2,38	2,58	5,21	5,98
202643_s_at		WT	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	1,8	1,85	3,49	3,59
200598_s_at		WT	tumor rejection antigen (gp96) 1	1,14	1,24	2,2	2,36
217799_x_at		WT	ubiquitin-conjugating enzyme E2H (UBC8 homolog, yeast)	1,22	1,18	2,33	2,27
219555_s_at		WT	uncharacterized bone marrow protein BM039	2,6	3,04	6,06	8,22
210053_at		WT	upregulated during skeletal muscle growth 5	1,39	1,43	2,62	2,69
206411_s_at		WT	v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 2 (arg, Abelson-related gene)	1,02	1,04	2,03	2,06
205193_at		WT	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma onco-gene homolog F (avian)	1,6	1,34	3,03	2,53
202626_s_at		WT	v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog	1,14	1,35	2,2	2,55

Probe set ID	NHK-HPV18E1	NHK-HPV18wt	Gen Bezeichnung	MW SLR E1	MW SLR wt	Faktor* E1	Faktor* wt
216228_s_at		WT	WD repeat and HMG-box DNA binding protein 1	1,79	1,81	3,46	3,51
38964_r_at		WT	Wiskott-Aldrich syndrome (eczema-thrombocytopenia)	0,94	1,11	1,92	2,16
209053_s_at		WT	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1	2,65	2,52	6,29	5,73
215848_at		WT	zinc finger protein 291	0,89	1,05	1,85	2,07
203521_s_at		WT	zinc finger protein 318	1,4	1,28	2,64	2,43
214900_at		WT	zinc finger protein 36 (KOX 18)	0,77	1,04	1,71	2,06
207699_at		WT	zinc finger protein 409	1,09	1,27	2,13	2,41

Tabelle 10

3.5.4 Vergleich der Transkriptionsprofile von HPV18wt- mit HPV18E1mt-haltigen Zellen

Der direkte Vergleich der NHK-HPV18wt Datensätze mit den NHK-HPV18E1-Datensätzen zeigte, dass nur fünf Gene unterschiedlich reguliert waren. Auffallend ist, dass diese fünf Gene nur schwach reguliert sind (max. SLR 1,54). Zudem waren die Signalstärken von LTBP1, ITM2A, MADH3 (SMAD3), und GRIP2 sehr niedrig im Vergleich zum minimalen Referenzwert von 64,25 (spiked control AFFX-BioB-3). Die niedrigen Werte waren vermutlich mit ein Grund, warum diese Gene in der Significance Analysis of Microarrays (SAM) nicht gefunden wurden.

Probe set ID	Gene Symbol	Gene Title	MW SLR (Faktor)	StdDev SLR	MW SLRlow	MW SLRhigh	MW SIGNAL E1	MW SIGNAL wt
201123_s_at	EIF5A	eukaryotic translation initiation factor 5A	1.13 (2,19x)	1.00	0.87	1.11	1975.5	791.4
202728_s_at	LTBP1	latent transforming growth factor beta binding protein 1	1.54 (2,91x)	0.64	0.91	0.97	116.8	34.3
202747_s_at	ITM2A	integral membrane protein 2A	1.46 (2,75x)	0.80	0.65	0.95	124.8	33.7
205397_x_at	MADH3 (SMAD3)	MAD, mothers against decapentaplegic homolog 3 (Drosophila)	1.15 (2,22x)	1.03	0.65	1.24	114.9	37.8
216481_at	GRIP2	glutamate receptor interacting protein 2	1.41 (2;66x)	1.27	0.72	1.56	113.5	34.9

Tabelle 11: Fünf auffällige Gene im direkten Vergleich der NHK-HPV18wt Datensätze mit den NHK-HPV18E1 Datensätzen

3.6 Immunologischer Nachweis ausgewählter deregulierter Gene

Im Folgenden sollte überprüft werden, ob sich die veränderten Transkriptmengen ausgewählter Gene auch in der Menge an Protein wiederspiegelt. Hierzu wurden Gesamtproteinextrakte hergestellt und die Zielproteine in Westernblotanalysen mit geeigneten Antikörpern nachgewiesen. Wie in Abb. 16 zu sehen ist, wurden mit Hilfe des FluorS-Max Imagers® die Chemilumineszenzsignale quantifiziert und auf das Signal von α–Tubulin abgeglichen. Für MCM7 wurde, wie auf dem Microarray für die Transkripte, in NHK-HPV18wt und in NHK-HPV18E1 eine 5- bzw. 4-fach erhöhte Proteinmenge nachgewiesen. CDC2 und p16 zeigten höhere Proteinmengen in den HPV18E1-Zelllinien (CDC2 9,5x/p16 26x) als in den NHK-HPV18wt-Zelllinien (CDC2 6,6x / p16 9,0x) und waren gegenüber normalen Keratinozyten deutlich erhöht. Zusätzlich wurden die Proteinmengen von STAT1 im gleichen Ausmaß (-2 x) in den NHK-HPV18wt und NHK-HPV 18E1 reduziert.

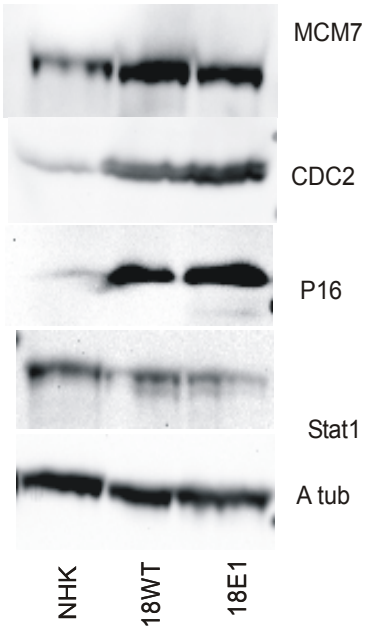


Abbildung 16: Western Blot Analyse

Gesamtzellextrakte wurden im SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt, auf Westran Nitrocellulosemembranen (0,2 µm) transferiert und mit entsprechenden Erstantikörpern inkubiert. Die entsprechenden Zweitantikörper wurden in einer 1:10000 fachen Verdünnung verwendet. Als Substrat für die Peroxidasereaktion wurden Supersignal Dura bzw. Femto Perbio Science verwendet. Die Detektion und die Daten Analyse erfolgte mit dem BioRad Fluor-S-Max Detektion System und mit der Quantity One Software.

3.7 Validierung der veränderten Expression ausgewählter Gene durch quantitative Echtzeit-PCR

Die Validierung der Microarraydaten erfolgte über die qPCR Analyse mit verschiedenen Primerpaaren. Die Amplikons wurden, soweit möglich, so gewählt, dass die beiden Primer in unterschiedlichen Exons lokalisiert waren, um spezifisch Transkripte und nicht potentiell kontaminierende DNA zu detektieren. Die relativen Transkriptmengen wurden mit der ΔΔCT-Methode (Applied Biosystems, 1999) mit HPRT (hypoxanthine phosphoribosyltransferase) bzw. β-Actin als Housekeeping-Gen bestimmt und sind bezogen auf die Expression in normalen Keratinozyten.

3.7.1 Validierung der veränderten Genexpression des Vergleichs von NHK-HPV18E1 mit NHK-HPV18wt

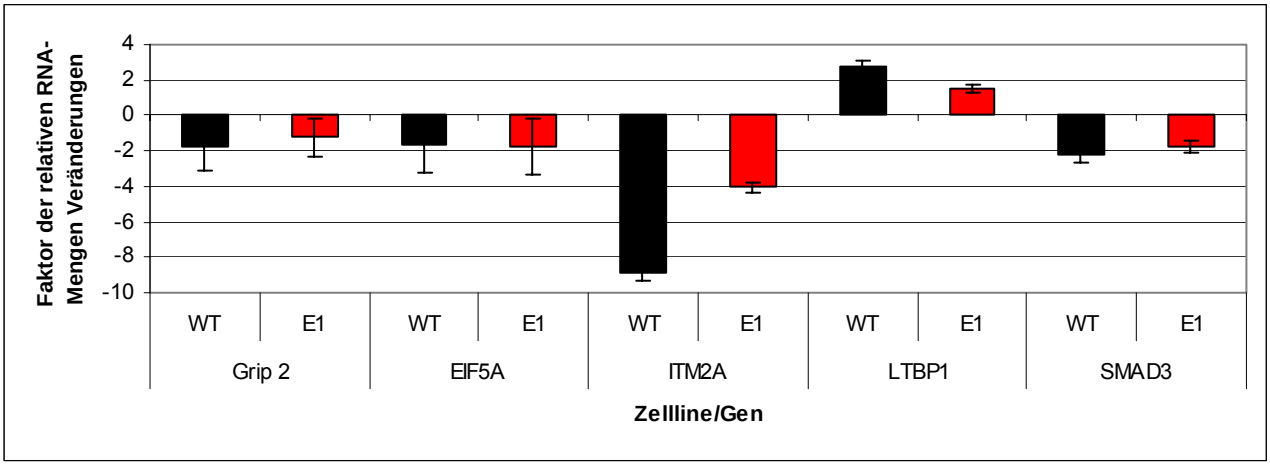


Abbildung 17: qPCR Analyse der Expression von Grip2, EIF5A, ITM2A, LTBP1, und SMAD3. Die cDNA (30 ng) der verschiedenen Zelllinien wurden mit den entsprechenden Primerpaaren durch qPCR analysiert und mit der ΔΔCT Methode auf die

Expression des Housekeeping-Gens (hprt) und normale Keratinozyten (NHK) abgeglichen, welche als 1 gesetzt wurden. Die Säulen entsprechen der relativen Veränderung der Expressionsstärken gemittelt über die verschiedenen Zelllinien und die Balken stellen die Standardabweichung dar.

Es zeigte sich, dass EIF5A und Grip2 weniger als doppelt gegenüber NHK und kaum verändert in wt gegen E1 Zelllinien war. LTBP1 und SMAD3 waren mehr als doppelt in wt, aber nicht in E1-Zelllinien gegenüber NHK verändert und es war kein zweifacher Unterschied zwischen wt und E1 zu beobachten. Nur ITM2A war deutlich in wt und E1-Zelllinien gegenüber NHKs verringert und es bestand ein zweifacher Unterschied in der Expression zwischen wt und E1-Zellen. Die Diskrepanz zwischen Microarray und qPCR-Analysen ist bei EIF5, GRIP2, LTBP1 und SMAD3 vermutlich auf die geringere Expression (Tabelle 12) zurückzuführen.

Gen	N	Relative Veränderung der RNA Expressionsmengen			X-fache Veränderung	
		WT	E1	NHK	E1 vs. wt	
					qPCR	Microarray
EIF5A	4	-1,63 ±1,60	-1,74 ±1,57	1,00 ±1,61	1,07	2,19
GRIP2	4	-1,81 ±1,26	-1,24 ±1,05	1,00 ±1,11	1,45	2,66
ITM2A	4	-8.89 ±0,38	-4,07 ±0,32	1,00 ±0,36	2,18	2,76
LTBP1	4	2,77 ±0,35	1,47 ±0,23	1.00 ±0,46	0,53	2,90
SMAD3	4	-2.26 ±0,44	-1,77 ±0,33	1.00 ±0,51	0,78	2,22

Tabelle 12: Vergleich der Veränderungen E1 vs. wt zwischen qPCR und Microarray Gene Chip (Chip). Die X-fache Veränderung E1 vs. wt qPCR ergibt sich aus der qPCR-Analyse, in dem die gemittelten relativen Veränderungen der RNA-Expressionsmengen der wt- und E1-Zelllinien in Beziehung **(Mittelwert (Faktor) E1 / Mittelwert (Faktor) WT**) gesetzt werden. Dieser Wert wurde der relativen Veränderung (in nicht-log. Darstellung **(2^{SLR})**) auf dem Chip gegenübergestellt (X-fache Veränderung E1 vs. wt Microarray)**.**

Probe set ID	Gene Symbol	14-18 wt Signal	14-18E1 Signal	18-18 wt Signal	18-18E1 Signal	28-18-wt Signal	28-18E1 Signal	30-wt Signal	30-18E1 Signal
205397_x_at	**SMAD3**	31.4	69.3	23.9	81.9	37.6	175.6	58.3	132.6
202747_s_at	**ITM2A**	20.4	91	27.8	81.3	57.6	205.7	28.9	121.2
201123_s_at	**EIF5A**	1059.8	2401.4	1174.9	1357.9	308.7	1969.7	622.3	2172.8
216481_at	**GRIP2**	23.8	98.8	34.7	53.8	27.5	158.6	53.5	142.8
202728_s_at	**LTBP1**	36	76.4	58.9	122	29.4	118	12.7	150.7

Tabelle 13. Signalstärken auf den Microarrays

3.7.2 Validierung differentiell exprimierter Gene zwischen HPV18-positiven und -negativen Zelllinien durch qPCR

Im Folgenden wurde die Expression ausgewählter Gene in normalen Keratinozyten und HPV18wt, und HPV18 E1mt-Zelllinien untersucht. Diese Analysen bestätigten, dass die Ex-

pression von ADAM8, DLG7, Kiaa0101, MCM7, CDKN2A/p16, STK6 und SEPP1 durch HPV18 verändert wird. Bei DLG7, Kiaa0101, CDKN2A und SEPP1 war die durch qPCR bestimmte Deregulation schwächer als in den Microarrayanalysen (Tab. 14). Im Gegensatz dazu konnte für MCM7 und STK6 eine der den Microarrays entsprechenden Veränderungen festgestellt werden (Tab. 14). Bei allen untersuchten Genen war kein verdoppelter Unterschied zwischen HPV18wt und HPV18 E1mt festzustellen, was die Einschätzung unterstützt, dass die forcierte Integration nur zu sehr wenigen zusätzlichen Veränderungen in der Genexpression führt.

Gen	Faktor der relativen Veränderung der RNA Mengen		N PCR	N PCR	Microarray (wt/E1)	Probe set ID
	WT	E1	WT	E1		
ADAM 8	13,64 ±0,49	8,02 ±0,52	39	33	C+ (5,0x/8,5x)	205180_s_at
DLG7	2,24 ±0,69	3,23 ±0,75	37	22	C+ (5,2x/16,1x)	203764_at
Kiaa0101	2,80 ±0,80	1,95 ±0,71	24	14	C+ (3,2x/3,0x)	202503_s_at
MCM7	4,90 ±0,94	4,03 ±1,05	48	29	C+ (3,6x/3,7x)	210983_s_at
CDKN2A/ p16	9,73 ±1,73	7,46 ±1,74	12	6	C+ (13,2x/13,5x)	209644_x_at
STK6	3,27 ±0,77	5,01 ±0,69	34	24	C+ (5,5x/5,4x)	208079_s_at
SEPP1	-2,16 ±0,60	-3,91 ±0,55	12	12	C – (-8,5x/-6,8x)	201427_s_at

Tabelle 14. qPCR Analyse ausgewählter Gene. Die cDNA der verschiedenen Zelllinien dieser Studie wurden mit den entsprechenden Primersätzen in der qPCR analysiert und mit der ΔΔCT Methode gegen die Housekeeping Gene (hprt oder β-Actin) und mit der Expression der NHK abgeglichen. Die Werte entsprechen der relativen Veränderung der Expressionsstärken, gemittelt über die verschiedenen Zelllinien. Tabelle 14 repräsentiert die Ergebnisse aller PCRs mit diesen Genen aus den verschiedenen cDNA-Isolationen. Die Spalte „Microarray" zeigt die Expression auf dem Microarray an C+=erhöhte SLR, C-=verringerte SLR und in Klammern den Faktor der relativen Transkriptmengenveränderungen. Die Farbkodierung bezieht sich auf die Übereinstimmung der Microarraydaten und der qPCR-Analyse (grün=übereinstimmendes Ergebnis).

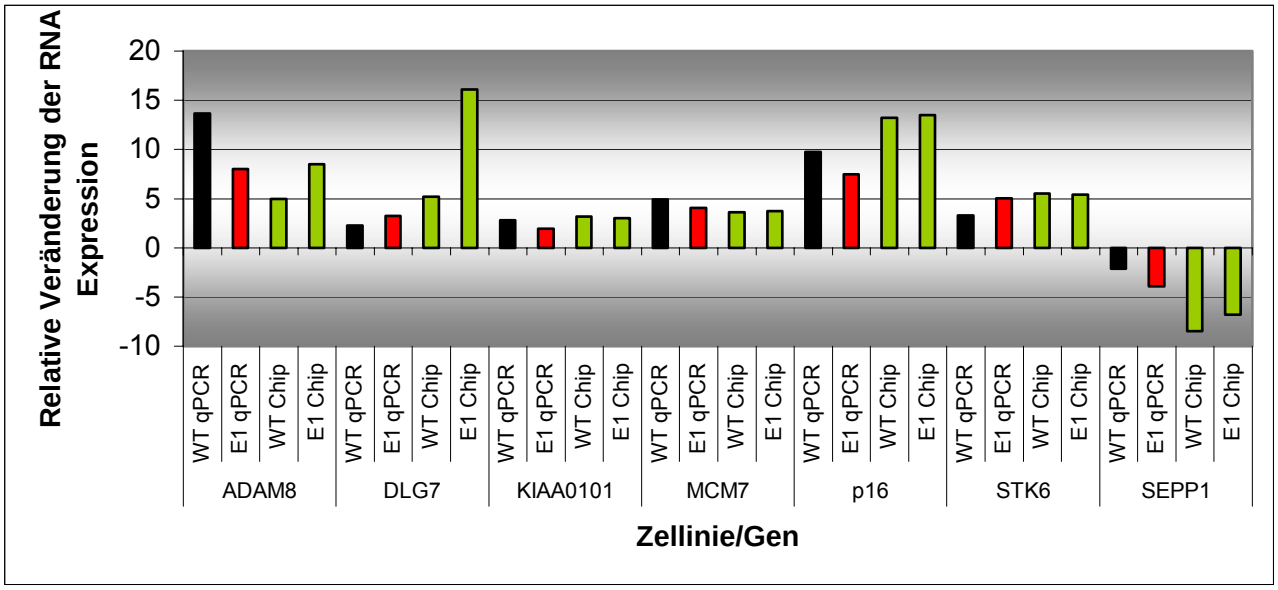


Abbildung 18 zeigen die graphische Darstellung der relativen Veränderung der Expression bezogen auf die Expression von virusfreien NHK.

3.7.3 Untersuchung der differentiellen Expression weiterer Gene durch qPCR Analysen

Zusätzlich sollte überprüft werden, ob weitere Gene durch HPV18wt oder HPV18 E1mt deregulliert werden. Hierzu wurden einerseits Gene wie Calmodulin, Desmocollin1 und YB1/p50 untersucht, welche im CRPV/Kaninchen Modell als Progressionsmarker identifiziert wurden (Huber, E. et al., 2004). Zusätzlich wurden Gene analysiert, die bei einer Microarrayanalyse von normalen Keratinozyten und HPV18 wt-haltigen Keratinozyten unter Verwendung der Incyte Arrayplatform, sowohl bei geänderter Markierungstechnik als auch mit Auswertungssoftware identifiziert werden können (Stubenrauch, unveröffentlicht). In Übereinstimmung mit der Affymetrix U133A-Analyse zeigten sich sowohl CDC2, Kiaa 0101, MCM7, DLG7 als auch STK6 als dereguliert. (Abb. 18) Auch Desmocollin1, hDKK1, hBD1, WNT5A, Kiaa0136, Kiaa1754 und VRK1 waren dereguliert. Eine qPCR Analyse mit geeigneten Primerpaaren ergab, dass die Expression von Calmodulin, Desmocollin, hDKK1, WNT5A, Kiaa0136, Kiaa1754 und VRK1 bei HPV18wt- und HPV18E1mt-haltigen Zelllinien gegenüber normalen Keratinozyten mehr als verdoppelt war (Tab. 15). Dagegen waren Calmodulin und Desmocollin in HPV18E1mt-Zellen gegenüber HPV18wt Zellen ca. 3-fach reprimiert.

Calmodulin 1 (*CAL*cium *MODUL*ated prote*IN*) ist ein Calcium-bindendes Protein, welches in allen eukaryontischen Zellen exprimiert wird. Calmodulin 1 kann verschiedene Proteine binden und regulieren und erfüllt so verschiedene Funktionen bei der Inflammation, dem Stoffwechsel, der Apoptose, der Muskelkontraktion der Kurz- und Langzeitgedächtnisbildung, dem Nervenwachstum und der Immunantwort. Calmodulin 1 fungiert sowohl als Calciumsensor als auch bei der Signaltransduktion (Rasmussen, C. D. et al., 1987c; Rasmussen, C. D. et al., 1987a; Rasmussen, C. D. et al., 1987b; Rasmussen, C. D. et al., 1992; Rosenthal,

D. S. et al., 2000). BPV und HPV16E7 steigern die Expression von Calmodulin (Rasmussen, C. D. et al., 1987d; Huh, K. W. et al., 2005). Die Calmodulin Expression war in der Microarray-Analyse schwach erhöht (WT 1,3 / E1 1,3), und lag unterhalb der Filterkriterien. Desmocollin 1 (DSC1) ist ein Calcium-abhängiges Glycoprotein, welches zur Cadherin Superfamilie gehört. DSC1 wird vor allem in Epithelzellen gebildet, die Adhäsionsmoleküle expremieren müssen und so Desmosomen-Formationen bilden (Buxton, R. S. et al., 1993b).

Bei der „atrophischen Knötchenflechte" (Oraler Lichen Planus (OLP)), möglicherweise eine Präkanzerose der Mundschleimhaut, ist eine veränderte Expression von DSC1 ein wichtiges Anzeichen für eine Entartung (Mattila, R. et al., 2008). Ein Zusammenhang zwischen dieser Erkrankung und HPV ist noch nicht bekannt, jedoch für andere Virusinfektionen (Herpesviren und das Hepatits-C-Virus) nachgewiesen (Kragelund, C. et al., 2009; Chainani-Wu, N. et al., 2004). In der vorliegenden Untersuchung lag die Änderung der relativen DSC1-RNA-Mengen (WT -1,8x / E1 1,1x) unterhalb der Filterkriterien der Microarray-Analyse. Bei der pPCR zeigte sich dagegen eine deutliche Reduktion der relativen RNA Mengen (WT –3,7x / E1 –13,0x). Ähnlich wie bei Calmodulin 1 war die RNA Menge bei der HPV18E1-Zelllinie bezogen auf HPV18wt um den Faktor 3,5x reduziert,. Mit dieser deutlichen Abweichung der RNA-Mengen unterscheiden sich DSC1 und Calmodullin 1 von allen anderen untersuchten Genen in dieser Gruppe.

Dickkopf 1 (hDKK1) ist bei der Embryogenese und der WNT Signalkaskade beteiligt (Kawano, Y. et al., 2003). Die Überprüfung der hDKK1-Expression durch qPCR bestätigte eine Veränderung um den Faktor 3 bei HDKK1 (Tabelle 14).

Gen	Relative Expression bezogen auf NHK		N PCR	N PCR
	WT	E1	WT	E1
Calmodulin	-2.94 ±0.74	-9.19 ±1.10	9	2
Desmocollin	-3.68 ±0.87	-13.04 ±0.60	9	2
hDKK1	2,88 ±1,18	3,64 ±0,97	65	36
WNT5A	15,72 ±0,65	14,03 ±0,45	10	8
hBD1	-1,87 ±2,21	-1,65 ±2,39	12	2
Kiaa0136	-3,34 ±2,13	-4,63 ±2,41	12	2
Kiaa1754	-3,69 ±2,44	-3,46 ±2,38	12	2
VRK1	-2,74 ±2,11	-2,41 ±2,40	12	2
YB1/p50	0.67 ±0.61	0.98 ±0.60	12	12

Tabelle 15. qPCR Analyse ausgewählter Gene. Die cDNA (30ng) der verschiedenen Zelllinien wurden mit den entsprechenden Primersätzen durch qPCR analysiert und mit der ΔΔCT Methode gegen das Housekeeping Gen (hprt) und die Expression in NHK abgeglichen.

3.7.4 Veränderungen der relativen hTERT Expression

Die transkriptionelle Aktivierung des hTERT Gens durch die E6 Proteine von high risk HPVs scheint essentiell für die Immmortalisierung der Wirtszelle (Gudjonsson, T. et al., 2004; Tanaka, H. et al., 1999). Trotzdem konnte in den Microarrayanalysen keine Veränderung der hTERT-Expression nachgewiesen werden. Um zu überprüfen, ob hTERT in HPV18-haltigen Zellen tatsächlich dereguliert ist, wurde eine qPCR Analyse durchgeführt. Es ergab sich, dass die hTERT RNA Expression durch HPV18 15- bis 20-fach gesteigert wird, wobei kein Unterschied zwischen wt und E1mt Zellen bestand. hTERT RNA wird bei diesen Zellen nur sehr wenig exprimiert (Intensität bei der Microarrayanalysen nur Signale von 2 bis 10 und in den qPCR-Analysen CT-Werte von 37-42. Siehe Tab. 16). Vermutlich können schwach exprimierte Gene nicht mit Microarrays, jedoch mit der qPCR detektiert werden.

Gen	Mittelwert (Faktor) WT	Mittelwert (Faktor) E1	N PCR WT	N PCR E1	Microarray	Probe set ID
hTERT	15,05 ±0,83	18,56 ±0.68	26	19	c+ (1,6x/1,8x)	**207199_at**

Tabelle 16: Die Werte entsprechen der relativen Veränderung der Expressionsstärken, gemittelt über die verschiedenen Zelllinien. Die Spalte Microarray in der Tabelle 16 zeigt die Expression von hTERT auf dem Microarray an (c+=erhöhte SLR) und in Klammern die relative Veränderung der Expression. Die Farbkodierung bezieht sich auf die Übereinstimmung der Microarraydaten und der qPCR-Analyse (grün = übereinstimmendes Ergebnis).

3.7.5 Herstellung und Charakterisierung von E1/E2/E4/E5-negativen HPV18-haltigen Zelllinien.

Die bisherigen Untersuchungen zeigten, dass nur geringe Unterschiede zwischen HPV18wt- und HPV18E1-Zelllinien bestanden. Eine Ursache hierfür könnte die Expression von E2 sein (Abb.2). In Karzinomen und abgeleiteten Zelllinien ist sehr häufig der E1 und E2 Bereich des Virusgenoms deletiert , und kann deshalb nicht mehr exprimiert werden (Alazawi, W. et al., 2002c; Badaracco, G. et al., 2002b; Choo, K. B. et al., 1996b). Deshalb wurden Zelllinien mit Deletionen in den Virusgenomen erzeugt, welche der natürlichen Situation nachempfunden waren. Die Deletion 2472-5144bp (Sang, B. C. et al., 1992b) wurde mit den Zelllinien HPV18 5171-2472 und HPV18 5096-2440 nachgeahmt. Sie enthalten keine E2-, E4- und E5-Leserahmen und nur noch einen partiellen E1- und L2-Leserahmen. Die Virusgenome wurden in Wirtszellen transfiziert und Zelllinien etabliert. Aus den Zelllinien wurde RNA isoliert und durch qPCR die Expression von 12 ausgewählten Genen mit HPRT als Referenzgen untersucht. Bei ADAM8, KIAA0101, MCM7, SEPP1 und STK6 waren keine Unterschiede zwischen HPV18 wt, -E1, HPV18 5096-2440- und HPV18 5171-2472- Zelllinien zu beobachten (Tab. 17). Dagegen waren TERT und LTBP1 sehr viel höher (15-307x, TERT; 1,5-57x LTBP1) in den beiden HPV18 Deletionszelllinien exprimiert. Dies bedeutet, dass LTBP1 und TERT nicht von E1, aber möglicherweise von E2, E4 oder E5 reguliert werden.

SEPP1 wurde in allen Zelllinien ähnlich stark herunter reguliert. Auch GRIP2 gehört zu den Genen, die erst im Vergleich HPV18E1 vs. HPV18wt identifiziert werden konnten, aber bezogen auf die NHK nicht signifikant verändert waren. GRIP2 ist in beiden Zelllinien mit deletierten HPV18 Genomen reguliert (HPV18 5096-2440 –5,5x ±0,63 und HPV18 5171-2472 –2,4x ±1,00). Auffallend ist der große Unterschied bei der GRIP2 Expression der beiden Zelllinien, obwohl sich die Virusgenome nur in 32 bp unterscheiden.

Gen	Relativen Veränderung der RNA Mengen				N PCR			
	WT	E1	5096-2440	5171-2472	WT	E1	5096-2440	5171-2472
ADAM 8	13,64 ±0,49	8,02 ±0,52	10,9 ±0,33	2,38 ±0,71	39	33	3	3
hTERT	15,05 ±0,83	18,56 ±0,68	58,76 ±0,55	306,73 ±0,60	26	19	4	4
Kiaa0101	2,8 ±0,80	1,95 ±0,71	3,18 ±0,39	3,49 ±0,44	24	14	3	3
LTBP1	2,77 ±0,35	1,47 ±0,23	56,89 ±0,25	40,04 ±0,35	12	12	3	3
MCM7	4,9 ±0,94	4,03 ±1,05	4,85 ±0,32	4,04 ±0,47	48	29	5	5
GRIP2	-1,81 ±1,26	-1,24 ±1,05	-5,50 ±0,63	-2,38 ±1,00	23	23	6	5
STK6	3,27 ±0,77	5,01 ±0,69	2,28 ±0,34	1,50 ±0,40	34	24	3	3
SEPP1	-2,16 ±0,60	-3,91 ±0,55	-2,96 ±0,39	-3,10 ±0,63	12	12	3	3

Tabelle 17: Die relative Veränderung der Genexpression, die gegen die Expression der Housekeeping Gene und auf die Expression in NHKs abgeglichen wurde. N PCR gibt die Anzahl der Experimente an.

Die zweite Gruppe mit Genen wie EIF5A, SMAD3 und DLG7 zeigte große Unterschiede im Expressionsmuster bei HPV18 5096-2440 und HPV18 5171-2472 im Vergleich mit den HPV18wt- und HPV18E1-Zelllinien. Während die Expression von EIF5A in den HPV18wt- und –E1-Zellen nur wenig (wt –1,6x / E1 -1,7x), und bei SMAD3 nur die HPV18wt -Zellen signifikant (wt –2,3x / E1 -1,8x) verändert waren, zeigten HPV18 5096-2440 und HPV18 5171-2472 (Zelllinien) eine deutliche Überexpression (EIF5A 4,8x/3,8x; SMAD3 4,8x / 3,6x). Bei DLG7 war die Expression bei HPV18wt und -E1 gesteigert (2,2x / 3,2x), hingegen war die Expression bei den Deletionszelllinien HPV18 5096-2440 und HPV18 5171-2472 vermindert (-3,2x / -2,9x).

Gen	Relativen Veränderung der RNA Mengen				N PCR			
	WT	E1	5096-2440	5171-2472	WT	E1	5096-2440	5171-2472
EIF5A	-1,63 ±1,6	-1,74 ±1,57	4,87 ±0,34	3,78 ±0,38	23	24	6	5
SMAD3	-2,26 ±0,44	-1,77 ±0,33	4,80 ±0,50	3,56 ±0,51	12	12	3	3
DLG7	2,24 ±0,69	3,23 ±0,75	-3,22 ±0,34	-2,87 ±0,34	37	22	3	3

Tabelle18: zeigt die relative Veränderung der Genexpression, die gegen die Expression der Housekeeping Gene und auf die Expression in NHKs abgeglichen wurde. N PCR gibt die Anzahl der PCRs an.

Im Gegensatz hierzu war die Expression von ITM2A in allen Zelllinien reduziert. Auffallend war die geringe Transkriptmenge bei den HPV18wt-Zelllinien (-8,9x ±0,38) (Tab. 19).

.Gen	Relativen Veränderung der RNA Mengen				N PCR			
	WT	E1	5096-2440	5171-2472	WT	E1	5096-2440	5171-2472
ITM2A	-8,89 ±0,38	-4,07 ±0,32	-5,03 ±0,27	-2,88 ±0,31	11	12	3	3

Tabelle 19 zeigt die relative Veränderung der Genexpression, die gegen die Expression der Housekeeping Gene und auf die Expression in NHKs abgeglichen wurde. N PCR gibt die Anzahl der PCRs an.

3.7.6 Herstellung und Charakterisierung von HPV18 E6/E7 exprimierenden Keratinozyten

Das Modell der HPV Integration (Abb. 5) und der veränderten viralen Genexpression durch die partielle Deletion des viralen Genoms sagt eine Deregulation der Expression der viralen Onkogene E6 und E7 voraus, da die Repression durch E2 wegfällt. Da die HPV18E1-Zelllinien den kompletten E2-Leserahmen besitzen und auch E2-Transkripte bilden können, kommt es vermutlich zu keiner stärkeren E6/E7-Expression (Abb.8). Um die Folgen einer

konstitutiven E6/E7-Expression zu untersuchen, wurden die HPV18 E6 und E7-Leserahmen (nt. 109-905) in den retroviralen Expressionsvektor $pBabe_{neo}$ inseriert und in Anlehnung an die Arbeit von Nees (Nees, M. et al., 2000) eine stabile Zelllinie durch Transfektion mit Plasmid-DNA und Selektion hergestellt. Von dieser Zelllinie wurde RNA isoliert und die Expression ausgewählter Gene durch qPCR Analysen untersucht. Die relativen Expressionsänderungen sind in Tabelle 20-22 zusammengefasst. Die Ergebnisse zeigten überraschenderweise, dass E2F-regulierte Gene wie MCM7, KIAA0101, DLG7 und STK6 in E6/E7-exprimierenden Zellen im Gegensatz zu Zellen mit HPV18 Genomen in ihrer Genexpression reduziert werden (Armstrong, D. J. et al., 1997; Hiraiwa, A. et al., 1996; Lam, E. W. et al., 1994; McCaffrey, J. et al., 1999; Morris, J. D. et al., 1993; Wu, E. W. et al., 1993; Zerfass, K. et al., 1995).

Leider konnte eine weitere Charakterisierung dieser Zelllinie im Rahmen der Promotionsarbeit aus zeitlichen Gründen nicht durchgeführt werden.

Gen	Relativen Veränderung der RNA Mengen			N PCR		
	WT	E1	E6/E7	WT	E1	E6/E7
DLG7	2,24 ±0,69	3,23 ±0,75	-2,46 ±1,55	37	22	4
Kiaa0101	2,80 ±0,80	1,95 ±0,71	-2,4 ±1,59	24	14	4
MCM7	4,90 ±0,94	4,03 ±1,05	-4,31 ±1,63	48	29	4
STK6	3,27 ±0,77	5,01 ±0,69	-2,58 ±1,36	34	24	4
Kiaa0136	-3,34 ±2,13	-4,63 ±2,41	-4,82 ±1,56	12	2	4
Kiaa1754	-3,69 ±2,44	-3,46 ±2,38	-3,95 ±1,50	12	2	4
hDKK1	2,88 ±1,18	3,64 ±0,97	1,91 ±1,76	65	36	8
VRK1	-2,74 ±2,11	-2,41 ±2,4	-47,09 ±6,89	12	2	4

.**Tabelle 20** Relative Veränderung der Genexpression in pbabe E6/E7-transfizierten humanen Keratinozyten. Als Referenz dienten NHK Zellen und das Referenzgen HPRT.

Die zweite Gruppe von Genen mit KIAA0136, KIAA1754 und hDKK1 war dagegen ähnlich reguliert wie in HPV18wt und –E1 Zelllinien (Tab. 20).

VRK1 war in der HPV18 E6/E7-Zelllinie um den Faktor -47 ±6,89 herunterreguliert, (während) die Expression in HPV18wt und HPV18E1-Zelllinien (Faktor –2,74 ±2,11 und –2,41 ±2,4) war gegenüber NHK nur schwach verändert (Tab. 22).

Um zu überprüfen, ob die heterologe Expression von E6/E7 vergleichbar ist mit der von wt Genomen, wurde ein qPCR mit einem Primerpaar aus dem E7 Bereich (Position 548-655) durchgeführt, welches die E6/E7 und die gespleißte E7-mRNA detektieren kann. Es zeigte sich, dass der retrovirale pBabe Transfervektor gegenüber HPV18wt-Genomen ca. 3-fach weniger E6/E7 RNA transkribiert wird (Tab. 23). Dies legt nahe, dass die retrovirale Expression von HPV18 E6 und E7 mit der Expression von E6 und E7 vom homologen viralen Promoter des HPV18-Genoms nicht identisch ist. Dies könnte auch die unterschiedliche Regulation von Wirtszellgenen erklären.

Gen	WT	E6/E7
HPV18E6/E7	*268,18±1,53*	*87,88±2,17*

Tabelle 23: Bestimmung der E6/E7 Expression durch qPCR in HPV18 wt Genom Zelllinien (WT) und pBabe-E6/E7 Zelllinien (E6/E7).

4 Diskussion

Die Genome von karzinogenen HPV werden sehr häufig in Abhängigkeit vom Progressionszustand der induzierten Läsion in das Wirtsgenom integriert gefunden und dies gilt insbesondere für HPV18 (Badaracco, G. et al., 2002a; Cullen, A. P. et al., 1991a). Zusätzlich weisen die integrierten Virusgenome in Karzinomen häufig Deletionen auf (Venuti, A. et al., 1989; Hukku, B. et al., 2000). Der Verlust dieser Genombereiche könnte die Progression zur Karzinomzelle begünstigen oder möglicherweise sogar verursachen (Abb. 5). Daher wurden in dieser Arbeit einer Reihe von Keratinozytenzelllinien erzeugt, welche entweder komplette, replizierende extrachromosomale HPV18wt oder unterschiedliche, integrierte HPV18mt-Genome enthielten, um den Einfluss auf die Expression der viralen Onkogene und die Expression zellulärer Gene zu untersuchen.

4.1 Veränderungen der zellulären Genexpression durch komplette extrachromosomale HPV18 wildtyp Genome

Globale Transkriptionsanalysen zeigten, dass eine große Anzahl von Genen durch HPV18wt-Genome gegenüber normalen Keratinozyten verändert waren (Abb. 14). Insgesamt waren 327 Gene in ihrer Expression verändert. Auffallend war, dass nur drei Gene in ihrer Expression verringert vorlagen. Mindestens 80 Gene konnten als Rb/E2F-regulierte Gene identifiziert werden (Tabelle 9) (Ishida, S. et al., 2001b; Markey, M. P. et al., 2002a; Vernell, R. et al., 2003b; Polager, S. et al., 2002b; Ren, B. et al., 2002b; Stanelle, J. et al., 2002a). Dies steht im Einklang mit dem Befund, dass das E7 Protein von HPV16 und 18 Rb-Proteine inaktiviert und somit E2F-Transkriptionsfaktoren aktiviert (Morozov, A. et al., 1997; Mabruk, M., 2008). In dieser Gruppe sind Gene wie CDC2, DLG7, MCM7, KIAA0101 und STK6, deren Deregulation durch qPCR und für MCM7 und CDC2 durch Immunoblotanalysen bestätigt werden konnte. MCM7 ist ein E2F-Zielgen und ein robuster Indikator der viralen HPVE7 Onkoproteinaktivität (Strati, K. et al., 2006). CDC2 ist ein entscheidender Faktor in der Zellzykluskontrolle.

Nur wenige der deregulierten Gene konnten Interferon- oder p53 zugeordnet werden, was im Widerspruch zu den Beobachtungen steht, dass E6 zur Degradation von p53 bei HPV31 und HPV16E6/E7-haltige(n) Zellen führt (Chang, Y. E. et al., 2000c; Nees, M. et al., 2001e; Kannan, K. et al., 2001b; Scheffner, M. et al., 1990; Thomas, M. et al., 1999). Nur drei Gene (BRCA1, CDC6, GADD45B) wurden in anderen Modellen mit einer p53-Regulation in Verbindung gebracht (Kannan, K. et al., 2001e; Kannan, K. et al., 2001c). BRCA1 wird als transkriptionelles Zielgen sowohl von Rb/E2F als auch von pTP53 beschrieben (Kannan, K. et al., 2001d). Dass nur wenige p53-regulierte Gene gefunden wurden könnte bedeuten,

dass eine transkriptionelle Induktion von p53 durch posttranskriptionelle Inhibition durch E6 ausgeglichen wird. Es könnte aber auch sein, dass E2F und p53 überlappende Zielgene besitzen (siehe Abb. 9 Seite 46). Interessant ist, dass die Interferonantwort scheinbar nicht oder nur sehr schwach beeinflusst wurde. Obwohl in der Microarrayanalyse keine klassischen Interferonzielgene gefunden wurden, zeigten Immunoblotanalysen, dass vergleichbar zu HPV31- und HPV16E6/E7-Zellen die Menge an STAT1 reduziert war (Chang, Y. E. et al., 2000d; Nees, M. et al., 2001d)(Abb. 16). STAT1 ist ein essentieller Interferon-induzierter Transkriptionsfaktor und in die IFN-abhängige-Induktion verschiedener Gene involviert (Bromberg, J. F. et al., 1996; DaFonseca, C. J. et al., 2001). Eine Erklärung könnte sein, dass die hier verwendete Auswertung der Microarrays keinen Nachweis von schwach exprimierten Genen wie z.B. IFN-regulierten Genen zulässt. Außerdem konnten vier Gene identifiziert werden, deren Regulation in Verbindung mit NFκB gebracht wird (CXCL2, IL8, SAA2, TNFAIP3) (Hinata et al. 2003, Nees et al., 2001, Pahl, 1999). Dies ist vermutlich eine Konsequenz der Expression von E6 und E7 (Patel, D. et al., 1999; Spitkovsky, D. et al., 2002; Nees, M. et al., 2001c; Havard, L. et al., 2002; James, M. A. et al., 2006).

Überraschenderweise wurden nur 50 Übereinstimmungen mit anderen Transkriptionsstudien gefunden, in denen andere HPV-Typen wie 16, 31 und 33 untersucht wurden (Ruutu, M. et al., 2002a; Alazawi, W. et al., 2002b; Chang, Y. E. et al., 2000e; Thomas, J. T. et al., 2001a; Schwarze, S. R. et al., 2002a; Nees, M. et al., 2001b; Duffy, C. L. et al., 2003b). Diese relativ geringe Übereinstimmung könnte auf den unterschiedlichen Arrayplattformen, den unterschiedlichen Versuchsbedingungen, oder auf Unterschieden zwischen den verschiedenen HPV-Typen beruhen (Fu, B. et al., 2003a; Nees, M. et al., 2001a).

Der Vergleich mit HPV18E6/E7 exprimierenden Zellen dagegen ergab 109 Übereinstimmungen (Garner-Hamrick, P. A. et al., 2004a). Es handelt sich größtenteils um Gene, die in die Zellzykluskontrolle bzw. Proteinbiosynthese involviert sind, aber auch um einige wenige Gene, welche an intrazellulären Transportprozessen und am Bau des Cytoskeletts (KCNS1, MAGP2) beteiligt sind. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die HPV18wt-haltigen Zellen v.a. durch die Onkoproteine-E6 und -E7 und möglicherweise durch andere virale Proteine den Zellzyklus steuern ohne eine inflammatorische Antwort auszulösen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von *Garner-Hamrick et al.* zeigte eine retrovirale Expression von HPV18 E6/E7 deutliche Unterschiede zu Zellen auf, in welchen E6/E7 vom viralen Genom exprimiert werden.

4.2 Veränderungen der viralen und zellulären Genexpession in Zelllinien mit integrierten HPV18E1mt Genomen

4.2.1 Deregulierte zelluläre Gene

Ein Ziel der Arbeit bestand darin, integrationsspezifische Veränderungen der Genexpressionen zu analysieren. Gegenüber NHK waren bei HPV18E1mt-Zelllinien insgesamt 418 Gene in ihrer Expression verändert. Davon waren 131 Gene ebenso in HPV18wt-Zelllinien dereguliert. 287 dieser Gene waren nur signifikant in den HPV18E1-Zelllinien verändert. Dagegen gab es beim Vergleich von HPV18wt- vs. HPV18E1mt-Zelllinien kaum Unterschiede. Es sieht so aus, als ob sich die Expression der 287 HPV18E1mt spezifischen Gene nur unwesentlich von HPV18wt unterscheidet. Dies gilt vermutlich ebenso für die 196 HPV18wt-spezifischen Gene. Eine ähnliche Expression konnte für ADAM8, DLG7, KIAA0101, MCM7, p16, STK6, SEPP1, SMAD3, DKK1, Wnt5a, KIAA0136, KIAA1754, VRK1 und TERT durch qPCR Analysen bestätigt werden.

4.2.2 Die Integration der HPV18E1mt-DNA hatte keine Erhöhung der E6/E7 Expression zu Folge.

Die Arbeitshypothese war, dass die Integration zu einer Veränderung der zellulären Genexpression durch die Deregulation der viralen Onkogenspiegel von E6/E7 führt und so die Progression zu Karzinomzellen begünstigt (Duffy, C. L. et al., 2003a; Alazawi, W. et al., 2002a; Chang, J. L. et al., 2001b; Chang, J. L. et al., 2001a; Daniel, B. et al., 1997; Daniel, B. et al., 1995; Jansen-Durr, P., 1998; Pei, X. F., 1996). Entgegen der Annahme hatte die Integration der HPV18E1-Genome in das Wirtsgenom eine verringerte E6/E7-Expression zur Folge. Dieses Ergebnis korreliert nicht mit den Ergebnissen vorhergehender Studien an HPV18 und 16 (Sang, B. C. et al., 1992a; Sathish, N. et al., 2004; Schmidt, M. T. et al., 2005; Lambert, P. F. et al., 1993). Ein Unterschied zu diesen Studien besteht darin, dass keine Deletionen im HPV18-Genom beobachtet wurden(Abb.7). Ebenso konnten bei den HPV18E1-Zelllinien festgestellt werden, dass mehrere Kopien des HPV18E1-Genoms „head to tail“ in das Wirtsgenom integriert vorlagen (Abb. 7). Dies wird unterstützt durch den Befund, dass die HPV18E1mt Zelllinien E2 und E1^E4 Transkripte exprimieren (Abb. 13). Im Gegensatz dazu wurden in früheren Arbeiten bei integrierten HPV16- und 18-Genomen keine E2-Transkripte nachgewiesen (Alazawi, W. et al., 2004). Die verringerten E6/E7-Transkripte in HPV18E1mt-Zelllinien sind daher vermutlich eine Konsequenz der intakten viralen Regulationsmechanismen durch E2. Interessanterweise erlauben die verringerten E6- und E7-Mengen bei vielen untersuchten Genen dasselbe Ausmaß an Deregulation der Wirtszellgene, wie höhere E6- und E7-Mengen. Dies könnte einen Vorteil in vivo darstellen, da derartige Zellen möglicherweise eine geringere Immunogenität besitzen.

5.3 Veränderungen zwischen HPV18wt- und HPV18E1-haltigen Zellen

Beim Vergleich der HPV18wt- mit den HPV18E1mt-Zelllinien zeigte es sich, dass nur fünf zellulären Gene eine geänderte Expression aufwiesen. Davon konnte durch qPCR nur die differentielle Expression von ITM2A mit einem 2,2-fachen Unterschied zwischen wt und E1mt bestätigt werden. In der Zelllinie HPV18E1mt war ITM2A 4,1-fach und 8,9-fach in HPV18 wt Zelllinien gegenüber normalen Keratinozyten reduziert.

ITM2A ist ein Transmembranprotein und führt zu einem verminderten chondrogenen Differenzierungspotenzial mesenchymaler Stammzellen (Pittois, K. et al., 1999). ITM2A wird indirekt über PAX3 mit der Entstehung des alveolaren Rhabdomyosarcoms in Verbindung gebracht (Barber, T. D. et al., 2002), welches eines der häufigsten kindlichen Weichteiltumore ist. Interessanterweise wird ITM2A während der T-Zell-Aktivierung induziert und dies korreliert mit einer Verringerung der CD8-Expression (Kirchner, J. et al., 1999). ITM2A könnte daher eine Rolle bei der Erkennung von HPV-infizierten-Keratinozyten spielen und die Reduktion der ITM2A Mengen durch HPV18 könnte somit ein immunevasiver Mechanismus sein. Die Reduktion von ITM2A in HPV18wt-Zellen war stärker als in HPV18E1mt-Zellen und korreliert somit mit den E6/E7-Transkriptmengen. Dies könnte bedeuten, dass E6 und/oder E7 an der Reduktion von ITM2A beteiligt ist und dass vor allem das replizierende HPV18wt-Genom Strategien entwickelt hat, um der zellulären Immunantwort zu entgehen.

Calmodulin1 und Desmocollin1 zeigten ca. 3-fache Expressionsunterschiede zwischen HPV18wt- und HPV18E1mt-Zellen. Die Expression beider Gene war 9- bzw. 13-fach in E1mt-Zellen und ~3-fach in wt Zellen gegenüber NHK reduziert. Calmodulin1 bindet Ca^{2+} Ionen und reguliert über Protein-Protein-Wechselwirkungen eine Vielzahl von an verschiedenen Proteinen aus verschiedenen Stoffwechselwegen (Gu, Z. et al., 1995; Rasmussen, C. D. et al., 1987e; Rasmussen, C. D. et al., 1987a), und spielt eine Rolle bei der Differenzierung von Keratinozyten (Rogers, M. S. et al., 2001). E7 bindet p600, welches wiederum mit Calmodulin1 interagiert (Nakatani, Y. et al., 2005).

Desmocollin1 (DSC1) ist ein Adhäsionsmolekül, das zur Cadherin-Superfamilie gehört (Buxton, R. S. et al., 1993a). DSC1 wird in suprabasalen Schichten der Haut exprimiert (Garrod, D. et al., 1996). Studien mit transgenen Mäuse zeigen, dass der Verlust von DSC1 zur Hyperproliferation und zu einer gestörten Differenzierung der Haut führt (Chidgey, M. et al., 2001). Dieser Phänotyp ähnelt progredierenden HPV-Läsionen. Interessanterweise verhindert E6 die Calcium-induzierte Differenzierung von Keratinozyten (Sherman, L. et al., 1996). Hierzu könnte eine Reduktion der Calmodulinmenge und der DSC1 Menge beitragen und eine weitere Verringerung könnte die Progression von HPV18-Läsionen begünstigen.

4.4 Die Analyse von Zelllinien mit deletierten Virusgenomen

Die verringerte Expression von E6/E7 in HPV18E1mt-Zelllinien ist vermutlich auf die kontinuierliche Expression von E2 zurück zu führen.

Da in vivo häufig E2 (und somit auch E4 und E5) deletiert ist, wurden HPV18-Genome generiert, in welchen E2-, E4- und E5- komplett und das E1-Gen partiell deletiert wurde (HPV18 5096- 2440 und HPV18 5171-2472). Stabile Zelllinien mit den deletierten Genomen wiesen interessanterweise Unterschiede zu HPV18wt- sowie den HPV18E1mt-Zelllinien auf. (Tab. 17-19)

hTERT ist die katalytische Untereinheit der Telomerase und ermöglicht den Zellen ihre Telomere zu verlängern. Eine Telomeraseaktivität ist notwendig, um den Keratinozyten eine unbegrenzte Anzahl von Zellteilungen zu ermöglichen und somit keiner zu frühen replikativen Seneszenz zum Opfer zu fallen (Bodnar, A. G. et al., 1998; Vaziri, H. et al., 1998). Während hTERT in HPV18wt und HPV18E1mt-Zellen lediglich 15- bis 18-fach induziert war, zeigten HPV18 5171-2472-Zellen eine nahezu 300-fache und HPV185096-2440-Zellen eine 50-fache Steigerung der hTERT-Mengen. Die Erhöhung der Telomeraseaktivität ist ein wichtiger Schritt in der Progression zu einer Karzinomzelle (Liu, X. et al., 2005).

Die Expression von LTBP1 war in HPV18wt 2,7-fach erhöht, aber nur 1,5-fach in HPV18E1mt-Zelllinien. Im Gegensatz dazu zeigten HPV18 5171-2472-Zellen eine 40-fache und HPV185096-2440-Zellen eine 57-fache Induktionssteigerung. LTBP1 gehört zur Familie der latenten TGF-beta Bindungsproteine und moduliert so die Aktivität von TGF-beta (Annes, J. P. et al., 2003). TGF-beta stellt einen Wachstumsinhibitor von epithelialen Zellen wie Keratinozyten dar (Bascom, C. C. et al., 1989). HPV-haltige Zellen werden im Verlauf der malignen Progression resistent gegenüber TGF-beta (Hasskarl, J. et al., 2000). Als Mechanismus wird ein Verlust der TGF-beta Rezeptorexpression diskutiert (Mi, Y. et al., 2000). Allerdings gibt es auch TGF-beta resistente HPV-positive Zellen mit natürlicher TGF-beta Rezeptorexpression (Nindl, I. et al., 2003). Möglicherweise trägt die verstärkte Expression von LTBP1 zu der TGF-beta Resistenz von HPV-positiven Zellen bei.

Die Expression von GRIP2 in HPV18 wt und HPV18E1mt-Zelllinien war gegenüber normalen Keratinozyten kaum verändert. Im Gegensatz dazu zeigten HPV18 5171-2472-Zellen eine 2,4-fache und HPV185096-2440-Zellen eine 5,5-fache Reduktion. GRIP2 ist das Glutamat Rezeptor interagierende Protein 2. GRIP2 bindet an eine Untereinheit des AMPA-Rezeptors und ermöglicht die synaptische Steuerung des AMPA-Rezeptors (Dong, H. et al., 1999). Die Funktion von GRIP2 in Keratinozyten ist derzeit nicht bekannt.

Die Expression von SMAD3 war 2,3-fach in HPV18wt- und 1,8-fach in HPV18E1mt-Zellen reduziert. Im Gegensatz dazu zeigten HPV18 5171-2472-Zellen eine 3,6-fache und HPV185096-2440-Zellen eine 4,8-fache Induktion von SMAD3. SMAD3 stellt eine Komponente der TGF-beta Signaltransduktionskaskade dar (Millet, C. et al., 2007). Die Erhöhung

der SMAD3 RNA Mengen in diesen Zellen hat vermutlich keine funktionelle Konsequenz, da E7 SMAD3 funktionell inaktivieren kann (Lee, D. K. et al., 2002).

Die Expression von DLG7 war 2,2-fach in HPV18wt- und 3,2-fach in HPV18E1mt-Zellen induziert. Im Gegensatz dazu zeigten HPV18 5171-2472-Zellen eine 2,9-fache und HPV185096-2440-Zellen eine 3,2-fache Reduktion von DLG7. DLG7 ist eine Komponente des mitotischen Apparats und ein Teil eines Multikomponentenkomplexes, der die mitotische Spindel kontrolliert (Wong, J. et al., 2006). Eine Reduktion von DLG7 könnte in Zusammenhang stehen mit der Beobachtung, dass HPV-positive Zellen häufig mitotische Defekte aufweisen und chromosomale Aberrationen aufweisen (Duensing, S. et al., 2000).

Die Expression von EIF5A war in HPV18 5171-2472-Zellen 3,8-fach und in HPV185096-2440-Zellen 4,8-fach erhöht, jedoch in HPV18wt- oder HPV18E1mt-Zellen unverändert. EIF5A ist ein Translationselongationsfaktor (Saini, P. et al., 2009). Interessanterweise wurde eine Erhöhung des eukaryonten Initiationsfaktors eIF-4E in Abhängigkeit von der Progression von zervikalen Neoplasien beschrieben (Lee, J. W. et al., 2005). Dies könnte bedeuten, dass eine Erhöhung der Menge von Translationsfaktoren die maligne Progression von HPV-induzierten Läsionen begünstigt. Zusammenfassend könnte dies bedeuten, dass die Integration von HPV18 nur bei gleichzeitigem Verlust von E1/E2/E4 und E5 zu weiteren Veränderungen der zellulären Genexpression führen, die auf vielfältige Weise die maligne Progression begünstigen können. Interessanterweise sind die hier identifizierten Gene (hTERT, DSC1, Calmodulin, ITM2A, etc) bisher nicht als Rb/E2F, p53, NF-kappa B oder Interferon-regulierte Gene beschrieben worden, was nahe legt, dass weitere Signaltransduktionswege durch E6 und/oder E7 beeinflusst werden.

4.5 Generelle Bedeutung dieser Arbeit

Die in dieser Arbeit gewonnenen in vitro Daten legen nahe, dass HPV18 die Expression einer Vielzahl von zellulären Genen verändert. Allerdings führt die forcierte Integration der viralen DNA durch Inaktivierung von E1 zu keinen weiteren Veränderungen mit Ausnahme von ITM2A. Erst durch den zusätzlichen Verlust des kompletten E1, E2, E4 und E5 lassen sich weitere Veränderungen der Wirtszellgenexpression nachweisen, die möglicherweise die Progression beeinflussen. Es wäre wichtig in der Zukunft zu überprüfen, ob die hier identifizierten Marker auch in vivo verändert sind und ob dies eine generelle Bedeutung für die Karzinogenese von anderen HPV-Typen besitzt.

5 Danksagung

Ich danke Dr. Steffen Müller (Medizinische Mikrobiologie, Tübingen) bei der Unterstützung mit der Affymetrix Datenanalyse. Sven Poppelreuther danke ich für die theoretische und praktische Unterstützung bei den RPA-Experimenten. Außerdem möchte ich mich beim Graduiertenkolleg für Onkologie der DFG stellvertretend durch Herrn Prof. Dr. Thomas Iftner bedanken, durch das mir zusätzliche Ausbildungsinhalte und meine Finanzierung ermöglicht wurden. Zur guter Letzt möchte ich mich bei meinem Betreuer PD Dr. Frank Stubenrauch für die Überlassung des Themas, die gute Betreuung und die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe bedanken.

6 Literaturverzeichnis

Alazawi, W. et al.; 2002a, Changes in cervical keratinocyte gene expression associated with integration of human papillomavirus 16. Cancer Res.**62**: 6959-6965

Alazawi, W. et al.; 2004, Genomic imbalances in 70 snap-frozen cervical squamous intraepithelial lesions: associations with lesion grade, state of the HPV16 E2 gene and clinical outcome. 108. Br. J. Cancer**91**: 2063-2070

Annes, J. P. et al.; 2003, Making sense of latent TGFbeta activation. J. Cell Sci.**116**: 217-224

Applied Biosystems; 1999, User Bulletin #2. **2**:

Armstrong, D. J. et al.; 1997, The relative ability of human papillomavirus type 6 and human papillomavirus type 16 E7 proteins to transactivate E2F-responsive elements is promoter- and cell-dependent. Virology**239**: 238-246

Badaracco, G. et al.; 2002a, HPV16 and HPV18 in genital tumors: Significantly different levels of viral integration and correlation to tumor invasiveness. J. Med. Virol.**67**: 574-582

Barber, T. D. et al.; 2002, Identification of target genes regulated by PAX3 and PAX3-FKHR in embryogenesis and alveolar rhabdomyosarcoma. Genomics**79**: 278-284

Bartsch, D. et al.; 1992, Retinoic acid-mediated repression of human papillomavirus 18 transcription and different ligand regulation of the retinoic acid receptor beta gene in non-tumorigenic and tumorigenic HeLa hybrid cells. EMBO J.**11**: 2283-2291

Bascom, C. C. et al.; 1989, Regulation of epithelial cell proliferation by transforming growth factors. J. Cell Biochem.**39**: 25-32

Bodnar, A. G. et al.; 1998, Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. Science**279**: 349-352

Bromberg, J. F. et al.; 1996, Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A**93**: 7673-7678

Buxton, R. S. et al.; 1993a, Nomenclature of the desmosomal cadherins. J. Cell Biol.**121**: 481-483

Chainani-Wu, N. et al.; 2004, Hepatitis C virus and lichen planus: a review. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**98**: 171-183

Chang, J. L. et al.; 2001a, The expression of HPV-16 E5 protein in squamous neoplastic changes in the uterine cervix. J. Biomed. Sci.**8**: 206-213

Chang, Y. E. et al.; 2000a, Microarray analysis identifies interferon-inducible genes and Stat-1 as major transcriptional targets of human papillomavirus type 31. J. Virol.**74**: 4174-4182

Chen, S. L. et al.; 1996, The regulation mechanism of c-jun and junB by human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein. Arch. Virol.**141**: 791-800

Cheng, S. et al.; 1995, Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes. Genes Dev.**9**: 2335-2349

Chidgey, M. et al.; 2001, Mice lacking desmocollin 1 show epidermal fragility accompanied by barrier defects and abnormal differentiation. J. Cell Biol.**155**: 821-832

Cho, N. H. et al.; 2006, Elevation of cyclin B1, active cdc2, and HuR in cervical neoplasia with human papillomavirus type 18 infection. Cancer Lett.**232**: 170-178

Choo, K. B. et al.; 1996a, Molecular analysis of cellular loci disrupted by papillomavirus 16 integration in cervical cancer: frequent viral integration in topologically destabilized and transcriptionally active chromosomal regions. J. Med. Virol.**49**: 15-22

Choo, K. B. et al.; 1988, Sequence duplication and internal deletion in the integrated human papillomavirus type 16 genome cloned from a cervical carcinoma. J. Virol.**62**: 1659-1666

Choo, K. B. et al.; 1987a, Integration of human papillomavirus type 16 into cellular DNA of cervical carcinoma: preferential deletion of the E2 gene and invariable retention of the long control region and the E6/E7 open reading frames. Virology**161**: 259-261

Cole, S. T. et al.; 1987, Nucleotide sequence and comparative analysis of the human papillomavirus type 18 genome. Phylogeny of papillomaviruses and repeated structure of the E6 and E7 gene products. J. Mol. Biol.**193**: 599-608

Contreras-Paredes, A. et al.; 2009, E6 variants of human papillomavirus 18 differentially modulate the protein kinase B/phosphatidylinositol 3-kinase (akt/PI3K) signaling pathway. Virology**383**: 78-85

Cooper, K. et al.; 1992, Integration of human papillomavirus types 16 and 18 in cervical adenocarcinoma. J. Clin. Pathol.**45**: 382-384

Corden, S. A. et al.; 1999a, The integration of HPV-18 DNA in cervical carcinoma. Mol. Pathol.**52**: 275-282

Crusius, K. et al.; 1997, Enhancement of EGF- and PMA-mediated MAP kinase activation in cells expressing the human papillomavirus type 16 E5 protein. Oncogene**15**: 1437-1444

Cullen, A. P. et al.; 1991a, Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. J. Virol.**65**: 606-612

DaFonseca, C. J. et al.; 2001, Identification of two residues in MCM5 critical for the assembly of MCM complexes and Stat1-mediated transcription activation in response to IFN-gamma. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A**98**: 3034-3039

Daniel, B. et al.; 1995, Changes in the physical state and expression of human papillomavirus type 16 in the progression of cervical intraepithelial neoplasia lesions analysed by PCR. J. Gen. Virol.**76 (Pt 10)**: 2589-2593

Daniel, B. et al.; 1997, The link between integration and expression of human papillomavirus type 16 genomes and cellular changes in the evolution of cervical intraepithelial neoplastic lesions. J. Gen. Virol.**78 (Pt 5)**: 1095-1101

Das, B. C. et al.; 1992a, Analysis by polymerase chain reaction of the physical state of human papillomavirus type 16 DNA in cervical preneoplastic and neoplastic lesions. J. Gen. Virol.**73 (Pt 9)**: 2327-2336

Davy, C. E. et al.; 2005, Human papillomavirus type 16 E1 E4-induced G2 arrest is associated with cytoplasmic retention of active Cdk1/cyclin B1 complexes. J. Virol.**79**: 3998-4011

Demeret, C. et al.; 1997, Different mechanisms contribute to the E2-mediated transcriptional repression of human papillomavirus type 18 viral oncogenes. J. Virol.**71**: 9343-9349

Deng, S. J. et al.; 2004, Identification of peptides that inhibit the DNA binding, trans-activator, and DNA replication functions of the human papillomavirus type 11 E2 protein. 858. J. Virol.**78**: 2637-2641

Dick, F. A. et al.; 2002, Three regions of the pRB pocket domain affect its inactivation by human papillomavirus E7 proteins. J. Virol.**76**: 6224-6234

Dong, H. et al.; 1999, Characterization of the glutamate receptor-interacting proteins GRIP1 and GRIP2. J. Neurosci.**19**: 6930-6941

Dong, X. P. et al.; 1994, Prevalence of deletions of YY1-binding sites in episomal HPV 16 DNA from cervical cancers. Int. J. Cancer**58**: 803-808

Dowhanick, J. J. et al.; 1995, Suppression of cellular proliferation by the papillomavirus E2 protein. J. Virol.**69**: 7791-7799

Duensing, S. et al.; 2000, The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A**97**: 10002-10007

Duffy, C. L. et al.; 2003a, Microarray analysis identifies differentiation-associated genes regulated by human papillomavirus type 16 E6. Virology**314**: 196-205

Dyson, N. et al.; 1989, The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. Science **243**: 934-937

Frattini, M. G. et al.; 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**: 12398-12402

Fu, B. et al.; 2003a, Keratinocyte growth conditions modulate telomerase expression, senescence, and immortalization by human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncogenes. Cancer Res.**63**: 7815-7824

Fujiwara, H. et al.; 1995, Clear cell adenosquamous carcinoma of the cervix. An aggressive tumor associated with human papillomavirus-18. Cancer**76**: 1591-1600

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**: 2090-2100

Garner-Hamrick, P. A. et al.; 2004a, Global effects of human papillomavirus type 18 E6/E7 in an organotypic keratinocyte culture system. J. Virol.**78**: 9041-9050

Garrod, D. et al.; 1996, Desmosomes: differentiation, development, dynamics and disease. Curr. Opin. Cell Biol.**8**: 670-678

Gilbert, D. M. et al.; 1987, Bovine papilloma virus plasmids replicate randomly in mouse fibroblasts throughout S phase of the cell cycle. Cell**50**: 59-68

Gissmann, L. et al.; 1978, Physical characterization of deoxyribonucleic acids of different human papilloma viruses (HPV) . Med. Microbiol. Immunol. (Berl)**166**: 3-11

Gu, Z. et al.; 1995a, Effect of human papillomavirus type 16 oncogenes on MAP kinase activity. J. Virol.**69**: 8051-8056

Gudjonsson, T. et al.; 2004, Immortalization protocols used in cell culture models of human breast morphogenesis. Cell Mol. Life Sci.**61**: 2523-2534

Hasskarl, J. et al.; 2000, Differential cell cycle response of nontumorigenic and tumorigenic human papillomavirus-positive keratinocytes towards transforming growth factor-beta1. J. Mol. Med.**78**: 94-101

Havard, L. et al.; 2002, Differential production of cytokines and activation of NF-kappaB in HPV-transformed keratinocytes. Virology **298**: 271-285

Hawley-Nelson, P. et al.; 1989, HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. EMBO J.**8**: 3905-3910

Higashi, K. et al.; 2003, Interferon-gamma interferes with transforming growth factor-beta signaling through direct interaction of YB-1 with Smad3. J. Biol. Chem.**278**: 43470-43479

Hiraiwa, A. et al.; 1996, E7 proteins of four groups of human papillomaviruses, irrespective of their tissue tropism or cancer association, possess the ability to transactivate transcriptional promoters E2F site dependently. Virus Genes**12**: 27-35

Hou, S. Y. et al.; 2000, Alleviation of human papillomavirus E2-mediated transcriptional repression via formation of a TATA binding protein (or TFIID)-TFIIB-RNA polymerase II-TFIIF preinitiation complex. Mol. Cell Biol.**20**: 113-125

Howley, P. M.; 1996, Papillomavirinae: the viruses and their replication. **Fields Virology**: 2045-2076

Huber, E. et al.; 2004, Gene profiling of cottontail rabbit papillomavirus-induced carcinomas identifies upregulated genes directly Involved in stroma invasion as shown by small interfering RNA-mediated gene silencing. J. Virol.**78**: 7478-7489

Huh, K. W. et al.; 2005, Association of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein with the 600-kDa retinoblastoma protein-associated factor, p600. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A**102**: 11492-11497

Hukku, B. et al.; 2000, Stepwise genetic changes associated with progression of nontumorigenic HPV-18 immortalized human prostate cancer-derived cell line to a malignant phenotype. Cancer Genet. Cytogenet.**120**: 117-126

Ishida, S. et al.; 2001a, Role for E2F in control of both DNA replication and mitotic functions as revealed from DNA microarray analysis. Mol. Cell Biol.**21**: 4684-4699

James, M. A. et al.; 2006, Human papillomavirus type 16 E6 activates NF-kappaB, induces cIAP-2 expression, and protects against apoptosis in a PDZ binding motif-dependent manner. J. Virol.**80**: 5301-5307

Jansen-Durr, P.; 1998, The making and the breaking of senescence: changes of gene expression during cellular aging and immortalization. Exp. Gerontol.**33**: 291-301

Jeon, S. et al.; 1995a, Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. J. Virol.**69**: 2989-2997

Kalantari, M. et al.; 2001, Physical state of HPV16 and chromosomal mapping of the integrated form in cervical carcinomas. Diagn. Mol. Pathol.**10**: 46-54

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**: 159-169

Kannan, K. et al.; 2001a, DNA microarrays identification of primary and secondary target genes regulated by p53. Oncogene**20**: 2225-2234

Kannan, K. et al.; 2001f, DNA microarray analysis of genes involved in p53 mediated apoptosis: activation of Apaf-1. Oncogene**20**: 3449-3455

Kawano, Y. et al.; 2003, Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. J. Cell Sci.**116**: 2627-2634

Keeti , V. S. et al.; 1996, Papillomavirinae:the virus and their repliction. **Fields Virology**: 2076-2098

Kim, S. S. et al.; 2000, The structural basis of DNA target discrimination by papillomavirus E2 proteins. J. Biol. Chem.**275**: 31245-31254

Kirchner, J. et al.; 1999, ITM2A is induced during thymocyte selection and T cell activation and causes downregulation of CD8 when overexpressed in CD4(+)CD8(+) double positive thymocytes. J. Exp. Med.**190**: 217-228

Kragelund, C. et al.; 2009, Polymorphic drug metabolizing CYP-enzymes--a pathogenic factor in oral lichen planus? J. Oral Pathol. Med.**38**: 63-71

Kurman, R. J. et al.; 1988, Analysis of individual human papillomavirus types in cervical neoplasia: a possible role for type 18 in rapid progression. Am. J. Obstet. Gynecol.**159**: 293-296

Laimins, L. A.; 1993, The biology of human papillomaviruses: from warts to cancer. Infect. Agents Dis.**2**: 74-86

Laimins, L. A.; 1996, Human papillomaviruses target differentiating epithelia for virion production and malignant conversion. **Seminars in Virology**: 305-313

Lam, E. W. et al.; 1994, HPV16 E7 oncoprotein deregulates B-myb expression: correlation with targeting of p107/E2F complexes. EMBO J.**13**: 871-878

Lambert, P. F. et al.; 1993, Epidermal cancer associated with expression of human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncogenes in the skin of transgenic mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A**90**: 5583-5587

Lee, D. K. et al.; 2002, The human papilloma virus E7 oncoprotein inhibits transforming growth factor-beta signaling by blocking binding of the Smad complex to its target sequence. J. Biol. Chem.**277**: 38557-38564

Lee, J. W. et al.; 2005, eIF-4E expression is associated with histopathologic grades in cervical neoplasia. Hum. Pathol.**36**: 1197-1203

Liu, X. et al.; 2005, The E6AP Ubiquitin Ligase Is Required for Transactivation of the hTERT Promoter by the Human Papillomavirus E6 Oncoprotein. J. Biol. Chem.**280**: 10807-10816

Lowy, D. R. et al.; 1994, Genital human papillomavirus infection. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A**91**: 2436-2440

Luft, F. et al.; 2001a, Detection of integrated papillomavirus sequences by ligation-mediated PCR (DIPS-PCR) and molecular characterization in cervical cancer cells. Int. J. Cancer**92**: 9-17

Mabruk, M.; 2008, The mystery of human papillomaviruses in carcinogenesis. Expert. Rev. Mol. Diagn.**8**: 1-4

Mantovani, F. et al.; 2001, The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. Oncogene**20**: 7874-7887

Markey, M. P. et al.; 2002a, Unbiased analysis of RB-mediated transcriptional repression identifies novel targets and distinctions from E2F action. Cancer Res.**62**: 6587-6597

Martin, L. G. et al.; 1998, Disruption of the G1/S transition in human papillomavirus type 16 E7-expressing human cells is associated with altered regulation of cyclin E. J. Virol.**72**: 975-985

Mattila, R. et al.; 2008, Desmocollin expression in oral atrophic lichen planus correlates with clinical behavior and DNA content. J. Cutan. Pathol.**35**: 832-838

McCaffrey, J. et al.; 1999, Disruption of retinoblastoma protein family function by human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein inhibits lens development in part through E2F-1. Mol. Cell Biol.**19**: 6458-6468

McLaughlin-Drubin, M. E. et al.; 2005, The role of the human papillomavirus type 18 E7 oncoprotein during the complete viral life cycle. Virology**338**: 61-68

Merrick, D. T. et al.; 1996a, Re-expression of interleukin 1 in human papillomavirus 18 immortalized keratinocytes inhibits their tumorigenicity in nude mice. Cell Growth Differ.**7**: 1661-1669

Meyers, C. et al.; 1997a, Synthesis of infectious human papillomavirus type 18 in differentiating epithelium transfected with viral DNA. J. Virol.**71**: 7381-7386

Mi, Y. et al.; 2000, Loss of transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptor type I mediates TGF-beta resistance in human papillomavirus type 16-transformed human keratinocytes at late stages of in vitro progression. Virology**270**: 408-416

Millet, C. et al.; 2007, Roles of Smad3 in TGF-beta signaling during carcinogenesis. Crit Rev. Eukaryot. Gene Expr.**17**: 281-293

Mohr, I. J. et al.; 1990, Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. Science**250**: 1694-1699

Morozov, A. et al.; 1997, Accumulation of human papillomavirus type 16 E7 protein bypasses G1 arrest induced by serum deprivation and by the cell cycle inhibitor p21. J. Virol.**71**: 3451-3457

Morris, J. D. et al.; 1993, Human papillomavirus type 16 E7 regulates E2F and contributes to mitogenic signalling. Oncogene**8**: 893-898

Munger, K. et al.; 2001, Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. Oncogene**20**: 7888-7898

Munger, K. et al.; 1989, Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. EMBO J.**8**: 4099-4105

Nakatani, Y. et al.; 2005, p600, a unique protein required for membrane morphogenesis and cell survival. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A**102**: 15093-15098

Nees, M. et al.; 2001f, Papillomavirus type 16 oncogenes downregulate expression of interferon-responsive genes and upregulate proliferation-associated and NF-kappaB-responsive genes in cervical keratinocytes. J. Virol.**75**: 4283-4296

Nees, M. et al.; 2000, Human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins inhibit differentiation-dependent expression of transforming growth factor-beta2 in cervical keratinocytes. Cancer Res.**60**: 4289-4298

Nindl, I. et al.; 2003, Assessment of TGF-beta1-mediated growth inhibition of HPV-16- and HPV-18-transfected foreskin keratinocytes during and following immortalization. Arch. Dermatol. Res.**295**: 297-304

Park, J. S. et al.; 1994, Human papillomavirus detection in cervical carcinoma tissues and paraaortic lymph nodes by the polymerase chain reaction. Gynecol. Oncol.**53**: 344-351
Park, J. S. et al.; 1997a, Physical status and expression of HPV genes in cervical cancers. Gynecol. Oncol.**65**: 121-129

Patel, D. et al.; 1999, The E6 protein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits coactivation by CBP and p300. EMBO J.**18**: 5061-5072

Pei, X. F.; 1996, The human papillomavirus E6/E7 genes induce discordant changes in the expression of cell growth regulatory proteins. Carcinogenesis**17**: 1395-1401

Piirsoo, M. et al.; 1996, Cis and trans requirements for stable episomal maintenance of the BPV-1 replicator. EMBO J.**15**: 1-11

Pittois, K. et al.; 1999, Genomic organization and chromosomal localization of the Itm2a gene. Mamm. Genome**10**: 54-56

Polager, S. et al.; 2002b, E2Fs up-regulate expression of genes involved in DNA replication, DNA repair and mitosis. Oncogene**21**: 437-446

Rasmussen, C. D. et al.; 1987a, Calmodulin as a regulator of cell growth and gene expression. Soc. Gen. Physiol Ser.**42**: 287-293

Rasmussen, C. D. et al.; 1987b, Calmodulin is involved in regulation of cell proliferation. EMBO J.**6**: 3961-3968

Rasmussen, C. D. et al.; 1992, Increased calmodulin affects cell morphology and mRNA levels of cytoskeletal protein genes. Cell Motil. Cytoskeleton**21**: 45-57

Ren, B. et al.; 2002a, E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G(2)/M checkpoints. Genes Dev.**16**: 245-256

Renshaw, A. A.; 2002, Qualification of ASCUS. Am. J. Clin. Pathol.**117**: 333-336

Rogers, M. S. et al.; 2001, Human calmodulin-like protein is an epithelial-specific protein regulated during keratinocyte differentiation. Exp. Cell Res.**267**: 216-224

Rosenthal, D. S. et al.; 2000, Calmodulin, poly(ADP-ribose)polymerase and p53 are targets for modulating the effects of sulfur mustard. J. Appl. Toxicol.**20 Suppl 1**: S43-S49

Ruutu, M. et al.; 2002a, Transcriptional profiling of a human papillomavirus 33-positive squamous epithelial cell line which acquired a selective growth advantage after viral integration. Int. J. Cancer**100**: 318-326

Saini, P. et al.; 2009, Hypusine-containing protein eIF5A promotes translation elongation. Nature**459**: 118-121

Sang, B. C. et al.; 1992a, Increased E6/E7 transcription in HPV 18-immortalized human keratinocytes results from inactivation of E2 and additional cellular events. Virology**189**: 448-455

Sathish, N. et al.; 2004, Human papillomavirus 16 E6/E7 transcript and E2 gene status in patients with cervical neoplasia. Mol. Diagn.**8**: 57-64

Scheffner, M. et al.; 1990, The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. Cell**63**: 1129-1136

Schmidt, M. T. et al.; 2005, The HPV16 E2 transcriptional regulator mode of action depends on the physical state of the viral genome. Acta Biochim. Pol.**52**: 823-832

Schneider-Maunoury, S. et al.; 1987, Integration of human papillomavirus type 16 DNA sequences: a possible early event in the progression of genital tumors. J. Virol.**61**: 3295-3298

Schwarz, E. et al.; 1985a, Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. Nature. **314**: 111-114

Schwarze, S. R. et al.; 2002a, Novel pathways associated with bypassing cellular senescence in human prostate epithelial cells. J. Biol. Chem.**277**: 14877-14883

Sen, E. et al.; 2002, Genetic analysis of cis regulatory elements within the 5' region of the human papillomavirus type 31 upstream regulatory region during different stages of the viral life cycle. J. Virol.**76**: 4798-4809

Sherman, L. et al.; 1996, Serum- and calcium-induced differentiation of human keratinocytes is inhibited by the E6 oncoprotein of human papillomavirus type 16. J. Virol.**70**: 3269-3279

Spitkovsky, D. et al.; 2002, The human papillomavirus oncoprotein E7 attenuates NF-kappa B activation by targeting the Ikappa B kinase complex. J. Biol. Chem.**277**: 25576-25582

Stanelle, J. et al.; 2002a, Gene expression changes in response to E2F1 activation. Nucleic Acids Res.**30**: 1859-1867

Stenlund A.; 1996, Papillomavirus DNA replication. 679-698

Strati, K. et al.; 2006, Identification of biomarkers that distinguish human papillomavirus (HPV)-positive versus HPV-negative head and neck cancers in a mouse model. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A**103**: 14152-14157

Stubenrauch, F. et al.; 2000a, 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**: 1178-1186

Stubenrauch, F. et al.; 1999a, Krebs durch Papillomviren. TargetForum**1**: 5-15

Stubenrauch, F. et al.; 1999b, Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. Semin. Cancer Biol.**9**: 379-386

Stubenrauch, F. et al.; 1999c, Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. Semin. Cancer Biol.**9**: 379-386

Stubenrauch, F. et al.; 1996, E2 represses the late gene promoter of human papillomavirus type 8 at high concentrations by interfering with cellular factors. J. Virol.**70**: 119-126

Stubenrauch, F. et al.; 1998, Differential requirements for conserved E2 binding sites in the life cycle of oncogenic human papillomavirus type 31. J. Virol.**72**: 1071-1077

Tan, S. H. et al.; 1994, The human papillomavirus type 16 E2 transcription factor binds with low cooperativity to two flanking sites and represses the E6 promoter through displacement of Sp1 and TFIID. J. Virol.**68**: 6411-6420

Tanaka, H. et al.; 1999, Telomerase-independent senescence of human immortal cells induced by microcell-mediated chromosome transfer. Mol. Carcinog.**25**: 249-255

Thierry, F. et al.; 1991, Functional analysis of E2-mediated repression of the HPV18 P105 promoter. New Biol.**3**: 90-100

Thomas, J. T. et al.; 1998a, Human papillomavirus oncoproteins E6 and E7 independently abrogate the mitotic spindle checkpoint. J. Virol.**72**: 1131-1137

Thomas, J. T. et al.; 2001a, Cellular changes induced by low-risk human papillomavirus type 11 in keratinocytes that stably maintain viral episomes. J. Virol.**75**: 7564-7571

Thomas, M. et al.; 1999, The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. Oncogene**18**: 7690-7700

Thonemann, B. et al.; 2000a, Bovine dental papilla-derived cells immortalized with HPV 18 E6/E7. Eur. J. Oral Sci.**108**: 432-441

Thonemann, B. et al.; 2000b, Bovine dental papilla-derived cells immortalized with HPV 18 E6/E7. Eur. J. Oral Sci.**108**: 432-441

Thorland, E. C. et al.; 2003, Common fragile sites are preferential targets for HPV16 integrations in cervical tumors. Oncogene**22**: 1225-1237

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**: 4321-4329

Vaziri, H. et al.; 1998, Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. Curr. Biol.**8**: 279-282

Venuti, A. et al.; 1989, Presence of human papillomavirus type 18 DNA in vulvar carcinomas and its integration into the cell genome. J. Gen. Virol.**70 (Pt 6)**: 1587-1592

Vernell, R. et al.; 2003a, Identification of target genes of the p16INK4A-pRB-E2F pathway. J. Biol. Chem.**278**: 46124-46137

Walboomers, J. M. et al.; 1994, Biology and Immunology. 41-69

Walboomers, J. M. et al.; 1999a, Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J. Pathol.**189**: 12-19

Wilson, R. et al.; 2005, Role of the E1--E4 protein in the differentiation-dependent life cycle of human papillomavirus type 31. J. Virol.**79**: 6732-6740

Wong, J. et al.; 2006, HURP controls spindle dynamics to promote proper interkinetochore tension and efficient kinetochore capture. J. Cell Biol.**173**: 879-891

Wu, E. W. et al.; 1993, The human papillomavirus E7 oncoprotein and the cellular transcription factor E2F bind to separate sites on the retinoblastoma tumor suppressor protein. J. Virol.**67**: 2402-2407

Yang, L. et al.; 1991, Activation of BPV-1 replication in vitro by the transcription factor E2. Nature**353**: 628-632

Yiu, K. C. et al.; 1990, Integration of HPV-16 DNA in cervical carcinoma cell line CC3/CUHK3 and its xenografts. Anticancer Res.**10**: 917-922

Zerfass, K. et al.; 1995, Cell cycle-dependent disruption of E2F-p107 complexes by human papillomavirus type 16 E7. J. Gen. Virol.**76 (Pt 7)**: 1815-1820

Zerfass-Thome, K. et al.; 1996, Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. Oncogene**13**: 2323-2330

zur Hausen, H. et al.; 1994a, Human papillomaviruses. Annu. Rev. Microbiol.427-447

zur Hausen, H. et al.; 1994b, Pathogenesis of cancer of the cervix. 8747. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.**59**: 623-628

LEBENSLAUF

Persönliche Daten

Name:	Bernd Karstensen
Geburtsdatum:	08. November 1971
Geburtsort:	Niebüll
Wohnort:	Cäsar-Flaischlen-Str.4 73033 Göppingen
Telefon:	07161/8089696
Email:	Bernd Karstensen@t-online.de
Familienstand:	verheiratet, zwei Söhne (17.01.2002, 03.10.2003)

Beruflicher Werdegang

01.09.2010-heute	**Customer Liaison Manager**; Bayer Vital GmbH, Leverkusen
01.05.2004-31.08.2010	**Pharmaberater im Fach-AD Neurologie**; Merz Pharmaceuticals, Frankfurt/Main
01.07.2006-30.09.2008	**Regional Manager Medical Care**; Merz Pharmaceuticals, Frankfurt/Main
01.05.04-30.06.2006	**Pharmaberater im Fach-AD Neurologie**; Merz Pharmaceuticals, Frankfurt/Main

Studium

01.04.01-31.04.04	**Promotionsarbeit im Graduiertenkolleg für Onkologie**; Institut für medizinische Virologie; Sektion Experimentelle Virologie; Prof. Dr. T. Iftner, mit dem Thema: *Veränderungen der Wirtszellgenexpression in Keratinozyten durch hochkarzinogene human-pathogene Papillomviren*

01.11.00-16.07.01 **Diplomarbeit im Universitätsklinikum der Universität Tübingen**; Abt. Neuropharmakologie; PD. Dr. J. B. Schulz, mit dem Thema:
Regulationsanalyse der Transkription von Apoptose- und Zellzyklusgenen mit Reverser Transkriptase (RT)-Polymerase Kettenreaktion (PCR) und quantitativer Echtzeit PCR-Detektion im 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin-(MPTP-)Maus-Modell der Parkinsonschen Erkrankung. (Note: sehr gut)

01.11.97-31.10.00 **Studium der Diplom Biologie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen**;
Hauptstudium:

Hauptfach: Zellbiologie/Immunologie *(Note: gut)*

Nebenfächer: Tierphysiologie *(Note: sehr gut)*
Virologie *(Note: sehr gut)*
Mikrobiologie *(Schein-frei ungeprüft)*
Biochemie *(Schein-frei ungeprüft)*
Toxikologie und Parasitologie *(Grundkurs)*

Grundstudium:
Botanik, Zoologie, Chemie, Physik, Zellbiologie, Mikrobiologie, Genetik, Mathematik und zoologische und botanische Exkursionen und Seminare.
Juli 1999: *Vordiplom*

Veröffentlichungen

Posterbeiträge:

21-24.03.03 Posterpräsentation bei der Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie in Berlin; Thema: „*Microarray analyses reveal no dramatic changes in cellular gene expression between cell lines with integrated and episomal HPV18 genomes.*“

Publikationen:

01.2006 "*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.*" Bernd Karstensen, Sven Poppelreuther, Thomas Iftner, Frank Stubenrauch; eingereicht beim Journal of Virology

Berufserfahrung

01.06.95-31.12.96 Max-Planck-Institut für Biologie, Abt. Immungenetik
Prof. Dr. Jan Klein
(*Technischer-Assistent*)

01.01.97-30.11.97 City Labor Fenner; Hamburg
(*Technischer-Assistent*)

15.11.97-30.06.98 Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie; Abt. Genetik;
Prof. Dr. C. Nüsslein-Vollhard
(*Hilfswissenschaftler*)

Schul-und Berufsausbildung

1978-1982 Grundschule Niebüll

1982-1987 Hauptschule Niebüll

1987-1989 Berufsfachschule Wirtschaft Niebüll
(Mittlere Reife)

1989-1992 Fachgymnasium Wirtschaft in Niebüll
(*Abitur*)

1993-1995 Berufskolleg für biologisch-technische Assistenten in Überlingen
(*Staatlich geprüfter Biologisch-technischer Assistent*)

Göppingen, 10. März 2011

Bernd Karstensen