

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
-Direktorin: Univ.-Prof. Dr. C. Rudack-

HPV-induzierte Genmethylierung von *Cyclin A1* bei malignen Tumoren des Rachens

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Kovacic, Alina Isabel
aus Duisburg
2019

**Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen
Wilhelms-Universität Münster**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. S. Meuth

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. D. Weiß

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. P. Barth

Tag der mündlichen Prüfung: 31.10.2019

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
-Direktorin: Univ.-Prof. Dr. C. Rudack -
Referent: Priv.-Doz. Dr. med. D. Weiß
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. P. Barth

ZUSAMMENFASSUNG

HPV-induzierte Genmethylierung von *Cyclin A1* bei malignen Tumoren des Rachens
Kovacic, Alina Isabel

Humane Papillomaviren (HPV) sind für eine Vielzahl an Karzinomen verantwortlich. Insbesondere HPV16 verursacht Kopf-Hals- sowie Zervixkarzinome. HPV16 besitzt zwei Onkogene, E6 und E7, welche hauptsächlich für die karzinogene Entartung der infizierten Zellen verantwortlich sind. Zur Entartung tragen genetische und epigenetische Veränderungen bei. Eine wichtige epigenetische Veränderung ist die Promotormethylierung. Es gibt Studien zum Tumorsuppressorgen *Cyclin A1*, welche auf eine HPV-assoziierte Methylierung hindeuten. In dieser Arbeit sind benigne Humane Orale Keratinozyten (HOK) mit HPV16 E6E7 immortalisiert und kultiviert worden. Die Expression von E6E7 in den HOK wurde mit einer Polymerase Kettenreaktion (PCR) bestätigt. Es wurde, nach einer Bisulfit-Behandlung der DNA, anhand einer methylierungsspezifischen PCR der Methylierungsstatus von *Cyclin A1* bei den immortalisierten und den gesunden HOK erschlossen. Mit einer reversen Transkriptase PCR wurde die Expression von *Cyclin A1* und der Methyltransferasen DNMT1, DNMT3a und DNMT3b der HOK gemessen. Danach wurde eine für E6 bzw. E7 spezifische, partiell doppelsträngige, interferierende RNA (miRNA) erstellt, um E6 und E7 einzeln hemmen zu können und damit zu eruieren, welches Onkogen die HPV-assoziierte Methylierung bewirkt.

Die Bestimmung der Promotormethylierung und der Expression von *Cyclin A1* konnte keine vermehrte Methylierung/Expression bei den immortalisierten HOK zeigen. Allerdings konnte eine erhöhte Expression der DNA-Methyltransferasen (DNMT) in den E6E7 positiven HOK im Vergleich zu den gesunden HOK nachgewiesen werden. Die relative Quantifizierung der PCR-Ergebnisse der DNMT ergab eine 6,8-fache Erhöhung der Expression von DNMT1, eine 2,75-fache Erhöhung der DNMT3b und eine 1,09-fache Erhöhung der DNMT3a.

In dieser Arbeit konnte eine erhöhte Expression der relevanten DNA-Methyltransferasen in immortalisierten HOK nachgewiesen werden. Dies lässt eine vermehrte Methylierung von Genen in diesen Zellen vermuten. Allerdings konnte in den Zellkulturen keine veränderte *Cyclin A1* Expression oder Methylierung in den HPV16E6E7 positiven Zellen gezeigt werden. Dies deutet auf Prozesse in vivo hin, welche in diesem Modell nicht nachgestellt wurden.

Tag der mündlichen Prüfung: 31.10.2019

Erklärung

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:
HPV-induzierte Genmethylierung von *Cyclin A1* bei malignen Tumoren des Rachens

in der Klinik:

Universitätsklinikum Münster, Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde

unter der Anleitung von: Priv.-Doz. Dr. D. Weiß

1. selbstständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit oder zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt habe.

Bielefeld 8.11.19
.....
Ort\Datum

A. Kovacic
.....
Name\Unterschrift

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinem Doktorvater Herrn Priv.-Doz. Dr. D. Weiß danken für seine wissenschaftliche und methodische Unterstützung während der gesamten Bearbeitungsphase meiner Dissertation und ihm für seine unendliche Geduld bei den Korrekturen danken.

Frau Univ.-Prof. Dr. C. Rudack möchte ich für die Möglichkeit danken, an ihrer Klinik zu promovieren.

Außerdem gilt mein Dank Frau M. Menke, ohne sie wäre ich im Labor verloren gewesen. Ich möchte mich bei ihr sehr für ihre tatkräftige Unterstützung bedanken.

Meiner Familie, insbesondere meiner Mutter H. Kovacic, danke ich herzlich für ihre unermüdliche Stärkung und Unterstützung.

Abschließend möchte ich noch M. Borowiak danken, welche mir mit Protokollen aus der Biochemie geholfen hat und mich in den Themen der Biochemie unterstützt hat.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Anatomie und Physiologie des Pharynx	1
1.2	Neoplasien	2
1.3	Kopf-Hals-Karzinome	3
1.4	Oropharynxkarzinome	4
1.4.1	Epidemiologie	4
1.4.2	Risikofaktoren	4
1.4.3	Stadien	5
1.4.4	Therapie und Prognose von Oropharynxkarzinomen	7
1.5	Humane Papilloma Viren	10
1.5.1	Nachweis von HPV	11
1.5.2	Entstehung eines Karzinoms durch <i>high-risk</i> HPV	12
1.6	Epigenetik	13
1.7	Genetische und epigenetische Veränderungen bei Oropharynxkarzinomen	14
1.7.1	Veränderungen durch HPV	15
1.7.2	Veränderungen bei HPV positiven und negativen Karzinomen im Vergleich	15
1.8	<i>Cyclin A1</i>	16
1.9	DNA-Methyltransferasen	17
1.10	Ziel der Arbeit	19
2	Material und Methoden	19
2.1	Material	19
2.1.1	Zelllinien	19
2.1.2	Zellkulturmaterialien	20
2.1.3	Kits	21
2.1.4	PCR- und Sequenzierungs-Materialien	21
2.1.5	Primer und Sonden	22
2.1.6	Geräte	23
2.1.7	Software	23
2.2	Methoden	24
2.2.1	Humane Orale Keratinozyten	24
2.2.2	DNA-Isolation	27
2.2.3	Bisulfit-Behandlung der DNA	28
2.2.4	RNA-Isolation	30
2.2.5	Reverse Transkription der RNA	31
2.2.6	Quantitative <i>real-time</i> PCR	31
2.2.7	Relative Quantifizierung	35
2.2.8	Erstellen der miRNA	36

2.2.9	Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	39
2.2.10	Sequenzierung	40
3	Ergebnisse	42
3.1	Wachstum der Humanen Oralen Keratinozyten	42
3.2	Nukleinsäurekonzentrationen der isolierten DNA und RNA	42
3.3	Ergebnisse der <i>Real-time</i> -PCR zur Bestimmung der Expression von E6/E7 in den HOK	43
3.4	Ergebnisse der QMSP zur Bestimmung der Methylierung der Promotorregion von <i>Cyclin A1</i>	43
3.5	<i>Real-time</i> Reverse-Transkriptase-PCR-Ergebnisse zur Bestimmung der Expression von <i>Cyclin A1</i>	44
3.6	Ergebnisse der <i>Real-time</i> Reverse-Transkriptase-PCR zur Bestimmung der DNMT	45
3.7	Auswertung der Sequenzierung der miRNA	47
4	Diskussion	49
4.1	Kultivierung der HOK und Immortalisierung durch HPV16 E6 und E7	50
4.2	Methylierung von <i>Cyclin A1</i> bei HOK und HPV16 E6 und E7 positiven HOK .	50
4.3	Expression von <i>Cyclin A1</i> und deren Korrelation zur Promotormethylierung . .	52
4.4	Expression der Methyltransferasen bei nativen und mit HPV16 immortalisierten HOK	53
4.5	Erstellen einer miRNA gegen E6 und E7	55
4.6	Ausblick	55
5	Literaturverzeichnis	57
6	Abkürzungsverzeichnis	73
7	Abbildungsverzeichnis	75
8	Tabellenverzeichnis	76

1 Einleitung

1.1 Anatomie und Physiologie des Pharynx

Hinter der Mundhöhle liegt der Rachen, auch Pharynx genannt. Er ist 12-15 cm lang und ein muskulärer Schlauch. Die wichtigsten Funktionen des Pharynx sind die Weiterleitung von Atemluft und Nahrung. Um dies zu bewerkstelligen, sind im Pharynx wichtige Hilfsstrukturen wie die Epiglottis und das Gaumensegel lokalisiert [3].

Der Schluckakt ist ein komplexer Vorgang. In diesem wird als erstes der vordere Bereich des Pharynx über den Speisebrei gezogen, dabei wird der Passavant-Wulst gebildet, dieser verhindert, dass Nahrung in den Nasopharynx gerät. Anschließend wird die Epiglottis auf den Kehlkopfeingang gedrückt und somit ein Verschlucken verhindert. Nun wird die Nahrung weiter in die tieferen Teile des Pharynx geschoben, bis diese im Ösophagus ankommt und die Peristaltik einsetzt [3].

Die Gefäßversorgung des Pharynx wird vor allem durch Arteria pharyngea ascendens und Äste der Arteria facialis gewährleistet, beide entspringen der Arteria carotis externa [50]. Die nervöse Versorgung erfolgt hauptsächlich durch Äste des Nervus vagus und des Nervus glossopharyngeus [3]. Der Pharynx wird in drei Teile unterteilt: den Nasopharynx (auch Epipharynx genannt), den Oropharynx (auch Mesopharynx genannt) und den Laryngopharynx (auch Hypopharynx genannt). Die Anatomie ist in Abbildung 1 veranschaulicht. Im Nasopharynx befindet sich respiratorisches Epithel, im Oro- und Laryngopharynx unverhorntes mehrschichtiges Plattenepithel [3].

Der Waldeyer-Rachenring gehört ebenfalls zum Pharynx, dieser ist Teil des *mucosal associated lymphoid tissue* (MALT) [3]. Er besteht aus der Tonsilla pharyngealis (Rachenmandel), den Tonsillae tubariae (Tubenmandeln), den Tonsillae palatinae (Gaumenmandeln), der Tonsilla lingualis (Zungenmandel) und lymphatischem Gewebe in der Mukosa [3].

Im mittleren Abschnitt des Rachens liegt der Oropharynx, in ihm treffen Luft- und Speiseröhre aufeinander [3]. Die Grenzen des Oropharynx werden gebildet durch: ventral die Gaumenbögen, kranial das Gaumensegel und kaudal den Oberrand der Epiglottis. Die hintere Wand des Oropharynx und das Gaumensegel werden aus unverhorntem Plattenepithel mit einer Lamina Propria und Muscularis gebildet [39].

Die Tonsillae palatinae und die Tonsilla lingualis sind im Oropharynx lokalisiert. Jede Tonsille der Tonsillae palatinae besteht aus 10-30 Krypten. Dadurch wird die Oberfläche jeder Tonsille auf ca. 300 cm² erweitert. Die Krypten werden von unverhorntem Plattenepithel bedeckt. An manchen Stellen der Tonsillen gibt es Follikel-assoziiertes Epithel, dort wird das Plattenepithel von Lymphzellen infiltriert. Das Epithel wird durch Desmosomen und Keratin zusammengehalten. Die Oberfläche ist an diesen Stellen sehr dünn und besteht nur aus einschichtigem Plattenepithel, dies ermöglicht den Lymphozyten einen schnellen Zugang zum Lumen. Die Tonsilla lingualis besteht ebenfalls aus Follikel-assoziiertem Epithel, allerdings sind dort die Krypten flacher [3, 39]. Durch Humane Papilloma Viren induzierte Karzinome sind fast ausschließlich im Oropharynx lokalisiert [15, 44, 160].

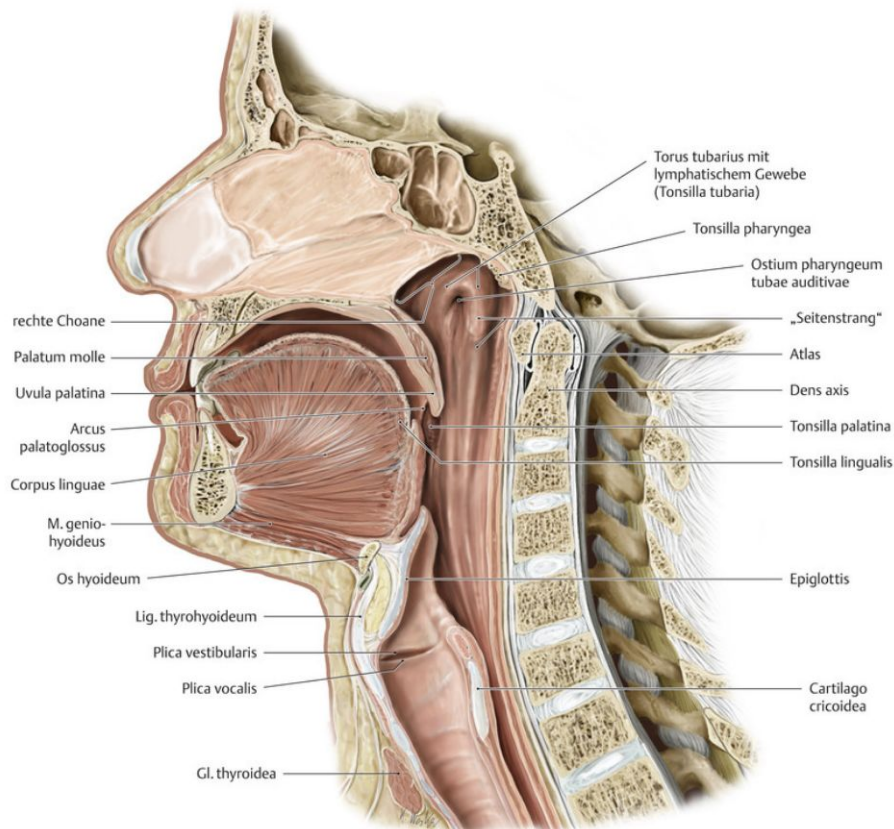


Abbildung 1: Pharynx im Mediansagittalschnitt

(Quelle: [139])

1.2 Neoplasien

Neoplasie ist das griechische Wort für *neues Wachstum* und stellt eine abnormale und unkontrollierte Proliferation von Zellen im Gewebe oder in Organen dar. Maligne (böartige) Neoplasien können benachbarte Strukturen infiltrieren und sich durch das lymphatische System oder das Blut im Körper ausbreiten und Metastasen bilden [16]. Maligne Neoplasien werden auch als Krebs bezeichnet. Die meisten malignen Neoplasien gehen von Epithelien aus und sind damit definitionsgemäß Karzinome [68]. 70 % der böartigen Neoplasien gehen von Drüsengewebe aus (Adenokarzinome). 15 % sind Plattenepithelkarzinome, Urothelkarzinome und kleinzellige Karzinome (häufig in der Lunge lokalisiert) [68]. Zudem können maligne Neoplasien aus dem blutbildenden Knochenmark (z. B. Leukämie), lymphatischem Gewebe (Lymphome), Gliazellen und aus Pigment bildenden Zellen (Melanome) entstehen. Zu den seltener auftretenden Krebsarten gehören noch die Sarkome und Mesotheliome [68]. Das Zentrum für Krebsregisterdaten schätzt, dass 2012 ca. 478 000 Krebserkrankungen erstmalig diagnostiziert wurden. Das Zentrum veröffentlichte ebenfalls, dass 51 % aller Männer und 43 % aller Frauen im Laufe ihres Lebens an Krebs erkranken [68].

1.3 Kopf-Hals-Karzinome

Nach ICD-10 werden bösartige Neubildungen der Lippe, der Mundhöhle und des Pharynx (C00-C14) zusammengefasst. Zu den Kopf-Hals-Tumoren gehören ebenfalls bösartige Neubildungen der Nasenhöhle und des Mittelohres (C30.-), bösartige Neubildung der Nasennebenhöhlen (C31.-) und bösartige Neubildungen des Larynx (32.-) [116]. Sie sind, wenn die Inzidenzen der einzelnen Karzinome zusammengezählt werden, nach dem GLOBOCAN 2012 die acht-häufigste Neuerkrankung von malignen Neoplasien. 95 % der Kopf-Hals-Tumore sind Plattenepithelkarzinome [86]. Männer sind ca. dreimal so häufig betroffen wie Frauen [116].

Die größten Risikofaktoren zur Entwicklung dieser Karzinome sind der Alkohol- und Tabakkonsum [143]. Die dadurch verursachten Karzinome machen ca. 80 % der Kopf-Hals-Karzinome aus [94].

Zigaretten verursachen oxidativen Stress [143] und dadurch Genmutationen. Kopf-Hals-Karzinome waren die ersten Karzinome, bei denen eine Verbindung zwischen Mutationen des Tumorsuppressorgens *p53* und Tabakkonsum hergestellt werden konnte [143]. Das Benzopyren war das erste entdeckte Karzinogen in Zigaretten, von dem ebenfalls ein Metabolit zu *p53* Mutationen führt [54]. Mittlerweile sind über 60 verschiedene Karzinogene in Zigaretten gefunden worden. Prinzipiell sind die starken Karzinogene in geringeren Mengen in Zigaretten enthalten als die schwachen. Zu den starken Karzinogenen gehören z. B. polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, Nitrosamine und aromatische Amine, von diesen sind ca. 1-200 ng in einer Zigarette enthalten. Zu den schwachen Karzinogenen gehören z.B Acetylaldehyde, Katechole und Isoprene [16, 54].

Ein anderer großer Risikoaktor für Kopf-Hals-Karzinome ist der Alkoholkonsum. Es konnte ein Zusammenhang zwischen Alkoholkonsum und Krebs in der Mundhöhle, im Pharynx, im Larynx, im Ösophagus, in der Leber, im Dickdarm, im Rektum und bei Frauen in der Mamma hergestellt werden. Der genaue karzinogene Mechanismus von Alkohol ist noch nicht vollständig verstanden. Alkohol enthält an Karzinogenen z. B. Ethanol, Acetaldehyde, Aflatoxine und Ethyl-Carbamat. Wobei Ethanol das stärkste Karzinogen ist. Allerdings gibt es nach dem bisherigen Verständnis verschiedene Mechanismen, die für die Krebsentstehung wichtig sind. Zum einen werden durch Acetaldehyde, welche die meisten Metabolite vom Ethanol darstellen, DNA-Schäden verursacht. Zum anderen wird *p450 2E1* und damit oxidativer Stress induziert, die Östrogenkonzentration steigt an, es gibt Veränderungen im Folsäuremetabolismus und in den DNA-Reparaturmechanismen. In der Kombination mit Zigarettenkonsum dient der Alkohol zusätzlich als Lösungsmittel für die Toxine im Tabak [16, 99].

Ein weiterer Risikofaktor ist die Infizierung mit dem Humanen Papilloma Virus (HPV). Durch HPV verursachte Karzinome sind nahezu ausschließlich im Oropharynx zu finden (siehe nächstes Kapitel).

Zusätzlich zu den sporadisch auftretenden Tumoren gibt es ebenfalls hereditäre, diese treten meist in jüngerem Alter auf. Zu den Erkrankungen, welche mit hereditären Tumoren einhergehen

können, zählen z. B. die Fanconi-Anämie, das Bloom-Syndrom und die Xeroderma pigmentosum [143].

1.4 Oropharynxkarzinome

1.4.1 Epidemiologie

Nach dem Globocan 2012 erkrankten jährlich ca. 142 000 Menschen an Oropharynx- und Hypopharynxkarzinomen und ca. 96 105 Menschen versterben an der Diagnose. In den letzten Jahren hat die Inzidenz der Oropharynxkarzinome zugenommen [60, 66, 122], was vor allem auf einen Anstieg der HPV induzierten Karzinome zurückzuführen ist. In den Niederlanden wurden Oropharynxkarzinome auf HPV-DNA und *p16* Expression untersucht, wobei p16 ein Zellzyklus regulierendes Protein ist, welches regelhaft in HPV positiven Zellen überexprimiert wird [165]. So konnte zwischen 1990 und 2010 ein Anstieg von 5,1 % auf 29,0 % festgestellt werden [126]. Dieser Trend ist ebenfalls in anderen Regionen zu beobachten [45].

1.4.2 Risikofaktoren

Insgesamt können zwei verschiedene Risikogruppen unterschieden werden. Für die eine Gruppe ist der größte Risikofaktor die HPV-Infektion, wobei nicht aus jeder Infektion ein Karzinom entsteht. Für die andere Gruppe sind die größten Risikofaktoren der Tabakkonsum und exzessiver Alkoholkonsum [153], das Erkrankungsalter für diese Gruppe liegt vorwiegend höher als 60 Jahre. Die HPV assoziierten Karzinome kommen eher bei jüngeren Menschen mit einem höheren sozioökonomischen Status vor. Für die Infektion mit HPV ist der wichtigste Risikofaktor der orale Geschlechtsverkehr. Dabei steigt die Inzidenz bei frühem ersten Geschlechtsverkehr und bei Promiskuität [44, 74, 96].

Ebenso wie die Inzidenz der HPV induzierten Karzinome hat sich das Sexualverhalten der Menschen geändert, so hatten 15 % der Männer, die vor 1930 geboren sind, in ihrem Leben Oralsex und 54 % der Männer, die nach 1930 geboren sind; bei den Frauen sind es 13 % der vor 1930 geborenen und 69 % der jüngeren. In dieser Studie waren Länder weltweit (Argentinien, Australien, Brasilien, Kanada, Kuba, Indien, Italien, Spanien, Polen, Puerto Rico, Russland und die USA) mit einbezogen, wobei die Zahlen je nach Region sehr unterschiedlich sind [55].

In der HPV assoziierten Risikogruppe sind 84 % der Betroffenen Männer (in der anderen sind es 76 %) [112]. Bei ihnen treten die Karzinome größtenteils an den Tonsillen und dem Zungengrund auf. Allerdings sind bei Diagnosestellung häufig bereits Absiedlungen (Metastasen) in den Halslymphknoten vorhanden [103]. Trotzdem haben die Patienten, deren Karzinome durch eine HPV-Infektion entstanden sind, eine bessere Prognose und weniger Zweitumoren [62].

1.4.3 Stadien

Zur Einteilung des Stadiums von malignen Tumoren hat sich die TNM-Klassifikation etabliert. In dieser steht im Allgemeinen das T für die lokale Tumorausbreitung des Primärtumors, das N für den Lymphknotenbefall und das M für die Fernmetastasierung (nur 0 und 1). Eine genauere Einteilung der TNM-Klassifikation bei Oropharynxkarzinomen ist in Tabelle 1 und 3 aufgeführt. Bei den Oropharynxkarzinomen gibt es seit dem 01.01.2017 eine TNM-Klassifikation für HPV positive Karzinome und eine für HPV negative. Zusätzlich wird noch die Differenzierung des Tumors klassifiziert. Es gibt "Grade" 1-4, wobei 1 für eine hohe Differenzierung der Zellen steht und 4 für eine niedrige [16]. Die TNM-Klassifikation kann nach der UICC (Union for International Cancer Control) zusätzlich in die Stadien I-IV zusammengefasst werden (siehe Tabellen 2 und 4).

Tabelle 1: TNM-Klassifikation von HPV¹ (p16) positiven Karzinomen im Oropharynx (klinisch und pathologisch)

T/N/M²-Stadium	Definition
T0	Primärtumor unbekannt
T1	Tumor ≤ 2 cm
T2	Tumor > 2 cm, aber ≤ 4 cm
T3	Tumor > 4 cm
T4	Invasion benachbarter Strukturen (Knochen, Muskel, Halsweichteile, Haut etc.)
NX	regionale Halslymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	keine Lymphknoten befallen
klinische Beurteilung der Lymphknoten	
cN1	ein oder mehr ipsilaterale Halslymphknoten, keiner > 6 cm
cN2	kontralaterale oder bilaterale Halslymphknoten, keiner > 6 cm
cN3	Lymphknoten > 6 cm
pathologische Beurteilung der Lymphknoten	
pN1	Metastasen in ≤ 4 Halslymphknoten
pN2	Metastasen in mehr als 4 Halslymphknoten
M0	keine entfernten Metastasen
M1	es liegen entfernte Metastasen vor

¹ Humanes Papillomavirus

² tumor, node, metastasis

Quelle: [164]

Tabelle 2: UICC¹ Stadium von HPV² (p16) positiven Karzinomen im Oropharynx (pathologisch und klinisch)

T-Stadium ³	N-Stadium	M-Stadium	UICC Stadium
pathologisch			
T0, T1 oder T2	N0, N1	M0	I
T0, T1 oder T2	N2	M0	II
T3 oder T4	N0, N1	M0	II
T3 oder T4	N2	M0	III
Jedes T	Jedes N	M1	IV
klinisch			
T0, T1 oder T2	N0, N1	M0	I
T0, T1 oder T2	N2	M0	II
T3	N0, N1 oder N2	M0	II
T0, T1, T2, T3 oder T4	N3	M0	III
T4	N0, N1, N2 oder N3	M0	III
Jedes T	Jedes N	M1	IV

¹ Union for International Cancer Control

² Humanes Papillomavirus

³ TNM: *tumor, node, metastasis*

Quelle: [164]

Tabelle 3: TNM-Klassifikation von HPV¹ (p16) negativen Karzinomen im Oropharynx

T/N/M ² -Stadium	Definition
TX	unbekannter Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor ≤ 2 cm
T2	Tumor > 2 cm, aber ≤ 4 cm
T3	Tumor > 4 cm oder Befall der linguale Oberfläche der Epiglottis
T4a & b	Invasion benachbarter Strukturen (Knochen, Muskel, Halsweichteile, Haut etc.)
N0	keine Lymphknoten befallen
N1	ein solitärer Halslymphknoten ≤ 3 cm und ENE ³ neg.
N2a	solitärer ipsilateraler Halslymphknoten > 3 bis ≤ 6 cm und ENE neg.
N2b	multiple ipsilaterale Halslymphknoten ≤ 6 cm und ENE neg.
N2c	bilaterale oder kontralaterale Halslymphknoten ≤ 6 cm und ENE neg.
N3a	Halslymphknoten > 6 cm und ENE neg.
N3b	jeder Lymphknoten ENE pos.
M0	keine entfernten Metastasen
M1	es liegen entfernte Metastasen vor

¹ Humanes Papillomavirus

² *tumor, node, metastasis*

³ *extranodal extension*

Quelle: [164]

Tabelle 4: UICC¹ Stadium von HPV² (p16) negativen Karzinomen im Oropharynx (pathologisch und klinisch)

T-Stadium³	N-Stadium	M-Stadium	UICC Stadium
Tis	N0	M0	0
T1	N0	M0	I
T2	N0	M0	II
T3	N0	M0	III
T1, T2, T3	N1	M0	III
T4a	N0, N1	M0	IVA
T1, T2, T3, T4a	N2	M0	IVA
Jedes T	N3	M0	IVB
T4b	Jedes N	M0	IVB
Jedes T	Jedes N	M1	IVC

¹ Union for International Cancer Control

² Humanes Papillomavirus

³ TNM: *tumor, node, metastasis*

Quelle: [164]

1.4.4 Therapie und Prognose von Oropharynxkarzinomen

Therapie

Die Therapie ist unter anderem vom Stadium, von der Resektabilität des Tumors und vom Wunsch des Patienten abhängig. Insgesamt sind die therapeutischen Möglichkeiten vielfältig und jeder Fall gesondert zu betrachten. So ist als kurativer Ansatz eine Operation mit oder ohne anschließender/vorangehender Radiochemotherapie möglich. Ebenso kann eine definitive Strahlentherapie oder Radiochemotherapie angestrebt werden [97]. Metastasen sind meistens in den zervikalen Lymphknoten zu finden, in dem Fall werden diese ebenfalls therapiert [116].

Ziel einer Operation ist eine R0-Resektion (eine vollständige Resektion des Tumors), mit mindestens 5 mm Sicherheitsabstand im gesunden Gewebe. Dies kann je nach Lokalisation des Tumors durch den Mund, also transoral, oder über eine Eröffnung des Pharynxschlauches von außen (laterale Pharyngotomie) geschehen. Bei größeren operativ entstandenen Defekten im Rachen werden diese meist mithilfe von Transplantaten (sog. Lappenplastiken) gedeckt und so Form und Funktion des Rachens wieder hergestellt [50, 58]. Bei der früher häufiger propagierten radikalen *Neck-Dissection* wurde sowohl das gesamte zervikale Fettgewebe der (möglicherweise) betroffenen Halsregionen (Level) inklusive der darin enthaltenen Lymphknoten als auch der Musculus sternocleidomastoideus, der Nervus accessorius und die Vena jugularis entfernt. Heute wird bei Oropharynxkarzinomen, bei denen Lymphknoten mit betroffen sind bzw. mitbetroffen sein könnten, meist eine *selektive Neck-Dissection* durchgeführt. In dieser werden die Lymphknoten der Level entfernt, welche ausgehend vom bekannten Lymphabflussweg wahrscheinlich betroffen sein könnten bzw. die anhand der präoperativen Bildgebung betroffen sind [157]. Neuerdings gibt es die *Transoral Robotic Surgery* (TORS) als Alternative Behandlungsmethode im T1 oder

T2 Stadium. Welchen Stellenwert die Therapie einnehmen wird, bleibt noch abzuwarten [70].

Chemotherapie ist die Gabe von zytotoxischen Medikamenten. Dies greift vor allem sich schnell teilende Zellen an. Da Tumorzellen sich sehr schnell teilen, sind dies die Zellen, die von der Zytotoxizität am stärksten betroffen sind. Chemotherapie kann mit Radiotherapie zusammen eingesetzt werden, dadurch wird die Sensitivität für die Radiotherapie verstärkt. Außerdem kann sie eingesetzt werden, um den Tumor vor der Radiotherapie oder einer Operation zu verkleinern. Es können auch zwei oder drei Chemotherapeutika gleichzeitig eingesetzt werden, dies verstärkt die Toxizität für den Tumor, aber auch die Nebenwirkungen. Als Chemotherapeutika bei Oropharynxkarzinomen kann z. B. Cisplatin oder 5-Fluorouracil gegeben werden [97]. Schließlich werden Chemotherapeutika auch als palliative Therapie eingesetzt.

Radiotherapie ist eine andere etablierte Behandlung von Karzinomen. Sie greift ebenfalls, wie die Chemotherapie, sich schnell teilende Zellen an. Durch radioaktive Strahlung wird die DNA von diesen Zellen geschädigt und der normale Reparaturmechanismus der Zelle wird behindert. Es werden abgesehen von den Tumorzellen ebenfalls die sich schnell teilenden gesunden Zellen geschädigt, in der Kopf-Hals-Region sind dies hauptsächlich die Speicheldrüsen und die orale Mukosa. Die meisten Tumoren in der Region werden mit Photonen bestrahlt [77]. Normalerweise wird ein Tumor im Oropharynxbereich mit ca. 2 Gy am Tag bestrahlt, an 5 Tagen pro Woche [97]. Bei einer definitiven Strahlentherapie wird eine Strahlendosis von 70 - 72 Gy verwendet [2]. Bei einer adjuvanten (post-operativen) Strahlentherapie hingegen 60 - 66 Gy [101].

Da Patienten mit HPV positiven Karzinomen häufig jünger und gesünder sind, wird eine Deeskalation der Therapie diskutiert. Chemo- und Radiotherapie können vor allem bei den jüngeren Patienten langfristig zu Komplikationen führen. Komplikationen der Radiochemotherapie sind z. B. Mukositis, Nierenversagen, Ösophagusstenosen, Muskelfibrosen und ein zweiter Primärtumor [115, 70]. Wie bereits erwähnt, sprechen HPV positive Karzinome besser auf die Radiochemotherapie an als HPV negative.

Die letzte zu erwähnende Therapiemöglichkeit sind die *Biologicals*. *Biologicals* sind Arzneimittel, deren aktive Form natürlicherweise in lebenden Organismen vorkommt. Sie können entweder aus dem lebenden Organismus oder durch biochemische Verfahren gewonnen werden. Sie können z. B., wie das Biological Nivolumab (ein monoklonaler PD1-Antikörper), das eigene Immunsystem gegen den Krebs unterstützen [38].

Ein weiteres Biological ist das Cetuximab, ein *EGFR*-spezifischer Antikörper [86, 121].

Prognose

Neben dem TNM-Stadium ist der HPV- Status ein wichtiger prognostischer Faktor bei Oropharynxkarzinomen [123].

Zur Zeit liegt die 5-Jahres-Überlebensrate nach Diagnose eines Kopf-Hals-Karzinoms bei 40-50 % [44]. Laut dem Robert Koch Institut lag die 5-Jahres-Überlebensrate für Frauen im Jahr 2013/2014 für Mundhöhlen und Rachenkarzinome bei 59 % und für Männer bei 48 %. Eine Ursache der unterschiedlichen Überlebensrate ist, dass bei Frauen der Anteil der durch Alkohol-

und Tabakkonsum induzierten Karzinome geringer ist [43]. In einer Studie zum Vergleich von intensivierter Radiotherapie zu Radiochemotherapie lag insgesamt die 8-Jahres-Überlebensrate bei HPV positiven Karzinomen bei 71 % und bei negativen bei 30 %. In diese Studie waren nur Patienten im fortgeschrittenen Stadium eingeschlossen [110].

Insgesamt weisen HPV positive Karzinome bei gleicher Therapie eine bessere Prognose als HPV negative Karzinome auf [160, 116]. In einer Metaanalyse zu HPV-DNA positiven Oropharynxkarzinomen ist ein 28 % geringeres Risiko am Tumor zu sterben als bei HPV negativen Tumoren nachgewiesen worden [119]. In einer anderen Studie wurde für HPV positive Karzinome eine bessere krankheitsspezifische 5-Jahres-Überlebensrate (85,7 % gegen 11,1 %) gezeigt. In dieser Studie sind alle Patienten mit einer Radiotherapie behandelt worden, teilweise noch zusätzlich mit einer Chemo- oder Immuntherapie [89]. In einer Studie von Patienten, die operiert worden sind, lag die krankheitsspezifische 5-Jahres-Überlebensrate bei HPV positiven Karzinomen bei 91 % und bei HPV negativen bei 69 % [27].

Es gibt verschiedene Ursachen für die bessere Überlebensrate. HPV positive Tumore sprechen besser auf die Therapie an, wahrscheinlich vor allem auf die Strahlentherapie. Die Immunantwort bei der Radiotherapie bei HPV positiven Karzinomen ist durch die bessere Perfusion und Oxygenierung besser als bei den HPV negativen [154]. Außerdem liegt bei HPV positiven Karzinomen meist ein *p53*-Wildtyp vor. Sie sind damit weiterhin apoptosefähig und sogar sensitiver für Apoptose durch manche Chemotherapeutika [92].

Bei Alkohol- und Zigarettenkonsum können durch genetische oder epigenetische Veränderungen präneoplastische Felder von Mukosazellen entstehen. Bei HPV positiven Karzinomen könnten durch eine fehlende Feldkanzerisierung weniger Zweitumoren zustande kommen. Ebenfalls könnten die geringeren Komorbiditäten Einfluss nehmen [74]. Für Oropharynxkarzinomen wurde nachgewiesen, dass eine niedrige Expression des Onkogens *EGFR* (Rezeptor für den epidermalen Wachstumsfaktor) und eine hohe *p16* Expression mit einem guten Ansprechen auf Radio- und Chemotherapie und guter Prognose einhergehen, während hohe *EGFR* Expression und Rauchen eine schlechtere Prognose bedeuten [44, 74, 79]. In den letzten Jahren hat zwar die Inzidenz der Oropharynxkarzinome zugenommen [60, 66], aber die Prognose hat sich verbessert. Beide Umstände sind am ehesten auf eine Zunahme der HPV induzierten Karzinome zurückzuführen [45, 66].

Primäre Prävention

2006 wurde ein Impfstoff gegen HPV16 und 18 und ein weiterer, der zusätzlich gegen HPV6 und HPV11 (Verursacher von Genitalwarzen) schützt, zugelassen. Die Effektivität dieser Impfstoffe zur Prävention von CIN (Zervikale intraepitheliale Neoplasie) 2 Läsionen oder höher liegt bei ca. 99 % [28]. Die Ständige Impfkommision des Robert Koch Instituts empfiehlt seitdem die Impfung von Mädchen zwischen 9 und 14 Jahren. Ab August 2018 wird die Impfung ebenfalls für Jungen empfohlen. Inwieweit dieser Impfstoff auch vor HPV-induzierten Kopf-Hals-Karzinomen schützt, ist noch nicht nachgewiesen. In Deutschland wird in einer S3-Leitlinie (Leitlinien

sind Richtlinien für Ärzte zur Entscheidungsfindung) die frühzeitige Impfung aller Jungen und Mädchen ab dem 9. Lebensjahr empfohlen. 2014 ist zusätzlich ein Impfstoff eingeführt worden, welcher gegen 9 verschiedene HP-Viren schützt. So bietet er einen zusätzlichen Schutz gegen die HP-Viren 31, 33, 45, 52, und 58 [72, 117].

1.5 Humane Papilloma Viren

HPV sind unbehüllte, doppelsträngige DNA-Viren und gehören zu der Familie der *Papillomaviridae*. Sie synthetisieren zwei Kapsid-Proteine: *late 1* (L1) und *late 2* (L2) [108] und die Proteine *early 1* bis *early 7* (E1-E7). Davon sind E5-E7 Onkoproteine, wobei E5 in der Karzinogenese im Gegensatz zu E6 und E7 einen untergeordneten Stellenwert hat [37, 14]. Eine Beschreibung der Funktionen der Proteine findet sich in Tabelle 5.

Tabelle 5: Funktionen der Proteine von HPV¹

Protein	Funktion
L ² 1	enthält Epitope, welche die Immunantwort neutralisieren [33]
L2	Verkapselung der viralen DNA [33]
E ³ 1	Helikase (Replikation, Transkription) [91]
E2	Origin-Erkennungsprotein (bei der Replikation, Transkription) [91]
E3	unklar [33]
E4	Freisetzung von HPV aus der Zelle [33]
E5	interagiert mit Rezeptoren für Wachstumsfaktoren [33]
E6	Deaktivierung von <i>p53</i> , Aktivierung der Telomerase [33, 162]
E7	aktiviert Gene zur Zellproliferation, bindet an das Retinoblastomprotein [33, 156]

¹ Humanes Papillomavirus

² *Late*

³ *Early*

Es gibt mehr als 100 Subtypen von HPV [34]. Die Viren können in *high-risk* und *low-risk* unterteilt werden [107]. Die WHO hat eine genauere Unterteilung vorgenommen:

- Gruppe 1, humankarzinogen: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58,
- Gruppe 2A, wahrscheinlich karzinogen: 68
- Gruppe 2B, möglicherweise karzinogen: 26, 53, 66, 67, 69, 70, 73, 82, 85, 97
- Gruppe 3, karzinogenes Potential fraglich: 6, 11, 42, 44, 54, 62, 72, 81, 83, 84, 90, 91

Die *low-risk*-Typen verursachen meist nur Warzen und sind eher ungefährlich.

HPV infizieren die Basalzellen von Plattenepithel. Vor allem in den Tonsillen und der Zunge sind die Basalzellen durch das Kryptenepithel oberflächlich gelegen, deshalb sind dort die meisten HPV positiven Karzinome im Kopf-Hals-Bereich zu finden [15, 53, 137, 148]. In diesem Bereich werden die meisten Karzinome von HPV16 verursacht [46].

Bereits seit 1990 ist eine Assoziation zwischen HPV und Gebärmutterhalskrebs bekannt, dort konnten sie in 90-100 % der Karzinome nachgewiesen werden [11]. Gebärmutterhalskrebs wird meistens durch HPV16 oder 18 verursacht [11]. Es konnte eine Prävalenz von 5 - 20 %, bei Frauen, welche von der Studie als passend für eine epidemiologische Kontrollgruppe befunden wurden, festgestellt werden. Einbezogen wurden Frauen aus Spanien, Kolumbien, Brasilien, Marokko, Paraguay, Philippinen, Thailand und Peru [11]. Neue HPV-Infektionen sind zunächst gutartig. Um Gebärmutterhalskrebs zu entwickeln, ist eine persistierende HPV-Infektion Voraussetzung. Ohne eine persistierende HPV-Infektion ist das Risiko zur Entwicklung eines Karzinoms extrem gering. Bei 5-10 % der infizierten Frauen kann eine Persistenz gezeigt werden, die Entwicklung eines Karzinoms bei 3 % [138]. Dieser Prozess findet bei allen durch HPV verursachten Karzinomen statt. Für Frauen über 35 Jahren wird seit Ende 2016 zur Sekundärprävention eine Kombinationsuntersuchung (HPV-Test und zytologische Untersuchung) im Abstand von 3 Jahren angeboten [87].

Außerdem wird HPV für Anal- und Peniskarzinome verantwortlich gemacht [108].

1.5.1 Nachweis von HPV

Da der HPV-Status eines Karzinoms Einfluss auf die Prognose und zukünftig evtl. auch auf die Therapie besitzt, ist die Testung darauf von Bedeutung. Bis jetzt gibt es keinen Goldstandard. Aktuelle Tests sind unterschiedlich im Bias und im Preis-Benefit-Verhältnis. Die Tests haben unterschiedliche Ziel-Strukturen, diese sind z. B. HPV-DNA, HPV-RNA, virale Onkoproteine, HPV spezifische Antikörper im Serum oder zelluläre Proteine. Zudem gibt es unterschiedliche Methoden z. B. PCR oder in-situ Hybridisierung [163, 165]. Wichtig für die Aussagekraft ist, dass die Präsenz von HPV detektiert wird, aber auch, dass das karzinogene Potential erfasst wird, da nicht jede HPV-Infektion zu einem Karzinom führt [163].

Durch eine PCR (zur Funktionsweise der PCR siehe Kapitel 2.2.6) kann auch in Zellen mit einer sehr niedrigen Viruslast HPV-DNA nachgewiesen werden, das Vorliegen der DNA ist allerdings nicht unbedingt klinisch relevant [86, 163]. Möglich ist deswegen eine quantitative PCR. Bei einer hohen Viruslast wird öfter E6 und E7 exprimiert und damit ist die Entartungsgefahr höher [163]. Es hat sich gezeigt, dass HPV gut durch eine PCR der E6 und E7 DNA oder mRNA nachgewiesen werden kann [96, 155]. Die Bestimmung der E6 und E7 mRNA hat den Vorteil, dass die klinische Relevanz direkt mit erfasst wird [163].

Eine weitere Nachweismethode ist die in-situ Hybridisierung. Bei dieser Methode wird eine Sonde mit der spezifischen Ziel-DNA/RNA verbunden. Die Sonde sendet ein Signal aus (z. B. Fluoreszenz) und kann dadurch detektiert werden. Diese Methode hat gegenüber der PCR den Vorteil, dass sie besser bei in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Geweben funktioniert. Dadurch kann sie in den meisten Laboren besser angewendet werden [96, 163]. Unter einem Mikroskop kann die genaue Ausbreitung der HPV-Infektion gesehen werden, so ist detektierbar, ob die HPV-Infektion nur in dem Tumorgewebe vorliegt oder auch in dem umliegenden Gewebe [165]. Die in-situ Hybridisierung ist weniger sensitiv als die PCR. Da

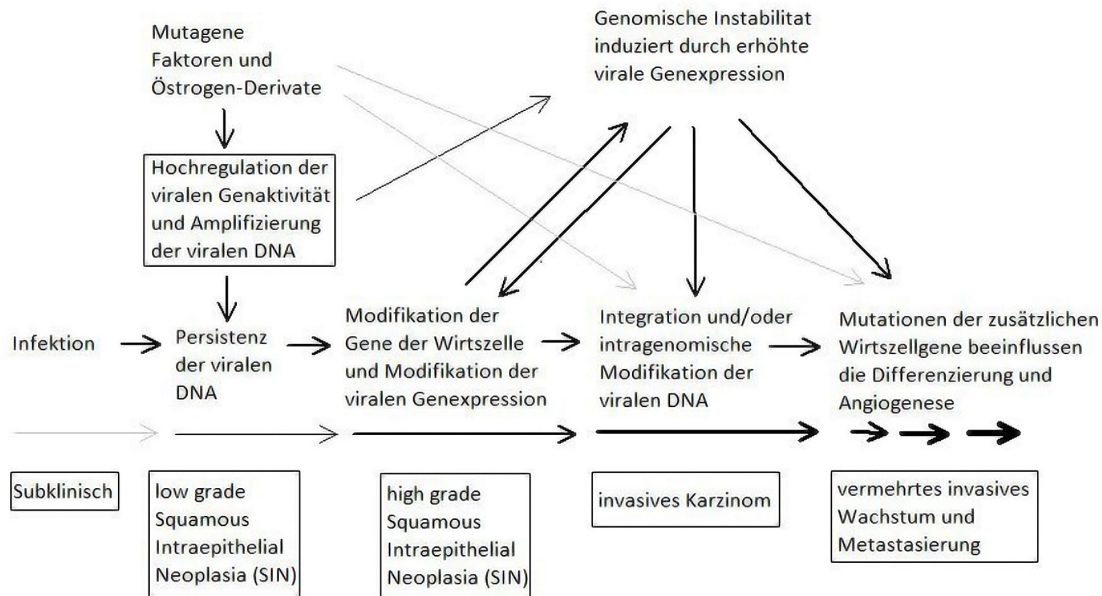
allerdings bei geringer Viruslast die klinische Relevanz nachlässt, ist dies kein großer Nachteil [36, 163]. Mit dieser Methode kann ebenfalls entweder die HPV-DNA oder E6/E7 mRNA nachgewiesen werden, wobei hier wieder die Vor- und Nachteile der Strukturen ähnlich zur PCR bestehen [163].

Eine weitere Methode ist die immunhistochemische Färbung des Produktes des Tumorsuppressorgens *CDKN2A/p16* (kurz *p16*). Infektionen mit *high-risk* HPV-Typen gehen signifikant häufig mit einer *p16^{ink4a}* Überexpression einher [76]. Bei diesem Verfahren werden spezifische Antikörper benutzt, um p16 anzufärben. Hierdurch ist die Quantität und die Lokalisation erkennbar [51]. Dieses Verfahren funktioniert ebenfalls bei in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Geweben und ist kostengünstig [86, 163]. Bei einer Erhöhung von p16 müssen, im Gegensatz zum E6/E7 Nachweis, ebenfalls andere Ursachen in Betracht gezogen werden [163]. Dieses Verfahren hat eine gute Sensitivität, aber eine schlechtere Spezifität. Deshalb ist diese Methode vor allem für Oropharynxkarzinome geeignet, da dort häufig HPV16 Infektionen vorliegen. Eine Kombination mit einem HPV-DNA Nachweis kann vor allem bei positivem Ergebnis sinnvoll sein [96, 163, 165]. Die Bestimmung einer *p16*-Überexpression wird für die neue TNM-Klassifikation vereinfacht zum Nachweis einer HPV-Ätiologie bei Karzinomen herangezogen (siehe Kapitel 1.4.3).

1.5.2 Entstehung eines Karzinoms durch *high-risk* HPV

Nach erfolgter Infektion der Zelle kann es entweder zu einer latenten Infektion oder einer Persistenz kommen. Bei bis zu 10 % der Bevölkerung kann HPV im oberen Hals-Rachen-Bereich nachgewiesen werden. In den meisten Fällen wird das Virus innerhalb von neun Monaten vom Immunsystem beseitigt [44]. Eine persistierende Infektion führt zu einer vermehrten Expression von E6 und E7, dadurch kommt es zu einer Aneuploidie und zur genetischen Instabilität. Anschließend wird durch die Reparaturmechanismen der Zelle die HPV-DNA integriert. Ein Schema der Pathogenese ist in Abbildung 2 zu sehen.

Im Genom gibt es instabile Positionen, die eher zu Brüchen im Chromosom neigen, und damit einen Angriffspunkt für die Integration fremder DNA bieten. So gibt es eine hohe Korrelation zwischen diesen bruchanfälligen Loci und den Stellen, an denen die HPV-DNA integriert wird [161]. In einer Studie von Matzner *et al.* [98] wurde die Integration eines Vektors zur Multiresistenz gegen Chemotherapeutika bei Brustkrebszellen unter Chemotherapie erforscht. Dieser Vektor wurde an einem zufälligen Locus in das Genom integriert, durch Selektion haben sich aber nur bestimmte Positionen durchsetzen können. Es gibt eine signifikante Überschneidung der Loci der Integration dieses Vektors, der bruchanfälligen Loci und der Loci, an denen die HPV-DNA integriert wird (diese Positionen sind: 1p36, 1q21, 6q21, 9q34, 12q13 und 13q22). Deshalb kommen Wentzensen *et al.* zu dem Schluss, dass nach der Integration der HPV-DNA eine Selektion stattfindet. Die Zellen, bei denen die Integration an besonders guten Positionen stattgefunden hat, haben eine höhere Expression von E6 und E7 und vermehren sich besser als die anderen Zellen [175, 161].

Abbildung 2: Schema zur *high-risk* HPV vermittelten Pathogenese

(eigene Übersetzung, Quelle: [175], genehmigt von Oxford University Press)

1.6 Epigenetik

Epigenetik ist die Veränderung in der Expression von Genen ohne eine Änderung der Aminosäuresequenz. Epigenetische Prozesse sind wichtig für die Entwicklung und Differenzierung, finden aber ebenfalls bei erwachsenen Menschen statt, entweder durch Zufall oder durch den Einfluss der Umgebung. Sie geben dem Genom die Möglichkeit sich anzupassen [65]. Ebenso kann die Epigenetik Einfluss auf die Entstehung von Karzinomen nehmen.

Die Möglichkeiten der Tumorentstehung sind im Allgemeinen vielfältig. Onkogene und Tumorsuppressorgene sind dabei häufig in die Entstehung involviert. Bei den Onkogenen kann eine vermehrte Expression zur Karzinomentstehung beitragen und bei den Tumorsuppressorgenen eine verminderte oder gar vollständig fehlende [75]. Nach der *Two-Hit-Hypothese* von Knudson müssen beide Gene eines Tumorsuppressorgens betroffen sein, um einen Ausfall zu erwirken. Dies kann entweder durch einen familiären Gendefekt der Fall sein, durch eine zufällig auftretende Mutation oder durch epigenetische Prozesse. Ist bereits vorher eines der Gene geschädigt, hat ein Verlust des zweiten Gens unmittelbare Konsequenzen [57].

Epigenetische Veränderungen können z. B. durch Methylierung der Promotorregion oder durch eine Modifikation der Histone geschehen. Histone können durch Acetylierung, Phosphorylierung, Methylierung und Ubiquitylierung modifiziert werden. Es gibt zwei verschiedene Theorien zur Funktionsweise der Histonmodifizierung. Eine Theorie besagt, dass sie die Chromatinstruktur direkt beeinflusst und die andere, dass sie eine besondere Oberfläche zur Interaktion mit anderen Proteinen schafft [8].

1975 wurden erstmals zwei unabhängige Artikel veröffentlicht, in denen postuliert wurde, dass die Methylierung von Cytosin in CpG-Inseln eine epigenetische Veränderung in der Säugetier-

DNA darstellen könnte und dass dies zum *Gene-Silencing* führen könnte [59, 127]. Nach heutigem Kenntnisstand findet bei dieser Art der epigenetischen Veränderung eine Methylierung der Promotorregion statt. Die Promotorregion liegt vor dem Transkriptionsstart eines Gens, dort sind Cytosin-phosphatidyl-Guanin-Inseln (CpG-Inseln) lokalisiert. Diese weisen einen CG Gehalt von über 55 % auf und umfassen mindestens 200 Basenpaare (bp) [147]. Wird diese Region methyliert, wird das Gen vermindert oder gar nicht mehr exprimiert, dies wird auch *Gene-Silencing* genannt [19].

Ebenso gibt es CpG-Dinukleotide, welche nicht in CpG-Inseln liegen. Diese sind normalerweise überwiegend methyliert. Bei einem Karzinom ist dies nicht der Fall: Die CpG-Inseln, die normalerweise nicht methyliert sind, sind häufiger methyliert und die CpG-Dinukleotide sind seltener methyliert (siehe Abbildung 3) [57].

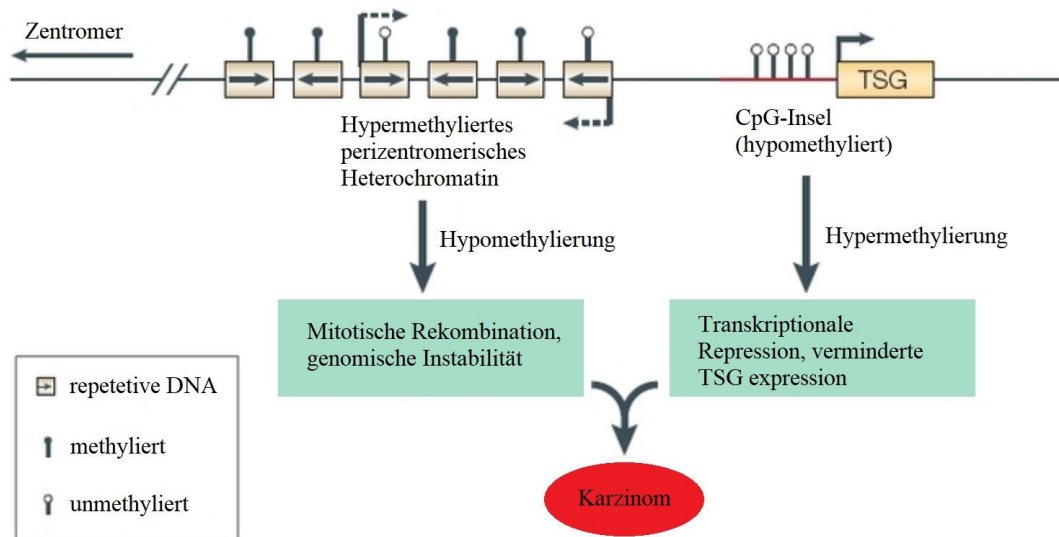


Abbildung 3: DNA-Methylierung und Karzinome

„Das Diagramm zeigt eine repräsentative Region der genomischen DNA einer normalen Zelle. Die gezeigte Region enthält wiederholungsreiches, hypermethyliertes, perizentromeres Heterochromatin und ein aktiv transkribiertes Tumorsuppressorgen (TSG), assoziiert mit einer hypomethylierten CpG-Inseln (angezeigt in rot). In Tumorzellen wird wiederholungsreiches Heterochromatin hypomethyliert und das trägt zu einer genomischen Instabilität, welche ein Kennzeichen von Tumorzellen darstellt, durch erhöhte mitotische rekombinative Ereignisse bei. *De novo* Methylierung von CpG-Inseln erscheint auch in Karzinomzellen und kann in der transkriptionellen Ausschaltung von wachstumsregulierenden Genen resultieren. Diese Veränderungen in der Methylierung sind frühe Ereignisse in der Tumorgenese.“
(eigene Übersetzung, Quelle: [129], genehmigt von Springer Nature)

1.7 Genetische und epigenetische Veränderungen bei Oropharynxkarzinomen

Es gibt verschiedene bekannte genetische Mutationen, die häufig zur Entartung der Zelle beitragen. Die wichtigsten betreffen die Signaltransduktionswege von *p53*, von *Retinoblastom-Protein*,

von *EGFR* oder von *PI3K-PTEN-AKT* [86]. Es gibt mehrere etablierte Krebs-Gene zur Entstehung von Kopf-Hals-Karzinomen. Diese können in Tumorsuppressorgene und Onkogene unterteilt werden. Die bekannten Tumorsuppressorgene sind nach Leemans *et al.* [86]: *CDKN2A/p16*, *PTEN*, *TP53* und *SMAD4*. Zu den bekannten Onkogenen gehören: *PIK3CA*, *EGFR*, *MET* und *CCND1*. Ebenso gibt es bekannte epigenetische Veränderungen bei den Kopf-Hals-Karzinomen. Es konnten vermehrte Methylierungen in den Promotorregionen von *MGMT*, *CDKN2A/p16*, *DAPK*, *TIMP3*, *CDH1*, *RASSF1*, *Cyclin A1* und *MLH1* in verschiedenen Studien nachgewiesen werden [158, 95, 128, 140, 152].

1.7.1 Veränderungen durch HPV

Vor allem die Onkoproteine E6 und E7 führen zu relevanten Veränderungen. E6 führt zusammen mit der in der Zelle vorliegenden Ubiquitinligase E6AP zu einer Deaktivierung und zum Abbau von p53, welches den Zellzyklus reguliert (siehe Abbildung 4) [162, 165]. p53 ist bei HPV positiven Karzinomen im Gegensatz zu den HPV negativen Karzinomen als Wildtyp vorhanden [79]. Zusätzlich erhöht E6 die humane Telomerase-Aktivität (in der Abbildung hTERT) und ermöglicht der Zelle somit ein längeres Leben [162, 165]. E7 bindet an Inhibitoren der cyclinabhängigen Kinase und beeinflusst die Expression von p16.

CDKN2A/p16

p16 wird ebenfalls *p16^{ink4a}* oder *Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A* (CDKN2A) genannt. Es ist ein Tumorsuppressorgen, welches die *Cyclin dependent Kinase 4A* inhibiert. So verhindert p16 in der gesunden Zelle den Übergang von der G1 in die S-Phase im Zellzyklus. Bei einer aktiv mit HPV infizierten Zelle bindet E7 an pRB, wodurch E2F und dadurch p16 vermehrt exprimiert werden (siehe Abbildung 4) und es der Zelle ermöglicht wird, in die S-Phase überzugehen [82, 156]. Durch diese vermehrte Expression kann p16 zur Diagnostik herangezogen werden, ob Karzinomzellen aktiv mit HPV infiziert sind [82, 165]. Es konnte nachgewiesen werden, dass die *p16^{ink4a}* Expression mit der HPV-Viruslast korreliert [74]. HPV16 und 18 gehen signifikant häufig mit einer vermehrten p16 Expression einher [76].

1.7.2 Veränderungen bei HPV positiven und negativen Karzinomen im Vergleich

Bei den Oropharynxkarzinomen gibt es die durch HPV verursachten Karzinome und die durch Noxen verursachten. Karzinome, die durch Alkohol- und Zigarettenkonsum entstehen, entarten durch eine Ansammlung von Replikationsfehlern. Dadurch können Tumorsuppressorgene deaktiviert und Onkogene aktiviert werden und es kann zu einem Verlust der kontrollierenden Faktoren des Zellzyklus kommen (siehe Abbildung 4). Durch die unterschiedliche Genese dieser Tumore gibt es große genetische Differenzen (siehe Tabelle 6). So ist bei HPV negativen Tumoren p53 meistens mutiert, wobei es bei den HPV positiven zwar durch E6 herunter reguliert wird, jedoch noch in seiner Wildtyp-Form vorliegt [46]. Bei den Noxen assoziierten Karzinomen wird *p16^{ink4a}* vermindert und *EGFR*, *Survivin* und *Cyclin D1* vermehrt exprimiert. Insbesondere

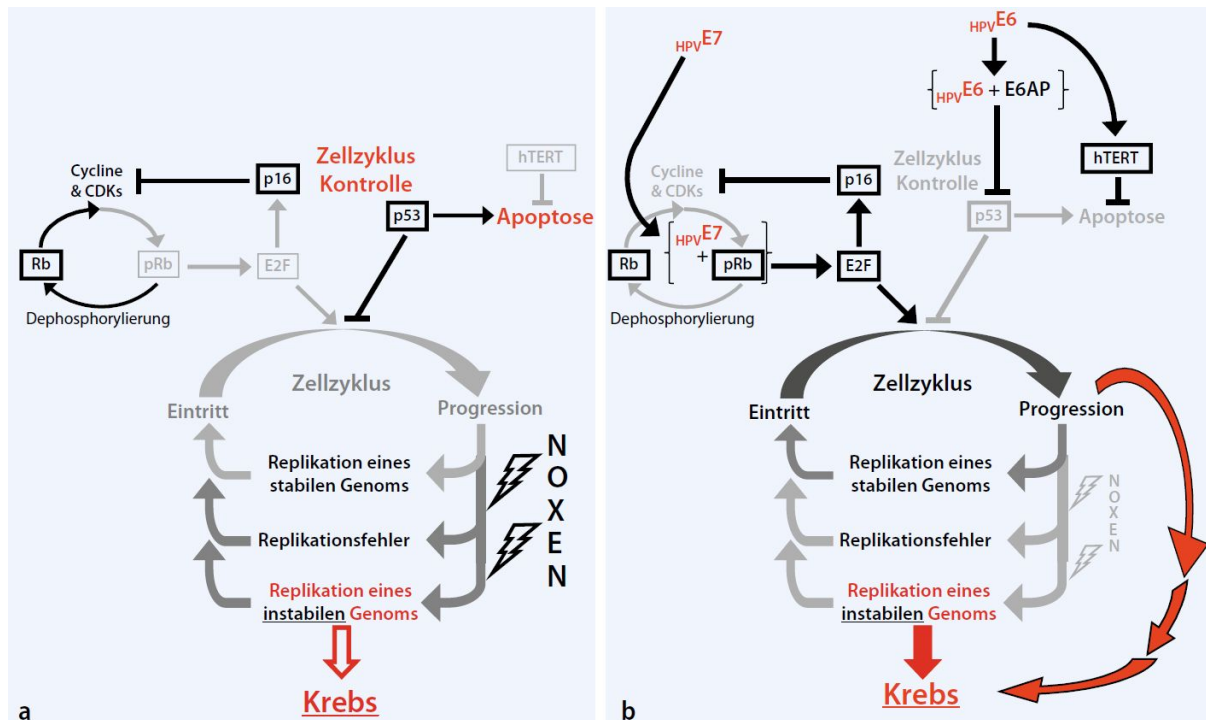


Abbildung 4: Karzinomentstehung durch HPV und durch Noxen

„a Nicht HPV assoziierte Karzinogenese und Kontrolle des Zellzyklus durch p16 und p53

b HPV assoziierte Karzinogenese und Deregulation des Zellzyklus durch die viralen Onkoproteine HPV E6 und HPV E7“

(Quelle: [165], genehmigt von Springer Nature)

die verminderte Synthese des antiproliferativ wirkenden $p16^{ink4a}$ ist ein frühes Ereignis in der Noxen assoziierten Genese. Bei den HPV assoziierten wird pRb vermindert und $p16^{ink4a}$, $p14$, $p21$ vermehrt exprimiert [74, 79, 96].

1.8 Cyclin A1

Die Proteine Cyclin A1 und Cyclin A2 sind beteiligt an der Regulation des Zellzyklus. Sie binden beide unter anderem an die Cyclin-abhängige Kinase 2 (CDK-2). Die CDK-2 initiiert die DNA-Replikation [26]. Cyclin A1 kontrolliert bedeutende Punkte im Zellzyklus. Während des regulären Zellzyklus herrscht in der G0-Phase in der Zelle eine niedrige Konzentration der Cyclin A1 mRNA, in der S-Phase und G2/M dagegen eine hohe, wodurch die DNA-Synthese in Säugetierzellen ermöglicht wird [64, 48]. Außerdem interagiert Cyclin A1 mit E2F-1 und Rb, welche im Zellzyklus ebenfalls eine wichtige Funktion innehaben [170]. Somit ist *Cyclin A1* ein wichtiges Tumorsuppressorgen. In gesunden Zellen wird *Cyclin A1* im Hoden vermehrt exprimiert, es ist aber auch in den meisten anderen Geweben vorhanden [170, 26].

Bei Zervixkarzinomen konnte bei integrierter HPV-DNA eine gesteigerte Methylierung der Promotorregion nachgewiesen werden [168], dort korrelierte der *Cyclin A1* Status mit der Invasi-

Tabelle 6: Gegenüberstellung der Veränderungen von HPV¹ positiven und negativen Karzinomen

	HPV positive Karzinome	HPV negative Karzinome
HPV16 DNA	↑	
E6 & E7	↑ [165]	
<i>p53</i>	Wildtyp [46]	mutiert [46]
<i>p16^{ink4a}</i>	↑ [74, 79, 96]	↓
<i>EGFR</i> ²		↑ [74]
<i>Survivin</i>		↑ [74]
<i>Cyclin D1</i>		↑[74]
<i>pRb</i> ³	↓ [74]	
<i>p14</i>	↑ [74, 79, 96]	
<i>p21</i>	↑ [74, 79, 96]	
<i>E2F</i>	↑ [156]	

¹ Humanes Papillomavirus

² *Epidermal Growth Factor Receptor*

³ Retinoblastom-Protein

vität [73]. Santopietro *et al.* konnten eine gesteigerte Expression von *Cyclin A* als unabhängigen Risikofaktor von *high-risk* HPV Karzinomen bei Zervixkarzinomen feststellen [135]. In einer anderen Studie ist bei HPV16 infizierten Zervixkarzinomzellen eine verminderte Expression von *Cyclin A1* festgestellt worden [20].

Von Yang *et al.* konnte eine vermehrte Promotormethylierung von *Cyclin A1* bei malignen Tumoren gezeigt werden. Eingeschlossen in die Analyse waren Kopf-Hals-Karzinome, nicht-kleinzellige Lungenkarzinome, kolorektale Karzinome, nasopharyngeale Karzinome, Blasenkarzinome und hepatozelluläre Karzinome [169]. Für Mundhöhlenkarzinome hingegen wurde eine inverse Korrelation der *Cyclin A1* Methylierung und dem histologischen Grad gezeigt [140].

Tokumaru *et al.* [149] wiesen nach, dass die Promotorregion von *Cyclin A1* in Kopf-Hals-Tumoren mit einem *p53* Wildtyp vermehrt methyliert vorlag, allerdings ist in dieser Studie der HPV-Status nicht berücksichtigt worden. Bei HPV16 positiven Oropharynxkarzinomen wurde von mehreren Arbeitsgruppen eine vermehrte Promotormethylierung von *Cyclin A1* festgestellt [24, 158, 136], wobei dies unabhängig vom Vorliegen einer *p53*-Mutation war [71].

Bei HPV16 positiven Kopf-Hals-Karzinomen konnte jedoch auch eine Erhöhung der Expression von *Cyclin A1*, welche insbesondere mit der Expression von *p16* (ein CDK-Inhibitor) korrelierte, nachgewiesen werden. Unabhängig vom HPV-Status bedingte die vermehrte Synthesierung von *Cyclin A1* ebenfalls eine geringere Rezidivrate. Außerdem wiesen gutartige Tonsillentumoren eine inverse Korrelation der *Cyclin A1* Expression zum Alter auf [159].

1.9 DNA-Methyltransferasen

DNA-Methyltransferasen (DNMT) katalysieren eine Reaktion, in der eine Methyl-Gruppe von S-Adenosyl-Methionin an eine CpG-Insel transferiert wird [134].

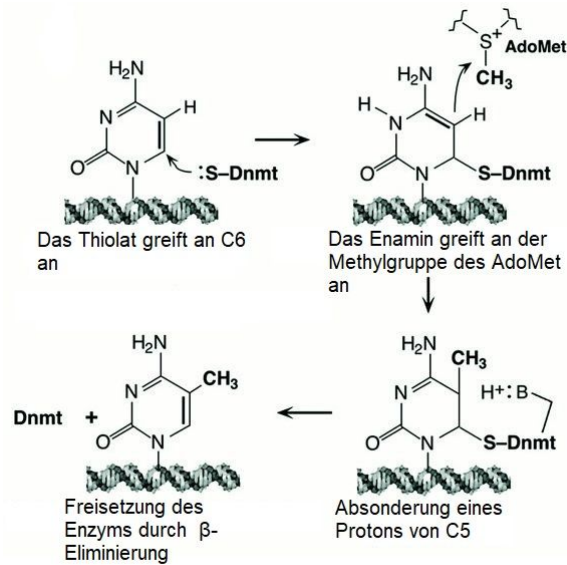


Abbildung 5: Katalysemechanismus und Struktur der DNA (Cytosin-5)-Methyltransferase

„Die Protonation von der N3-Position wird vermittelt von dem hochkonservierten ENV Tripeptid in motif VI. Die Base, die das 5-Proton nach dem Methyltransfer absorbieren, ist nicht in allen Fällen bekannt.“
(eigene Übersetzung, Quelle: [9], genehmigt von Oxford University Press)

Dies führt zum bereits erwähnten *Gene-Silencing*. So können DNMT zur Karzinogenese beitragen und sind Gegenstand aktueller Forschungen [144]. Es gibt vier bekannte DNMT in Säugetieren: DNMT1, DNMT3a, DNMT3b und DNMT3L. Die DNMT1 ist für den Erhalt von bestehenden Methylierungsmustern der DNA verantwortlich, für das genomische *Imprinting* sowie für die Inaktivierung des X-Chromosoms [142]. Sie ist ubiquitär vorhanden und wird vor allem in proliferierenden Zellen vermehrt exprimiert [131]. Bei HPV16 positiven Karzinomen ist eine erhöhte Expression von der DNMT1 in Zervixkarzinomzellen (SiHa) nachgewiesen worden [20]. Sie bildet zudem einen Angriffspunkt für E7 von HPV16, die CR3 Zinkfingerdomäne von E7 kann an die DNMT1 binden und die Aktivität erhöhen [17]. In einer anderen Studie ist gezeigt worden, dass E6 von HPV16 in Zervixkarzinomzellen die DNMT1 über *p53* reguliert [172]. Die DNMT3a und die DNMT3b sind für die Etablierung neuer Methylierungsmuster zuständig [6]. Sie spielen beide eine wichtige Rolle sowohl in der normalen Entwicklung als auch bei der Entwicklung von Krankheiten. Die DNMT3b methyliert außerdem Satelliten-DNA bei den Zentromeren [114]. Die DNMT3L übt ihre Funktion hauptsächlich bei der mütterlichen genomischen Prägung aus [13]. Es gibt viele andere Karzinome, in denen bereits eine vermehrte Expression der DNMT nachgewiesen wurde [144]. Robertson [130] hat die These aufgestellt, dass DNMT mit vielen anderen Proteinen interagieren, diese können sie davon abhalten, bestimmte Regionen zu methylieren, oder aber sie von den Regionen weg titrieren. Zu den Proteinen, die mit der DNMT1 interagieren, zählt er z. B. Annexin V [113], p23 [174], *Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen* [22], Histon-Deacetylase 1 [41] und Histon-Deacetylase 2 [132].

1.10 Ziel der Arbeit

Das Ziel der Arbeit war es herauszufinden, ob in mit HPV16 E6/E7 immortalisierten Humanen Oralen Keratinozyten die Methyltransferasen vermehrt exprimiert werden und ob es einen Zusammenhang zwischen dem *Cyclin A1* Methylierungsstatus und der Expression gibt oder ob *Cyclin A1* trotz einer Promotormethylierung vermehrt exprimiert wird.

Dazu werden zuerst HOK mit HPV16 E6 und E7 immortalisiert und mit Hilfe einer *real-time*-PCR die Synthese von E6 und E7 überprüft. Ist dies geschehen, werden die Expression der Methyltransferasen, der Methylierungsstatus von *Cyclin A1* und die Expression von *Cyclin A1* zwischen den E6/E7 positiven und den E6/E7 negativen HOK gemessen. Dadurch sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Führt die HPV-bedingte Immortalisierung (der HOK) zur vermehrten Methylierung von *Cyclin A1*?
2. Führt die HPV-bedingte Immortalisierung (der HOK) zu Änderungen der Expression von *Cyclin A1*?
3. Besteht ein Zusammenhang zwischen Methylierung und Expression von *Cyclin A1*, speziell in Abhängigkeit einer HPV-Infektion?
4. Führt eine HPV-bedingte Immortalisierung zu einer vermehrten Expression einer oder mehrerer Methyltransferasen?

Wird ein signifikanter Unterschied festgestellt, werden in einem nächsten Schritt die E6/E7 positiven HOK mit E6-miRNA und E7-miRNA transfiziert, um einen selektiven *knock-down* zu erreichen. Diese Arbeit endet mit der Herstellung der miRNA.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

Die folgenden Zelllinien entstammen der American Type Culture Collection (Manassas, Virginia, USA).

Zelllinie	Zelltyp/Entnahmeregion
A549	alveoläre Basalzellen eines Adenokarzinoms der Lunge, Human
CaSki	Epidermoidkarzinom der Zervix, Human
HeLa	Adenokarzinom der Zervix, Human
U937	Pleuraerguss bei histiozytärem Lymphom, Human
PA317 LXS N 16 E6/E7	Fibroblasten, Mausembryo

Die folgende Zelllinie ist von ScienCell Research Laboratories (Carlsbad, CA, USA).

Zelllinie	Zelltyp/Entnahmeregion
Humane Orale Keratinozyten	orale Mukosazellen, Human

2.1.2 Zellkulturmaterialien

Hersteller	Produktname
American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA	<i>Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM)</i>
	RPMI 1640 Medium
Greiner bio one, Frickenhausen	CELLSTAR Filter Top Zellkulturflasche, T25 CELLSTAR Filter Top Zellkulturflasche, T75
Merck Millipore, Darmstadt	<i>G 418 Sulfate, Cell Culture Tested</i> <i>Polybrene Infection/Transfection Reagent</i>
PAA Laboratories GmbH, Cölbe	FCS Gold Accutase
PanReac AppliChem, Darmstadt	<i>Ethanol absolute</i>
Sarstedt AG & Co., Nümbrecht	Filtropur S 0.45 TC-Flasche T25, Cell+, <i>PE Vented Cap</i> TC-Flasche T75, Cell+, <i>PE Vented Cap</i> (gelb)
ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, CA, USA	Poly-L-Lysin <i>Oral Keratinocyte Medium (OKM)</i> - eine Flasche enthält 500 <i>mL</i> Basalmedium - 5 <i>mL</i> <i>oral kartinocyte growth supplement</i> - bei Bedarf: 5 <i>mL</i> Penicillin/Streptomycin
Merck Millipore, Darmstadt	Dimethylsulfoxide (DMSO)
Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	<i>Lennox LB Broth Base</i> LB Agar

2.1.3 Kits

Firma	Produktname
Qiagen, Hilden	<i>EpiTect Bisulfite Kit</i> <i>Rneasy Mini Kit</i> <i>QIAamp DNA Mini Kit</i>
Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	<i>SuperScript II Reverse Transcriptase</i> <i>Block-iT Pol II miR RNAi Expression Vector Kit with EmGFP</i> <i>PureLink® HQ Mini Plasmid Purification Kit</i>

2.1.4 PCR- und Sequenzierungs-Materialien

Firma	Produktname
GE Healthcare, München	Sephadex G 50
Merck Millipore, Darmstadt	96-Well MultiScreen-HV 0,45 μ L Platte <i>MultiScreen₉₆ PCR Filter-Platte</i> S7821, CpGenome Universal Methylated DNA S7822, CpGenome Universal Unmethylated DNA
Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	<i>BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit</i> TaqMan® Universal PCR Mastermix <i>Purelink HQ Plasmid Pur. Kit</i> <i>MicroAmp Optical 384-Well Reaction Plate with Barcode</i> <i>Optical Adhesive Cover</i>

2.1.5 Primer und Sonden

Alle Primer und Sonden wurden von Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) bezogen und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die TaqMan-Sonden waren am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff FAM und am 3'-Ende mit dem Quencher TAMRA *gelabelt* und wurden möglichst vor Lichteinstrahlung geschützt. Die Primer waren in H_2O aufgelöst, sodass sie eine Konzentration von $100\text{ }\mu\text{M}$ hatten.

Primer und Sonden	Sequenz
HPV16E6 <i>forward</i> Primer	5'-CTG CAA TGT TTC AGG ACC CA-3'
HPV16E6 <i>reverse</i> Primer	5'-TCA TGT ATA GTT GTT TGC AGC TCT GT-3'
HPV16E6 TaqMan Sonde	5'-AGG AGC GAC CCG GAA AGT TAC CAC AGT T-3'
HPV16E7 <i>forward</i> Primer	5'-AAG TGT GAC TCT ACG CTT CGG TT-3'
HPV16E7 <i>reverse</i> Primer	5'-GCC CAT TAA CAG GTC TTC CAA A-3'
HPV16E7 TaqMan Sonde	5'-TGC GTA CAA AGC ACA CAC GTA GAC ATT CGT A-3'
cDNA CCNA1 <i>forward</i> Primer	5'-GCA CCC TGC TCG TCA CTT G-3'
cDNA CCNA1 <i>reverse</i> Primer	5'-AGCC CCC CAA TAA AAG ATC CAG-3'
cDNA CCNA1 TaqMan Sonde	5'-AGA CCG GCT TTC CCG CAA TCA TG-3'
cDNA GAPDH <i>forward</i> Primer	5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT C-3'
cDNA GAPDH <i>reverse</i> Primer	5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3'
cDNA GAPDH TaqMan Sonde	5'-CAA GCT TCC CGT TCT CC-3'
CCNA1 QMSP <i>forward</i> Primer	5'-TCG CGG CGA GTT TAT TCG-3'
CCNA1 QMSP <i>reverse</i> Primer	5'-CCG ACC GCG ACA AAC G-3'
CCNA1 QMSP TaqMan Sonde	5'-AGA GTG GAG TTG TGC TGG CT-3'
cDNA DNMT1 <i>forward</i> Primer	5'-CGG TTC TTC CTC GAG AAT GTC A-3'
cDNA DNMT1 <i>reverse</i> Primer	5'-CAC TGA TAG CCC ATG CGG ACC A-3'
cDNA DNMT1 TaqMan Sonde	5'-AAC TTT GTC TCC TTC AAG CGC TCC ATG GTC-3'
cDNA DNMT3a <i>forward</i> Primer	5'-CAA TGA CCT CTC CAT CGT CAA C-3'
cDNA DNMT3a <i>reverse</i> Primer	5'-CAT GCA GGA GGC GGT AGA A-3'
cDNA DNMT3a TaqMan Sonde	5'-AGC CGG CCA GTG CCC TCG TAG-3'
cDNA DNMT3b <i>forward</i> Primer	5'-CCA TGA AGG TTG GCG ACA A-3'
cDNA DNMT3b <i>reverse</i> Primer	5'-TGG CAT CAA TCA TCA CTG GAT T-3'
cDNA DNMT3b TaqMan Sonde	5'-CAC TCC AGG AAC CGT GAG ATG TCC CT-3'
EmGFP (Sequ.) <i>forward</i> Primer	5'-GGC ATG GAC GAG CTG TAC AA-3'

miRNA (Sequ.) *reverse* Primer 5'-CTC TAG ATC AAC CAC TTT GT-3'

2.1.6 Geräte

Hersteller	Produktname
BD Bioscience, Heidelberg	<i>Conical Tube</i> 15 m <i>Conical Tube</i> 50 mL
Eppendorf AG, Wesseling-Berzdorf	Biophotometer plus <i>Mastercycler</i> <i>Research Plus</i> (Pipette) 0.1-2,5 μ L <i>Research Plus</i> (Pipette) 0.5-10 μ L <i>Research Plus</i> (Pipette) 10-100 μ L <i>Research Plus</i> (Pipette) 100-1000 μ L <i>Safe-Lock Tubes</i> , 1,5 mL (Biopur) UVette 220-1 600 nm
Heraeus Instruments, Hanau	Brutschrank Biofuge Pico
Infors HT, Bottmingen, Schweiz	Multitron
Hettich Laborapparate, Tuttlingen	Rotanta Zentrifuge
Merck Millipore, Darmstadt	<i>IKA[®] MS 1 Minishaker</i>
Julabo, Seelbach	Wasserbad
Leica, Wetzlar	Mikroskop
Qiagen, Hilden	<i>QIAshredder (50)</i>
Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	<i>3730xl DNA Analyzer</i> <i>Gene Amp PCR System 9700</i>

2.1.7 Software

Produzent	Software
Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Australia	Chromas
Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	SDS 2.3 SeqScanner
U.S. National Library of Medicine, Bethesda, Maryland, USA	<i>Nucleotide BLAST</i>

2.2 Methoden

In dieser Arbeit wird hauptsächlich auf die Humanen Oralen Keratinozyten eingegangen, es wird für diese Zellen die Anzucht und das Erstellen der miRNA beschrieben. Bei der Isolierung der DNA, RNA, der Bisulfit-Behandlung und den anschließenden *Real-time*-PCR wurden zusätzlich bereits in dem Labor vorhandene Zelllinien als Kontrollgruppe verwendet. Die miteinbezogenen Zellreihen waren HeLa, Caski, U937, PA317 und A549. Im Folgenden sind kurz die Eigenschaften dieser Zellreihen aufgeführt.

- HeLa Zellen sind mit HPV 18 infizierte Zellen eines Adenokarzinoms der Zervix, bei diesen Zellen ist eine Methylierung der Promotorregion für *Cyclin A1* nachgewiesen [104],
- CaSki Zellen sind mit HPV16 infizierte Zellen eines Epidermoidkarzinoms der Zervix,
- U937 Zellen sind aus einem Pleuraerguss eines Patienten mit einem histiozytären Lymphom isoliert worden,
- PA317 Zellen sind Zellen von einem Mausembryo mit Herpes Thymidinkinase-Gen und
- A549 sind alveoläre Basalzellen von einem Adenokarzinom der Lunge.

2.2.1 Humane Orale Keratinozyten

Initiierung der HOK Kultur

Die HOK wurden von ScienCell Research Laboratories (Carlsbad, CA, USA) bezogen. Beim Ansetzen der HOK Kultur wurde steril gearbeitet. Es wurden *Cell+* Kulturflaschen (*TC-Flasche T75*) (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) bereitgestellt. Diese wurden erst wie vom Hersteller empfohlen mit Poly-L-Lysin ($2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) vorbereitet. Dazu wurden 10 mL steriles Wasser und 15 μL von der Poly-L-Lysin Stocklösung in die Kulturflaschen pipettiert und diese über Nacht im Inkubator bei 37°C inkubiert. Als Nächstes wurde das Medium (OKM) vorbereitet. Hierzu wurde das Medium nach Herstellerangaben mit dem mitgelieferten Supplement versetzt. In dieser Arbeit ist mit dem Oralen Keratinozytenmedium (OKM) immer das supplementierte Medium gemeint. In die vorbereiteten Kulturflaschen wurden 15 mL von dem OKM hineinpipettiert. Nun wurden die kryokonservierten Zellen transferiert: Die gefrorene Probe der HOK wurde in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut. Dann wurden die Zellen in die vorbereiteten Kulturflaschen pipettiert, bis eine Zelldichte von $5000 \text{ Z}/\text{cm}^2$ bestand. Nun wurden die Kulturflaschen vorsichtig geschwenkt, damit ein konfluent wachsender Zellrasen entstehen konnte, und im Brutschrank inkubiert. Nach 24 h wurde das OKM gewechselt, um die letzten Reste DMSO zu entfernen. Als in den Kulturflaschen eine Konfluenz von ca. 90 % erreicht war, wurden die Zellen passagiert. Für die weitere Anzucht wurden unbehandelte (nicht mit den Poly-L-Lysin vorbereitete) TC-Flaschen, *Cell+* (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) verwendet. Diese besitzen eine *Cell+*-Wachstumsfläche für sensitiv adhärente Zellen.

Anzucht der HOK

Zur Kultivierung der HOK wurde OKM verwendet. Die Zellen wurden in T75 Kulturflaschen (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) kultiviert und bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Zum Schutz vor der Infizierung mit Bakterien wurde sicherheitshalber parallel zu den Zellen ohne Antibiotikum eine mit Streptomycin versehene Flasche kultiviert. Alle zwei bis drei Tage wurde das OKM in den Zellkulturflaschen ausgetauscht, sodass immer genügend Nährstoffe für die Zellen vorhanden waren.

Passagierung

War eine Konfluenz von 85% bis 95% erreicht, wurden die Zellen passagiert, um optimale Bedingungen für eine weitere Proliferation zu erhalten. Das Kulturmedium wurde entfernt, danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und 10 min mit 2 mL Accutase inkubiert, bis sich die Zellen von der Flasche lösten. Zur Deaktivierung der Accutase wurden die Zellen mit OKM und 10% FCS versetzt und anschließend wurde die Zellsuspension in ein Reaktionsgefäß überführt. Es wurde nochmals mit PBS gewaschen und die Zelllösung danach ebenfalls in das Röhrchen pipettiert, um auch die restlichen Zellen zu transferieren. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei $10\,000\text{ U/min}$ für 5 min , danach wurden die pelletierten Zellen in OKM resuspendiert. Nach einer Zellzählung wurden ca. $200\,000$ Zellen in eine neue Flasche ausgesät. Die restlichen Zellen wurden zur späteren Verwendung eingefroren.

Einfrieren und Auftauen der HOK

Es wurden $10^6 - 1,5\text{ mio Z/mL}$ mit 10% FCS und 5% DMSO zunächst bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und einige Tage später in die Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ überführt. Zur weiteren Verwendung wurden die eingefrorenen Zellsuspensionen im Wasserbad bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgetaut. Anschließend wurde der Inhalt in eine Kulturflasche mit Medium überführt und im Brutschrank inkubiert. Einige Stunden später wurde das alte Medium entfernt, da das enthaltene DMSO zellschädigend ist, und durch neues Medium ersetzt.

Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden $30\text{ }\mu\text{L}$ der Zelllösung in eine Neubauerkammer zur Zellzählung überführt. Die großen Quadrate der Zählkammer hatten eine Fläche von 1 mm^2 und eine Tiefe von $0,1\text{ mm}$, woraus sich ein Volumen von $1\text{ }\mu\text{L}$ ergibt. Es wurden jeweils acht große Quadrate ausgezählt. Der durch das Auszählen der großen Quadrate erhaltene Mittelwert der Zellzahl wurde mit $10\,000$ multipliziert. So ergab sich die Anzahl der Zellen, die pro mL in der Zelllösung vorhanden waren.

Erstellen der Impfstoffkultur

Als Nächstes wurde die Impfstoffkultur erstellt, mit der die Zellen mit E6/E7 immortalisiert wurden. E6 und E7 sind die onkogenen Abschnitte der HPV-DNA. Hierzu wurde das *Polybrene Infection / Transfection Reagent* (Merck Millipore, Darmstadt) verwendet und nach Herstellerangaben gearbeitet. Die Zellen zur Herstellung der Impfstoffkultur stammten aus der American

Type Culture Collection (Manassas, Virginia, USA). Es wurde die Zelllinie *PA317/LXSN16E6E7* verwendet.

Die *PA317/LXSN16E6E7* Zellen wurden zusammen mit 9 *mL* PBS in ein Reaktionsgefäß umgefüllt. Die Zellen wurden 5 *min* bei 400 *x g* zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und die Zellen in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA) mit 10 % FCS supplementiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in eine *CELLSTAR Filter Top Zellkulturflasche T75* (Greiner bio one, Frickenhausen) überführt und bis zu einer Menge von 10 *mL* mit Medium aufgefüllt. Die Zellen wurden 96 *h* inkubiert, anschließend wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Es wurden 2 *mL* Accutase zugefügt. Nach ca. 10 *min*, als sich die Zellen gelöst hatten (mikroskopische Kontrolle), wurden sie mit 5 *mL* Wachstumsmedium aus der Flasche entnommen. Die Kulturflasche wurde nochmals mit PBS gespült, um die restlichen Zellen ebenfalls zu transferieren. Es wurden je $3 \cdot 10^6$ Zellen mit 15 *mL* Medium in 15 *Filter Top Zellkulturflasche T75* (Greiner bio one, Frickenhausen) kultiviert. Nach drei Tagen waren die Zellen zu einer Dichte von 90 % angewachsen. Das Medium wurde entfernt und OKM mit 5 % FCS hinzugefügt. Nun wurden die Zellen 20 *h* inkubiert und das Medium wurde mit Hilfe eines *Filtropur S 0.45* (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) steril filtriert. Die derart erstellte Impfstoffkultur wurde bei -20 °C gelagert.

Immortalisieren der HOK mit E6/E7

Diese Methode zur Immortalisierung der HOK wurde von Pritinder Kaur *et al.* [69] etabliert und wie folgt durchgeführt.

1. Tag: Es wurden drei *TC-Flaschen T75* (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) mit 10 *mL* OKM versetzt und $6 \cdot 10^5$ HOK ausgesät. Die restlichen Zellen wurden in eine weitere T75 (Sarstedt AG & Co.) Flasche überführt.
2. Tag: Zwei der Kulturflaschen wurden verworfen. Zu der letzten Flasche wurden 3 *mL* der Impfstoffkultur, 7 *mL* von OKM und 40 μL Polybrene hinzugefügt. Danach wurden die Zellen 6 *h* inkubiert. Nun wurde die gesamte Flüssigkeit in der Flasche durch 10 *mL* OKM ersetzt.
3. Tag: Es wurde eine T75 Flasche als Kontrolle mit $6 \cdot 10^5$ Zellen mit 10 *mL* OKM angesetzt.
4. Tag: Zur immortalisierten Zellsuspension wurde Selektionsmedium hinzugefügt: 10 *mL* OKM mit 7,8 μL G418 (Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) von EMD Millipore. G418 gehört zu der Gruppe der Aminoglycosid Antibiotika. Der durch die Impfstoffkultur integrierte retrovirale Vektor in den transfizierten Zellen enthält ein Neomycin-Geneticin-Resistenzgen, welches die Zelle vor der zelltoxischen Wirkung von G418 schützt.
5. Tag: Das Wachstum der Zellen wurde kontrolliert.
6. Tag: Das Medium wurde gewechselt.
7. Tag: Die Zellen wurden wiederum in 10 *mL* Selektionsmedium kultiviert. Es waren viele Zellen abgerundet. Ein Teil der nicht immortalisierten Zellen der Kontrollflasche wurde bei

-70 °C eingefroren, um DNA und RNA aus den Zellen zu isolieren.

8. Tag: Das Wachstum der Zellen wurde kontrolliert.
9. Tag: Die immortalisierten Zellen wurden erneut in 10 mL Selektionsmedium kultiviert. Die Zellen der Kontrollflasche wurden ab jetzt mit OKM + Streptomycin kultiviert.
10. Tag: Das Wachstum der Zellen wurde kontrolliert.
11. Tag: Die immortalisierten Zellen wurden mit OKM ohne das Selektionsmedium kultiviert. Mittlerweile war die Anzahl der Zellen deutlich reduziert. Bei den Zellen in der Kontrollflasche wurde ebenfalls das Medium gewechselt.

Die Zellen wurden weiterhin in OKM kultiviert. Nun wurde auch zu den immortalisierten Zellen Streptomycin hinzugefügt.

2.2.2 DNA-Isolation

Vorbereitung der Zellen

Die kultivierten Zellen wurden zur DNA-Isolation vorbereitet. Sie bildeten in ihrer Kulturflasche eine Monolayerschicht. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und danach mit 2 mL Accutase behandelt. Nachdem sie sich gelöst hatten (mikroskopische Kontrolle), wurde die Accutase mit Nährmedium und 10 % FCS deaktiviert und die Zellsuspension in ein Reaktionsgefäß überführt, dann wurde die Kulturflasche nochmals mit PBS gewaschen, um auch die letzten Zellen zu transferieren. Nach dem Zählen wurden $5 \cdot 10^6$ Zellen in ein 15 mL Falconröhrchen pipettiert und bei 10 000 U/min für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und $5 \cdot 10^6$ Zellen in 200 µL PBS resuspendiert. Die Zellen wurden bei -20 °C eingefroren.

DNA-Isolation

Nach Herstellerangaben wurde die DNA mit Hilfe des *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen, Hilden) isoliert. Das Prinzip dieses Kits beruht auf einer Silica-Gel-Membran, welche die DNA bindet. Die gewonnene DNA kann eine Länge von bis zu 50 000 Basenpaaren haben. In einer Probe können bis zu 50 µg DNA gewonnen werden.

Es wurde bei Raumtemperatur gearbeitet. Die DNA wurde aus HeLa, CaSki, U937, P317, A549, HOK (E6/E7 pos.) und nicht E6/E7 immortalisierten HOK isoliert. Dazu wurden die Proben aufgetaut und 20 µL von der Qiagen Protease hinzugefügt. Danach wurde 200 µL AL-Puffer hinzugefügt, dieser war wie die folgenden im Kit enthalten, und 15 sek gevortext. Dann wurden die Zellen bei 56 °C für 10 min inkubiert und anschließend zentrifugiert. Als Nächstes wurden 20 µL Ethanol (96-100 %) hinzugefügt, danach wurde die Lösung 1 sek gevortext und zentrifugiert. Nun wurde die Lösung in eine QIAamp-Spinsäule überführt und zentrifugiert. Durch diesen Schritt wird die DNA in der Membran der QIAamp-Spinsäule gebunden. Der Durchfluss wurde anschließend verworfen. In den beiden folgenden Schritten wurde die DNA gewaschen, um mögliche Verunreinigungen zu entfernen. Es wurde 500 µL Puffer AW1 in die Spinsäule pipettiert und 1 min lang bei 8 000 U/min zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Dann wurden 500 µL AW2 Puffer hinzugefügt und bei maximaler Geschwindigkeit 3 min lang

zentrifugiert. Es wurde ein weiterer Zentrifugationsschritt durchgeführt (1 *min*, bei maximaler Geschwindigkeit). Der folgende Schritt wurde zweimal durchgeführt: Zu der Probelösung wurden 200 μL AE Puffer hinzugefügt und eluiert. Es wurde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 1 *min* bei 8000 U/min zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt und ein 2. Eluat erhalten.

2.2.3 Bisulfit-Behandlung der DNA

Für die Bisulfit-Behandlung wurde das *EpiTect Bisulfite Kit* (Qiagen, Hilden) verwendet. Mit dieser Behandlung wird die Quantifizierung der Methylierung der DNA ermöglicht. Durch Methylierung der Promotorregion wird die Expression eines Gens herunterreguliert. Durch Inkubation der DNA mit Natriumbisulfit wird unmethyliertes Cytosin in Uracil-Sulfonat überführt, während methyliertes Cytosin unverändert bleibt. Die Desulfonation des Uracil-Sulfonats wird zum Schluss durch den Desulfonationspuffer chemisch erreicht (siehe Abbildung 6).

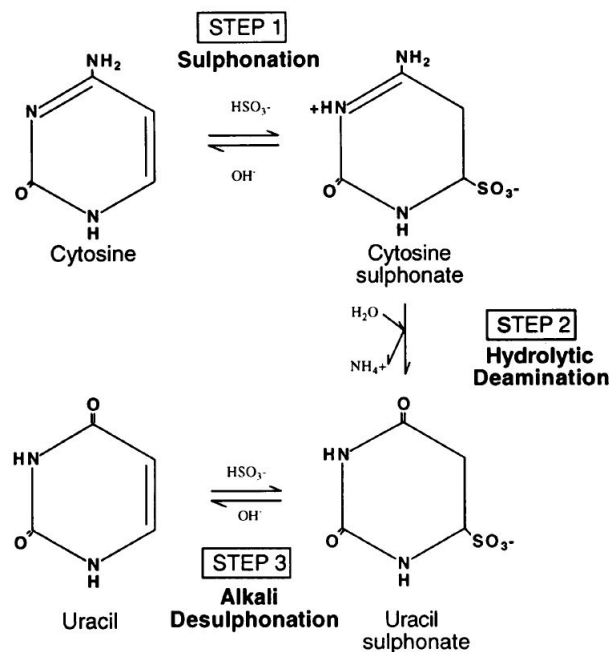


Abbildung 6: Schema der Bisulfit-Reaktion

Schritt 1: Es wird ein sulfoniertes Cytosin-Derivat gebildet, diese Reaktion braucht einen niedrigen pH-Wert.

Schritt 2: Cytosin- SO_3 wird durch hydrolytische Desulfonation zu Uracil- SO_3 , für diese Reaktion wird ein pH-Wert unter 7 benötigt.

Schritt 3: Zum Schluss erfolgt die Desulfonation unter alkalischen Bedingungen.

(Quelle: [145], genehmigt von Oxford University Press)

Es wurde nach Herstellerangaben gearbeitet. Als Erstes wurde die DNA von den gesunden HOK, den mit E6/E7 immortalisierten HOK, A549, CaSki, HeLa, PA317 und U937 aufgetaut. Dann wurde der Bisulfit Mix vorbereitet, indem 800 μL RNase freies Wasser in die Probe

gegeben und durch Vortexen gemischt wurde, bis es komplett gelöst war. Danach wurde in ein 200 μL Röhrchen 85 μL Bisulfit Mix, 35 μL DNA Protect Puffer und 2 μg DNA (außer PA317: 1 μg und U937: 0,528 μg) pipettiert. Die Röhrchen wurden anschließend mit RNase freiem Wasser auf 140 μL aufgefüllt und gevortext. Danach erfolgte das *Thermocycling* mit Hilfe des *Gene Amp PCR System 9700* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), das Programm des *Thermocycling* ist in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: *Thermocycling* bei der Bisulfit-Behandlung der DNA

Dauer	Temperatur	Schritt
5 min	99 °C	Denaturierung
25 min	60 °C	Inkubation
5 min	99 °C	Denaturierung
85 min	60 °C	Inkubation
5 min	99 °C	Denaturierung
175 min	60 °C	Inkubation

Durch sich wiederholende Reaktionsschritte aus Denaturierung und Inkubation wurde eine nahezu vollständige Umsetzung der unmethylierten Cytosinbasen in Uracil erzielt. Durch das saure Milieu und die hohen Temperaturen wird DNA beschädigt, sodass die Ausbeute am Ende geringer ist als die Ausgangsprobe. Die Proben wurden nach Beendigung des *Thermocycling*-Programms bei Raumtemperatur gelagert. Als Nächstes wurden die Proben zentrifugiert und 560 μL Puffer BL (welcher im Kit enthalten war) mit 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ *carrier RNA* hinzugefügt und nochmals zentrifugiert, damit auch geringe Mengen DNA an die Membran der EpiTec Spinsäule gebunden wurden. Anschließend wurde die Probe in eine EpiTec Spinsäule überführt. Nun wurde 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und der Durchfluss wurde verworfen. Dann wurden 500 μL BW Puffer hinzugefügt und nochmals ein Zentrifugationsschritt bei maximaler Geschwindigkeit durchgeführt und der Durchfluss wurde verworfen. Nun wurden 500 μL BD Puffer (Desulfonationspuffer), welcher zur chemischen Umwandlung des Cytosins diente, dazupipettiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 1 min Zentrifugieren bei maximaler Geschwindigkeit wurde der Durchfluss verworfen. Es wurden 500 μL BW Puffer hinzugefügt und 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und der Durchfluss wurde verworfen. Der vorherige Schritt wurde einmal wiederholt und im Anschluss erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei maximaler Geschwindigkeit. Anschließend wurden 20 μL Puffer AE auf die Membran pipettiert und 1 min bei 12 000 U/min zentrifugiert. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt, um zwei Eluate zu erhalten.

2.2.4 RNA-Isolation

Da die RNA nur als Einzelstrang vorliegt, ist diese Enzymen gegenüber sehr empfindlich. Deswegen wurden vor dem Versuch alle Materialien mit RNase und DNase Inhibitoren gereinigt. Auch die Röhren und die Pipettenspitzen waren RNase frei. Aufgrund der Instabilität der RNA wurde zügig gearbeitet. Zur Isolierung der RNA wurde das *RNeasy Mini-Kit* der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Das Prinzip dieses Kits beruht auf einer Silikon-Gel-Membran, welche die RNA bindet, wiederholtem Zentrifugieren und speziellen Puffersystemen. Dieses Kit ermöglicht eine Gewinnung von bis zu 100 μg RNA ab einer Länge von 200 Basenpaaren. Am Ende des Vorgangs ist hauptsächlich mRNA vorhanden, da 5.8S rRNA, 5S rRNA und tRNAs kürzer als 200 Basenpaare sind und diese mit diesem Kit nicht erfasst werden.

Vorbereitung der Zellen

Es wurde nach Herstellerangaben gearbeitet. Die kultivierten Zellen lagen in einer Monolayerschicht vor. Sie wurden zuerst mit PBS gewaschen, dann mit 2 mL Accutase behandelt. Nachdem sie sich gelöst hatten, wurden sie in der Neubauerkammer gezählt und $3 \cdot 10^6$ Zellen in ein Reaktionsgefäß pipettiert und zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen. Die Zellen wurden zunächst in 96-100 % Ethanol gelöst und in RLT Puffer resuspendiert. Diese Pufferlösung enthält Guanidine und Thiocyanate, welche die RNasen denaturieren, um somit möglichst reine, intakte RNA zu gewährleisten. Nun wurden die Zellen direkt auf eine Qiasreddersäule gegeben, um sie dann in dem Qiasredder (50) No 79654 (Qiagen, Hilden) bei maximaler Geschwindigkeit 2 min zu zentrifugieren. Der Durchfluss wurde für weitere Versuche verwendet. Schließlich wurden die Zellen bei -70°C eingefroren.

RNA-Isolation

Es wurde bei Raumtemperatur gearbeitet. Die Proben der mit E6/E7 immortalisierten HOK und der E6/E7 negativen HOK wurden aufgetaut, gevortext und zentrifugiert. Dann wurden 350 μL 70 % Ethanol dazugegeben, um im folgenden Schritt eine optimale Bindung der RNA an die Membran in der RNeasy Spinsäule zu erzielen. Im Anschluss wurden die Proben in die RNeasy Spinsäule pipettiert, 15 sek bei 10 000 U/min zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Dann wurden 350 μL RW1 Puffer auf die Säule gegeben, 15 sek bei 10 000 U/min zentrifugiert und wieder der Durchfluss verworfen. Anschließend wurden 80 μL DNase-Mix (10 μL DNase + 70 μL RDD Puffer) auf die Säule gegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, damit auch die letzten Reste eventuell noch vorhandener DNA eliminiert wurden. Nun wurden 350 μL RW1 Puffer auf die Säule gegeben, 15 sek bei 10 000 U/min zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. 500 μL RPE Puffer wurden auf die Säule pipettiert, danach wurde 15 sek bei 10 000 U/min zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Durch das häufige Waschen werden mögliche Verunreinigungen herausgespült. Es wurden nochmals 500 μL RPE Puffer auf die Säule gegeben und zur Trocknung der Säule erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 10 000 U/min für 2 min . Die Elution erfolgte in 50 μL RNase freiem Wasser. Zum Schluss wurde für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Durchlauf ergab das 1. Eluat.

Der letzte Schritt wurde wiederholt, um das 2. Eluat zu erhalten.

2.2.5 Reverse Transkription der RNA

Zur Synthese der cDNA wurde das *SuperScript II Reverse Transcriptase Kit* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) verwendet. Es wurde nach Herstellerangaben gearbeitet. Die RNA muss in cDNA umgeschrieben werden, um die PCR zur Auswertung durchführen zu können.

Es wurde cDNA aus HeLa, CaSki, U937, P317, A549, HOK (E6/E7 pos.) und gesunden HOK Zellen gewonnen. Die RNA wurde während der Arbeit auf Eis gelagert. Es wurden $1 \mu\text{L}$ *Random Primer* (dies sind zufällige Hexamerprimer, die an beliebiger Stelle an der mRNA binden, damit alle mRNA-Bereiche am Ende in cDNA umgewandelt sind), 250 ng RNA und RNase freies Wasser in ein Reaktionsgefäß pipettiert, bis ein Endvolumen von $12 \mu\text{L}$ entstand. Die Lösung wurde 5 min lang bei 65°C inkubiert, um sekundäre RNA Strukturen aufzuschmelzen. Danach wurde die RNA direkt wieder auf das Eis gestellt und kurz in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert. Anschließend wurden der Lösung $4 \mu\text{L}$ *5X First Strand Puffer*, $2 \mu\text{L}$ $0,1 \text{ M DTT}$ und $1 \mu\text{L}$ RNase freies Wasser hinzugefügt und bei 25°C für 2 min inkubiert. Nun wurde $1 \mu\text{L}$ *SuperScript II RT* dazupipettiert. Es wurde 10 min bei 25°C inkubiert, anschließend 50 min bei 42°C und zum Schluss 15 min bei 70°C , um die *SuperScript II RT* zu deaktivieren. Die Lösung wurde bei -20°C gelagert.

2.2.6 Quantitative *real-time* PCR

Die Polymerasekettenreaktion ist ein Verfahren zur Amplifizierung von bestimmten Gensequenzen (*Templates*). Die Grundlagen für diese Methode wurden 1986 von K. Mullis *et al.* [106] erforscht. Durch dieses Verfahren wird eine exponentielle Vervielfältigung der gewünschten Gensequenz erreicht. Diese wird durch verschiedene Faktoren limitiert (z. B. eingeschränkte Verfügbarkeit der Reagenzien), sodass irgendwann eine Plateauphase erreicht wird, in welcher keine Quantifizierung mehr stattfinden kann. Grundsätzlich werden für die quantitative *real-time* PCR die zu untersuchende DNA, Primer und Sonden benötigt. Die Primer bestehen aus Nukleotiden und bilden immer ein Paar aus jeweils komplementären Sequenzen. Sie dienen der DNA-Polymerase als Startpunkt, außerdem sind sie wichtig, um die zu amplifizierende Gensequenz zu markieren.

Ein PCR-Zyklus setzt sich aus drei Phasen zusammen. Der erste Schritt umfasst die Denaturierung, dazu wird die DNA auf ca. 95°C erhitzt. Durch die Temperatur werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen aufgebrochen und die DNA-Stränge aufgetrennt. In der zweiten Phase (Hybridisierung) lagern sich die *Primer* an die DNA an. Jeder *Primer* hat eine spezifische Temperatur, mit der die besten Ergebnisse erzielt werden können. In der letzten Phase (Polymerisation), die bei ca. 70°C stattfindet, füllt die DNA-Polymerase die Lücken zwischen den *Primern* mit freien Desoxynukleosid-Triphosphate (dNTP) auf. Dadurch

entstehen aus den DNA-Einzelsträngen wieder DNA-Doppelstränge.

Bei der quantitativen *real-time* PCR wird die DNA zusätzlich zur Amplifizierung quantifiziert. Dafür gibt es verschiedene Arten von Sonden, in diesem Versuch wurden TaqMan-Sonden verwendet. Sonden hybridisieren an die jeweilige Zielsequenz. TaqMan Sonden, auch Hydrolyse Sonden genannt, setzen sich aus einem *Quencher* am 3'-Ende und einem *Reporter* am 5'-Ende zusammen, der *Reporter* besteht aus einem Fluoreszenzfarbstoff (Tamra oder FAM). Solange der *Reporter* und der *Quencher* nah beieinander sind, findet ein *Förster-Resonanzenergietransfer* statt, das heißt die Energie wird vom *Reporter* auf den *Quencher* übertragen, sodass vom *Reporter* keine Fluoreszenz gemessen werden kann. Während des Syntheseprozesses des neuen Stranges durch die Polymerase baut diese ebenfalls durch ihre Exonuklease-Aktivität die Sonde ab. Dadurch werden Quencher und Reporter voneinander getrennt, es findet kein Energietransfer vom *Reporter* zum *Quencher* mehr statt und die Fluoreszenz des *Reporters* kann gemessen werden (siehe Abbildung 7) [47].

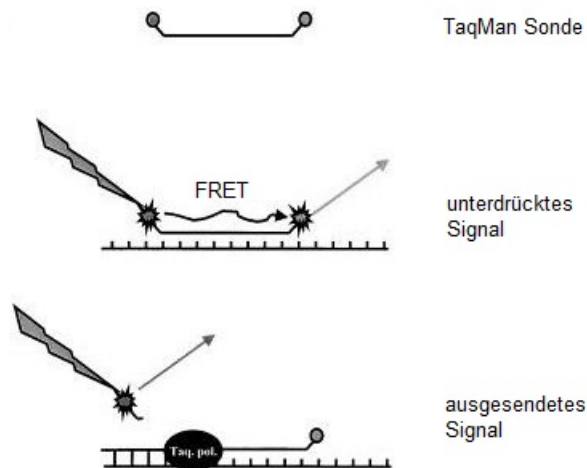


Abbildung 7: Mechanismus der TaqMan-Sonden

Auf der Abbildung ist eine TaqMan Sonde zu sehen, die dazu genutzt wird, ein Signal zu erzeugen. Die Taq-DNA-Polymerase spaltet durch ihre Exonuklease-Aktivität die Sonde. Sobald die Sonde gespalten ist, findet kein *Förster-Resonanzenergietransfer* (*FRET*) mehr statt und der *Reporter* kann ein Signal aussenden.

(eigene Übersetzung, Quelle: [47], genehmigt von Elsevier)

Das *Thermocycling* gibt die Temperaturen an, die eingestellt werden, damit diese Phasen optimal durchlaufen werden können. Durch die Messung der Fluoreszenz ist eine Quantifizierung möglich. Es ist üblich, als Angabe den C_t -Wert zu verwenden. In den ersten Zyklen findet noch eine geringe Vervielfältigung der Gensequenz statt. Der C_t -Wert gibt den Zyklus an, in welchem ein bestimmter Schwellenwert überschritten wird. Dies markiert den Beginn des exponentiellen Wachstums. Da sich in jedem Zyklus die DNA verdoppelt, bedeutet ein C_t -Wert, der um eins niedriger ist, die doppelte Menge an ursprünglich vorhandener DNA [56, 61]. Das *Thermocycling* und die Messung des C_t -Wertes wurde mit dem *Mastercycler* (Eppendorf AG, Wesseling-

Berzdorf) durchgeführt. Als Vorbereitung für die Durchführung jeder PCR wurde ein Mastermix nach dem Protokoll in Tabelle 8 hergestellt. Dieser war für jede der folgenden PCR gleich. Für die PCR wurden *MicroAmp Optical 384-Well Reaction Plate mit Barcode* verwendet.

Tabelle 8: Zusammensetzung des Mastermixes

	Stamm- lösung	Vorver- dünnung	gesetzte Kon- zentration	Endkon- zentration	1 x
<i>forward</i> Primer	100 μM	1 : 2	50 μM	900 nM	0,09 μL
<i>reverse</i> Primer	100 μM	1 : 2	50 μM	900 nM	0,09 μM
Sonde	100 μM	1 : 20	5 μM	250 nM	0,25 μL
Universal Mastermix					2,50 μL
H ₂ O					0,07 μL

Real-time-PCR zur Bestimmung der Integration von E6/E7

Mit dieser *Real-time*-PCR wurde die Integration von HPV16 E6/E7 in die mit der Impfstoffkultur behandelten Zellen überprüft. Zur Bestimmung von E6 wurden der *forward* Primer HPV16 E6, der *reverse* Primer HPV16 E6 und die TaqMan Sonde HPV16 E6 verwendet. Für die Basensequenzen siehe Kapitel 8, Primer und Sonden. Die Bestimmung von E7 erfolgte mit dem *forward* Primer HPV16 E7, dem *reverse* Primer HPV16 E7 und der TaqMan Sonde HPV16 E7. Es wurde die isolierte DNA der mit E6/E7 immortalisierten HOK, der HPV negativen HOK und der CaSki verwendet (siehe Kapitel 2.2.2). Für jede Probe wurden 2 μL DNA und 3 μL Mastermix verwendet, als Negativkontrolle diente H₂O und als Positivkontrolle CaSki. Die Zusammensetzung des Mastermixes wird in Tabelle 8 aufgeführt. Es wurden 5-7 ng DNA/ μL eingesetzt. Die Proben wurden in Zweifachbestimmung aufgetragen. Die Temperaturen des *Thermocycling* dieser PCR sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: *Thermocycling* der PCR von E6/E7

Zyklen	Dauer	Temperatur	Schritt
1	5 min	50 °C	UNG Inkubierung
	10 min	95 °C	Aktivierung
40	15 sek	95 °C	Denaturierung
	1 min	60 °C	Annealing/Extension

PCR zur Bestimmung der Promotormethylierung von *Cyclin A1*

Zur Bestimmung des Methylierungsstatus der Promotorregion von *Cyclin A1* wurde eine QMSP (*quantitative methylation specific PCR*) durchgeführt. Dazu wurden der *forward* und der *reverse* Primer CCNA1 QMSP und die TaqMan Sonde CCNA1 QMSP verwendet. Das Programm des *Thermocycling* dieser PCR ist in Tabelle 10 zu finden. Für diese PCR wurden 2 μL DNA und

3 μL Mastermix verwendet. Die eingesetzte DNA-Konzentration lag jeweils in 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ vor. Es wurden Proben verwendet, welche zuerst der Bisulfit-Behandlung unterzogen worden waren (siehe Kapitel 2.2.3). Für die Positivkontrolle wurden 2 μg *CpGenome Universal Methylated DNA* (Merck Millipore, Darmstadt) und für die Negativkontrolle wurden 2 μg *CpGenome Universal Unmethylated DNA* (Merck Millipore, Darmstadt) und H_2O genommen. Es wurde zuerst eine Kontroll-PCR der PCR-Bedingungen durchgeführt, in dieser wurden die Proben der E6/E7 negativen HOK und der E6/E7 positiven HOK gemessen. Danach wurde eine zweite PCR unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. In dieser sind die Proben der HOK, der HOK E6/E7, der A549, der CaSki, der HeLa, der PA317 und der U937 gemessen worden. Bei beiden PCR wurden Proben in Zweifachbestimmungen durchgeführt.

Tabelle 10: *Thermocycling* der PCR zur Bestimmung der Promotormethylierung von *Cyclin A1*

Zyklen	Dauer	Temperatur	Schritt
1	2 min	50 °C	UNG Inkubierung
	10 min	95 °C	Aktivierung
50	15 sek	95 °C	Denaturierung
	1 min	60 °C	Annealing/Extension

Real-time Reverse-Transkriptase-PCR zur Bestimmung der Expression von Cyclin A1 und GAPDH

Für die Bestimmung der Expression von *Cyclin A1* wurden der *forward* Primer CCNA1, der *reverse* Primer CCNA1 und die TaqMan Sonde CCNA1 eingesetzt, die Basensequenzen sind in Kapitel 8 aufgelistet. Für diese PCR wurden je Probe 1 μL DNA, 1 μL H_2O und 3 μL Mastermix verwendet, zur Zusammensetzung des Mastermixes siehe Tabelle 8. Es sind Proben genommen worden, bei denen zunächst die RNA isoliert und dann mit der reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben worden war. Die Konzentration betrug 250 $\text{ng RNA}/\mu\text{L}$. Es wurden folgende Proben gemessen: gesunde HOK, mit E6/E7 immortalisierte HOK und HeLa. Die Proben sind in Doppelbestimmung verwendet worden und als Negativkontrolle diente H_2O . Das Protokoll des *Thermocycling* ist in Tabelle 11 dargestellt.

Zur relativen Quantifizierung (siehe 2.2.7) wurde ebenfalls eine PCR zur Bestimmung der Expression von *GAPDH* durchgeführt. *GAPDH* ist ein Haushaltsgen, bei diesen handelt es sich um nicht regulierbare Gene, deren Expression unabhängig von Umwelteinflüssen erfolgt.

In dieser PCR wurde gleichzeitig ein zweites Mal die Expression von *Cyclin A1* bestimmt. Sie wurde exakt zu den gleichen Bedingungen durchgeführt wie die erste PCR.

Tabelle 11: *Thermocycling* der PCR zur Expression von *Cyclin A1* und *GAPDH*

Zyklen	Dauer	Temperatur	Schritt
1	5 min	50 °C	UNG Inkubierung
	2 min	95 °C	Aktivierung
45	2 min	95 °C	Denaturierung
	2 min	50 °C	Annealing/Extension

Real-time Reverse-Transkriptase-PCR zur Bestimmung der DNA-Methyltransferasen

Es wurde die Aktivität der Methyltransferasen DNMT1, DNMT3a und DNMT3b gemessen. Dafür wurden die jeweiligen *forward* und *reverse* Primer mit den zugehörigen TaqMan-Sonden verwendet. Die Basensequenzen sind in Kapitel 8 zu finden. Es sind Proben genommen worden, bei denen zunächst die RNA isoliert und dann mit der reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben worden war. Die verwendete cDNA hatte eine Konzentration von 10-20 ng/ μ L. Es wurden jeweils 1 μ L cDNA, 1 μ L Wasser und 3 μ L Mastermix je Vertiefung in die 96-Kavitäten-Platte pipettiert. Die Zusammensetzung des Mastermixes ist in Tabelle 8 aufgeführt. Zuerst wurde eine PCR zur Probe der Primer und Sonden durchgeführt. Mit der PCR wurde die cDNA von E6/E7 negativen HOK, HOK E6/E7, U937, CaSki, HeLa, A549 und P317 sowie eine Negativprobe mit H₂O analysiert. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Zur Kontrolle wurden die anderen Zellreihen mitbestimmt. Das Protokoll des *Thermocycling* ist in Tabelle 12 zusammengefasst.

Tabelle 12: *Thermocycling* bei der PCR der DNMT

Zyklen	Dauer	Temperatur	Schritt
1	2 min	50 °C	UNG Inkubierung
	15 min	95 °C	Aktivierung
50	1 min	94 °C	Denaturierung
	1 min	60 °C	Annealing/Extension

2.2.7 Relative Quantifizierung

Zur relativen Quantifizierung wurde die $\Delta\Delta - C_t$ -Methode von Livak und Schmittgen [93] verwendet. Mit dieser Methode kann die Relation bestimmt werden, um welche die Expression von DNMT und *Cyclin A1* in den immortalisierten HOK Zellen verändert ist. Für die Berechnung wird ein Referenzgen benötigt, dieses Gen sollte konstitutiv in der Zelle exprimiert werden. In dieser Arbeit wurde als Referenzgen *GAPDH* verwendet. Die Formel von Livak und Schmittgen

dazu lautet:

$$\Delta C_t = C_{t \text{ Zielgen}} - C_{t \text{ Referenzgen}}$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t \text{ HPV pos.}} - \Delta C_{t \text{ HPV neg.}}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Quelle: [93]

2.2.8 Erstellen der miRNA

MicroRNA ist ca. 22 Nukleotide lang und gehört zu den kleinen nicht-codierenden RNA [5]. Die Genregulation durch RNA wird auch *RNA interference* (RNAi) genannt. Dies ist ein ebenfalls natürlich vorkommender Prozess zur Regulierung der Genexpression. Zu dieser RNA-Gruppe gehören die *small interfering RNA* (siRNA), *microRNA* (miRNA) und *piwi-interacting RNA* [18]. Im Gegensatz zu siRNA hat miRNA wenig Variation an den Enden der Basensequenz, dadurch interagiert die miRNA exakt mit der *Targeting* mRNA und schaltet diese so aus. Aus diesem Grund ist miRNA spezifischer als siRNA [18].

Die Transkription der pri-miRNA erfolgt normalerweise durch die RNA-Polymerase II, danach wird sie mit einer Cap-Struktur versehen und polyadenyliert [85]. Die pri-miRNA ist mehrere tausend Basenpaare lang und bildet eine Haarnadel-Struktur [85]. Die RNase III schneidet die pri-miRNA in ca. 70 bp lange Sequenzen, die pre-miRNA, diese werden bei Tieren (bei Pflanzen bleiben sie im Zellkern) durch Exportin-5 vom Zellkern ins Zytoplasma transportiert [10, 84]. Die doppelsträngige Vorläufer RNA von der miRNA wird durch verschiedene Enzyme, in kleinere ca. 22 bp lange Stücke geschnitten [18]. Einzelsträngige miRNA lagert sich zusammen mit anderen Faktoren an eine Endonuklease, die *Argonaute*, an und bildet damit den *RNA-induced silencing complex* (RISC). An diesen Komplex kann sich nun der miRNA komplementäre mRNA anlagern, diese wird dann von der *Argonaute* zerschnitten und somit funktionsuntüchtig gemacht [18, 150].

Es wurde E6-miRNA und E7-miRNA erstellt. Diese wird dazu genutzt, einen selektiven *knock-down* der einzelnen Onkogene in den immortalisierten HOK zu erzeugen. Die miRNA wurde mit den Oligonukleotiden für E6 und E7 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) und dem *Block-iT Pol II miR RNAi Expression Vector Kit with EmGFP* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) hergestellt. Hierbei wurde nach Angabe des Herstellers ein pcDNATM 6.2-GW/EmGFP-miR Vektor verwendet, dadurch wird in die pre-miRNA von E6 und E7 ein Pol II Promotor des humanen Cytomegalovirus und die Thymidinkinase des Herpes simplex Virus eingebracht. Der Pol II Promoter bietet den Ansatzpunkt für die Polymerase II (der vom CMV hat besonders hohe Expressionsraten und funktioniert in den meisten Säugetierzellen), die Thymidinkinase übernimmt das Anhängen der Cap-Struktur und die Polyadenylierung. *Emerald Green Fluorescent Protein* (EmGFP) ist aufgrund seiner Lumineszenz ein natürlicher *Reporter*. Durch EmGFP wird eine Detektion der miRNA ermöglicht, dies ist von Vorteil, da

seine Expression eine strenge Korrelation mit dem funktionierenden *knock-down* der Ziel-DNA aufweist. Die Struktur der pre-miRNA orientiert sich an der miR-155 Sequenz von Mäusen [80] und ist von Invitrogen optimiert worden. Unter Anleitung von Thermo Fisher Scientific wurden die einzelsträngigen Oligonukleotide für E6 und E7 entworfen, in Tabelle 13 sind die Basensequenzen aufgelistet.

Tabelle 13: Basensequenzen der einzelsträngigen Oligonukleotide von E6 und E7

Einzelsträngiger Oligonukleotid	Basensequenz
E6 oberer Strang	5'- TGC TGA TGT ATA GTT GTT TGC AGC TCG TTT TGG CCA CTG ACT GAC GAG CTG CAC AAC TAT ACA T -'3
E6 unterer Strang	5'- CCT GAT GTA TAG TTG TGC AGC TCG TCA GTC AGT GGC CAA AAC GAG CTG CAA ACA ACT ATA CAT C -'3
E7 oberer Strang	5'- TGC TGT AGT GTG CCC ATT AAC AGG TCG TTT TGG CCA CTG ACT GAC GAC CTG TTT GGG CAC ACT A -'3
E7 unterer Strang	5'- CCT GTA GTG TGC CCA AAC AGG TCG TCA GTC AGT GGC CAA AAC GAC CTG TTA ATG GGC ACA CTA C -'3

Die entworfene pre-miRNA wird von dem *BLOCK-iTTM Pol II miR RNAi Expression Vector* und den miR-155 umrahmt. Ebenso besitzt sie einen vier Nukleotide langen 5'-Überhang, der komplementär zu dem Vektor ist, sodass die DNA in den *pcDNA 6.2-GW/EmGFP-miR expression Vector* ligiert werden kann.

Zu dem Kit gehört ebenfalls eine Kontrolle mit LacZ. Sie dient als Positivkontrolle der miRNA Erstellung. LacZ wird bei der Sequenzierung mitbestimmt und die Zellen können ebenfalls mit der LacZ miRNA transfiziert werden, wodurch ein *knock-down* der β -galactosidase erzielt werden sollte. Es wurde nach Herstellerangaben gearbeitet.

Double-Stranded Oligonukleotide generieren

In diesem Schritt lagern sich die komplementären einzelsträngigen Oligonukleotide von Thermo Fisher Scientific an. Bei diesem Versuch wurde bei Raumtemperatur gearbeitet. Die Reaktion wurde in einem sterilen 0,5 mL Röhrchen angesetzt, dazu wurden 5 μ L *Top-Strand* DNA-Oligonukleotide (200 μ M), 5 μ L *Bottom-Strand* DNA-Oligonukleotide (200 μ M), 2 μ L 10X *Oligo-annealing Puffer* und 8 μ L DNase/RNase freies Wasser in das Röhrchen pipettiert. Es gab jeweils einen separaten Ansatz für die E6 und einen für E7. Als Nächstes wurde die *miR.lacZ positive ds control Oligo* kurz zentrifugiert und ebenfalls in ein steriles 0,5 mL Röhrchen pipettiert. Die Proben wurden nun 4 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurden sie 10 min auf Raumtemperatur heruntergekühlt und kurz zentrifugiert. Danach wurde 1 μ L von den ds-Oligonukleotiden in ein Reaktionsgefäß überführt und die restlichen ds-Oligonukleotide wurden bei -20 °C eingefroren. Die nicht eingefrorenen ds-Oligonukleotide wurden mit 99 μ L DNase/RNase freiem Wasser verdünnt. Davon wurde wieder 1 μ L in ein neues Röhrchen pipettiert und mit 5 μ L 10X *Oligo annealing Puffer* und 44 μ L DNase/RNase freiem Wasser verdünnt.

Dadurch wurde eine Konzentration von 10 nM erhalten, nun wurden diese ds-Oligonukleotide ebenfalls bei -20 °C gelagert.

Ligationsreaktion

Die doppelsträngigen Oligonukleotide wurden in den *pcDNA 6.2-GW/EmGFP-miR expression Vektor* kloniert. Hierzu wurde die in dem Kit enthaltene *T4 DNA Ligase* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) verwendet. Diese verbindet 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxyl-Enden, sodass eine Phosphodiesterbindung entsteht und die Oligonukleotide in den Vektor ligiert werden.

Die verwendeten Lösungen wurden auf Eis aufgetaut. Dann wurde die Ligationsreaktion angesetzt, hierzu wurden in drei Eppendorf Röhren jeweils 4 µL *5X Ligation Puffer*, 2 µL *pcDNA 6.2-GW/EmGFP-miR, linearized* (5 ng/µL) pipettiert. Es wurden in zwei Röhren jeweils 4 µL der im vorherigen Schritt hergestellten miR ds-Oligonukleotide (10 nM) hinzugefügt. In das dritte Röhren wurde die ebenfalls im vorherigen Schritt hergestellte *miR-LacZ positive ds control Oligo* (10 nM) als Positivkontrolle pipettiert. Eine weitere Probe wurde als Negativkontrolle eingesetzt. Dann wurde zu allen Röhren DNase/RNase freies Wasser hinzugefügt, sodass in in jedem Röhren 19 µL Reagenz vorhanden waren. Jetzt wurde zu allen vier Röhren jeweils 1 µL *T4 DNA Ligase* (1 U/µL) hinzugefügt. Jede Probe wurde gemischt und danach 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Schluss erfolgte die Reaktion auf Eis und es wurde direkt mit der Hitzeschock-Transformation fortgefahren.

Hitzeschock-Transformation

Die molekularbiologische Methode der Transformation beschreibt das Einbringen von Plasmid-DNA in chemisch- oder elektrokompente Bakterienzellen [23]. Dazu wurden die chemisch kompetenten *One Shot TOP 10 Competent E. coli* aus dem *Block-iT Pol II miR RNAi Expression Vector Kit with EmGFP* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) verwendet. Die Bakterien wurden mit *Lennox LB Broth Base* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) angezüchtet.

Zur Transformation wurden 2 µL der Ligationsreaktion zu *One Shot TOP 10 E. coli* hinzupipettiert. Die Lösung wurde 8 min auf Eis, dann bei 42 °C für 30 sek im vorgewärmten Wasserbad und anschließend wieder auf Eis inkubiert. Durch den kurzfristigen Hitzeschock von 42 °C wurde die Membran der *E. coli* permeabilisiert und die Plasmid-DNA konnte aufgenommen werden. Danach wurden 250 µL vom Raumtemperatur warmen SOC Medium hinzugefügt. Der Ansatz wurde nun 60 min bei 37 °C im *Multitron* (Infors HT, Bottmingen, Schweiz) horizontal geschüttelt. Dann wurden von jedem Röhren 60 µL auf einer Agarplatte und 150 µL auf einer zweiten Agarplatte ausgestrichen. Es wurden *LB Agarplatten* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) mit 50 µg/mL Spectinomycin, die bei 37 °C vorgewärmt waren, verwendet. Die Zellen wurden bei 37 °C 20 h inkubiert. Dann wurden von jedem Ansatz fünf einzelne Kolonien in 1 mL *SOB Medium* mit 50 µL/L Spectinomycin in ein Reaktionsgefäß pipettiert, sodass in jedem Röhren eine Kolonie vorhanden war. In der *pcDNATM 6.2-GW/EmGFP-miR* ist ein Spectinomycin Resistenzgen enthalten, sodass die Zellen, die den Ziel-Vektor enthalten,

überleben und eine Selektion stattfindet. Die Kolonien wurden 20 h inkubiert.

Isolieren der Plasmid-DNA

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus den Kulturen der *E. coli* erfolgte mit dem *PureLink® HQ Mini Plasmid Purification Kit* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) nach Herstellerangaben. Die Proben aus dem vorherigen Schritt wurden 15 min bei 1 500 x g zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Die *Resuspension Solution* wurde anschließend mit RNase vorbereitet und die Pellets in 240 µL der *Resuspension Solution* resuspendiert. Nun wurden 240 µL Lysepuffer hinzugefügt und gemischt, indem die Röhren invertiert wurden. Ein dreiminütiger Inkubationsschritt wurde anschließend durchgeführt. Dann wurden 340 µL Neutralisations-/Bindungspuffer hineinpipettiert und durch Invertieren gemischt. Anschließend wurde 10 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Daraufhin wurde die Lösung auf eine Spinsäule geladen. Diese wurde bei 14 000 x g 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Es wurden 650 µL Waschpuffer hinzugefügt und wieder 1 min bei 14 000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde wiederum verworfen und die Lösung wurde nochmals 3 min bei 14 000 x g zentrifugiert, um den restlichen Waschpuffer zu entfernen. Die Elution erfolgte in 50 µL Elutionspuffer. Die Proben wurden für 1 min inkubiert und anschließend 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Eine weitere Elution erfolgte ebenfalls in 50 µL Elutionspuffer, sodass ein zweites Eluat erhalten wurde.

2.2.9 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die photometrische Quantifizierung von DNA und RNA erfolgte mit dem *Biophotometer plus* (Eppendorf AG, Wesseling-Berzdorf) und den *UVetten 220 - 1 600 nm* (Eppendorf AG, Wesseling-Berzdorf). Um Störungen durch Hintergrundabsorptionen zu umgehen, wird erst eine Blank-Messung mit dem jeweiligen Puffer, in dem die Nukleinsäure vorliegt, durchgeführt. RNA und DNA haben ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, das von Proteinen liegt bei 280 nm. Dieser Umstand ermöglicht eine Differenzierung zwischen DNA/RNA und Proteinen und weist Verunreinigungen der Proben durch Proteine nach [32]. Der Quotient der beiden Absorptionsmaxima (A260/A280) bestimmt die Reinheit der Proben. Der Wert für reine DNA liegt nach Qiagen zwischen 1,7 und 1,9, der für reine RNA zwischen 1,9 und 2,1, Die Angaben variieren je nach Literatur. Nach Desjardins et al. liegt die Ratio für reine RNA oder DNA bei ca. 2 [32].

Es erfolgte die spektrophotometrische Quantifizierung der DNA und der Plasmid DNA, indem in 1 mL Kuvetten 100 µL von der Probe pipettiert wurden. Die Blank-Messung wurde mit dem Puffer AE aus dem *QIAmp DNA Mini Kit* (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Es wurden Messungen bei einer Wellenlänge von 260 nm und bei einer Wellenlänge von 280 nm durchgeführt. Es erfolgte ebenfalls eine spektrophotometrische Quantifizierung der RNA, dazu wurde eine 1 mL Kuvette mit jeweils einer Probe von 100 µL verwendet. Als Eichwert diente RNase freies Wasser. Es wurden Messungen bei einer Wellenlänge von 260 nm und bei 280 nm durchgeführt. Anschließend wurden die Proben zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.10 Sequenzierung

Zur Kontrolle der korrekten Basensequenz der miRNA und zur Verifizierung, dass die erstellten Oligonukleotide inseriert wurden, wurde eine Sequenzierung durchgeführt. Diese eignete sich dazu, Mutations-, Insertions- oder Deletionsereignisse zu erkennen. Nach Herstellerangaben sind in 20 % aller Klone Mutationen zu finden, meistens sind 1-2 bp in den Oligonukleotiden gelöscht. Es wurden Sequenzierungen für die E6-miRNA, die E7-miRNA und LacZ durchgeführt. Die Sequenzierung wurde nach einer modifizierten Methode von Sanger, welche auch als Kettenabbruchmethode bezeichnet wird, durchgeführt. Bei dieser Methode wird eine PCR mit Didesoxyribonukleosid-Triphosphaten (ddNTPs) und Primern, welche die zu sequenzierenden Gensequenzen umrahmen, durchgeführt. Die ddNTPs sind im *BigDye Terminator Ready Reaction Mix* aus dem Kit enthalten. Es gibt für jede Base ein ddNTP, also ddATP, ddTTP, ddGTP und ddCTP. Diese sind jeweils mit einem bestimmten Fluoreszenzfarbstoff markiert. Die ddNTPs besitzen am 3'-Kohlenstoff-Atom keine Hydroxygruppe, sodass bei der Polymerisation das nächste Nukleotid nicht angehängt werden kann und ein Abbruch erfolgt. Durch die Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff kann gemessen werden, bei welcher Base der Abbruch erfolgt [141, 133]. Die Messung erfolgte mit dem *3730xl DNA Analyzer* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Die Daten wurden mit Hilfe des *SeqScanners* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) ausgewertet.

Es wurde das *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) verwendet und nach Herstellerangaben gearbeitet. Die *Ampli Taq DNA Polymerase* wurde ebenfalls von Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) bezogen. Es wurden die Proben mit der E6-miRNA, E7-miRNA und LacZ zur Kontrolle sequenziert. Dafür wurde zunächst eine AmpliTaq-PCR durchgeführt. Die Zusammensetzung des Mastermixes für die PCR ist in Tabelle 14 zusammengefasst. Die Programmierung und das Temperaturprofil für die Ampli-Taq PCR ist in Tabelle 15 dargestellt.

Zur Kontrolle wurde eine Agarose Gelelektrophorese durchgeführt. Danach wurden die Proben mit einer *Multi-Screen₉₆ PCR Filter-Platte* (Merck Millipore, Darmstadt) aufgereinigt. Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers gearbeitet. Der Ansatz für die Sequenzierung erfolgte in einer 96-Kavitätenplatte. Bestimmungen wurden für die Proben von E6, E7 und LacZ durchgeführt, für diese wurden jeweils zwei Ansätze für den *reverse* Primer und zwei für den *forward* Primer erstellt. Davon enthielt jeweils ein Ansatz 5 μ L DNA und einer 10 μ L DNA. Die Zusammensetzung des Mastermixes ist in Tabelle 16, das Programm des *Thermocycling* in Tabelle 17 einzusehen. Für das *Thermocycling* wurde das *Gene Amp PCR System 9700* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) verwendet. Die in der Tabelle angegebenen Temperaturen des *Thermocycling* wurden mit 1 $^{\circ}$ C/sek erreicht. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert und nach Herstellerangaben mit *Sephadex G 50* (GE Healthcare, München) in einer *96-Well MultiScreen-HV 0,45 μ L Platte* (Merck Millipore, Darmstadt) aufgereinigt. Die miRNA wurde mit Hilfe des *3730xl DNA Analyzer* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) analysiert.

Tabelle 14: Ansatz des Mastermixes für die Ampli Taq-PCR zur Sequenzierung der miRNA

Reagenzien	Volumen
EmGFP <i>forward</i> Primer	2,5 μL
miRNA <i>reverse</i> Primer	2,5 μL
Puffer II	12,5 μL
Mg Cl_2 (25 mM)	10 μL
dNTPs (10 nM)	5 μL
Ampli Taq Pol (5 u/ μL)	1,3 μL
DNA	1 μL
H ₂ O	86,2 μL

Tabelle 15: Einstellungen des *Thermocycling* der Ampli-Taq PCR zur Sequenzierung

Zyklen	Dauer	Temperatur	Schritt
1	4 min	96 °C	initiale Denaturierung
40	45 sek	96 °C	Denaturierung
	45 sek	60 °C	Annealing
	45 sek	72 °C	Elongation
1	7 min	72 °C	finale Elongation
		22 °C	Lagerung

Tabelle 16: Mastermix-Ansatz für die Sequenzierung

Reagenzien	1. Volumen	2. Volumen
Primer	0,32 μL	0,32 μL
<i>Terminator Ready Reaction Mix</i>	8 μL	8 μL
DNA	5 μL	10 μL
DMSO	1 μL	1 μL
H ₂ O	5,68 μL	0,68 μL

Tabelle 17: Einstellungen des *Thermocycling* der Sequenzierung der miRNA

Zyklen	Dauer	Temperatur	Schritt
1	1 min	96 °C	Aktivierung
25	10 sek	96 °C	Denaturierung
	5 sek	50 °C	Annealing
	4 min	60 °C	Extension
		4 °C	Lagerung

3 Ergebnisse

3.1 Wachstum der Humanen Oralen Keratinozyten

Die HOK Zellen ließen sich gut kultivieren. Allerdings wuchsen die HOK langsam und waren anfällig für Verunreinigungen, weswegen Antibiotikum zum Medium hinzugefügt wurde. Nach der Immortalisierung der HOK mit E6/E7 war ein deutlich schnelleres Wachstum zu beobachten. Zudem waren die Zellen unempfindlicher gegenüber Kontaminationen. Mit dem Fortschreiten der Versuche wurden für die immortalisierten HOK *CELLSTAR Filter Top Zellkulturflaschen* (Greiner bio one, Frickenhausen) benutzt. Es wurden drei verschiedene Nährböden verwendet: *Cell+ Kulturflaschen* (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht), welche mit Poly-L-Lysin behandelt wurden, *Cell+ Kulturflaschen* ohne Poly-L-Lysin und *CELLSTAR Filter Top Zellkulturflaschen* (Greiner bio one, Frickenhausen). Die Zellen wuchsen auf allen drei Nährböden gleich gut.

3.2 Nukleinsäurekonzentrationen der isolierten DNA und RNA

Es wurde eine photometrische Bestimmung der DNA nach ihrer Isolierung von den HPV negativen HOK und den E6/E7 positiven HOK durchgeführt. Die Blank-Messung wurde mit dem Puffer AE aus dem *QIAmp DNA Mini Kit* (Qiagen, Hilden) vorgenommen. Um die Reinheit des Eluats zu prüfen, wurde das Ergebnis von 260 nm durch das von 280 nm dividiert. Der Wert für reine DNA liegt nach Qiagen zwischen 1,7 und 1,9. Nach Desjardins et al. liegt die 260 nm / 280 nm Ratio für reine RNA oder DNA bei ca. 2 [32]. Durch diese Messung sollen vor allem Verunreinigungen durch Proteine nachgewiesen werden, dabei wird die Ratio kleiner. Werte, die größer sind, sprechen für eine gute DNA-Isolierung.

Für die gesunden HOK lag das Ergebnis des ersten Eluats bei 2,1 und des zweiten Eluats bei 2,0. Bei den HOK mit E6/E7 lag es für das erste Eluat bei 2,11 und für das zweite bei 2,14. Demnach wurde reine DNA isoliert.

Es wurde ebenfalls eine photometrische Bestimmung der RNA der E6/E7 negativen HOK und der E6/E7 positiven HOK durchgeführt. Hier diente als Eichwert RNase freies Wasser. Reine RNA erzielt nach Qiagen einen Wert zwischen 1,9 und 2,1. Bei den gesunden HOK lag das Ergebnis des ersten Eluats bei 1,93, des zweiten bei 2,18. Bei den HOK mit E6/E7 lag das erste Eluat bei 2,00 und das zweite bei 1,56. Demnach wurde größtenteils reine RNA gewonnen. Nur das zweite Eluat der E6/E7 HOK zeigte kein gutes Ergebnis, für unsere Bestimmungen wurde das 1. Eluat verwendet.

Nach dem Isolieren der Plasmid-DNA wurde ebenfalls eine photometrische Bestimmung durchgeführt. Als Eichwert diente der Puffer AE aus dem *QIAmp DNA Mini Kit* (Qiagen, Hilden). Der Wert für reine DNA liegt zwischen 1,7 und 1,9. Es wurden Messungen für Kolonien mit miRNA von E6, für Kolonien mit miRNA von E7 und für Kolonien mit LacZ durchgeführt. Stichprobenartig wurden drei Einzelkolonien isoliert. Von diesen wiederum wurde das erste und das zweite Eluat gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 18 zusammengefasst. Bis auf die

DNA der ersten Kolonie von E6 konnten gute Ergebnisse erzielt werden.

Tabelle 18: Spektrophotometrie-Ergebnisse der Plasmid-DNA

Kolonie	E6		E7		LacZ	
	1. Eluat	2. Eluat	1. Eluat	2. Eluat	1. Eluat	2. Eluat
1.	0,006	1,19	1,94	1,76	1,94	1,78
2.	1,92	1,66	1,94	1,74	1,93	1,73
3.	1,92	1,71	1,94	1,71	1,95	1,78

3.3 Ergebnisse der *Real-time*-PCR zur Bestimmung der Expression von E6/E7 in den HOK

Es wurde eine PCR der DNA der mit E6/E7 immortalisierten HOK, der HPV-negativen HOK und den CaSki (Positivkontrolle) durchgeführt. Für die nicht immortalisierten HOK war kein C_t -Wert messbar, für die immortalisierten hingegen schon. Damit ist die DNA von E6 und E7 im Genom der immortalisierten HOK vorhanden. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse wird in Tabelle 19 gezeigt. Die Negativprobe (H_2O) fiel wie erwünscht negativ aus.

Tabelle 19: Ergebnisse der HPV16 E6/E7 DNA *Real-time*-PCR in HOK, immortalisierten HOK und CaSki Zellen (jeweils Doppelbestimmung)

Probe	Detektor	C_t -Mittelwert
HOK ¹ E6/E7	HPV16 E6	27,282
CaSki ²	HPV16 E6	17,475
HOK E6/E7	HPV16 E7	27,847
CaSki	HPV16 E7	16,279

¹ HOK: Humane orale Keratinozyten

² CaSki: Humane Epidermoidkarzinom der Zervix

Für die folgenden Versuche war die Bestätigung der Integration von E6 und E7 in die HOK wichtig, weil dadurch Aussagen über den Unterschied der mit E6/E7 immortalisierten zu den nicht immortalisierten HOK getroffen werden können.

3.4 Ergebnisse der QMSP zur Bestimmung der Methylierung der Promotorregion von *Cyclin A1*

Nach der Bisulfit-Behandlung wurde die Methylierung des Gens für *Cyclin A1* bei den HPV negativen HOK und den E6/E7 positiven HOK sowie den Zellreihen A549, CaSki, HeLa, PA317 und U937 überprüft. Bei beiden HOK Zellreihen konnte keine Methylierung des Gens gezeigt

werden. Nur bei der Positivkontrolle (*CpGenome Universal Methylated DNA*) und den HeLa Zellen konnte eine Methylierung nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Für HeLa ist bereits eine Methylierung des Gens nachgewiesen worden [104]. Im Gegensatz dazu sind U937 HPV negativ und die Promotorregion von *Cyclin A1* ist nicht methyliert [105]. Das Ergebnis zeigt, dass die PCR verlässliche Ergebnisse zum Methylierungsstatus hervorbrachte.

3.5 Real-time Reverse-Transkriptase-PCR-Ergebnisse zur Bestimmung der Expression von *Cyclin A1*

Es wurde die cDNA der RNA aus den immortalisierten und den nicht immortalisierten HOK Zellreihen verwendet. Zusätzlich wurde die cDNA der RNA der HeLa-Zellen (*Cyclin A1* methyliert) überprüft. Die Ergebnisse der PCR sind in Tabelle 20 aufgeführt.

Tabelle 20: Real-time Reverse-Transkriptase-PCR zur Bestimmung der Expression von *Cyclin A1* in HOK und immortalisierten HOK (jeweils Mehrfachbestimmungen)

Probe	Detektor	C_t -Mittelwert
HOK ¹	cDNA CCNA1 ²	31,993
HOK E6/E7	cDNA CCNA1	31,996

¹ Humane orale Keratinozyten

² Cyclin A1

Tabelle 21: Real-time Reverse-Transkriptase-PCR zur Bestimmung der Expression von *GAPDH* in HOK und immortalisierten HOK (jeweils Mehrfachbestimmungen)

Probe	Detektor	C_t -Mittelwert
HOK ¹	cDNA <i>GAPDH</i> ²	19,329
HOK E6/E7	cDNA <i>GAPDH</i>	19,328

¹ Humane orale Keratinozyten

² Referenzgen

Für die $\Delta\Delta C_t$ -Methode von Livak und Schmittgen wird ein Referenzgen benötigt, dazu wurde *GAPDH* verwendet (siehe Tabelle 21). Wenn die C_t -Werte eingesetzt werden, ergibt sich folgende Analyse:

Tabelle 22: C_t -Mittelwerte und ΔC_t -Werte der *Real-time* Reverse-Transkriptase-PCR für die Bestimmung der relativen Genexpression von *Cyclin A1* bei HPV16 positiven HOK und HOK

Cyclin A1 HPV pos. HOK ¹	Cyclin A1 HOK	GAPDH ² HPV pos. HOK	GAPDH HOK	ΔC_t HPV pos. HOK	ΔC_t HOK
31,996	31,993	19,328	19,329	12,668	12,664

¹ Humane orale Keratinozyten

² Referenzgen

$$\Delta\Delta C_t \text{ Cyclin A1} : 12,668 - 12,664 = 0,004$$

$$2^{-\Delta\Delta C_t} : 2^{-0,004} = 0,997$$

Quelle: [93]

Somit ergibt sich mit einem Wert von 0,997 in der relativen Quantifizierung kein relevanter Unterschied in der Expression von *Cyclin A1* zwischen den mit HPV immortalisierten und den nativen HOK.

3.6 Ergebnisse der *Real-time* Reverse-Transkriptase-PCR zur Bestimmung der DNMT

Tabelle 23: *Real-time* Reverse-Transkriptase-PCR zur Bestimmung der Expression der DNMT in HOK und immortalisierten HOK (jeweils Mehrfachbestimmung)

Probe	Detektor	C_t -Mittelwert
HOK ¹ E6/E7	DNMT ² 1	22,971
HOK	DNMT1	25,689
HOK E6/E7	DNMT3a	25,128
HOK	DNMT3a	25,260
HOK E6/E7	DNMT3b	26,359
HOK	DNMT3b	27,723

¹ Humane orale Keratinozyten

² DNA-Methyltransferase

In der PCR wurde zur Bestimmung der Expression der DNMT die cDNA von den HOK E6/E7 und den nativen HOK verwendet. Die Ergebnisse der PCR sind in Tabelle 23 zusammengefasst. Um eine Veränderung in der Expression der DNA-Methyltransferasen festzustellen, wurde die relative Quantifizierung nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode von Livak und Schmittgen angewandt. Als Referenzgen wurde *GAPDH* verwendet, die Ergebnisse der PCR für *GAPDH* sind in Tabelle 21

dargestellt. Die Analysen zur Expressierung von DNMT1 (Tabelle 24), DNMT3a (Tabelle 25) und DNMT3b (Tabelle 26) sind wie folgt:

Tabelle 24: C_t -Mittelwerte und ΔC_t - Werte der *Real-time* Reverse-Transkriptase-PCR für die Bestimmung der relativen Genexpression von DNMT1 in HPV16 positiven HOK und HOK

DNMT ¹ 1 HPV pos. HOK ²	DNMT1 HOK	GAPDH ³ HPV pos. HOK	GAPDH HOK	ΔC_t HPV pos. HOK	ΔC_t HOK
22,971	25,689	19,328	19,329	3,643	6,360

¹ DNA-Methyltransferase

² Humane orale Keratinozyten

³ Referenzgen

$$\Delta\Delta C_t \text{ DNMT1} : 3,643 - 6,36 = -2,717$$

$$2^{-\Delta\Delta C_t} : 2^{-(-2,717)} = 2^{2,717} = 6,575$$

Tabelle 25: C_t -Mittelwerte und ΔC_t - Werte der *Real-time* Reverse-Transkriptase-PCR für die Bestimmung der relativen Genexpression von DNMT3a in HPV16 positiven HOK und HOK

DNMT ¹ 3a HPV pos. HOK ²	DNMT3a HOK	GAPDH ³ HPV pos. HOK	GAPDH HOK	ΔC_t HPV pos. HOK	ΔC_t HOK
25,128	25,260	19,328	19,329	5,800	5,931

¹ DNA-Methyltransferase

² Humane orale Keratinozyten

³ Referenzgen

$$\Delta\Delta C_t \text{ DNMT3a} : 5,8 - 5,931 = -0,131$$

$$2^{-\Delta\Delta C_t} : 2^{-(-0,131)} = 2^{0,131} = 1,095$$

Tabelle 26: C_t -Mittelwerte und ΔC_t -Werte der *Real-time* Reverse-Transkriptase-PCR für die Bestimmung der relativen Genexpression von DNMT3b in HPV16 positiven HOK und HOK

DNMT ¹ 3b HPV pos. HOK ²	DNMT3b HOK	GAPDH ³ HPV pos. HOK	GAPDH HOK	ΔC_t HPV pos. HOK	ΔC_t HOK
26,359	27,723	19,328	19,329	7,031	8,394

¹ DNA-Methyltransferase

² Humane orale Keratinozyten

³ Referenzgen

$$\Delta\Delta C_t \text{ DNMT3b} : 7,031 - 8,394 = -1,363$$

$$2^{-\Delta\Delta C_t} : 2^{-(-1,363)} = 2^{1,363} = 2,572$$

Quelle: [93]

Die relative Quantifizierung hat für DNMT1 ergeben, dass die Expression in den E6/E7 positiven HOK im Gegensatz zu den E6/E7 negativen HOK 6,575-fach erhöht war. Die Expression von DNMT3b war 2,572-fach und die von DNMT3a 1,095-fach erhöht. Damit ist die Expression von DNMT3a in beiden Zellreihen fast gleich geblieben. Die DNMT1 hingegen sind in den immortalisierten Zellen deutlich vermehrt exprimiert worden und die Expression von den DNMT3b war ebenfalls etwas erhöht.

3.7 Auswertung der Sequenzierung der miRNA

Zur Kontrolle der korrekten Basensequenz und zur Verifizierung, dass die erstellten Oligonukleotide inseriert wurden, wurde eine Sequenzierung durchgeführt. Diese eignet sich dazu, Mutations-, Insertions- oder Deletionsereignisse zu erkennen. Nach Herstellerangaben sind in 20 % aller Klone Mutationen zu finden, meistens sind 1-2 bp in den Oligonukleotide gelöscht. Zur Sequenzierung wurden der EmGFP *forward* Primer und der miRNA *reverse* Primer aus dem *Block-iT Pol II miR RNAi Expression Vector Kit with EmGFP* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) verwendet. Für die Karte der pcDNATM 6.2-GW/EmGFP-miR siehe Abbildung 8. In der Sequenzierung wurde das *Alignment* zwischen den angegebenen Abschnitten und den generierten Oligonukleotiden überprüft. Die Proben mit LacZ und E7 zeigten ein korrektes *Alignment*. Die Sequenzierung hat gezeigt, dass die Ligierung in den Zielvektor ohne relevante Mutationen erfolgreich war. In den Abbildungen 9 und 10 sind Auszüge der Chromatogramme der Basensequenzen der Sequenzierung dargestellt.

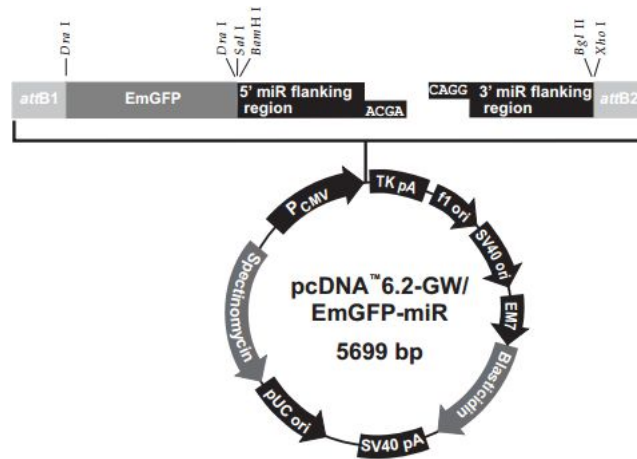


Abbildung 8: Karte der pcDNA™ 6.2-GW/EmGFP-miR

EmGFP *forward* Primer: Basen 1409-1428

miRNA *reverse* Primer: Basen 1607-1626

Quelle: Herstellerangabe

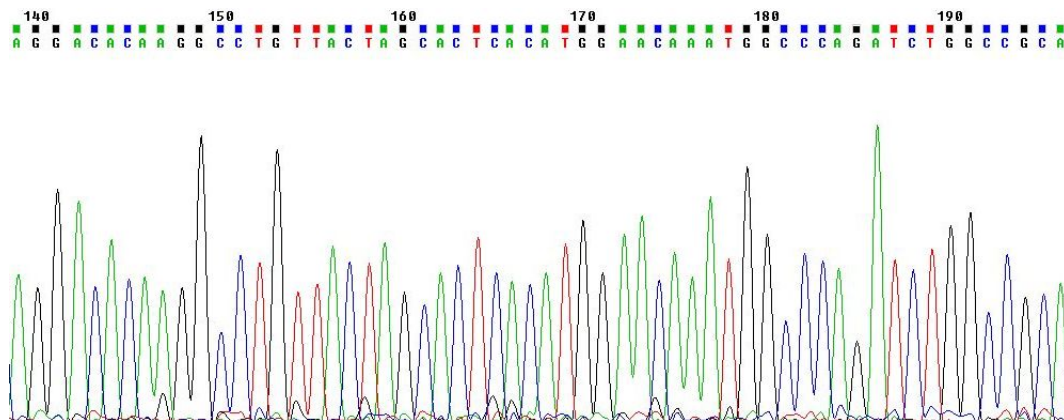


Abbildung 9: Auszug aus dem Chromatogramm der Sequenzierung von E7

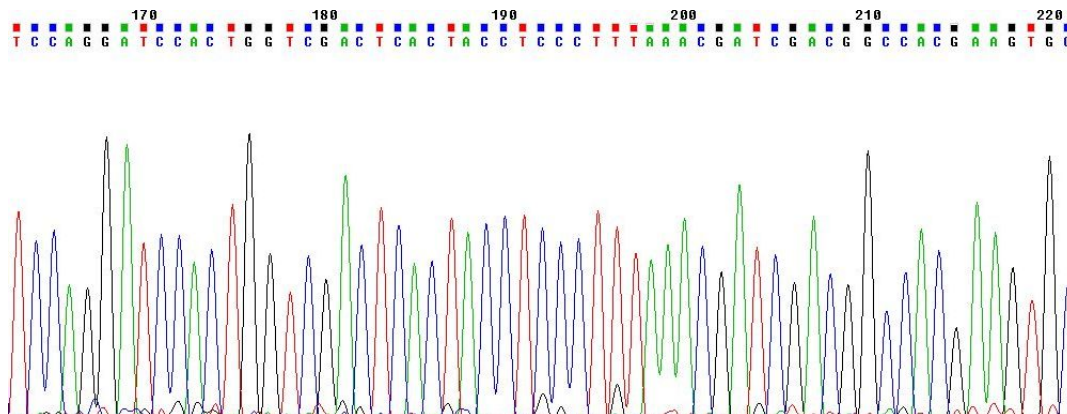


Abbildung 10: Auszug aus dem Chromatogramm der Sequenzierung von LacZ

4 Diskussion

Die Kopf-Hals-Karzinome zählen, wenn die Inzidenzen der einzelnen Karzinome unterschiedlicher Sublokalisation zusammengezählt werden, nach dem GLOBOCAN 2012 zur acht-häufigsten Neuerkrankung von malignen Neoplasien. Risikofaktoren für Kopf-Hals-Karzinome sind vor allem der Zigaretten- und Alkoholkonsum [153]. Zudem gibt es die HPV-assoziierten Karzinome. Diese treten vor allem im Oropharynx auf. Das Erkrankungsalter für durch Noxen verursachte Karzinome liegt vorwiegend höher als 60 Jahre. Die HPV positiven Karzinome kommen eher bei jüngeren Menschen mit einem höheren sozioökonomischen Status vor. Hierfür ist der wichtigste Risikofaktor der orale Geschlechtsverkehr. Dabei steigt die Inzidenz bei frühem ersten Geschlechtsverkehr und bei Promiskuität [44, 74, 96].

HPV16 ist mit ca. 90 % das häufigste HP-Virus bei Kopf-Hals-Karzinomen [46, 78, 29], deswegen wurde in dieser Arbeit HPV16 verwendet. Es kann bei bis zu 10 % der gesunden Bevölkerung HPV im Hals-Rachen-Bereich nachgewiesen werden [44]. Nicht jede HPV-Infektion führt direkt zu einer Erkrankung, in den meisten Fällen schafft es das Immunsystem, das Virus innerhalb von neun Monaten zu beseitigen [44]. Die Immortalisierung der ursprünglich gutartigen Schleimhautepithelzelle durch HPV wird durch verschiedene Mechanismen verursacht. Vor allem die Onkoproteine E6 und E7 spielen dabei eine wichtige Rolle [37, 14]. In den letzten Jahren konnte nachgewiesen werden, dass epigenetische Veränderungen und insbesondere die Gen-Methylierung von entscheidender Bedeutung sind. Die Gen-Methylierung geschieht durch eine Reaktion, welche durch die DNA Methyltransferasen katalysiert wird [134]. Ebenso könnte der Methylierungsstatus und damit zusammenhängend die Expression von *Cyclin A1* zur Karzinogenese beitragen. Aus diesem Grund beschäftigt die hier vorgestellte Arbeit sich eingehender mit den Methyltransferasen und *Cyclin A1*.

In dieser Arbeit wurden Humane Orale Keratinozyten mit E6 und E7 von HPV16 immortalisiert. Die Integration von E6 und E7 wurde mittels einer *Real-time-PCR* überprüft und bestätigt. Nachdem eine Immortalisierung der HOK mit E6 und E7 nachgewiesen war, wurden *Real-time-PCRs* für die Genmethylierung von *Cyclin A1*, die Expression von *Cyclin A1* und der Methyltransferasen DNMT1, DNMT3a und DNMT3b durchgeführt. Für *Cyclin A1* konnte weder in der Methylierung des Gens noch in der Expression ein Unterschied zwischen den mit E6/E7 immortalisierten und den gesunden Zellen festgestellt werden. Dafür konnte eine erhöhte Expression der DNA-Methyltransferasen (DNMT1, DNMT3a und DNMT3b) in den immortalisierten Zellen nachgewiesen werden. Die relative Quantifizierung ergab vor allem eine vermehrte Expression der DNMT1, die DNMT3a und DNMT3b waren hingegen nur gering erhöht. Anschließend wurde miRNA für HPV16 E6 und E7 erstellt. Die Erstellung der miRNA wurde mittels Sequenzierung überprüft und die Erstellung der E7 miRNA konnte erfolgreich abgeschlossen werden.

4.1 Kultivierung der HOK und Immortalisierung durch HPV16 E6 und E7

Zunächst sind die HOK kultiviert worden. Da dies vor der Immortalisierung gesunde Schleimhautzellen waren, wuchsen diese wie erwartet langsam an. Nachdem die kultivierten HOK mit E6 und E7 immortalisiert wurden, wurde eine *Real-time*-PCR zur Überprüfung der Expression von E6 und E7 durchgeführt. Die PCR zeigte, dass E6 und E7 in den immortalisierten HOK exprimiert wurden (siehe Tabelle 19). Diese Methode zur Immortalisierung der HOK wurde von Pritinder Kaur *et al.* [69] veröffentlicht.

Es gibt verschiedene Studien dazu, dass eine Infektion der Zellen mit E6 und E7 zur Immortalisierung ausreicht. Dies ist allerdings die erste Arbeit, die HOK mit E6 und E7 immortalisiert, um ein grundsätzliches Zellmodell zu entwickeln, in dem durch HPV bedingte genetische und epigenetische Veränderungen nachvollzogen werden können. Aus diesem Grund ist kein direkter Vergleich mit anderen Arbeitsgruppen möglich. Es konnten beispielsweise Halbert *et al.* [52] zeigen, dass in manchen Zellen alleine die Expression von HPV16 E7 zur Immortalisierung reicht. Band *et al.* [4] hingegen wiesen nach, dass E6 von HPV16 in Epithelzellen der Mamma essentiell zur Immortalisierung ist. Pritinder Kaur *et al.* [69] vermuteten deshalb, dass zellspezifische Faktoren ebenfalls einen Einfluss besitzen. Hudson *et al.* zeigten [63], dass humane Keratinozyten, welche E6 und E7 von HPV 18 exprimieren, meist immortalisiert sind und nur eine geringe morphologische Differenzierung aufweisen. McMurray *et al.* [100] führten Versuche an humanen Vorhautkeratinozyten *in vitro* mit HPV durch. Sie erschlossen, dass die Funktion von E6 zur Degradation von *p53* essentiell zur Immortalisierung der Zellen ist. Durch Mutationen wurden verschiedene Funktionen von E6 ausgeschaltet. Solange die Möglichkeit zur Inaktivierung von *p53* bestand, konnte E6 in Kombination mit E7 die Zellen immer immortalisieren.

Es war eine Veränderung des Wachstumsverhaltens der immortalisierten Zellen zu beobachten, diese Zellen vermehrten sich deutlich schneller als die nicht immortalisierten Zellen. Außerdem waren sie weniger anfällig für Verunreinigungen. Diese Veränderungen und der Nachweis der Expression von E6 und E7 sprechen für eine erfolgreiche Immortalisierung der Zellen.

4.2 Methylierung von *Cyclin A1* bei HOK und HPV16 E6 und E7 positiven HOK

Zur Untersuchung der Promotormethylierung von *Cyclin A1* wurde die DNA zuerst mit Bisulfit behandelt und danach eine QMSP für CCNA1 durchgeführt. Die Methoden zur Überprüfung des Methylierungsstatus der DNA sind vielfältig [40], wobei die hier angewandte Methode eine hohe Sensitivität und Spezifität aufweist [25, 19, 35]. In der QMSP konnte bei den mit E6 und E7 immortalisierten HOK keine vermehrte Methylierung des Gens für *Cyclin A1* gezeigt werden. Dies war nicht das erwartete Ergebnis, da es bereits Studien zur Methylierung der Promotorregion von *Cyclin A1* in verschiedenen HPV positiven Karzinomen gibt, die Veränderungen des

Methylierungsstatus zeigen.

Die epigenetischen Veränderungen und damit auch der Methylierungsstatus spielen in der Erforschung der Karzinogenese eine große Rolle. So findet sich bei Karzinomen häufig eine Hypermethylierung von *CpG-Islands* [67]. Bei einer Methylierung dieser Region wird das Gen vermindert oder gar nicht mehr exprimiert [19]. Wohingegen CpG-Dinukleotide, welche nicht in CpG-Inseln liegen, normalerweise überwiegend methyliert vorliegen, sind diese bei Karzinomen seltener methyliert [57]. Es ist nachgewiesen worden, dass eine Hypomethylierung der gesamten DNA eine Verminderung von intestinalen Tumoren bewirkt [81]. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass die Infektion mit HPV mit einer vermehrten Methylierung von bestimmten Promotorregionen einhergeht. Allerdings muss noch weiter erforscht werden, wie das genaue Methylierungsmuster aussieht [111]. Für die Gene *RASSF1*, *TCF21* und *MGMT* variieren die Ergebnisse des Methylierungsstatus in den Studien [24, 30, 146, 111]. Für *Cyclin A1* gibt es mehrere Studien, die eine vermehrte Promotormethylierung nachweisen konnten [20, 24, 158]

So konnten beispielsweise Kitkumthorn *et al.* [73] in einer Studie zeigen, dass vor allem in den aggressiven, HPV positiven Zervixzellkarzinomen eine Methylierung von *Cyclin A1* stattgefunden hatte. Ebenso wiesen Tokumaru *et al.* [149] nach, dass die Promotorregion von *Cyclin A1* in Kopf-Hals-Tumoren mit einem *p53* Wildtyp vermehrt methyliert vorlag. In dieser Studie ist zwar der HPV-Status nicht berücksichtigt worden, allerdings liegt bei HPV negativen Tumoren, im Gegensatz zu den HPV positiven Karzinomen, meist *p53* mutiert vor [46]. Auch bei kolorektalen Karzinomen konnte eine Hypermethylierung von *Cyclin A1* gezeigt werden [167]. Chalertpet *et al.* [20] führten eine Studie durch, die in mehreren Punkten für diese Arbeit interessant ist. Sie haben unter anderem an Zervixkarzinomzellen (SiHa), welche mit HPV16 infiziert wurden, zeigen können, dass die Promotorregion von *Cyclin A1* bei den SiHa Zellen vermehrt methyliert ist. Chalertpet *et al.* erzielten durch Transfektion der SiHa Zellen mit E7-siRNA einen selektiven *knock-down*, wodurch die Methylierung zurückging und *Cyclin A1* wieder vermehrt exprimiert wurde. Ein ähnliches Ergebnis erzielte ein *knock-down* von DNMT1, dadurch konnte die Methylierung der Promotorregion von *Cyclin A1* gesenkt werden.

Eine Studie zur Korrelation der Promotormethylierung von *Cyclin A1* und malignen Tumoren wurde von Yang *et al.* [169] durchgeführt. Sie sind zu dem Schluss gekommen, dass bei Krebspatienten die Promotorregion vermehrt methyliert vorliegt. Dies deutet laut Yang *et al.* auf eine signifikante Verbindung zwischen *Cyclin A1* und der Tumorentwicklung hin. Eingeschlossen in die Analyse sind Kopf-Hals-Karzinome, nichtkleinzellige Lungenkarzinome, kolorektale Karzinome, nasopharyngeale Karzinome, Blasenkarzinome und hepatozelluläre Karzinome. Es konnte zudem eine gesteigerte Methylierung der Promotorregion bei Zervixkarzinomen nachgewiesen werden, wenn die HPV-DNA integriert war [168]. Insgesamt hätte eine Promotormethylierung von *Cyclin A1* bei den mit E6/E7 immortalisierten HOK dem aktuellen Forschungsstand entsprochen. Es stellt sich die Frage, warum dies nicht das Resultat war.

Für HeLa ist bereits eine Methylierung des Gens nachgewiesen worden, was sich in dieser Arbeit ebenfalls bestätigt hat [104]. In der Positivkontrolle und in den HeLa-Zellen wurden Me-

thylierungen nachgewiesen, weshalb ein methodischer Fehler unwahrscheinlich ist. Allerdings wurden andere Studien mit einer größeren Probenanzahl durchgeführt. In diesen Studien ist nicht in allen Proben eine Methylierung festgestellt worden, sondern nur in einem bestimmten Prozentsatz. Dies lässt den Schluss zu, dass die *Cyclin A1*-Methylierung eventuell keine obligate, sondern nur eine mögliche epigenetische Veränderung ist. Eine andere Erklärung des Ergebnisses wäre, dass es einen entscheidenden Unterschied macht, dass alle genannten Beispiele an Gewebeproben durchgeführt worden sind, wohingegen bei dieser Arbeit eine Zelllinie *in vitro* mit E6 und E7 immortalisiert wurde. Dadurch ist das Ergebnis dieser Arbeit interessant, da dies die Frage aufwirft, ob für die Methylierung noch andere Faktoren von HPV oder dem umgebenden Milieu im Gewebe notwendig sind. Es sind viele Faktoren denkbar, diese können innerhalb der Zelle lokalisiert sein oder außerhalb. Beispielsweise könnten Umwelteinflüsse wie Rauchen oder Alkoholkonsum involviert sein.

4.3 Expression von *Cyclin A1* und deren Korrelation zur Promotormethylierung

Die *Real-time* Reverse-Transkriptase-PCR zur Bestimmung der Expression von *Cyclin A1* zeigte keinen relevanten Unterschied der mit E6/E7 immortalisierten HOK zu den nicht immortalisierten HOK.

Andere Studien, die bei Gewebeproben die Expression von *Cyclin A1* untersuchten und mit dem HPV-Status bzw. dem *Cyclin A1* Methylierungsstatus verglichen, kamen zu teilweise unterschiedlichen Ergebnissen. Bei Zervixkarzinomzellen, welche mit HPV16 infiziert waren, ist eine verminderte Expression von *Cyclin A1* festgestellt worden [20]. Kitkumthorn *et al.* haben in in Zervixkarzinomen eine verminderte Expression der CCNA1 mRNA nachgewiesen [73] und Pyeon *et al.* haben zeigen können, dass *Cyclin A1* bei HPV positiven Zervix- und Kopf-Hals-Karzinomen von HPV16 herunterreguliert wird [118]. Es gibt aber ebenfalls Studien, in denen eine gesteigerte Expression von *Cyclin A1* bei HPV positiven Karzinomen nachgewiesen wurde. Santopietro *et al.* identifizierten eine gesteigerte Expression von *Cyclin A* als unabhängigen Risikofaktor bei HPV positiven Zervixtumoren [135]. Außerdem ist in Leukämiezellen eine gesteigerte Expression zu finden [171]. In weiteren Experimenten zeigte sich eine Erhöhung der Expression von *Cyclin A1* bei HPV16 positiven Kopf-Hals-Karzinomen, insbesondere korrelierte hier die Erhöhung mit der Expression von *p16* (ein CDK-Inhibitor). Die vermehrte Expression von *Cyclin A1* war mit einer geringeren Rezidivrate assoziiert, unabhängig vom HPV-Status. Außerdem wurden in Tonsillengewebe, welches von Patienten mit akut rezidivierenden Tonsillitiden gewonnen wurde, eine Verminderung der Expression von *Cyclin A1* mit Fortschreiten des Lebensalters nachgewiesen [159].

Inwiefern die Expression *Cyclin A1* mit dessen Promotormethylierung zusammenhängt, ist bis jetzt unklar. Weiss *et al.* [159] wiesen eine vermehrte Expression von *Cyclin A1* trotz Methylierung der Promotorregion an HPV16 positiven Gewebeproben von Kopf-Hals-Karzinomen

nach. Allerdings ist in Zelllinien (unter anderem CaSki und Zelllinien von der *University of Michigan*) von HPV positiven Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs eine vermehrte Methylierung der Promotorregion und verminderte Expression von *Cyclin A1* gezeigt worden [136]. In der bereits erwähnten Studie von Chalertpet *et al.* [20] ist zudem ein Zusammenhang der verminderten Expression von *Cyclin A1* zu dessen Promotormethylierung demonstriert worden. Durch einen *knock-down* von DNMT1 wurde die Methylierung der Promotorregion von *Cyclin A1* gesenkt und das Expressionsniveau von *Cyclin A1* wurde erhöht. Allerdings wurde in einer anderen Studie zur Messung der Hypermethylierung der Promotorregion von *Cyclin A1* und zur Expression von *Cyclin A1* ermittelt, dass es keine inverse Korrelation zwischen der Methylierung und Expression dieses Gens geben muss [104]. Die Forschungsergebnisse von Müller *et al.* [105], zeigen, dass bei leukämischen Zellen eine Methylierung der Promotorregion von *Cyclin A1* zu einer verminderten Expression führt, wohingegen im Hoden eine Hypermethylierung keine verminderte Expression bewirkt. In anderen gesunden Geweben, in denen *Cyclin A1* im normalen Zustand nur wenig exprimiert wurde, war die Expression unabhängig von der Promotormethylierung von *Cyclin A1*. Es bleibt also eine Frage für weitere Forschungen, für welche Zellen ein Zusammenhang zwischen der Promotormethylierung und der Expression von *Cyclin A1* herzustellen ist und für welche nicht oder anders formuliert, warum es bei manchen Zellen eine Korrelation gibt und bei anderen nicht.

Insgesamt konnte demnach eine vermehrte Methylierung der Promotorregion erwartet werden. Daraus hätten sich zwei Möglichkeiten ergeben. Die erste wäre gewesen, dass trotzdem eine vermehrte Expression von *Cyclin A1* hätte nachgewiesen werden können. Die zweite Möglichkeit wäre eine Verminderung der Expression gewesen, in diesem Fall hätte ein Zusammenhang zwischen der Methylierung und der Expression hergestellt werden können. Dadurch, dass weder eine vermehrte Promotormethylierung noch eine vermehrte Expression von *Cyclin A1* festgestellt werden konnten, bestätigt sich keine der beiden Theorien.

Wie bereits in Kapitel 4.2 dargestellt wurde, ist es auch bei der Expression von *Cyclin A1* möglich, dass durch die alleinige Infektion mit E6 und E7 wichtige Einflüsse der Umwelt fehlten. Die anderen Studien sind an Gewebeproben durchgeführt worden, sodass dort durchaus auch andere Faktoren Einfluss nehmen konnten.

4.4 Expression der Methyltransferasen bei nativen und mit HPV16 immortalisierten HOK

Mittels *Real-time* Reverse-Transkriptase-PCR wurde die Expression von DNMT1, DNMT3a und DNMT3b bei gesunden und bei mit E6 und E7 immortalisierten HOK bestimmt. Die Ergebnisse wurden durch eine relative Quantifizierung ausgewertet, dabei wurde *GAPDH* als Referenzgen verwendet. Die relative Quantifizierung ergab, dass die Synthesisierung von DNMT1 in den immortalisierten HOK deutlich erhöht und die der DNMT3b etwas erhöht war. Die Expression der DNMT3a war nicht relevant erhöht. Für viele andere Karzinome wurde bereits

eine Erhöhung der DNMT nachgewiesen. DNMT1, 3a und 3b werden bei Leukämiezellen [102], bei Hepatozellulären Karzinomen [109], bei Pankreaskarzinomen [42], Colonkarzinomen [131] und Mammakarzinomen [49] vermehrt exprimiert [144]. DNMT1 wird ebenfalls bei Glioblastomen vermehrt exprimiert [120].

In mehreren Studien konnte eine mit HPV assoziierte Erhöhung der DNMT Expression gezeigt werden. In einer Studie konnte für die beiden Zervixkarzinomzelllinien SiHa und CaSki gezeigt werden, dass bei einem *knockdown* von HPV16 E6 *p53* wieder vermehrt exprimiert wird und es zu einer Erniedrigung der Expression und Aktivität von DNMT1 kommt. Ein *p53 knockdown* führte zu einer Erhöhung von DNMT1, sodass DNMT1 möglicherweise über eine HPV16 E6 bedingte Beeinflussung von *p53* reguliert wird [172]. Leonard *et al.* haben herausgefunden, dass eine Transfektion von humanen Vorhautkeratinozyten mit *high-risk* HPV zu einer Hochregulierung von DNMT1 und DNMT3b und zu einer Veränderung des Methylierungsstatus der zellulären Gene führt [88]. Lechner *et al.* verglichen Gewebeproben von Kopf-Hals-Karzinomen, in diesen konnten sie teilweise HPV18 nachweisen. In den mit HPV18 infizierten Proben konnte eine Erhöhung der mRNA Expression von DNMT1 und DNMT3a ermittelt werden [83]. Burgers *et al.* [17] zeigten, dass E7 von HPV16 mit der CR3 Zinkfingerdomäne an DNMT1 binden und die Aktivität von DNMT1 erhöhen kann. Das Ergebnis ihrer Arbeit weist darauf hin, dass dies auch bei Humanen Oralen Keratinozyten auf diese Weise funktionieren könnte.

Ebenso interessant sind die Auswirkungen einer gesteigerten DNMT Expression. Wu *et al.* [166] fügten ein exogenes eukaryotisches Gen für DNMT in NIH 3T3 Zellen (Fibroblasten eines Mausembryos) ein und demonstrierten damit, dass ein erzwungenes erhöhtes Expressionslevel der DNMT bei diesen Zellen zur zellulären Transformation führt. Bei humanen Fibroblasten findet durch eine Erhöhung der DNMT eine vermehrte *de novo* Methylierung von einigen CpG-Inseln statt [151]. In den bisher angeführten Studien wurde zur Untersuchung der Funktion der DNMT das Expressionslevel erhöht, Rhee *et al.* haben im Gegensatz dazu die Gene ausgeschaltet, um die Funktion der DNMT zu untersuchen. Sie haben Versuche an kolorektalen Krebszellen durchgeführt. In diesen wurde das Gen für DNMT1 durch homologe Rekombination ausgeschaltet, anschließend ging die globale Methylierung der DNA um 20 % zurück, wobei das *Gene-Silencing* des Tumorsuppressorgens *p16^{ink4a}* davon unbeeinflusst blieb. Bei einer alleinigen Ausschaltung des Gens für DNMT3b ging die globale Methylierung um weniger als 3 % zurück. Erst die gemeinsame Inaktivierung von DNMT1 und DNMT3b konnte einen Rückgang der Methylierung um 95 % bewirken, ebenso verschwand das *Gene-Silencing* von *p16^{ink4a}* und die Zellen wuchsen deutlich langsamer [125, 124]. Dies deutet auf ein enges Zusammenwirken von DNMT1 und DNMT3b hin. Die These, dass die DNMT abhängig voneinander arbeiten, wurde auch in einer zusammenfassenden Arbeit von Jones *et al.* aufgestellt [67]. Jedoch haben Chalertpet *et al.* [20] in ihrer bereits erwähnten Studie ebenfalls eine erhöhte Expression von DNMT1 und eine vermehrte Promotormethylierung von *Cyclin A1* in mit HPV16 infizierten SiHa Zellen gefunden. Sie konnten durch einen selektiven *knock-down* von DNMT1 einen Rückgang der Methylierung der Promotorregion von *Cyclin A1* bewirken.

In den Versuchen dieser Arbeit war die Expression von DNMT1 stark erhöht und die Expression von DNMT3b war ebenfalls deutlich erhöht. Damit konnte gezeigt werden, dass durch eine HPV bedingte Immortalisierung der HOK eine vermehrte Expression der Methyltransferasen initiiert wird. Inwiefern bei den HOK ein Zusammenspiel der DNMT zur Promotormethylierung von *Cyclin A1* nötig ist, bleibt unklar. In dieser Arbeit konnte der Zusammenhang der Erhöhung der DNMT1 mit einer vermehrten Promotormethylierung von *Cyclin A1* so nicht bestätigt werden. Da DNMT3a und DNMT3b für de-Novo-Methylierungen zuständig sind [6], könnte die fehlende erhöhte Expression der DNMT3a eine entscheidende Rolle spielen. Zudem wurden diese Versuche mit Zellkulturen durchgeführt, sodass möglicherweise weitere Faktoren fehlen, die Einfluss auf den Methylierungsstatus haben könnten.

4.5 Erstellen einer miRNA gegen E6 und E7

Nach dem Erstellen der miRNA gegen HPV16 E6 und E7 wurde zur Kontrolle der korrekten Basensequenz und zur Verifizierung, dass die erstellten Oligonukleotide inseriert wurden, eine Sequenzierung durchgeführt. Die Sequenzierung hat gezeigt, dass die Ligierung ohne Mutationen in den Zielvektor erfolgreich war. Es gibt bereits einige Studien, in denen RNA-Interferenz zum selektiven *knockdown* von HPV16 E6 und E7 genutzt wurde. So wurde in mehreren Studien HPV16 E7 siRNA zum *knockdown* in SiHa Zellen erstellt und in einer zusätzlich HPV16 E6 siRNA [1, 12, 20]. In weiteren Studien wurde siRNA gegen HPV16 E6 und E7 bei CaSki und HeLa Zellen eingesetzt [12, 21]. Im Gegensatz zu siRNA hat miRNA wenig Variation an den Enden der Basensequenz, dadurch interagiert die miRNA exakt mit der *Targeting* mRNA und schaltet diese so aus [18]. Diese kann dazu genutzt werden, um einen selektiven *knock-down* von HPV16 E6 und E7 in den immortalisierten HOK zu erzeugen. Durch den selektiven *knock-down* kann der Einfluss der Onkogene HPV16 E6 und E7 auf epigenetische Veränderungen genauer erforscht werden.

4.6 Ausblick

In dieser Arbeit konnte zwar keine Veränderung der Promotormethylierung oder der Expression von *Cyclin A1* nach Immortalisierung der Zellen mit E6/E7 ermittelt werden. Es konnte aber ein Zellkulturmodell etabliert werden, welches eine wichtige Grundlage für weitere Experimente bildet. Zudem konnte eindrucksvoll gezeigt werden, dass eine Immortalisierung der HOK durch HPV16 eine vermehrte Expression der Methyltransferasen bewirkt. Außerdem wurde miRNA mit Hilfe von *E. coli* hergestellt. In weiteren Versuchen können die mit E6 und E7 immortalisierten HOK mit der miRNA transfiziert werden, um einen selektiven *knock-out* von E6 und E7 zu erzielen. Im Anschluss sollte eine erneute Reduktion der DNMT mittels PCR gezeigt werden. Ebenfalls möglich wäre es, zuerst nur einen *knock-down* von E7 herbeizuführen, in einer anderen Studie ist bereits gezeigt worden, dass E7 direkten Einfluss auf DNMT1 nehmen kann [17].

Therapeutische und diagnostische Möglichkeiten

Die Erhöhung der DNMT weist vor allem für therapeutische Möglichkeiten eine hohe Relevanz auf. Epigenetische Veränderungen können im Gegensatz zu Mutationen durch Medikamente rückgängig gemacht werden. Es gibt bereits Medikamente, welche DNMT hemmen, diese sind jedoch mit Nebenwirkungen verbunden [144]. Zwei Medikamente werden bereits in klinischen Studien getestet. Dabei handelt es sich um 5-Azacytidine für hämatoonkologische Erkrankungen und 5-Aza-2'-Deoxycytidine für hämatoonkologische Erkrankungen, Zervixkarzinome und nichtkleinzellige Lungenkarzinome [173]. Außerdem soll es präventive Maßnahmen geben, welche die DNMT senken. Laut Subramaniam *et al.* gehört dazu der Verzehr von Brombeeren, Annurca-Apfel, Grüntee-Extrakt und Thymus serpyllum [144]. An Mäusen ist gezeigt worden, dass eine Unterdrückung der DNMT einen Rückgang intestinaler Neoplasien bewirkt [81]. Wenn es gut verträgliche Medikamente gibt, ist es von Interesse, für welche Karzinome sie eingesetzt werden können. Ob die Erhöhung des Expressionsniveaus der DNMT1 eine Möglichkeit zur Behandlung bietet, bleibt abzuwarten. Abgesehen von den Behandlungsmöglichkeiten bleibt offen, ob die Erhöhung zu diagnostischen Zwecken eingesetzt werden kann.

Die Hypermethylierung bestimmter Promotorregionen bietet ein großes Potenzial in der Diagnostik onkologischer Erkrankungen. Sie könnten als Biomarker zur Diagnostik und Prognose-Erstellung fungieren. Zu Kopf-Hals-Karzinomen gibt es viele Studien, die sich mit Methylierungsmustern im Speichel befassen. Speichel ist ein Medium, welches nah an der Region dieser Karzinomen liegt und nicht invasiv zu gewinnen ist [90]. Zum Beispiel wiesen Righini *et al.* im Speichel von Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen nach, dass *TIMP3*, *ECAD*, *p16*, *MGMT*, *DAPK* oder *RASSF1* häufig methyliert vorliegen. Bei mehr als 75 % der Patienten lag mindestens eins von diesen Genen methyliert vor. Hingegen konnten diese Methylierungen nicht im Speichel von gesunden Menschen gefunden werden [128]. In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass *KIF1A* und *EDNRB* in 67 % im Speichel von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren methyliert vorliegt und nur in 6,6 % bei gesunden Menschen [31].

Die Möglichkeiten, wie diese Erkenntnisse angewendet werden können, sind vielfältig. In dieser Arbeit konnte zwar keine Hypermethylierung für *Cyclin A1* gezeigt werden, es sollten aber zukünftig weitere Forschungsarbeiten zu diesem Themengebiet angestrebt werden [7].

5 Literaturverzeichnis

- [1] ALLISON, S. J.; JIANG, M.; MILNER, J.: Oncogenic viral protein HPV E7 up-regulates the SIRT1 longevity protein in human cervical cancer cells. In: *Aging* 1.3 (2009), S. 316–327.
- [2] ANG, K. K.; HARRIS, J.; WHEELER, R.; WEBER, R.; ROSENTHAL, D. I.; NGUYEN-TÂN, P. F.; WESTRA, W. H.; CHUNG, C. H.; JORDAN, R. C.; LU, C. et al.: Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. In: *New England Journal of Medicine* 363.1 (2010), S. 24–35.
- [3] AUMÜLLER, G.; AUST, G.; DOLL, A.; KIRSCH, J.; ENGELE, J.; MENSE, S.; WURZINGER, L.; REISSIG, D.; SALVETTER, J.; SCHMIDT, W. et al.: Duale Reihe Anatomie. In: *Bob, A. und Bob, K. (Hrsg.) Thieme, Stuttgart* (2007), S. 913–919.
- [4] BAND, V.; DE CAPRIO, J.; DELMOLINO, L.; KULESA, V.; SAGER, R.: Loss of p53 protein in human papillomavirus type 16 E6-immortalized human mammary epithelial cells.. In: *Journal of virology* 65.12 (1991), S. 6671–6676.
- [5] BARTEL, D.: MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. In: *cell* 116.2 (2004), S. 281–297.
- [6] BAYLIN, S.: DNA methylation and gene silencing in cancer. In: *Nat Clin Pract Oncol* 2 Suppl 1 (2005), S. 4–11.
- [7] BAYLIN, S. B.; HERMAN, J.: DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. In: *Trends in Genetics* 16.4 (2000), S. 168–174.
- [8] BERGER, S.: Histone modifications in transcriptional regulation. In: *Current opinion in genetics & development* 12.2 (2002), S. 142–148.
- [9] BESTOR, T.: The DNA methyltransferases of mammals. In: *Human Molecular Genetics* 9.16 (2000), S. 2395–2402.
- [10] BOHNSACK, M. T.; CZAPLINSKI, K.; GÖRLICH, D.: Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. In: *Rna* 10.2 (2004), S. 185–191.
- [11] BOSCH, F. X.; LORINCZ, A.; MUNOZ, N.; MEIJER, C. J.; SHAH, K.: The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. In: *J. Clin. Pathol.* 55.4 (2002), S. 244–265.
- [12] BOTTLEY, G.; WATHERSTON, O.; HIEW, Y.; NORRILD, B.; COOK, G.; BLAIR, G.: High-risk human papillomavirus E7 expression reduces cell-surface MHC class I molecules and increases susceptibility to natural killer cells. In: *Oncogene* 27.12 (2008), S. 1794–1799.
- [13] BOURC'HIS, D.; XU, G.-L.; LIN, C.-S.; BOLLMAN, B.; BESTOR, T.: Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. In: *Science* 294.5551 (2001), S. 2536–2539.

-
- [14] BOUVARD, V.; MATLASHEWSKI, G.; GU, Z.-M.; STOREY, A.; BANKS, L.: The human papillomavirus type 16 E5 gene cooperates with the E7 gene to stimulate proliferation of primary cells and increases viral gene expression. In: *Virology* 203.1 (1994), S. 73–80.
- [15] BOY, S.; RENSBURG, E. J. V.; ENGELBRECHT, S.; DREYER, L.; VAN HEERDEN, M.; VAN HEERDEN, W.: HPV detection in primary intra-oral squamous cell carcinomas - commensal, aetiological agent or contamination?. In: *Journal of Oral Pathology & Medicine* 35.2 (2006), S. 86–90.
- [16] BOYLE, P.; LEVIN, B.: World cancer report 2008.. In: *International Agency for Research on Cancer* (2008), S. 40–124.
- [17] BURGERS, W.; BLANCHON, L.; PRADHAN, S.; DE LAUNOIT, Y.; KOUZARIDES, T.; FUKS, F.: Viral oncoproteins target the DNA methyltransferases. In: *Oncogene* 26.11 (2007), S. 1650–1655.
- [18] CARTHEW, R. W.; SONTHEIMER, E.: Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. In: *Cell* 136.4 (2009), S. 642–655.
- [19] CARVALHO, A. L.; JERONIMO, C.; KIM, M. M.; HENRIQUE, R.; ZHANG, Z.; HOQUE, M. O.; CHANG, S.; BRAIT, M.; NAYAK, C. S.; JIANG, W.-W. et al.: Evaluation of promoter hypermethylation detection in body fluids as a screening/diagnosis tool for head and neck squamous cell carcinoma. In: *Clinical Cancer Research* 14.1 (2008), S. 97–107.
- [20] CHALERTPET, K.; PAKDEECHAIDAN, W.; PATEL, V.; MUTIRANGURA, A.; YANATATS-ANEEJIT, P.: Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein mediates CCNA1 promoter methylation. In: *Cancer science* 106.10 (2015), S. 1333–1340.
- [21] CHANG, J. T.; KUO, T.; CHEN, Y.-J.; CHIU, C.; LU, Y.; LI, H.; SHEN, C.; CHENG, A.: Highly potent and specific siRNAs against E6 or E7 genes of HPV16-or HPV18-infected cervical cancers. In: *Cancer gene therapy* 17.12 (2010), S. 827–836.
- [22] CHUANG, L. S.-H.; IAN, H.-I.; KOH, T.-W.; NG, H.-H.; XU, G.; LI, B.: Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1. In: *Science* 277.5334 (1997), S. 1996–2000.
- [23] COHEN, S. N.; CHANG, A. C.; HSU, L.: Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 69.8 (1972), S. 2110–2114.
- [24] COLACINO, J. A.; DOLINOY, D. C.; DUFFY, S. A.; SARTOR, M. A.; CHEPEHA, D. B.; BRADFORD, C. R.; MCHUGH, J. B.; PATEL, D. A.; VIRANI, S.; WALLINE, H. M. et al.: Comprehensive analysis of DNA methylation in head and neck squamous cell carcinoma indicates differences by survival and clinicopathologic characteristics. In: *PLoS One* 8.1 (2013), S. 54742.
-

- [25] COTRELL, S. E.; LAIRD, P.: Sensitive detection of DNA methylation. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 983.1 (2003), S. 120–130.
- [26] COVERLEY, D.; LAMAN, H.; LASKEY, R.: Distinct roles for cyclins E and A during DNA replication complex assembly and activation. In: *Nature Cell Biology* 4.7 (2002), S. 523–528.
- [27] DALE, O.; SOOD, S.; SHAH, K.; HAN, C.; RAPOZO, D.; MEHANNA, H.; WINTER, S.: Long-term survival outcomes in patients with surgically treated oropharyngeal cancer and defined human papilloma virus status. In: *The Journal of Laryngology & Otology* 130.11 (2016), S. 1048–1053.
- [28] DAMM, O.; NOCON, M.; ROLL, S.; VAUTH, C.; WILLICH, S.; GREINER, W.: Human papillomavirus (HPV) vaccination for the prevention of HPV 16/18 induced cervical cancer and its precursors. In: *GMS Health Technol Assess* 5 (2009), S. 04.
- [29] DAYYANI, F.; ETZEL, C. J.; LIU, M.; HO, C.-H.; LIPPMAN, S. M.; TSAO, A.: Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). In: *Head & neck oncology* 2.1 (2010), S. 1.
- [30] DE FREITAS CORDEIRO-SILVA, M.; STUR, E.; AGOSTINI, L. P.; PODESTÁ, J. R. V. de; OLIVEIRA, J. C. de; SOARES, M. S.; MENDONÇA, E. F.; GOUVEA, S. A.; VON ZEIDLER, S. V.; LOURO, I.: Promoter hypermethylation in primary squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx: a study of a Brazilian cohort. In: *Molecular biology reports* 39.12 (2012), S. 10111–10119.
- [31] DEMOKAN, S.; CHANG, X.; CHUANG, A.; MYDLARZ, W. K.; KAUR, J.; HUANG, P.; KHAN, Z.; KHAN, T.; OSTROW, K. L.; BRAIT, M. et al.: KIF1A and EDNRB are differentially methylated in primary HNSCC and salivary rinses. In: *International journal of cancer* 127.10 (2010), S. 2351–2359.
- [32] DESJARDINS, P.; CONKLIN, D.: NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. In: *Journal of visualized experiments: JoVE* 45 (2010), S. 2565.
- [33] DEUTSCHE AKADEMIE FÜR KINDER UND JUGENDMEDIZIN E.V.; DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR GYNÄKOLOGIE UND GEBURTSHILFE E.V.: Stellungnahme zur Infektions-prophylaxe gegen das humane Papillomavirus (HPV). In: *Monatsschr Kinderheilkd* 155 (2007), S. 459–463.
- [34] DOORBAR, J.: Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. In: *Clin. Sci.* 110.5 (2006), S. 525–541.
- [35] EADS, C. A.; DANENBERG, K. D.; KAWAKAMI, K.; SALTZ, L. B.; BLAKE, C.; SHIBATA, D.; DANENBERG, P. V.; LAIRD, P.: MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. In: *Nucleic acids research* 28.8 (2000), S. 32–00.

-
- [36] EL NAGGAR, A. K.; WESTRA, W.: p16 expression as a surrogate marker for HPV-related oropharyngeal carcinoma: A guide for interpretative relevance and consistency. In: *Head & neck* 34.4 (2012), S. 459–461.
- [37] FEHRMANN, F.; LAIMINS, L.: Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. In: *Oncogene* 22.33 (2003), S. 5201–5207.
- [38] FERRIS, R. L.; BLUMENSCHNEIN JR, G.; FAYETTE, J.; GUIGAY, J.; COLEVAS, A. D.; LICITRA, L.; HARRINGTON, K.; KASPER, S.; VOKES, E. E.; EVEN, C. et al.: Nivolumab for recurrent squamous-cell carcinoma of the head and neck. In: *New England Journal of Medicine* 375.19 (2016), S. 1856–1867.
- [39] FOSSUM, C. C.; CHINTAKUNTLAWAR, A. V.; PRICE, D. L.; GARCIA, J. J.: Characterization of the oropharynx: anatomy, histology, immunology, squamous cell carcinoma and surgical resection. In: *Histopathology* 70.7 (2017), S. 1021–1029.
- [40] FRAGA, M. F.; ESTELLER, M.: DNA methylation: a profile of methods and applications. In: *Biotechniques* 33.3 (2002), S. 632–649.
- [41] FUKS, F.; BURGERS, W. A.; BREHM, A.; HUGHES-DAVIES, L.; KOUZARIDES, T.: DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. In: *Nature genetics* 24.1 (2000), S. 88–91.
- [42] GAO, J.; WANG, L.; XU, J.; ZHENG, J.; MAN, X.; WU, H.; JIN, J.; WANG, K.; XIAO, H.; LI, S.; LI, Z.: Aberrant DNA methyltransferase expression in pancreatic ductal adenocarcinoma development and progression. In: *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 32.1 (2013), S. 1.
- [43] GEMEINSCHAFTSPUBLIKATION: Krebs in Deutschland für 2013/2014. In: *Gesundheitsberichterstattung-Hefte* 11 (2017), S. 24–27.
- [44] GILLESPIE, M. B.; RUBINCHIK, S.; HOEL, B.; SUTKOWSKI, N.: Human papillomavirus and oropharyngeal cancer: what you need to know in 2009. In: *Current Treatment Options in Oncology* 10.5 (2009), S. 296–307.
- [45] GILLISON, M. L.; CHATURVEDI, A. K.; ANDERSON, W. F.; FAKHRY, C.: Epidemiology of human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma. In: *Journal of Clinical Oncology* 33.29 (2015), S. 3235–3242.
- [46] GILLISON, M. L.; KOCH, W. M.; CAPONE, R. B.; SPAFFORD, M.; WESTRA, W. H.; WU, L.; ZAHURAK, M. L.; DANIEL, R. W.; VIGLIONE, M.; SYMER, D. E. et al.: Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. In: *Journal of the National Cancer Institute* 92.9 (2000), S. 709–720.
- [47] GINZINGER, D.: Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. In: *Experimental Hematology* 30.6 (2002), S. 503–512.
-

-
- [48] GIRARD, F.; STRAUSFELD, U.; FERNANDEZ, A.; LAMB, N.: Cyclin a is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. In: *Cell* 67.6 (1991), S. 1169–1179.
- [49] GIRAULT, I.; TOZLU, S.; LIDEREAU, R.; BIÈCHE, I.: Expression analysis of DNA methyltransferases 1, 3A, and 3B in sporadic breast carcinomas. In: *Clinical Cancer Research* 9.12 (2003), S. 4415–4422.
- [50] GÜRKOV, R.: Mediscript StaR: Das Staatsexamens-Repetitorium zur HNO. In: *Angst-wurm, M. and Kia, T. (Hrsg.) Urban & Fischer Verlag, Elsevier, München* (2013), S. 34–41.
- [51] HAINES, D. M.; WEST, K.: Immunohistochemistry: forging the links between immunology and pathology. In: *Veterinary immunology and immunopathology* 108.1 (2005), S. 151–156.
- [52] HALBERT, C.; DEMERS, G.; GALLOWAY, D.: The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells.. In: *Journal of virology* 65.1 (1991), S. 473–478.
- [53] HEBNER, C. M.; LAIMINS, L.: Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. In: *Reviews in medical virology* 16.2 (2006), S. 83–97.
- [54] HECHT, S.: Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. In: *Nature reviews. Cancer* 3.10 (2003), S. 733.
- [55] HECK, J. E.; BERTHILLER, J.; VACCARELLA, S.; WINN, D. M.; SMITH, E. M.; SHAN'GINA, O.; SCHWARTZ, S. M.; PURDUE, M. P.; PILARSKA, A.; ELUF-NETO, J. et al.: Sexual behaviours and the risk of head and neck cancers: a pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) consortium. In: *International journal of epidemiology* 39.1 (2009), S. 166–181.
- [56] HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K. J.; WILLIAMS, P. M.: Real time quantitative PCR.. In: *Genome Research* 6.10 (1996), S. 986–994.
- [57] HERMAN, J. G.; BAYLIN, S.: Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. In: *The New England Journal of Medicine* 349.21 (2003), S. 2042–2054.
- [58] HINNI, M. L.; FERLITO, A.; BRANDWEIN-GENSLER, M. S.; TAKES, R. P.; SILVER, C. E.; WESTRA, W. H.; SEETHALA, R. R.; RODRIGO, J. P.; CORRY, J.; BRADFORD, C. R. et al.: Surgical margins in head and neck cancer: a contemporary review. In: *Head & neck* 35.9 (2013), S. 1362–1370.
- [59] HOLLIDAY, R.; PUGH, J.: DNA modification mechanisms and gene activity during development. In: *Science* 187.4173 (1975), S. 226–232.
-

-
- [60] HONG, A.; LEE, C. S.; JONES, D.; VEILLARD, A.-S.; ZHANG, M.; ZHANG, X.; SMEE, R.; CORRY, J.; PORCEDDU, S.; MILROSS, C. et al.: Rising prevalence of human papillomavirus-related oropharyngeal cancer in Australia over the last 2 decades. In: *Head & neck* 38.5 (2016), S. 743–750.
- [61] HORN, F.; MOC, I.; SCHNEIDER, N.; GRILLHÖSL, C.; BERGHOLD, S.; LINDENMEIER, G.: Biochemie des Menschen: Das Lehrbuch für das Medizinstudium. In: *Horn, F. (Hrsg.) Thieme, Stuttgart (2005), S. 302–304.*
- [62] HUANG, S. H.; PEREZ-ORDONEZ, B.; LIU, F.-F.; WALDRON, J.; RINGASH, J.; IRISH, J.; CUMMINGS, B.; SIU, L. L.; KIM, J.; WEINREB, I. et al.: Atypical clinical behavior of p16-confirmed HPV-related oropharyngeal squamous cell carcinoma treated with radical radiotherapy. In: *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 82.1 (2012), S. 276–283.
- [63] HUDSON, J. B.; BEDELL, M. A.; MCCANCE, D. J.; LAIMINIS, L.: Immortalization and altered differentiation of human keratinocytes in vitro by the E6 and E7 open reading frames of human papillomavirus type 18.. In: *Journal of Virology* 64.2 (1990), S. 519–526.
- [64] HUNTER, T.; PINES, J.: Cyclins and cancer II: cyclin D and CDK inhibitors come of age. In: *Cell* 79.4 (1994), S. 573–582.
- [65] JAENISCH, R.; BIRD, A.: Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. In: *Nature genetics* 33 (2003), S. 245–254.
- [66] JEMAL, A.; SIMARD, E. P.; DORELL, C.; NOONE, A.-M.; MARKOWITZ, L. E.; KOHLER, B.; EHEMAN, C.; SARAIYA, M.; BANDI, P.; SASLOW, D. et al.: Annual report to the nation on the status of cancer, 1975–2009, featuring the burden and trends in human papillomavirus (HPV)-associated cancers and HPV vaccination coverage levels. In: *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 105.3 (2013), S. 175–201.
- [67] JONES, P. A.; BAYLIN, S.: The fundamental role of epigenetic events in cancer. In: *Nature reviews genetics* 3.6 (2002), S. 415–428.
- [68] KAATSCH, P.; SPIX, C.; KATALINIC, A.; HENTSCHEL, S.; LUTTMANN, S.; STEGMAIER, C.; CASPRITZ, S.; CHRIST, M.; ERNST, A.; FOLKERTS, J. et al.: Krebs in Deutschland 2011/2012. In: (2015), S. 8–20.
- [69] KAUR, P.; HALBERT, C.: Immortalization of human keratinocytes with human papilloma virus DNA. In: *Methods in Cell Science* 17 (1995), S. 117–123.
- [70] KELLY, K.; JOHNSON-OBASEKI, S.; LUMINGU, J.; CORSTEN, M.: Oncologic, functional and surgical outcomes of primary Transoral Robotic Surgery for early squamous cell cancer of the oropharynx: a systematic review. In: *Oral oncology* 50.8 (2014), S. 696–703.
-

- [71] KEMPEN, P. M.; NOORLAG, R.; BRAUNIUS, W. W.; STEGEMAN, I.; WILLEMS, S. M.; GROLMAN, W.: Differences in methylation profiles between HPV-positive and HPV-negative oropharynx squamous cell carcinoma: a systematic review. In: *Epigenetics* 9.2 (2014), S. 194–203.
- [72] KIRBY, T.: FDA approves new upgraded Gardasil 9. In: *Lancet Oncol* 16.2 (2015), S. 56.
- [73] KITKUMTHORN, N.; YANATATSANAJIT, P.; KIATPONGSAN, S.; PHOKAEW, C.; TRIRATANACHAT, S.; TRIVIJITSILP, P.; TERMRUNGRUANGLERT, W.; TRESUKOSOL, D.; NIRUTHISARD, S.; MUTIRANGURA, A.: Cyclin A1 promoter hypermethylation in human papillomavirus-associated cervical cancer. In: *BMC Cancer* 6.1 (2006), S. 1–9.
- [74] KLUSSMANN, J.; PREUSS, S.; SPEEL, E.: Humane papillomviren und oropharynxkarzinome. German. In: *HNO* 57.2 (2009), S. 113–122.
- [75] KNUDSON, A.: Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. In: *Cancer Res.* 45.4 (1985), S. 1437–1443.
- [76] KÖNIG, F.; KREKELER, G.; HÖNIG, J. F.; CORDON-CARDO, C.; FISCHER, G.; KORABIOWSKA, M.: Relation between human papillomavirus positivity and p16 expression in head and neck carcinomas—a tissue microarray study. In: *Anticancer research* 27.1A (2007), S. 283–288.
- [77] KOYFMAN, S. A.; HARA, W.: General principles of radiation therapy for head and neck cancer. In: *Waltham, MA: UpToDate Inc.* (aktualisiert: Juni 2018). eingesehen am 09.08.2019. URL: <https://www.uptodate.com/contents/general-principles-of-radiation-therapy-for-head-and-neck-cancer>.
- [78] KREIMER, A. R.; CLIFFORD, G. M.; BOYLE, P.; FRANCESCHI, S.: Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. In: *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 14.2 (2005), S. 467–475.
- [79] KUMAR, B.; CORDELL, K. G.; LEE, J. S.; WORDEN, F. P.; PRINCE, M. E.; TRAN, H. H.; WOLF, G. T.; URBA, S. G.; CHEPEHA, D. B.; TEKNOS, T. N. et al.: EGFR, p16, HPV Titer, Bcl-xL and p53, sex, and smoking as indicators of response to therapy and survival in oropharyngeal cancer. In: *Journal of clinical oncology* 26.19 (2008), S. 3128–3137.
- [80] LAGOS-QUINTANA, M.; RAUHUT, R.; YALCIN, A.; MEYER, J.; LENDECKEL, W.; TUSCHL, T.: Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. In: *Current biology* 12.9 (2002), S. 735–739.
- [81] LAIRD, P. W.; JACKSON-GRUSBY, L.; FAZELI, A.; DICKINSON, S. L.; JUNG, W. E.; LI, E.; WEINBERG, R. A.; JAENISCH, R.: Suppression of intestinal neoplasia by DNA hypomethylation. In: *Cell* 81.2 (1995), S. 197–205.

-
- [82] LARSEN, C. G.; GYLDENLØVE, M.; JENSEN, D.; THERKILDSEN, M.; KISS, K.; NORRILD, B.; KONGE, L.; VON BUCHWALD, C.: Correlation between human papillomavirus and p16 overexpression in oropharyngeal tumours: a systematic review. In: *British journal of cancer* 110.6 (2014), S. 1587.
- [83] LECHNER, M.; FENTON, T.; WEST, J.; WILSON, G.; FEBER, A.; HENDERSON, S. et al.: Identification and functional validation of HPV-mediated hypermethylation in head and neck squamous cell carcinoma. In: *Genome medicine* 5.2 (2013), S. 1.
- [84] LEE, Y.; AHN, C.; HAN, J.; CHOI, H.; KIM, J.; YIM, J.; LEE, J.; PROVOST, P.; RÅDMARK, O.; KIM, S.; KIM, V.: The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. In: *nature* 425.6956 (2003), S. 415.
- [85] LEE, Y.; KIM, M.; HAN, J.; YEOM, K.-H.; LEE, S.; BAEK, S. H.; KIM, V.: MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. In: *The EMBO journal* 23.20 (2004), S. 4051–4060.
- [86] LEEMANS, C. R.; BRAAKHUIS, B. J.; BRAKENHOFF, R. H.: The molecular biology of head and neck cancer. In: *Nature reviews. Cancer* 11.1 (2011), S. 9.
- [87] LEITLINIENPROGRAMM ONKOLOGIE: S3-Leitlinie Prävention des Zervixkarzinoms, Langversion 1.0 , Dezember 2017, AWMF-Registernummer 015/027OL. In: (2017), S. 42–48.
- [88] LEONARD, S. M.; WEI, W.; COLLINS, S. I.; PEREIRA, M.; DIYAF, A.; CONSTANDINO-WILLIAMS, C.; YOUNG, L. S.; ROBERTS, S.; WOODMAN, C.: Oncogenic human papillomavirus imposes an instructive pattern of DNA methylation changes which parallel the natural history of cervical HPV infection in young women. In: *Carcinogenesis* (2012), S. 157.
- [89] LILL, C.; BACHTIARY, B.; SELZER, E.; MITTLBOECK, M.; THURNHER, D.: A 5-year update of patients with HPV positive versus negative oropharyngeal cancer after radiochemotherapy in Austria. In: *Wiener klinische Wochenschrift* 129.11-12 (2017), S. 398–403.
- [90] LIM, Y.; SUN, C. X.; TRAN, P.; PUNYADEERA, C.: Salivary epigenetic biomarkers in head and neck squamous cell carcinomas. In: *Biomarkers in medicine* 10.3 (2016), S. 301–313.
- [91] LIN, B. Y.; MAKHOV, A. M.; GRIFFITH, J. D.; BROKER, T. R.; CHOW, L.: Chaperone proteins abrogate inhibition of the human papillomavirus (HPV) E1 replicative helicase by the HPV E2 protein. In: *Molecular and Cellular Biology* 22.18 (2002), S. 6592–6604.
- [92] LIU, Y.; MCKALIP, A.; HERMAN, B.: Human papillomavirus type 16 E6 and HPV-16 E6/E7 sensitize human keratinocytes to apoptosis induced by chemotherapeutic agents: Roles of p53 and caspase activation. In: *Journal of cellular biochemistry* 78.2 (2000), S. 334–349.
-

-
- [93] LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T.: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. In: *Methods* 25.4 (2001), S. 402–408.
- [94] LUBIN, J. H.; PURDUE, M.; KELSEY, K.; ZHANG, Z.-F.; WINN, D.; WEI, Q.; TALAMINI, R.; SZESZENIA-DABROWSKA, N.; STURGIS, E. M.; SMITH, E. et al.: Total exposure and exposure rate effects for alcohol and smoking and risk of head and neck cancer: a pooled analysis of case-control studies. In: *American journal of epidemiology* 170.8 (2009), S. 937–947.
- [95] MARTONE, T.; GILLIO-TOS, A.; DE MARCO, L.; FIANO, V.; MAULE, M.; CAVALOT, A.; GARZARO, M.; MERLETTI, F.; CORTESINA, G.: Association between hypermethylated tumor and paired surgical margins in head and neck squamous cell carcinomas. In: *Clinical Cancer Research* 13.17 (2007), S. 5089–5094.
- [96] MARUR, S.; D'SOUZA, G.; WESTRA, W. H.; FORASTIERE, A.: HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. In: *The lancet oncology* 11.8 (2010), S. 781–789.
- [97] MASTERSON, L.; MOUALED, D.; LIU, Z. W.; HOWARD, J. E.; DWIVEDI, R. C.; TY-SOME, J. R.; BENSON, R.; STERLING, J. C.; SUDHOFF, H.; JANI, P.; GOONF, P.: De-escalation treatment protocols for human papillomavirus-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis of current clinical trials. In: *European journal of cancer* 50.15 (2014), S. 2636–2648.
- [98] MATZNER, I.; SAVELYEVA, L.; SCHWAB, M.: Preferential integration of a transfected marker gene into spontaneously expressed fragile sites of a breast cancer cell line. In: *Cancer letters* 189.2 (2003), S. 207–219.
- [99] MCGUIRE, S.: World cancer report 2014. Geneva, Switzerland: World Health Organization, international agency for research on cancer, WHO Press, 2015. In: *Advances in Nutrition: An International Review Journal* 7.2 (2016), S. 418–419.
- [100] MCMURRAY, H. R.; MCCANCE, D.: Degradation of p53, not telomerase activation, by E6 Is required for bypass of crisis and immortalization by human papillomavirus type 16 E6/E7. In: *Journal of Virology* 78.11 (2004), S. 5698–5706.
- [101] MENDENHALL, W. M.; HINERMAN, R. W.; AMDUR, R. J.; MALYAPA, R. S.; LANSFORD, C. D.; WERNING, J. W.; VILLARET, D.: Postoperative radiotherapy for squamous cell carcinoma of the head and neck. In: *Clinical medicine & research* 4.3 (2006), S. 200–208.
- [102] MIZUNO, S.-i.; CHIJIWA, T.; OKAMURA, T.; AKASHI, K.; FUKUMAKI, Y.; NIHO, Y.; SASAKI, H.: Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia. In: *Blood* 97.5 (2001), S. 1172–1179.
-

- [103] MOORE, K. A.; MEHTA, V.: The growing epidemic of HPV-positive oropharyngeal carcinoma: a clinical review for primary care providers. In: *The Journal of the American Board of Family Medicine* 28.4 (2015), S. 498–503.
- [104] MÜLLER-TIDOW, C.; BORNEMANN, C.; DIEDERICHS, S.; WESTERMANN, A.; KLÜMPEN, S.; ZUO, P.; WANG, W.; BERDEL, W. E.; SERVE, H.: Analyses of the genomic methylation status of the human cyclin A1 promoter by a novel real-time PCR-based methodology. In: *FEBS letters* 490.1 (2001), S. 75–78.
- [105] MÜLLER, CARSTEN AND READHEAD, CAROL AND DIEDERICHS, SVEN AND IDOS, GREGORY AND YANG, RONG AND TIDOW, NICOLA AND SERVE, HUBERT AND BERDEL, WOLFGANG E AND KOEFFLER, H PHILLIP: Methylation of the cyclin A1 promoter correlates with gene silencing in somatic cell lines, while tissue-specific expression of cyclin A1 is methylation independent. In: *Molecular and cellular biology* 20.9 (2000), S. 3316–3329.
- [106] MULLIS, K.; FALOONA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G.; ERLICH, H.: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. In: *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51 (1986), S. 263–273.
- [107] MUÑOZ, N.; BOSCH, F. X.; DE SANJOSÉ, S.; HERRERO, R.; CASTELLSAGUÉ, X.; SHAH, K. V.; SNIJDERS, P. J.; MEIJER, C.: Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. In: *New England Journal of Medicine* 348.6 (2003), S. 518–527.
- [108] MUNOZ, N.; CASTELLSAGUÉ, X.; GONZÁLEZ, A. B. de; GISSMANN, L.: HPV in the etiology of human cancer. In: *Vaccine* 24 (2006), S. 1–10.
- [109] NAGAI, M.; NAKAMURA, A.; MAKINO, R.; MITAMURA, K.: Expression of DNA (5-cytosin)-methyltransferases (DNMTs) in hepatocellular carcinomas. In: *Hepatology research* 26.3 (2003), S. 186–191.
- [110] NGUYEN-TAN, P. F.; ZHANG, Q.; ANG, K. K.; WEBER, R. S.; ROSENTHAL, D. I.; SOULIERES, D.; KIM, H.; SILVERMAN, C.; RABEN, A.; GALLOWAY, T. J. et al.: Randomized phase III trial to test accelerated versus standard fractionation in combination with concurrent cisplatin for head and neck carcinomas in the Radiation Therapy Oncology Group 0129 trial: long-term report of efficacy and toxicity. In: *Journal of Clinical Oncology* 32.34 (2014), S. 3858–3867.
- [111] NOORLAG, R.; VAN KEMPEN, P. M.; MOELANS, C. B.; JONG, R. de; BLOK, L. E.; KOOLE, R.; GROLMAN, W.; DIEST, P. J. van; ES, R. J. van; WILLEMS, S.: Promoter hypermethylation using 24-gene array in early head and neck cancer: better outcome in oral than in oropharyngeal cancer. In: *Epigenetics* 9.9 (2014), S. 1220–1227.

-
- [112] O’SULLIVAN, B.; HUANG, S. H.; SU, J.; GARDEN, A. S.; STURGIS, E. M.; DAHLSTROM, K.; LEE, N.; RIAZ, N.; PEI, X.; KOYFMAN, S. A. et al.: Development and validation of a staging system for HPV-related oropharyngeal cancer by the International Collaboration on Oropharyngeal cancer Network for Staging (ICON-S): a multicentre cohort study. In: *The Lancet Oncology* 17.4 (2016), S. 440–451.
- [113] OHSAWA, K.; IMAI, Y.; ITO, D.; KOHSAKA, S.: Molecular cloning and characterization of annexin V-binding proteins with highly hydrophilic peptide structure. In: *Journal of neurochemistry* 67.1 (1996), S. 89–97.
- [114] OKANO, M.; BELL, D. W.; HABER, D. A.; LI, E.: DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. In: *Cell* 99.3 (1999), S. 247–257.
- [115] OLSEN, S. M.; MOORE, E. J.; GARCIA, J. J.; JANUS, J. R.; PRICE, D. L.; OLSEN, K.: Transoral surgery alone for human-papillomavirus-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma. In: *Ear, Nose & Throat Journal* 92.2 (2013), S. 76.
- [116] PREISS, J.; DORNOFF, W.; HAGMANN, F.; SCHMIEDER, A.: Taschenbuch Onkologie : interdisziplinäre Empfehlungen zur Therapie 2010/2011. In: (2010), S. 137–144.
- [117] PRINTZ, C.: FDA approves Gardasil 9 for more types of HPV. In: *Cancer* 121.8 (2015), S. 1156–1157.
- [118] PYEON, D.; NEWTON, M. A.; LAMBERT, P. F.; DEN BOON, J. A.; SENGUPTA, S.; MARSIT, C. J.; WOODWORTH, C. D.; CONNOR, J. P.; HAUGEN, T. H.; SMITH, E. M. et al.: Fundamental differences in cell cycle deregulation in human papillomavirus-positive and human papillomavirus-negative head/neck and cervical cancers. In: *Cancer research* 67.10 (2007), S. 4605–4619.
- [119] RAGIN, C. C.; TAIOLI, E.: Survival of squamous cell carcinoma of the head and neck in relation to human papillomavirus infection: review and meta-analysis. In: *International journal of cancer* 121.8 (2007), S. 1813–1820.
- [120] RAJENDRAN, G.; SHANMUGANANDAM, K.; BENDRE, A.; MUJUMDAR, D.; GOEL, A.; SHIRAS, A.: Epigenetic regulation of DNA methyltransferases: DNMT1 and DNMT3B in gliomas. In: *Journal of neuro-oncology* 104.2 (2011), S. 483–494.
- [121] REBUCCI, M.; PEIXOTO, P.; DEWITTE, A.; WATTEZ, N.; DE NUNCQUES, M.-A.; REZVOY, N.; VAUTRAVERS-DEWAS, C.; BUISINE, M.-P.; GUERIN, E.; PEYRAT, J.-P. et al.: Mechanisms underlying resistance to cetuximab in the HNSCC cell line: role of AKT inhibition in bypassing this resistance. In: *International journal of oncology* 38.1 (2011), S. 189–200.
- [122] REDDY, V.; CUNDALL-CURRY, D.; BRIDGER, M.: Trends in the incidence rates of tonsil and base of tongue cancer in England, 1985–2006. In: *The Annals of The Royal College of Surgeons of England* 92.8 (2010), S. 655–659.
-

- [123] RETTIG, E. M.; DSOUZA, G.: Epidemiology of head and neck cancer. In: *Surgical Oncology Clinics* 24.3 (2015), S. 379–396.
- [124] RHEE, I.; BACHMAN, K. E.; PARK, B. H.; JAIR, K.-W.; YEN, R.-W. C.; SCHUEBEL, K. E. et al.: DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. In: *Nature* 416.6880 (2002), S. 552–556.
- [125] RHEE, I.; JAIR, K.-W.; YEN, R.-W. C.; LENGAUER, C.; HERMAN, J. G.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B.; BAYLIN, S. B.; SCHUEBEL, K.: CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1. In: *Nature* 404.6781 (2000), S. 1003–1007.
- [126] RIETBERGEN, M. M.; LEEMANS, C. R.; BLOEMENA, E.; HEIDEMAN, D. A.; BRAAKHUIS, B. J.; HESSELINK, A. T.; WITTE, B. I.; JONG, R. J. B. de; MEIJER, C.; SNIJDERS, P. et al.: Increasing prevalence rates of HPV attributable oropharyngeal squamous cell carcinomas in the Netherlands as assessed by a validated test algorithm. In: *International journal of cancer* 132.7 (2013), S. 1565–1571.
- [127] RIGGS, A.: X inactivation, differentiation, and DNA methylation. In: *Cytogenetic and Genome Research* 14.1 (1975), S. 9–25.
- [128] RIGHINI, C. A.; DE FRAIPONT, F.; TIMSIT, J.-F.; FAURE, C.; BRAMBILLA, E.; REYT, E.; FAVROT, M.-C.: Tumor-specific methylation in saliva: a promising biomarker for early detection of head and neck cancer recurrence. In: *Clinical Cancer Research* 13.4 (2007), S. 1179–1185.
- [129] ROBERTSON, K.: DNA methylation and human disease. In: *Nat Rev Genet* 6.8 (2005), S. 597–610.
- [130] ROBERTSON, K.: DNA methylation, methyltransferases, and cancer. In: *Oncogene* 20.24 (2001), S. 3139.
- [131] ROBERTSON, K. D.; UZVOLGYI, E.; LIANG, G.; TALMADGE, C.; SUMEGI, J.; GONZALES, F. A.; JONES, P.: The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. In: *Nucleic Acids Research* 27.11 (1999), S. 2291–2298.
- [132] ROUNTREE, M. R.; BACHMAN, K. E.; BAYLIN, S.: DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. In: *Nature genetics* 25.3 (2000), S. 269–277.
- [133] SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74.12 (1977), S. 5463–5467.
- [134] SANTI, D. V.; GARRETT, C. E.; BARR, P.: On the mechanism of inhibition of DNA-cytosine methyltransferases by cytosine analogs. In: *Cell* 33.1 (1983), S. 9–10.

- [135] SANTOPIETRO, R.; SHABALOVA, I.; PETROVICHEV, N.; KOZACHENKO, V.; ZAKHAROVA, T.; PAJANIDI, J.; PODISTOV, J.; CHEMERIS, G.; SOZAEVA, L.; LIPOVA, E. et al.: Cell cycle regulators p105, p107, Rb2/p130, E2F4, p21CIP1/WAF1, cyclin A in predicting cervical intraepithelial neoplasia, high-risk human papillomavirus infections and their outcome in women screened in three new independent states of the former Soviet Union. In: *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 15.7 (2006), S. 1250–1256.
- [136] SARTOR, M. A.; DOLINOY, D. C.; JONES, T. R.; COLACINO, J. A.; PRINCE, M. E.; CAREY, T. E.; ROZEK, L. S.: Genome-wide methylation and expression differences in HPV (+) and HPV (-) squamous cell carcinoma cell lines are consistent with divergent mechanisms of carcinogenesis. In: *Epigenetics* 6.6 (2011), S. 777–787.
- [137] SCHEURER, M.; TORTOLERO-LUNA, G.; ADLER-STORTHZ, K.: Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. In: *International Journal of Gynecological Cancer* 15.5 (2005), S. 727–746.
- [138] SCHIFFMAN, M.; WENTZENSEN, N.; WACHOLDER, S.; KINNEY, W.; GAGE, J. C.; CASTLE, P.: Human papillomavirus testing in the prevention of cervical cancer. In: *Journal of the National Cancer Institute* 103.5 (2011), S. 368–383.
- [139] SCHÜNKE, M.; SCHULTE, E.; SCHUMACHER, U.; VOLL, M.; WESKER, K.: Prometheus - Lernatlas der Anatomie: Hals und innere Organe. In: Thieme, Stuttgart (2005), S. 36.
- [140] SHAW, R. J.; LILOGLOU, T.; ROGERS, S. N.; BROWN, J. S.; VAUGHAN, E. D.; LOWE, D.; FIELD, J. K.; RISK, J.: Promoter methylation of P16, RAR β , E-cadherin, cyclin A1 and cytoglobin in oral cancer: quantitative evaluation using pyrosequencing. In: *British journal of cancer* 94.4 (2006), S. 561–568.
- [141] SHENDURE, J.; JI, H.: Next-generation DNA sequencing. In: *Nat Biotech* 26.10 (2008), S. 1135–1145.
- [142] SONG, J.; TEPLOVA, M.; ISHIBE-MURAKAMI, S.; PATEL, D.: Structure-based mechanistic insights into DNMT1-mediated maintenance DNA methylation. In: *Science* 335.6069 (2012), S. 709–712.
- [143] STADLER, M. E.; PATEL, M. R.; COUCH, M. E.; HAYES, D.: Molecular biology of head and neck cancer: risks and pathways. In: *Hematology/oncology clinics of North America* 22.6 (2008), S. 1099–1124.
- [144] SUBRAMANIAM, D.; THOMBRE, R.; DHAR, A.; ANANT, S.: DNA methyltransferases: a novel target for prevention and therapy. In: *Front Oncol* 4.80 (2014), S. 10–3389.
- [145] SUSAN, J.; HARRISON, J.; PAUL, C. L.; FROMMER, M.: High sensitivity mapping of methylated cytosines. In: *Nucleic Acids Research* 22.15 (1994), S. 2990–2997.

- [146] TAIOLI, E.; RAGIN, C.; WANG, X.-h.; CHEN, J.; LANGEVIN, S. M.; BROWN, A. R.; GOLLIN, S. M.; GARTE, S.; SOBOL, R.: Recurrence in oral and pharyngeal cancer is associated with quantitative MGMT promoter methylation. In: *BMC cancer* 9.1 (2009), S. 1.
- [147] TAKAI, D.; JONES, P.: Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99.6 (2002), S. 3740–3745.
- [148] TERMINE, N.; PANZARELLA, V.; FALASCHINI, S.; RUSSO, A.; MATRANGA, D.; LO MUZIO, L.; CAMPISI, G.: HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and neck squamous cell carcinoma biopsies: a meta-analysis (1988-2007). In: *Annals of Oncology* (2008), S. 1681–1690.
- [149] TOKUMARU, Y.; YAMASHITA, K.; OSADA, M.; NOMOTO, S.; SUN, D.-I.; XIAO, Y.; HOQUE, M. O.; WESTRA, W. H.; CALIFANO, J. A.; SIDRANSKY, D.: Inverse correlation between cyclin A1 hypermethylation and p53 mutation in head and neck cancer identified by reversal of epigenetic silencing. In: *Cancer Research* 64.17 (2004), S. 5982–5987.
- [150] TOMARI, Y.; ZAMORE, P.: Perspective: machines for RNAi. In: *Genes & Development* 19.5 (2005), S. 517–529.
- [151] VERTINO, P. M.; YEN, R.; GAO, J.; BAYLIN, S.: De novo methylation of CpG island sequences in human fibroblasts overexpressing DNA (cytosine-5-)-methyltransferase.. In: *Molecular and Cellular Biology* 16.8 (1996), S. 4555–4565.
- [152] VISWANATHAN, M.; TSUCHIDA, N.; SHANMUGAM, G.: Promoter hypermethylation profile of tumor-associated genes p16, p15, hMLH1, MGMT and E-cadherin in oral squamous cell carcinoma. In: *International Journal of Cancer* 105.1 (2003), S. 41–46.
- [153] VOKES, E. E.; WEICHELBAUM, R. R.; LIPPMAN, S. M.; HONG, W.: Head and neck cancer. In: *New England Journal of Medicine* 328.3 (1993), S. 184–194.
- [154] VU, H. L.; SIKORA, A. G.; FU, S.; KAO, J.: HPV-induced oropharyngeal cancer, immune response and response to therapy. In: *Cancer letters* 288.2 (2010), S. 149–155.
- [155] WANG-JOHANNING, F.; LU, D. W.; WANG, Y.; JOHNSON, M. R.; JOHANNING, G.: Quantitation of human papillomavirus 16 E6 and E7 DNA and RNA in residual material from ThinPrep Papanicolaou tests using real-time polymerase chain reaction analysis. In: *Cancer* 94.8 (2002), S. 2199–2210.
- [156] WEINBERGER, P. M.; YU, Z.; HAFFTY, B. G.; KOWALSKI, D.; HARIGOPAL, M.; BRANDSMA, J.; SASAKI, C.; JOE, J.; CAMP, R. L.; RIMM, D. L.; PSYRRI, A.: Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus-associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis. In: *Journal of Clinical Oncology* 24.5 (2006), S. 736–747.

- [157] WEINSTEIN, G. S.; QUON, H.; O'MALLEY, B. W.; KIM, G. G.; COHEN, M.: Selective neck dissection and deintensified postoperative radiation and chemotherapy for oropharyngeal cancer: a subset analysis of the University of Pennsylvania transoral robotic surgery trial. In: *The Laryngoscope* 120.9 (2010), S. 1749–1755.
- [158] WEISS, D.; BASEL, T.; SACHSE, F.; BRAEUNINGER, A.; RUDACK, C.: Promoter methylation of cyclin A1 is associated with human papillomavirus 16 induced head and neck squamous cell carcinoma independently of p53 mutation. In: *Molecular Carcinogenesis* 50.9 (2011), S. 680–688.
- [159] WEISS, D.; KOOPMANN, M.; BASEL, T.; RUDACK, C.: Cyclin A1 shows age-related expression in benign tonsils, HPV16-dependent overexpression in HNSCC and predicts lower recurrence rate in HNSCC independently of HPV16. In: *BMC Cancer* 12.1 (2012), S. 1–10.
- [160] WEISS, D.; KOOPMANN, M.; RUDACK, C.: Prevalence and impact on clinicopathological characteristics of human papillomavirus-16 DNA in cervical lymph node metastases of head and neck squamous cell carcinoma. In: *Head & neck* 33.6 (2011), S. 856–862.
- [161] WENTZENSEN, N.; VINOKUROVA, S.; VON KNEBEL DOEBERITZ, M.: Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. In: *Cancer research* 64.11 (2004), S. 3878–3884.
- [162] WERNESS, B.; LEVINE, A.; HOWLEY, P.: Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. In: *Science* 248.4951 (1990), S. 76–79.
- [163] WESTRA, W.: Detection of human papillomavirus (HPV) in clinical samples: evolving methods and strategies for the accurate determination of HPV status of head and neck carcinomas. In: *Oral oncology* 50.9 (2014), S. 771–779.
- [164] WITTEKIND, C (HRSG.): TNM Klassifikation maligner Tumoren. In: Wiley-VCH, Weinheim (2017). Hrsg. von WITTEKIND, C., S. 32–44.
- [165] WITTEKINDT, C.; WAGNER, S.; KLUSSMANN, J.: Humane Papillomaviren bei Kopf-Hals-Karzinomen. In: *Hno* 59.9 (2011), S. 885–892.
- [166] WU, J.; ISSA, J. P.; HERMAN, J.; BASSETT, D. E.; NELKIN, B. D.; BAYLIN, S. B.: Expression of an exogenous eukaryotic DNA methyltransferase gene induces transformation of NIH 3T3 cells.. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90.19 (1993), S. 8891–8895.
- [167] XU, X.-L.; YU, J.; ZHANG, H.-Y.; SUN, M.-H.; GU, J.; DU, X.; SHI, D.-R.; WANG, P.; YANG, Z.-H.; ZHU, J.-D.: Methylation profile of the promoter CpG islands of 31 genes that may contribute to colorectal carcinogenesis.. In: *World journal of gastroenterology: WJG* 10.23 (2004), S. 3441–3454.

- [168] YANATATSANEEJIT, P.; MUTIRANGURA, A.; KITKUMTHORN, N.: Human papillomavirus's physical state and cyclin A1 promoter methylation in cervical cancer. In: *International Journal of Gynecological Cancer* 21.5 (2011), S. 902–906.
- [169] YANG, B.; MIAO, S.; ZHANG, L.-N.; SUN, H.-B.; XU, Z.-N.; HAN, C.-S.: Correlation of CCNA1 Promoter Methylation with Malignant Tumors: A Meta-Analysis Introduction. In: *BioMed Research International* 2015 (2015), S. 12.
- [170] YANG, R.; MULLER, C.; HUYNH, V.; FUNG, Y. K.; YEE, A. S.; KOEFFLER, H.: Functions of cyclin A1 in the cell cycle and its interactions with transcription factor E2F-1 and the Rb family of proteins. In: *Mol. Cell. Biol.* 19.3 (1999), S. 2400–2407.
- [171] YANG, R.; NAKAMAKI, T.; LÜBBERT, M.; SAID, J.; SAKASHITA, A.; FREYALDENHOVEN, B. S.; SPIRA, S.; HUYNH, V.; MÜLLER, C.; KOEFFLER, H.: Cyclin A1 expression in leukemia and normal hematopoietic cells. In: *Blood* 93.6 (1999), S. 2067–2074.
- [172] YEUNG, C.; TSANG, W. P.; TSANG, T. Y.; CO, N. N.; YAU, P.; KWOK, T.: HPV-16 E6 upregulation of DNMT1 through repression of tumor suppressor p53. In: *development* 1 (2010), S. 3.
- [173] YOO, C. B.; JONES, P.: Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. In: *Nat Rev Drug Discov* 5.1 (2006), S. 37–50.
- [174] ZHANG, X.; VERDINE, G.: Mammalian DNA cytosine-5 methyltransferase interacts with p23 protein. In: *FEBS letters* 392.2 (1996), S. 179–183.
- [175] ZUR HAUSEN, H.: Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. In: *Journal of the National Cancer Institute* 92.9 (2000), S. 690–698.

6 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
bp	Basenpaare
C	Cytosin
cDNA	<i>complementary DNA</i> (engl.) komplementäre DNA (deutsch)
CpG-Inseln	Cytosin-phosphatidyl-Guanin-Inseln
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
ddNTP	Didesoxyribonukleosid-Triphosphat
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
ds	<i>doublestranded</i> (engl.) doppelsträngig (deutsch)
E1-7 Protein	<i>early 1-7 protein</i> (engl.) frühes Protein 1-7 (deutsch)
EmGFP	<i>Emerald Green Fluorescent Protein</i> (engl.) Emerald grün fluoreszierendes Protein (deutsch)
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> (engl.) Fetales Kälber Serum (deutsch)
G	Guanin
GAPDH	<i>Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase</i>
h	<i>hour</i> (engl.) Stunde (deutsch)
HOK	Humane Orale Keratinozyten
HPV	Humane Papillomaviren
L	Liter
L1 Protein, L2	<i>late 1 protein</i> (engl.) spätes Protein 1 (deutsch)
M	mol/l
MA	Massachusetts
μmol	mikromol
miRNA	microRNA
mRNA	<i>messenger RNA</i> (engl.) Boten-RNA (deutsch)
neg.	negativ
negKo	Negativkontrolle
nm	Nanometer

OKM	Orales Keratinozytenmedium
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (engl.) phosphatgepufferte Kochsalzlösung (deutsch)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (engl.) Polymerase-Kettenreaktion (deutsch)
pos.	positiv
posKo	Positivkontrolle
RNA	Ribonukleinsäure
sek	Sekunde
U/min	Umdrehungen pro Minute
QMSP	<i>Quantitative Methylation Specific PCR</i> (engl.) Quantitative Methylierungsspezifische PCR (deutsch)
T	Thymin
UNG	Uracil-N-Glycosylase
Z	Zellen

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Pharynx im Mediansagittalschnitt	2
Abb. 2	Schema zur <i>high-risk</i> HPV vermittelten Pathogenese	13
Abb. 3	DNA-Methylierung und Karzinome	14
Abb. 4	Karzinomentstehung durch HPV und durch Noxen	16
Abb. 5	Katalysemechanismus und Struktur der DNA (Cytosin-5)-Methyltransferase	18
Abb. 6	Schema der Bisulfit-Reaktion	28
Abb. 7	Mechanismus der TaqMan-Sonden	32
Abb. 8	Karte der pcDNA TM 6.2-GW/EmGFP-miR	48
Abb. 9	Auszug aus dem Chromatogramm der Sequenzierung von E7	48
Abb. 10	Auszug aus dem Chromatogramm der Sequenzierung von LacZ	48

8 Tabellenverzeichnis

Tab. 1	TNM-Klassifikation von HPV (p16) positiven Karzinomen im Oropharynx (klinisch und pathologisch)	5
Tab. 2	UICC Stadium von HPV (p16) positiven Karzinomen im Oropharynx (pathologisch und klinisch)	6
Tab. 3	TNM-Klassifikation von HPV (p16) negativen Karzinomen im Oropharynx	6
Tab. 4	UICC Stadium von HPV (p16) negativen Karzinomen im Oropharynx (pathologisch und klinisch)	7
Tab. 5	Funktionen der Proteine von HPV	10
Tab. 6	Gegenüberstellung der Veränderungen von HPV positiven und negativen Karzinomen	17
Tab. 7	<i>Thermocycling</i> bei der Bisulfit-Behandlung der DNA	29
Tab. 8	Zusammensetzung des Mastermixes	33
Tab. 9	<i>Thermocycling</i> der PCR von E6/E7	33
Tab. 10	<i>Thermocycling</i> der PCR zur Bestimmung der Promotormethylierung von <i>Cyclin A1</i>	34
Tab. 11	<i>Thermocycling</i> der PCR zur Expression von <i>Cyclin A1</i> und <i>GAPDH</i>	35
Tab. 12	<i>Thermocycling</i> bei der PCR der DNMT	35
Tab. 13	Basensequenzen der einzelsträngigen Oligonukleotide von E6 und E7	37
Tab. 14	Ansatz des Mastermixes für die Ampli Taq-PCR zur Sequenzierung der miRNA	41
Tab. 15	Einstellungen des <i>Thermocycling</i> der Ampli-Taq PCR zur Sequenzierung	41
Tab. 16	Mastermix-Ansatz für die Sequenzierung	41
Tab. 17	Einstellungen des <i>Thermocycling</i> der Sequenzierung der miRNA	41
Tab. 18	Spektrophotometrie-Ergebnisse der Plasmid-DNA	43
Tab. 19	Ergebnisse der HPV16 E6/E7 DNA <i>Real-time</i> -PCR in HOK, immortalisierten HOK und CaSki Zellen (jeweils Doppelbestimmung)	43
Tab. 20	<i>Real-time</i> Reverse-Transkriptase-PCR zur Bestimmung der Expression von <i>Cyclin A1</i> in HOK und immortalisierten HOK (jeweils Mehrfachbestimmungen)	44
Tab. 21	<i>Real-time</i> Reverse-Transkriptase-PCR zur Bestimmung der Expression von <i>GAPDH</i> in HOK und immortalisierten HOK (jeweils Mehrfachbestimmungen)	44
Tab. 22	C_t -Mittelwerte und ΔC_t - Werte der <i>Real-time</i> Reverse-Transkriptase-PCR für die Bestimmung der relativen Genexpression von <i>Cyclin A1</i> bei HPV16 positiven HOK und HOK	45
Tab. 23	<i>Real-time</i> Reverse-Transkriptase-PCR zur Bestimmung der Expression der DNMT in HOK und immortalisierten HOK (jeweils Mehrfachbestimmung)	45

Tab. 24	C_t -Mittelwerte und ΔC_t - Werte der <i>Real-time</i> Reverse-Transkriptase-PCR für die Bestimmung der relativen Genexpression von DNMT1 in HPV16 positiven HOK und HOK	46
Tab. 25	C_t -Mittelwerte und ΔC_t - Werte der <i>Real-time</i> Reverse-Transkriptase-PCR für die Bestimmung der relativen Genexpression von DNMT3a in HPV16 positiven HOK und HOK	46
Tab. 26	C_t -Mittelwerte und ΔC_t - Werte der <i>Real-time</i> Reverse-Transkriptase-PCR für die Bestimmung der relativen Genexpression von DNMT3b in HPV16 positiven HOK und HOK	47

