

Aus dem Bereich Innere Medizin I  
Klinische Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Charakterisierung einer stromalen Nische  
in Geweben, die für eine transformierende  
Infektion mit dem Humanen Papillomvirus  
empfänglich sind**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
der Medizinischen Fakultät der

UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2021

vorgelegt von

**Julia Katrin Vicari**  
**(geb. Treitz)**

geb. am 10.08.1992 in Wadern

Die experimentellen Arbeiten im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Sigrun Smola am Institut für Virologie am Universitätsklinikum des Saarlandes in Homburg/Saar durchgeführt.

Tag der Promotion: 14. Dezember 2021  
Dekan: Prof. Dr. Michael Menger  
Erstberichterstatter: Prof. Dr. Klaus Römer  
Zweitberichterstatter: Prof. Dr. Sigrun Smola

Für meine Eltern.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>8</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>10</b>
<b>Abkürzungen .....</b>	<b>11</b>
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>15</b>
<b>Summary .....</b>	<b>16</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>17</b>
1.1 Das humane Papillomvirus.....	17
1.2 Lebenszyklus des HPV und virale Gene .....	18
1.3 HPV-induzierte Krankheiten.....	20
1.3.1 Das Zervixkarzinom.....	21
1.3.2 Kopf-Hals-Karzinom (HNSCC) .....	24
1.4 Aufbau des Gebärmutterhalses und der Gaumenmandel.....	25
1.4.1 Die zervikale Transformationszone .....	26
1.4.2 Die tonsilläre Krypte.....	27
1.5 Beteiligung von definierten Nischen an der Homöostase von Stammzellen und Unterstützung der klonalen Kapazität von Tumorstammzellen .....	28
1.5.1 Krebs-assoziierte Fibroblasten .....	30
1.6 Bedeutende Signalwege in der Karzinogenese der Zervix und des Kopf-Hals-Bereiches.....	33
1.6.1 Der STAT3-Signalweg.....	33
1.6.2 Die IL-6-Rezeptoruntereinheit gp80 und <i>Trans-Signaling</i> .....	35
1.7 Ziel der Arbeit.....	36
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>38</b>
2.1 Zellkultur .....	38
2.1.1 Eukaryotische Zelllinien.....	38
2.1.2 Primäre Zellen und Gewebe .....	39
2.1.3 Zellkulturmedien und Reagenzien .....	39
2.1.4 Antikörper.....	42

---

2.1.4.1	Western Blot .....	42
2.1.4.2	Immunhistochemie und Immunfluoreszenz.....	42
2.1.5	Oligonukleotide.....	44
2.1.6	Standards zur Quantifizierung der qRT-PCR .....	44
2.1.7	Reagenziensysteme .....	45
2.1.7.1	Western Blot .....	45
2.1.7.2	Immunzytochemie .....	45
2.1.7.3	Immunfluoreszenz .....	45
2.1.7.4	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA) .....	45
2.1.7.5	RNA-Isolation .....	45
2.1.7.6	cDNA-Synthese.....	46
2.1.7.7	qRT-PCR.....	46
2.1.7.8	cDNA-Synthese aus miRNA.....	46
2.1.7.9	miR-qRT-PCR.....	46
2.1.8	Chemikalien .....	46
2.1.9	Puffer und Lösungen .....	48
2.1.10	Molekulargewichtsmarker .....	52
2.1.10.1	Pierce™ Prestained Protein MW Marker .....	52
2.1.11	Laborgeräte.....	52
2.1.12	Gebrauchsmaterialien .....	53
2.1.13	Software .....	53
2.2	Methoden .....	55
2.2.1	Zellkultur .....	55
2.2.1.1	Kultivierung von Zelllinien .....	55
2.2.1.2	Isolierung und Kultivierung primärer Zellen .....	55
2.2.1.3	Einfrieren von Zellen .....	55
2.2.1.4	Bestimmung der Zellzahl.....	56
2.2.1.5	Herstellung der HPV18-positiven NIKS .....	56
2.2.1.6	Herstellung von <i>Feeder</i> Zellen für die Kultivierung von NIKS-Zellen.....	56
2.2.1.7	Partielle Trypsinierung von NIKS auf <i>Feedern</i> .....	57
2.2.1.8	Kollagenherstellung für organotypische 3D-Kulturen.....	57
2.2.1.9	Herstellung organotypischer 3D-Kulturen.....	58
2.2.1.10	Isolation von Protein- und RNA-Extrakten aus organotypischen 3D-Kulturen...59	
2.2.2	Histologische Analyse von Gewebe und organotypischen 3D-Kulturen .....	59

2.2.3	Analyse von Proteinen .....	60
2.2.3.1	Herstellung von Ganzzellextrakten.....	60
2.2.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	60
2.2.3.3	SDS-PAGE .....	61
2.2.3.4	Western Blot .....	61
2.2.3.5	Immunhistochemische Färbung.....	62
2.2.3.6	ELISA.....	64
2.2.4	Analyse von RNA .....	64
2.2.4.1	Isolation von Gesamt-RNA .....	64
2.2.4.2	RNA-Quantifizierung .....	64
2.2.4.3	cDNA-Synthese.....	64
2.2.4.4	cDNA-Synthese mittels TaqMan Assay .....	65
2.2.4.5	Quantitative <i>Real Time</i> PCR (qRT-PCR) .....	65
2.2.5	Statistische Analyse.....	67
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>68</b>
3.1	Charakterisierung von zervikalen Transformationszonen-Fibroblasten .....	68
3.1.1	Expression des IL-6-Rezeptors gp80 im Zervixgewebe .....	68
3.1.2	In Gegenwart von Transformationszonen-Fibroblasten wird vermehrt lösliches sgp80 gebildet.....	69
3.1.3	Erhöhte Expression der Metalloprotease ADAM17 in Transformationszonen-Fibroblasten .....	71
3.1.4	Aktivierung von pTyr705-STAT3 in Transformationszonen-Fibroblasten gleicht dem Verhalten von CAFs .....	72
3.1.5	Expression des CAF-assoziierten Markers $\alpha$ -SMA in Transformationszonen-Fibroblasten .....	74
3.1.6	Das Expressionsmuster von ADAM17 entspricht der Expression <i>in vivo</i> .....	76
3.1.7	In Gegenwart von gerichtet angeordneten Transformationszonen-Fibroblasten kommt es korrelierend zum Verhalten von CAFs zum verstärkten Invasionsverhalten von Keratinozyten und einer diskontinuierlichen Basalmembran .....	78
3.1.8	Transformationszonen-Fibroblasten fördern Invasion, Expression und Freisetzung von Metalloproteasen sowie eine verstärkte Kollagen-Kontraktion.....	80

3.1.9	Regulation von <i>Twist1</i> in Transformationszonen-Fibroblasten aus 3D-Kulturen mit NKS-18 .....	82
3.1.10	Regulation der miR-375-Expression in Transformationszonen-Fibroblasten .....	83
3.2	Charakterisierung und Vergleich spezifischer Nischen in der Zervix und der tonsillären Krypte .....	84
3.2.1	Die zervikale Nische ist durch die Expression von Lgr6 und p63 charakterisiert.....	84
3.2.2	Die tonsilläre Nische weist dieselben Charakteristika der zervikalen Nische auf .....	86
3.2.3	Die Präsenz von subepithelialen CD79a <sup>+</sup> -Lgr6 <sup>+</sup> -Zellen charakterisiert die HPV-suszeptible Nische in Zervix und Tonsille .....	87
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>91</b>
4.1	ADAM-Metalloprotease-vermitteltes <i>Shedding</i> des löslichen IL-6-Rezeptors sgp80 in Transformationszonen-Fibroblasten.....	92
4.2	pSTAT3-Aktivierung und Expression des CAF-assoziierten Markers $\alpha$ -SMA in Transformationszonen-Fibroblasten.....	96
4.3	Anisotrop gerichtete Transformationszonen-Fibroblasten fördern die Expression von Metalloproteasen sowie die Invasion .....	100
4.4	Veränderte Expression der miR-375 in Transformationszonen-Fibroblasten und Bedeutung für den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg.....	106
4.5	Subepitheliale CD79a <sup>+</sup> -Lgr6 <sup>+</sup> -Zellen charakterisieren die HPV-suszeptible Nische in Tonsille und Zervix.....	110
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>113</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>137</b>
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>139</b>
	<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>140</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau des zervikalen Epithels .....	18
Abbildung 2: Progression einer Neoplasie zum Zervixkarzinom .....	22
Abbildung 3: Vergleich der zervikalen Transformationszone und der tonsillären Krypte .....	25
Abbildung 4: Komplexer Aufbau der Tumornische und Vorkommen von Krebs-assoziierten Fibroblasten.....	31
Abbildung 5: Pierce™ Prestained Protein MW Marker .....	52
Abbildung 6: Expression der IL-6-Rezeptoruntereinheit gp80 <i>in vivo</i> .....	68
Abbildung 7: Die Gegenwart von Transformationszonen-Fibroblasten führt zur Bildung von sgp80.....	70
Abbildung 8: Expression von ADAM17 in organotypischen 3D-Kulturen nimmt in Gegenwart von Transformationszonen-Fibroblasten zu.....	71
Abbildung 9: Aktivierung des Transkriptionsfaktors pSTAT3 in den Transformationszonen-Fibroblasten.....	73
Abbildung 10: Induktion des CAF-Markers $\alpha$ -SMA in Transformationszonen-Fibroblasten.....	75
Abbildung 11: Zunahme der ADAM17-Expression von <i>in vivo</i> .....	78
Abbildung 12: Transformationszonen-Fibroblasten ordnen sich im organotypischen 3D-Kulturmodell gerichtet an und führen zu einer veränderten Struktur der Basalmembran.....	79
Abbildung 13: Transformationszonen-Fibroblasten fördern Invasion, ADAM17 Expression, MMP-9-Freisetzung und Kollagen-Kontraktion.....	81
Abbildung 14: Erhöhte Expression von <i>Twist1</i> -mRNA in Transformationszonen- Fibroblasten aus NIKS-18 3D-Kulturen .....	82
Abbildung 15: Suppression der miR-375 in Transformationszonen-Fibroblasten .....	83
Abbildung 16: Expression von Lgr6 und p63 charakterisiert die zervikale Nische .....	85
Abbildung 17: Die zervikale und Krypten-Nische ähneln sich in Morphologie und	

---

Expression charakteristischer Marker .....	87
Abbildung 18: Subepitheliale CD79a <sup>+</sup> -Lgr6 <sup>+</sup> -Zellen charakterisieren die HPV-suszeptible Nische in Zervix und Tonsille.....	89
Abbildung 19: Graphische Zusammenfassung der an der zervikalen und tonsillären Nische beteiligten Faktoren und Signalwege.....	109
Abbildung 20: Graphische Darstellung der HPV-suszeptiblen Nischen in Zervix und Tonsille.....	112

---

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primärantikörper für Western Blot .....	42
Tabelle 2: Sekundärantikörper für Western Blot.....	42
Tabelle 3: Primärantikörper für Immunhistochemie und -fluoreszenz .....	43
Tabelle 4: Sekundärantikörper für Immunfluoreszenz.....	43
Tabelle 5: Zur qRT-PCR verwendete Oligonukleotide, Sonden und MgCl <sub>2</sub> Konzentrationen.....	44
Tabelle 6: Standards zur Quantifizierung von qRT-PCRs .....	44
Tabelle 7: Inkubationszeiten des <i>ImmPACT™DAB Substrate Kit</i> in der immunhistochemischen Färbung .....	63
Tabelle 8: Inkubationszeiten des <i>ImmPRESS®-AP Substrate Kit</i> in der immunhistochemischen Färbung .....	63
Tabelle 9: Reagenzien und Konzentrationen zur Herstellung eines qRT-PCR-Mastermixes.....	66
Tabelle 10: Thermocycler-Konditionen zur qRT-PCR-Analyse.....	66
Tabelle 11: Thermocycler-Konditionen zur qRT-PCR-Analyse von miRNAs .....	67
Tabelle 12: Statistische Analyse der <i>LGR</i> -Genexpression in zytologischen Abstrichen der Zervix .....	86

## Abkürzungen

A	Adenin
ADAM	<i>A disintegrin and metalloproteinase</i>
ALDH1A1	<i>Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ARG2	Arginase, Typ II
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Cytosin
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CAF	<i>Cancer-associated fibroblast</i>
C/EBP $\beta$	<i>CCAAT/enhancer binding protein <math>\beta</math></i>
CCL	<i>Chemokine (C-C motif) ligand</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CIN	<i>Cervical intraepithelial lesion</i>
CSC	<i>Cancer stem cell</i>
CXCL	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ECM	<i>Extracellular matrix</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

---

EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
Ex	Exozervikal
Exo	Exozervikal
FAP	<i>Fibroblast activation protein alpha</i>
FFPE	<i>Formalin-fixed paraffin-embedded</i>
FKS	Fötales Kälberserum
G	Guanin
GDA	<i>Guanine deaminase</i>
gp80	Glykoprotein 80
HFSC	<i>Hair follicle stem cell</i>
HNSCC	<i>Head and neck squamous cell carcinoma</i>
HPV	Humanes Papillomvirus
HR-HPV	<i>High-risk HPV</i>
HSIL	<i>High-grade squamous intraepithelial lesion</i>
ICC	<i>Invasive cervical carcinoma</i>
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
kb	Kilobasen
kDa	Kilo Dalton
Krt7	Keratin 7
LCR	<i>Long control region</i>
Lgr	<i>Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor</i>
LSIL	<i>Low-grade squamous intraepithelial lesion</i>
LRR	<i>Leucine-rich repeat</i>
M	Molar

---

MCM	<i>Minichromosome Maintenance Protein Complex</i>
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMP	Matrixmetalloprotease
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NF $\kappa$ B	<i>Nuclear factor <math>\kappa</math>B</i>
NGFR	<i>Nerve growth factor receptor</i>
NILM	<i>Negative for intraepithelial lesions or malignancy</i>
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
OPSCC	<i>Oropharyngeal squamous cell carcinoma</i>
ORF	<i>Open reading frame</i>
OSM	<i>Oncostatin M</i>
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	Potentia hydrogenii
pRb	Retinoblastoma Protein
Pro	Prolin
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RT	Reverse Transkription
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
SCC	<i>Squamous cell carcinoma</i>
SCJ	<i>Squamocolumnar junction</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
sgp80	<i>Soluble gp80</i>

---

siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
STIKO	Ständige Impfkommission
T	Thymin
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TE	Tris-EDTA
TEMED	<i>Tetramethylethylenediamine</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor <math>\beta</math></i>
TZ	Transformationszone
UPL	<i>Universal Probe Library</i>
UTR	<i>Untranslated Region</i>
UV	Ultraviolett
Val	Valin
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VLP	<i>Virus like particle</i>
WHO	<i>World health organization</i>
YAP1	<i>Yes-associated protein 1</i>
°C	Grad Celsius
%	Prozent
$\mu$ L	Mikroliter

## Zusammenfassung

Die zervikale Transformationszone (TZ) steht als besondere zervikale Region in Bezug auf das Vorkommen spezialisierter Zellen sowie einer Suszeptibilität für transformierende HPV-Infektionen bereits seit längerer Zeit im Fokus der Forschung (Herfs *et al.*, 2012; Lopez, 2013; Chumduri *et al.*, 2021). Auch der tonsillären Krypte wird aufgrund ihrer ähnlichen Morphologie und der Assoziation mit HPV-Infektionen vermehrt Aufmerksamkeit geschenkt (Kang *et al.*, 2015; Rieth *et al.*, 2018). Sowohl in der Zervix als auch in der Tonsille zeigte sich, dass auch die lokale Mikroumgebung maßgeblich am epithelialen Schicksal beteiligt ist (Wu *et al.*, 2018; Chumduri *et al.*, 2021). In der vorliegenden Dissertation wurden zur Charakterisierung einer spezifischen Nische zervikale TZ-Fibroblasten detailliert analysiert sowie eine gemeinsame Nische in Tonsille und Zervix beschrieben.

In Gegenwart von TZ-Fibroblasten kam es zur Freisetzung der löslichen IL-6R $\alpha$  Untereinheit sgp80. Zur Untersuchung des löslichen Faktors kam das organotypische 3D-Kulturmodell zum Einsatz, welches eine einzigartige Trennung und Analyse verschiedener Kompartimente erlaubte. Damit einhergehend war die Expression der *Shedding*-Metalloprotease ADAM17 in TZ-Fibroblasten in 3D-Kulturen gegenüber exozervikalen Fibroblasten erhöht. In Folge der verstärkten sgp80-Freisetzung kam es in den TZ-Fibroblasten auch zu einer verstärkten pTyr705-STAT3-Aktivierung. Dieser Phänotyp ist auch in Krebs-assoziierten Fibroblasten (CAF) zu beobachten (Bastuck, 2016). Auch der Myofibroblastenmarker  $\alpha$ -SMA, welcher als CAF-Marker dient, war in den TZ-, im Gegensatz zu exozervikalen Fibroblasten, deutlich induziert, wobei die Expression in Gegenwart von HPV18-positiven Keratinozyten weiter stieg. Damit einhergehend wurden auch funktionelle Effekte in 3D-Kulturen beobachtet, wie eine geordnete Ausrichtung der Fibroblasten, Veränderungen der Basalmembran sowie verstärkte Invasion, MMP-9-Freisetzung und eine für CAFs typische, verstärkte Kollagen-Kontraktion. Letztlich wurde auch eine deutliche Herabregulation der miR-375 in den TZ-Fibroblasten beobachtet, welche möglicherweise ursächlich für den besonderen Phänotyp der TZ-Fibroblasten sein könnte und weiter untersucht werden sollte.

Neben der Analyse der TZ-Fibroblasten konnte auch eine spezifische Lgr6<sup>+</sup>-CD79a<sup>+</sup>-B-Zell-Subpopulation in Tonsille und zervikaler TZ beschrieben werden, die eine gemeinsame, spezifische Nische in beiden Geweben charakterisiert.

## Summary

The cervical transformation zone (TZ) has been a focus of research for many years with special regard to the presence of specialized cells and its susceptibility for transforming HPV infections (Herfs *et al.*, 2012; Lopez, 2013; Chumduri *et al.*, 2021). Due to its similar morphology and association with HPV infections, the palatine tonsil has recently gained more attention as well (Kang *et al.*, 2015; Rieth *et al.*, 2018). In both the uterine cervix and the palatine tonsil, evidence for the prevailing influence of the stromal microenvironment on the epithelial fate is growing (Wu *et al.*, 2018; Chumduri *et al.*, 2021). In this study, cervical transformation zone fibroblasts were intensely analyzed to characterize a cervical niche and compare both cervical and tonsillar microenvironments.

In the presence of transformation zone fibroblasts, the soluble IL-6R $\alpha$  subunit sgp80 was shed. The use of organotypic 3D cultures provided a unique tool to study the release of the soluble factor in a setting mimicking the *in vivo* situation and allowing for the separation and analysis of the distinct compartments. The release of sgp80 was accompanied by an increased expression of the shedding metalloprotease ADAM17 in transformation zone fibroblasts in contrast to exocervical fibroblasts. As a result of the sgp80 release, the transcription factor pTyr705-STAT3 was activated in transformation zone fibroblasts, a phenotype which was previously observed in cancer-associated fibroblasts (CAF) (Bastuck, 2016). In addition, the myofibroblast marker  $\alpha$ -SMA, which is also used as a CAF specific marker, was markedly induced in transformation zone fibroblasts with further increase of expression under the influence of HPV18 positive keratinocytes. The specific phenotype of transformation zone fibroblasts was accompanied by functional effects such as vertical fibroblast alignment, altered structure of the basement membrane and increased invasiveness in organotypic 3D cultures as well as MMP-9 release and increased collagen-gel contraction characteristic for CAFs. Finally, transformation zone fibroblasts showed a significantly reduced expression of miR-375 which might be causally involved in the specific phenotype and should be subjected to further analysis.

In addition to the detailed analysis of transformation zone fibroblasts, a specific niche environment present in both palatine tonsil and uterine cervix containing a specialized Lgr6<sup>+</sup>/CD79a<sup>+</sup> B cell subpopulation was characterized.

# 1 Einleitung

## 1.1 Das humane Papillomvirus

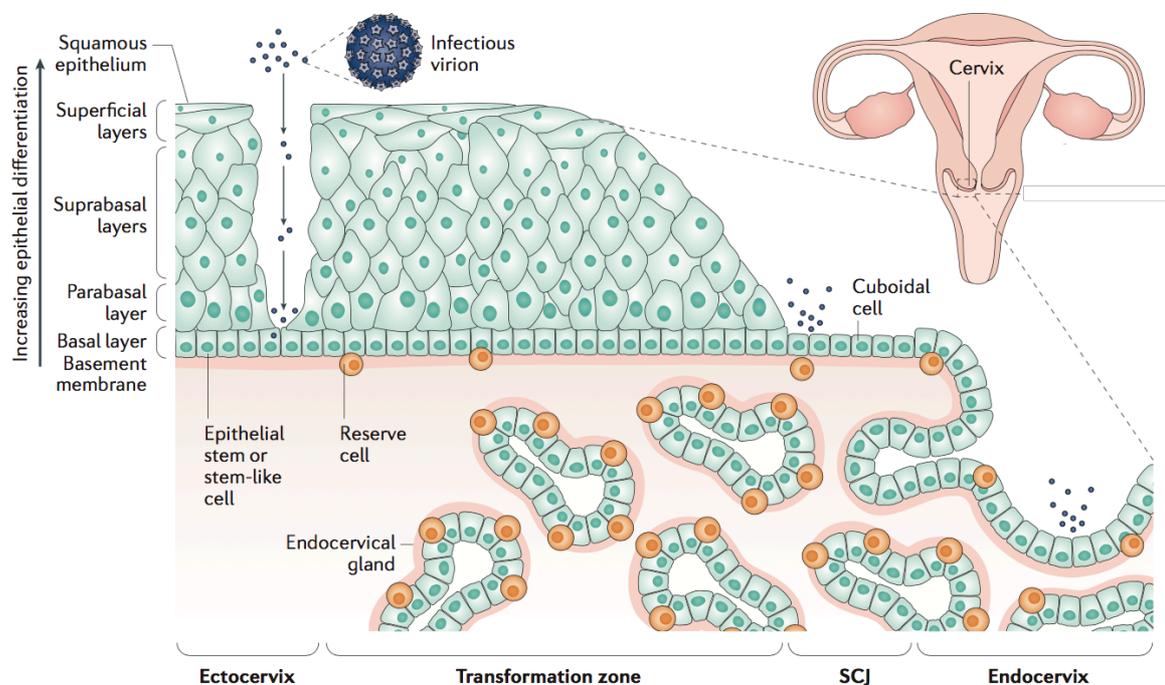
Das humane Papillomvirus (HPV) ist ein unbehülltes DNA-Virus, dessen Genom als doppelsträngiges Episom vorliegt. Das virale Genom von etwa 8000 bp Länge liegt in einem ikosaedrischen Kapsid eines Durchmessers von 50 bis 60 nm vor. Bisher sind insgesamt mehr als 200 Papillomvirus-Typen bekannt, wovon mehr als 150 human-spezifischer Natur sind (NIAID, 2019). Die humanen Papillomviren werden je nach Tropismus und DNA-Sequenzunterschieden in fünf Gattungen eingeteilt, wobei Typen des Genus  $\alpha$  mukosale und kutane Gewebe infizieren können, wohingegen die Genera  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\mu$  und  $\nu$  ausschließlich kutane Gewebe infizieren können (de Villiers *et al.*, 2004; Doorbar *et al.*, 2015).

Die unterschiedlichen HPV-Typen sind jeweils mit verschiedenen Krankheitsbildern assoziiert. Dabei führen kutane HPV-Typen wie HPV2 und HPV7 vor allem zu gutartigen Warzen, während HPV5 und HPV8 mit der autosomal-rezessiven Erkrankung *Epidermodysplasia verruciformis* (EV) in Verbindung stehen (Majewski and Jabłońska, 1995; Patel *et al.*, 2010).

Zudem kann eine Einteilung mukosaler humaner Papillomviren in *low-risk* (LR) und *high-risk* (HR) erfolgen, basierend auf ihrer Fähigkeit die Proliferation von Keratinozyten zu fördern und diese zu immortalisieren (Schlegel *et al.*, 1988; Münger and Howley, 2002; Doorbar *et al.*, 2015). Hierzu tragen vor allem die viralen Onkoproteine E6 und E7 bei, welche sich bei *low-risk* (LR) und *high-risk* (HR) HPV-Typen in ihrer Funktion unterscheiden (Werness, Levine and Howley, 1990; Münger and Howley, 2002; Doorbar *et al.*, 2015). Hierbei führen die LR-Typen des  $\alpha$ -Genus wie HPV6 und HPV11 vorwiegend zu Genitalwarzen (*Condyloma acuminatum*), wohingegen HR-Typen zu schwerwiegenden Krankheiten wie Plattenepithelkarzinomen führen können (Doorbar *et al.*, 2015; Egawa and Doorbar, 2017). Bekannte Vertreter der *high-risk* HPV-Typen sind HPV16 und HPV18, welche gemeinsam für mehr als 70 % der Zervixkarzinome verantwortlich sind (Roden and Wu, 2006).

## 1.2 Lebenszyklus des HPV und virale Gene

Der Lebenszyklus des humanen Papillomvirus ist an das Differenzierungspotential der von ihm infizierten Keratinozyten in einem mehrschichtigen Plattenepithel gebunden (Taichman, Reilly and LaPorta, 1983). Die unterste Schicht des Plattenepithels wird von den über der Basalmembran befindlichen Basalzellen gebildet. Ebenso wie die darüber befindlichen parabasalen Zellen haben Basalzellen eine runde Form sowie ein hohes Nukleus-Zytoplasma-Verhältnis. Die Zellen des Epithels differenzieren distal zu suprabasalen Keratinozyten und schließlich zu den oberflächlich gelegenen, verhornten Zellen.



**Abbildung 1: Aufbau des zervikalen Epithels**

Das Epithel des zervikalen Gewebes unterscheidet sich im Aufbau je nach Lokalisation. An der *Portio vaginalis uteri* befindet sich die Exozervix, die von einem mehrschichtigen, verhornten Plattenepithel bekleidet ist, welches an der *squamocolumnar junction* (SCJ) in das einschichtige Säulenepithel der Endozervix übergeht. Die fortschreitende Differenzierung der Keratinozyten im Plattenepithel ermöglicht eine produktive HPV-Infektion, welche die Freisetzung von infektiösen Virionen zur Folge hat. Als möglicher Infektionsort für HPV gelten basale Keratinozyten oder Reservezellen. Diese können auch für die transformierende Infektion, welche zervikale intraepitheliale Läsionen und Karzinome zur Folge haben kann, von Bedeutung sein. Bei den Zervixkarzinomen unterscheidet man im Allgemeinen Plattenepithelkarzinome, die ihren Ursprung im Bereich der Transformationszone – dem Bereich zwischen Endo- und Exozervix – haben, und solche, die aus Drüsen hervorgehen, den Adenokarzinomen. Auch hier befinden sich subepitheliale Reservezellen. Verändert nach Schiffman *et al.*, 2016.

Die Infektion durch HR-HPV erfolgt in Basalzellen oder Reservezellen in der Zervix an der sogenannten *squamocolumnar junction* (SCJ), an der das mehrschichtige Plattenepithel in ein einschichtiges Säulenepithel übergeht (Herfs *et al.*, 2012; Doorbar and Griffin, 2019). Dabei wird HPV durch endozytische Mechanismen in die in der M-Phase befindliche Wirtszelle aufgenommen (Spoden *et al.*, 2008; Pyeon *et al.*, 2009; Mikuličić and Florin, 2019). Das virale Genom liegt zunächst episomal in der Wirtszelle vor und besteht aus einer regulierenden *long control region* (LCR), den frühen Genen *E1* und *E2*, den akzessorischen frühen Genen *E4* und *E5*, den Onkogenen *E6* und *E7* sowie den späten Genen *L1* und *L2* (Doorbar *et al.*, 2015). Hierbei spielen *E1* und *E2* zunächst eine bedeutende Rolle bei der Genomamplifizierung, wohingegen *L1* als Kapsidprotein das ikosaedrische Kapsid des humanen Papillomvirus bildet (Buck, Day and Trus, 2013).

Generell wird unterschieden zwischen einer produktiven HPV-Infektion, bei der fortdauernd neue Virionen freigesetzt werden, und einer transformierenden Infektion, die langfristig zur Entstehung von Karzinomen beitragen kann.

Nach der anfänglichen Expression des viralen Episoms in der Wirtszelle wird schließlich die Expression weiterer früherer Gene, insbesondere der proliferationsfördernden Gene *E6* und *E7*, initiiert. *E2* ist hierbei imstande, konträre Funktionen auf die Expression der Onkogene auszuüben und kann sowohl bei niedriger Expression als Aktivator als auch bei hoher Expression als Repressor von *E6* und *E7* dienen (Nishimura *et al.*, 2000). *High-risk E6* und *E7* beeinflussen die Funktion von Wirtsgenen, indem sie unter anderem gemeinsam die Tumorsuppressoren *p53* und Retinoblastomprotein (*pRb*) in ihrer Funktionsweise beeinträchtigen (Hoppe-Seyler *et al.*, 2018). HR-*E7* kann an *pRb*, welches als Regulator des Zellzyklus der Wirtszelle dient, binden und dieses degradieren (Boyer, Wazer and Band, 1996; Classon and Harlow, 2002). Der hierdurch frei werdende Transkriptionsfaktor *E2F* führt so zum unkontrollierten Fortschreiten des Zellzyklus (Hwang *et al.*, 2002). Eine dadurch herbeigeführte Apoptose wird wiederum durch die HR-*E6*-vermittelte *p53*-Degradation verhindert (Jones, Thompson and Münger, 1997). Das Onkoprotein *E6* bildet gemeinsam mit dem *E6*-assoziierten Protein (*E6AP*) und *p53* einen Komplex, der letztlich zur proteolytischen Degradation von *p53* führt (Martinez-Zapien *et al.*, 2016). Gemeinsam bewirken die Onkoproteine somit eine Proliferation der nun deregulierten Keratinozyten und eine fortwährende Replikation des viralen Genoms. Da letzteres während einer produktiven Infekti-

on in Form eines Episoms vorliegt, wird das frühe Gen *E2* dauerhaft exprimiert und kann somit bei einer erhöhten *E6/7*-Expression letztlich zur Repression der Onkogene führen und somit eine regulierte Expression der viralen Gene im Epithel gewährleisten. Die erneute *E2*-Induktion führt zudem gemeinsam mit den frühen Genen *E1* und *E4* sowie den späten Genen zur viralen DNA-Synthese und zur Freisetzung von Virionen aus den enddifferenzierten, obersten Epithelzellen (Johansson *et al.*, 2012; Wang and Roden, 2013). Die Freisetzung der mithilfe der Kapsidproteine L1 und L2 neu synthetisierten Virionen wird durch die Expression von *E4* gefördert, welches an der Umgestaltung des Keratin-Netzwerkes in den obersten Zellschichten beteiligt ist (Peh *et al.*, 2004; Q. Wang *et al.*, 2004; Doorbar, 2013).

Im Gegensatz zur produktiven HPV-Infektion besteht bei einer persistierenden, transformierenden Läsion eine erhöhte Chance zur Genomintegration, welche den ORF des *E2*-Gens zerstört und somit eine Repression der Onkogene verhindert (Klaes *et al.*, 1999; Doorbar, 2006; Vinokurova *et al.*, 2008). Somit kommt es zu einer andauernden, deregulierten Expression der viralen Onkogene *E6* und *E7*, die eine erhöhte Mutationsrate der Wirtszelle fördert und schließlich die Entstehung hochgradiger Läsionen und Karzinome begünstigt (TD Kesis, DC Connolly, L Hedrick, 1996; Pett *et al.*, 2004).

### 1.3 HPV-induzierte Krankheiten

Eine Infektion mit HPV kann zu vielfältigen Krankheitsbildern führen, von gutartigen Veränderungen bis hin zu Karzinomen (Schiffman *et al.*, 2016). Die pathogene Wirkung von LR-HPV beschränkt sich dabei meist auf eher gutartige Läsionen wie mukosale Genitalwarzen und kutane Warzen. Diese Infektionen sind in der Regel selbstlimitierend und können vom Immunsystem in Schach gehalten werden. Vor dem Hintergrund einer Immunsuppression oder einer genetischen Vor-erkrankung kann es jedoch auch bereits durch eine Infektion mit HPV-Typen, die nicht zu den HR-HPV-Typen gehören, zu schwerwiegenderen Krankheitsbildern kommen (Doorbar *et al.*, 2015). So sind Betroffene mit der autosomal-rezessiven Erbkrankheit *Epidermodysplasia verruciformis* empfänglich für eine Infektion mit  $\beta$ -HPV-Typen, wie HPV5 und HPV8, was mit einer erhöhten Prävalenz EV-assoziiertes Hautkarzinome an sonnenexponierten Stellen einhergeht (Genders *et*

*al.*, 2015; Huang *et al.*, 2018).

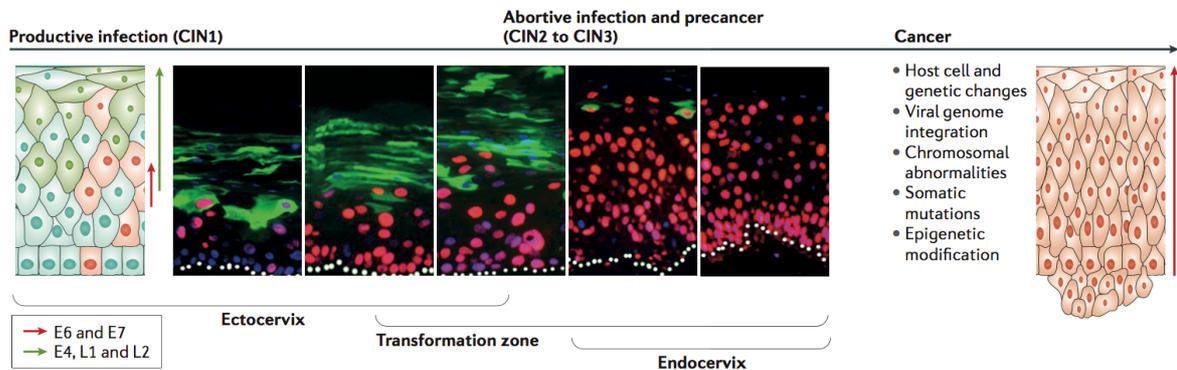
Insbesondere HR-HPV-Typen sind jedoch auch an der Entstehung von Karzinomen beteiligt (Schiffman *et al.*, 2016). Mit 56,1 % ist eine Infektion mit HPV die häufigste durch eine Infektion verursachte Krebsursache bei Frauen weltweit (de Martel *et al.*, 2020). Nahezu 100 % der Zervix- und 88 % der Analkarzinome sind auf eine Infektion mit HPV zurückzuführen (Alemany *et al.*, 2015; Schiffman *et al.*, 2016; de Martel *et al.*, 2020). Gerade bei Oropharynxkarzinomen (OPSCC) variiert der Anteil der auf eine HPV-Infektion zurückzuführenden Karzinome stark zwischen einzelnen in Untersuchungen betrachteten Ländern. So konnte eine retrospektive Studie zur Analyse der HPV-Prävalenz in OPSCC in den USA eine HPV-Prävalenz von 70 % zwischen 2000 und 2004 feststellen, wohingegen Studien in Deutschland stark schwankende Zahlen zwischen 21 % und 71 % für die Jahre 2000 und 2013 hervorbrachten (Chaturvedi *et al.*, 2011; Reuschenbach *et al.*, 2019). Eine länderübergreifende Studie zur Analyse in OPSCC aus 44 Ländern zeigte eine HPV-DNA-Prävalenz von 45,8 % (Ndiaye *et al.*, 2014).

### **1.3.1 Das Zervixkarzinom**

Das Zervixkarzinom stellt mit einer Prävalenz von 6,5 % noch immer die vierthäufigste Krebserkrankung bei Frauen weltweit dar (Sung *et al.*, 2021). Weit mehr als 90 % aller Zervixkarzinome sind dabei HPV-positiv (Walboomers *et al.*, 1999; Chan *et al.*, 2019). Eine Infektion mit HPV wird bei intaktem Immunsystem meist innerhalb einiger Monate von diesem erkannt und bekämpft, wodurch die Präsenz von HPV-DNA nicht zwangsläufig mit einer klinischen Manifestation einhergeht.

Ein Problem stellen persistierende HR-HPV-Infektionen dar, die zur Transformation des Zervixgewebes und über Vorstufen, die sogenannten zervikalen intraepithelialen Neoplasien (CIN), langfristig zur Entstehung eines Zervixkarzinoms führen können (Schlecht *et al.*, 2001). Diese Vorstufen werden je nach Schweregrad der Läsion in eine niedriggradige CIN1 oder hochgradige CIN2 und CIN3 eingeteilt, wobei der Grad der Proliferation des Plattenepithels mit dem Schweregrad der Läsion zunimmt und somit die differenzierungsgebundene Freisetzung von Virionen allmählich verhindert wird (Middleton *et al.*, 2003). Diese Zunahme des Anteils proliferierender Zellen im Epithel wird durch die Dysregulation der Onkogene *E6* und *E7* verursacht und geht meist mit einer Integration des viralen

Genoms ins Wirtsgenom einher (Klaes *et al.*, 1999). Ein Großteil der CIN1-Läsionen entwickelt sich im Laufe der Jahre wieder zurück und nur etwa 20 % führen zu einer CIN2-Läsion. Moscicki *et al.* konnten zeigen, dass nach drei Jahren nur 68 % der CIN2 wiederum zu einer CIN3-Läsion fortschreiten. Die Progressionsrate zu einem Plattenepithelkarzinom beträgt hier etwa 40 %.



**Abbildung 2: Progression einer Neoplasie zum Zervixkarzinom**

Eine produktive Infektion zeichnet sich vor allem durch die Expression der Gene *E4*, *L1* und *L2* in den obersten Epithelschichten (im Schema in grün dargestellt) aus, welche mit der viralen DNA-Synthese und Freisetzung von neuen Viruspartikeln einhergeht. Während der produktiven Läsion erfolgt die Expression der Onkogene *E6* und *E7* (im Schema in rot dargestellt) überwiegend reguliert. Im Gegensatz zu niedriggradigen Läsionen (CIN1) nimmt in hochgradigen Läsionen (CIN2/3) das Verhältnis von proliferierenden zu differenzierten Zellen zu (in der Immunfluoreszenz dargestellt durch die Expression des Zellzyklusmarkers MCM in rot und die späten viralen Gene in grün). Nach Jahren und Jahrzehnten kann es, einhergehend mit der Integration der viralen DNA ins Wirtsgenom sowie Mutationen, zur Entstehung eines Karzinoms kommen. Aus Schiffman *et al.*, 2016.

Abzugrenzen von den über Neoplasien entstehenden Plattenepithelkarzinomen sind die zervikalen Adenokarzinome, die sich von ersteren in ihrer Entstehung unterscheiden und aus Drüsenzellen hervorgehen und welche nur etwa 20 % der zervikalen Karzinome ausmachen (Berrington De González and Green, 2007; Gien, Beauchemin and Thomas, 2010).

Die lange Dauer der Progression von normalem Zervixgewebe über die Neoplasien hin zum Plattenepithelkarzinom ermöglicht eine frühzeitige Diagnose und Therapie. Seit seiner Einführung gilt der zytologische Pap-Test als Goldstandard der Zervixkarzinom-Diagnostik und hat seit seiner routinemäßigen Einführung zu einer Reduktion der Mortalität um bis zu 80 % geführt (Mählck, Jonsson and Lenner, 1994). Eine Kombination der zytologischen Untersuchung mit einer HR-HPV-Detektion kann die Sensitivität weiter erhöhen (Ronco *et al.*, 2010; Pimple,

Mishra and Shastri, 2016). Dennoch sind weitere Verbesserungen, insbesondere ein an Entwicklungsländer angepasstes Screening, notwendig, um die Prävalenz des Zervixkarzinoms weiterhin weltweit zu senken. Während die Mortalität unter Frauen weltweit im Jahr 2018 bei 7,5 % lag, liegt die einiger Schwellen- und Entwicklungsländer – wie Indien mit einer Mortalität von 19,3 % – deutlich höher (WHO, 2018).

Die Entwicklung und Einführung eines prophylaktischen HPV-Impfstoffes hat die HPV-Prävalenz sowie die Rate anormaler zytologischer Diagnosen, insbesondere in Ländern mit hoher Impf-Compliance, deutlich gesenkt (Tanaka *et al.*, 2017; Patel *et al.*, 2018). So konnte eine Studie in Schottland zeigen, dass eine Testgruppe 20-jähriger, geimpfter Frauen eine um 89 % reduzierte Prävalenz von CIN3+ gegenüber der Kontrollgruppe gleichaltriger, ungeimpfter Frauen haben (Palmer *et al.*, 2019). Derzeit gibt es zwei in Deutschland zugelassene Impfstoffe, welche nicht-infektiöse VLP aus dem Kapsidprotein L1 enthalten, darunter der 2016 eingeführte, nonavalente Impfstoff Gardasil9 (gegen HPV6, HPV11, HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV34, HPV45, HPV52 und HPV58) (McLemore, 2006). Die STIKO des Robert Koch-Instituts empfiehlt derzeit eine HPV-Impfung für Mädchen und Jungen im Alter von neun bis 14 Jahren (“Wissenschaftliche Begründung für die Empfehlung der HPV-Impfung für Jungen im Alter von 9 bis 14 Jahren,” 2018).

Trotz der Einführung der prophylaktischen Impfung ist das diagnostische Screening als sekundäre Präventionsmaßnahme noch immer von großer Bedeutung. So ist die Verfügbarkeit und Durchführung der Vakzine in Schwellen- und Entwicklungsländern noch immer nicht flächendeckend gewährleistet (Wigle, Coast and Watson-Jones, 2013; Bruni *et al.*, 2016). Auch in Deutschland liegt die Impfquote mit 43 % bei 15-jährigen Mädchen weit unter den Erwartungen (Rieck *et al.*, 2020). Zudem werden selbst bei hoher Impf-Compliance noch mehrere Generationen, die aus dem Impfraster fallen, diagnostische Maßnahmen in Anspruch nehmen müssen, um eine Verringerung der Zervixkarzinom-Prävalenz zu erreichen.

Eine frühzeitige Erkennung durch Screening-Maßnahmen oder gar eine Prävention durch HPV-Impfungen ist auch insbesondere aufgrund der invasiven Therapieverfahren, wie Ablation und Exzision, notwendig.

### 1.3.2 Kopf-Hals-Karzinom (HNSCC)

Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches (HNSCC) umfassen Karzinome der Mundhöhle, des Oro-, Naso- und Hypopharynx sowie des Larynx und der Trachea und stellen somit eine relativ heterogene Gruppierung dar. Mit einer Inzidenz von 890 000 Fällen weltweit und 450 000 Todesfällen 2018 stellen sie eine für die Forschung bedeutende Erkrankung dar (Johnson *et al.*, 2020). Historische Risikofaktoren für die Entstehung von HNSCC umfassen Alkoholkonsum und Rauchen (Sturgis, Wei and Spitz, 2004). In den letzten Jahrzehnten jedoch ist der HPV-Infektion in HNSCC, insbesondere in Oropharynxkarzinomen, jedoch eine wachsende Bedeutung zuteilgeworden (Chaturvedi *et al.*, 2008). HPV-induzierte Karzinome und solche, die durch Alkohol- und Zigarettenkonsum bedingt sind, unterscheiden sich sowohl in der molekularbiologischen Grundlage der Karzinogenese als auch in Therapieansprechen und -erfolg (Leemans, Snijders and Brakenhoff, 2018). So sprechen HPV-positive HNSCCs wesentlich besser auf eine Chemo- oder Radiotherapie an und tragen in der Regel weniger genetische oder epigenetische Veränderungen (Chaturvedi *et al.*, 2008; Dayyani *et al.*, 2010). Insbesondere der Tumorsuppressor p53 ist in HPV-negativen gegenüber HPV-positiven HNSCC häufig mutiert (Brachmann *et al.*, 1992; Kumar *et al.*, 2008; Hong *et al.*, 2016).

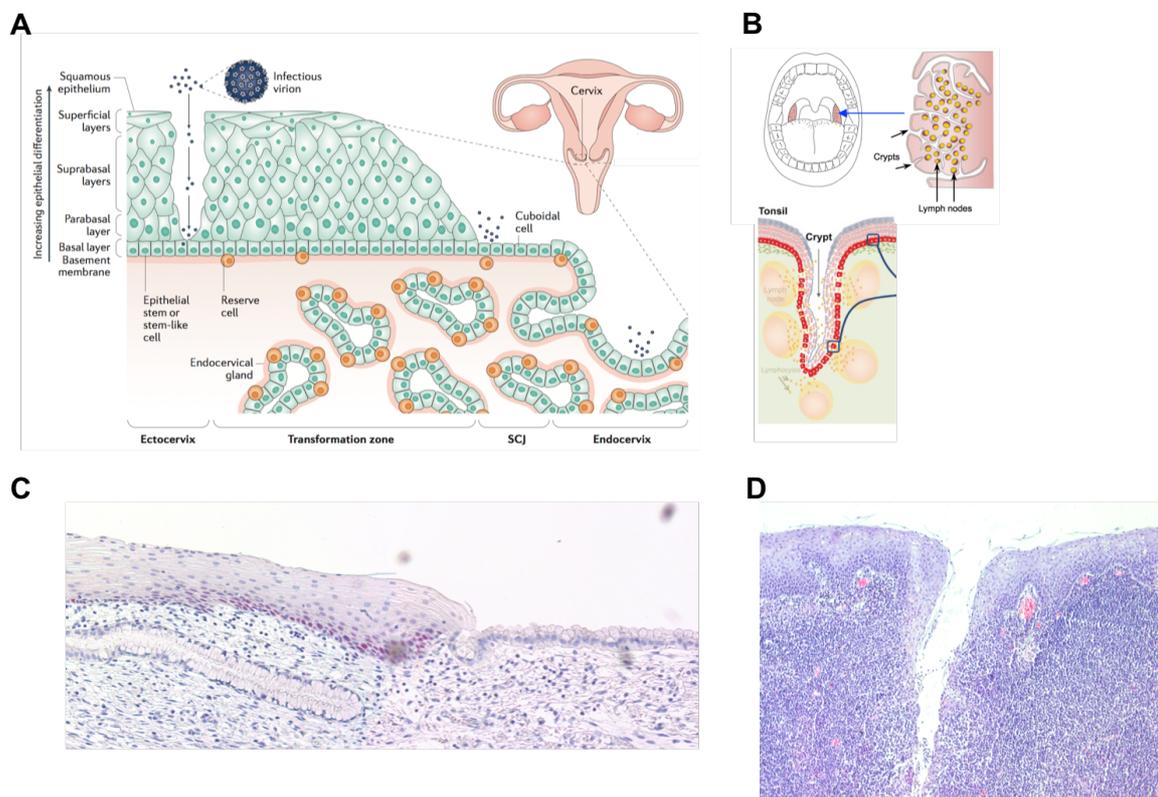
Von den HPV-positiven HNSCCs ist der Großteil im Oropharynx, dessen Karzinogenese zudem am besten erforscht ist, lokalisiert (24,9 %) (Castellsagué *et al.*, 2016). Insbesondere die Gaumentonsille (*Tonsilla palatina*, im Folgenden kurz als „Tonsille“ bezeichnet) ist häufig von einer karzinogenen HPV-Infektion betroffen, wobei etwa 50 % der Tonsillenkarzinome HPV-positiv sind (Syrjänen, 2004). Interessanterweise erfolgt in gesunden Tonsillen jedoch nur selten eine HPV-Detektion im Vergleich zum gesamten Kopf-Hals-Bereich (Palmer *et al.*, 2014; Combes *et al.*, 2017). Dies könnte durch die besondere Architektur der Gaumentonsille und ihre Bedeutung in der Immunabwehr bedingt sein (Leemans, Snijders and Brakenhoff, 2018). Als möglicher Infektionsort für HPV gilt hier die verzweigte Kryptenstruktur, welche nur ein einschichtiges, siebartiges Epithel aufweist und eine produktive Infektion somit möglicherweise nicht erlaubt (Syrjänen, 2004).

Im Gegensatz zu den alkohol- und tabakbedingten HPV-negativen HNSCC steigt die Prävalenz der HPV-induzierten OPSCCs stetig an. So stieg der Anteil HPV-

positiver OPSCC zwischen 1995 und 2012 in Männern von 36 % auf 72 %, der der Frauen von 29 % auf 77 % (D'Souza *et al.*, 2017).

## 1.4 Aufbau des Gebärmutterhalses und der Gaumenmandel

Die Empfänglichkeit der Zervix und des Kopf-Hals-Bereichs, insbesondere der Tonsille, für eine transformierende HPV-Infektion lässt auf molekulare und strukturelle Ähnlichkeiten beider Gewebe schließen. In der Tat findet sich ein ähnliches Expressionsmuster verschiedener Marker sowohl in der zervikalen *squamocolumnar junction* als auch in der tonsillären Krypte, welche in der Tonsille als vermeintlicher Hauptinfektionsort gilt (Westra, 2012; Morbini *et al.*, 2015).



**Abbildung 3: Vergleich der zervikalen Transformationszone und der tonsillären Krypte**

In der Zervix kommt es an der SCJ im Bereich der Transformationszone zum Übergang von mehrschichtigem Plattenepithel zu einem einschichtigem Säulenepithel (schematisch dargestellt in (A)), immunohistochemische Färbung für p63 (C)). Auch in der Gaumenmandel kommt es zum Übergang vom Plattenepithel der Tonsillen-Oberfläche zu einem einschichtigem Epithel der tonsillären Krypte. Im Gegensatz zum zervikalen Säulenepithel ist das Epithel der tonsillären Krypte jedoch retikulärer Natur (schematisch dargestellt in (B), HE (D)). Verändert nach Kang *et al.*, 2015; Schiffman *et al.*, 2016.

### 1.4.1 Die zervikale Transformationszone

Der Gebärmutterhals verbindet Vagina und Uterus und wird aus verschiedenen Epithelarten gebildet. Das untere Ende des Gebärmutterhalses bildet ein mehrschichtiges Plattenepithel, welches als Exozervix bezeichnet wird und schließlich auf ein einschichtiges Säulenepithel, die Endozervix, trifft. Der Übergang dieser beiden Epithelarten ineinander wird als SCJ bezeichnet. Nach der Adoleszenz durchgehen die Säulenepithelzellen mit zunehmendem Alter – unter Einfluss von Hormonen und des sauren Vaginalsekrets – metaplastische Veränderungen, wodurch das Säulenepithel durch Plattenepithel ersetzt wird und sich die Lokalisation der SCJ in Richtung Endozervix verschiebt (Singer, 1975). Der Abschnitt zwischen ursprünglicher und gegenwärtiger SCJ wird als Transformationszone bezeichnet.

In unmittelbarer Nähe dieser Transformationszone befinden sich unter den Basalzellen liegende Reservezellen, die stammzellähnliche Charakteristika besitzen und lange als Zielzelle einer HPV-Infektion vermutet wurden (Smedts *et al.*, 1992; Martens *et al.*, 2004). Auch die SCJ-Zellen selbst gelten als vermeintliche Zielzelle, da auch morphologisch unauffällige SCJ-Zellen nachweislich HPV-infiziert sein können (Mirkovic *et al.*, 2015). Herfs *et al.* postulierten eine Beteiligung einer speziellen SCJ-Zellpopulation, die sich durch die Expression der Marker Krt7, ARG2, CD63, MMP-7 und GDA auszeichnet, an der Entstehung des Zervixkarzinoms.

Während die vorherrschende Meinung bisher war, dass eine bestimmte Zellpopulation infiziert werden muss, um eine transformierende Läsion hervorzurufen und diese sich möglicherweise von der zu infizierenden Zellpopulation zur Entstehung einer produktiven Läsion unterscheidet, gewinnt allmählich auch der Einfluss des Mikromilieus eine bedeutende Rolle (Doorbar and Griffin, 2019).

So konnten Chumduri *et al.* zeigen, dass eine Veränderung stromaler Faktoren einen Wechsel zwischen exozervikalem und endozervikalem Schicksal bewirkt. In Gegenwart einer vom Stroma ausgehenden Wnt-Expression wird die Entstehung von Säulenepithelzellen gefördert, wohingegen die Suppression des Wnt-Signalweges die Entstehung einer Metaplasie fördert (Chumduri *et al.*, 2021). Die unterschiedliche Wirkung von Signalen des Mikromilieus auf das Epithel basiert Chumduri *et al.* zufolge zudem auf unterschiedlichen Subpopulationen von Stammzellen.

### 1.4.2 Die tonsilläre Krypte

Tonsillenkarcinome stellen den häufigsten HPV-assoziierten Kopf-Hals-Tumor dar (Syrjänen, 2004; Ndiaye *et al.*, 2014; Haegglom *et al.*, 2017). Auch hier variiert die HPV-Prävalenz zwischen einzelnen Ländern stark, beispielsweise zwischen 14 % in Indien und bis zu 89 % in den USA (Dahlstrom *et al.*, 2015; Bhosale *et al.*, 2016). Als Bestandteil des lymphatischen Systems ist die Tonsille zentral an der Immunantwort beteiligt (Nave, Gebert and Pabst, 2001). Das äußere Epithel der Tonsille ist weit verzweigt in tiefe Strukturen, die sogenannten Krypten, welche eine deutliche Vergrößerung der Oberfläche bewirken. Dabei ist das oberflächliche Plattenepithel ähnlich dem der Zervix aufgebaut und zum Stroma hin von einer Basalmembran abgegrenzt. Die Krypten hingegen bestehen aus einem diskontinuierlichen, siebartigen Epithel aus einzelnen Keratinozyten (Perry, 1994). Die Basalmembran ist dabei immer wieder unterbrochen, was die Immunfunktion der Tonsille unterstützt, indem Lymphozyten und Effektorzellen effektiv aus der Tonsille in die Lymphflüssigkeit abgegeben werden können. Somit bildet die äußere Schicht der Krypte ein loses Netzwerk aus Epithelzellen, Immunzellen und Stroma.

Morbini *et al.* konnten ein ähnliches Expressionsprofil spezifischer Marker entlang der Tonsillenkrypte und der zervikalen SCJ zeigen. Die Bedeutung der tonsillären Krypte bei der Infektion durch HPV zeigt sich zudem durch die Existenz spezieller CD44<sup>+</sup>/NGFR<sup>+</sup>-Progenitorzellen, welche nach einer ektopischen HPV-Onkogen-Expression im organotypischen 3D-Kulturmodell eine gestörte Differenzierung zugunsten einer erhöhten Proliferation zeigen (Kang *et al.*, 2015).

## 1.5 Beteiligung von definierten Nischen an der Homöostase von Stammzellen und Unterstützung der klonalen Kapazität von Tumorstammzellen

Stammzellen stellen eine Subpopulation von Zellen in einem jeweiligen Gewebe dar, die zum einen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung haben sowie als multipotente Zellen in verschiedene Zelltypen differenzieren können und so die Entstehung vielfältiger Zellen im Gewebe bewirken (Zakrzewski *et al.*, 2019). Multipotente Stammzellen befinden sich meist innerhalb einer definierten Nische, also einer spezifischen Mikroumgebung, die maßgeblich an der Homöostase der Stammzellentwicklung beteiligt ist. Diese ist für ein balanciertes Verhältnis zwischen Selbsterneuerungs- und Differenzierungspotential unabdingbar, um eine kontrollierte Stammzellentwicklung zu ermöglichen (Li and Xie, 2005).

Die Existenz einer spezifischen Nische wurde erstmals 1978 von R. Schofield postuliert. Die Nische ist demnach definiert als lokale Mikroumgebung der Stammzelle sowie weiterer darin angesiedelter Zellen und von diesen produzierten Faktoren und Signalmolekülen. Somit werden reziproke Interaktionen zwischen der Stammzelle und ihrer Nische ermöglicht. Zellen in der Stammzellnische können sowohl Nachkommen der zugehörigen Stammzelle selbst als auch anderen zellulären Ursprungs sein (Hsu and Fuchs, 2012).

Adulte Stammzellen konnten bisher in vielen Gewebetypen, wie zum Beispiel im Haarfollikel, Dünndarm und der Haut, identifiziert werden (Leushacke and Barker, 2012). Trotz ihrer unterschiedlichen Lokalisierung sind häufig ähnliche Signalwege an der Stammzell-Nischen-Interaktion beteiligt (Li and Xie, 2005). Insbesondere der Wnt-Signalweg und mit ihm assoziierte Faktoren sind von großer Bedeutung bei der Stammzell-Homöostase (Katoh and Katoh, 2007).

Der besondere Aufbau des Dünndarms in Zotten und Krypten erlaubt eine funktionelle Einteilung verschiedener Abschnitte, wobei sich die spezifischen Stammzellen tief an der Basis der Krypte befinden (Barker *et al.*, 2007). Die intestinalen Stammzellen exprimieren vermehrt Wnt-Rezeptoren, wie unter anderem die *leucine-rich repeat (LRR)-containing G-protein coupled receptors* Lgr4 und Lgr5 (Leushacke and Barker, 2012). Benachbarte *Paneth*-Zellen hingegen setzen vermehrt Wnt-Liganden in die Mikroumgebung frei und stellen somit einen zentralen Bestand-

teil der intestinalen Nische dar (Sato *et al.*, 2011).

Die Beteiligung von Lgr-exprimierenden Zellen an der Stammzellnische zeigte sich auch in anderen Geweben, wie dem Haarfollikel und der Haut (Tumbar *et al.*, 2004; Jaks *et al.*, 2008). Die Haarfollikel-Stammzellen (HFSC) können sowohl zur Entstehung von Haarzellen als auch Epidermis- und Drüsenzellen beitragen (Nowak *et al.*, 2008). Diese Stammzellen sind durch die Expression von Lgr6 charakterisiert und können auf Wnt-unabhängige Weise an der Entstehung unterschiedlicher Hautzellen beteiligt sein (Snippert *et al.*, 2010). Dahingegen kann die Wnt-vermittelte  $\beta$ -Catenin-Stabilisierung an der Proliferation von HFSCs und der Entstehung von Haarzellen beteiligt sein (Gat *et al.*, 1998; Moore and Lemischka, 2006). Desweiteren konnte eine Beteiligung Lgr5-exprimierender Haarfollikel-Stammzellen an der Entstehung HPV-induzierter Tumore gezeigt werden (Da Silva-Diz *et al.*, 2013). Tumbar *et al.* konnten zudem verschiedenste Nischenfaktoren, wie Zellzyklusregulatoren, Wnt-Faktoren und Proteine der extrazellulären Matrix (ECM) als Bestandteil der Mikroumgebung von Haut-Stammzellen identifizieren.

Auch in der Zervix zeigte sich eine Beteiligung verschiedener, lokal und zeitlich begrenzt exprimierter Faktoren am Schicksal des Epithels (Chumduri *et al.*, 2021). Die Arbeitsgruppe um Chumduri *et al.* konnte zeigen, dass sich verschiedene Signale der Mikroumgebung ganz spezifisch auf das Wachstum von Stammzellen der Zervix auswirken können, wobei auch hier der Wnt-Signalweg eine bedeutende Rolle einnimmt. Des Weiteren postulieren Chumduri *et al.*, dass zwei unterschiedliche Zellpopulationen auch für die Entstehung der beiden unterschiedlichen Karzinomarten der Zervix – dem Plattenepithel- und dem Adenokarzinom – verantwortlich sind.

In der ebenfalls HPV-suszeptiblen Tonsille konnten Kang *et al.* entlang der tonsillären Krypte die Präsenz von Progenitorzellen zeigen, die den *Nerve growth factor receptor* (NGFR) exprimieren. Die tonsilläre Nische wurde durch die Expression der Aldehyddehydrogenase ALDH1A1, welche während der Tumorgenese abnimmt, erstmals weitergehend charakterisiert (Wu *et al.*, 2018).

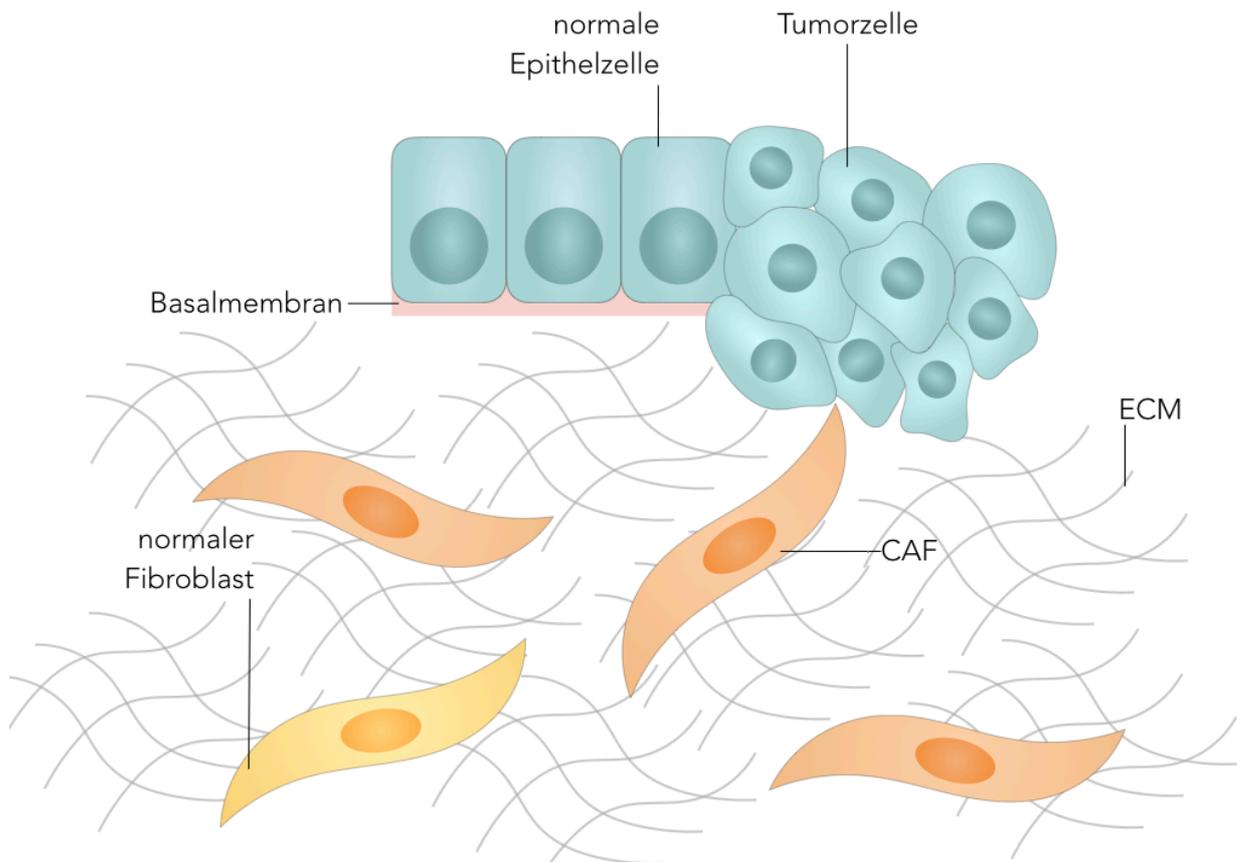
Gemeinsam zeigen die Erkenntnisse aus Zervix und Tonsille, dass Stammzellen in Form von Krebsstammzellen (CSC) auch bei der Tumorentstehung eine große Rolle spielen (Bruno and Smith, 2011). Sie verfügen mit ihrer Fähigkeit zur Selbster-

neuerung und Multipotenz über ideale Voraussetzungen für die Entstehung von präkanzerogenen Läsionen und Karzinomen.

### 1.5.1 Krebs-assoziierte Fibroblasten

Die Entstehung und Progression von Tumoren erfolgt nicht alleine durch Krebsstammzellen, sondern auch durch den Beitrag stromaler Zellen – wie Immunzellen, Endothelzellen, Fibroblasten und der extrazellulären Matrix sowie assoziierten Faktoren – welche die Tumornische ausmachen (Pietras and Östman, 2010). Durch die Interaktion maligner und nicht-maligner Zellen kommt es letztlich zum Voranschreiten des Karzinoms sowie zur verstärkten Invasion und potentiellen Metastasierung.

Zentraler Bestandteil dieser Tumornische sind sogenannte Krebs-assoziierte Fibroblasten (*cancer-associated fibroblasts*, kurz CAF). Der exakte Mechanismus zur Differenzierung von normalen Fibroblasten zu CAFs und deren Aktivierung ist noch immer Gegenstand der Forschung (Räsänen and Vaheri, 2010). Im Stroma angesiedelte Fibroblasten sind für die Synthese und Freisetzung diverser Bestandteile der ECM, wie Kollagen und Fibronectin, verantwortlich (LeBleu and Kalluri, 2018). Eine besondere Rolle erfüllen Fibroblasten bei dem Prozess der Wundheilung indem sie eine verstärkte Aktivierung der ECM fördern (Bainbridge, 2013). Aufgrund fehlender, eindeutiger Marker für Fibroblasten erfolgt eine Klassifizierung in Kombination der spindelförmigen Morphologie und der Expression eines Fibroblasten-assoziierten Markers wie Vimentin (Sahai *et al.*, 2020). Mithilfe weiterer Marker wie dem  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) und dem *Fibroblast activation protein alpha* (FAP) lassen sich bestimmte Fibroblasten-Subtypen wie CAFs weiter charakterisieren (Fearon, 2014; Nurmik *et al.*, 2020).



**Abbildung 4: Komplexer Aufbau der Tumornische und Vorkommen von Krebs-assoziierten Fibroblasten**

Für das Fortschreiten eines Karzinoms sind nicht nur die Tumorzellen selbst von Bedeutung, sondern auch weitere Zellarten, die sich in der direkten Nähe der Tumorzellen befinden und durch direkte oder indirekte Interaktion die Tumorprogression und Metastasierung fördern. Diese Zellen bilden die spezifische Tumornische. Zentraler Bestandteil dieser Nische sind, neben der extrazellulären Matrix, Krebs-assoziierte Fibroblasten, kurz CAFs. Nicht dargestellt sind weitere zelluläre Bestandteile wie T-Zellen, NK-Zellen sowie Endothelzellen. Adaptiert nach Kobayashi *et al.*, 2019.

Als Teil der Mikroumgebung des Tumors können CAFs sowohl tumorfördernd als auch tumorhemmend wirken (Özdemir *et al.*, 2014; Rhim *et al.*, 2014; Borriello *et al.*, 2017; Sahai *et al.*, 2020). Im Pankreas konnte eine verstärkte Proliferation der Tumorzellen durch die CAF-vermittelte Freisetzung von Exosomen demonstriert werden (Richards *et al.*, 2017). Sowohl im Kolon- als auch im Ovarialkarzinom konnte eine verstärkte Angiogenese nachgewiesen werden (Zhang *et al.*, 2011; Nagasaki *et al.*, 2014). Nagasaki *et al.* konnten in Kolonkarzinomen eine erhöhte IL-6-vermittelte VEGF (*vascular endothelial growth factor*)-Expression in CAFs nachweisen. Im Ovarialkarzinom zeigte sich eine Korrelation von Metastasierung und erhöhter, stromaler CAF-Präsenz *in vivo*. Zudem sind CAFs maßgeblich an der Pro-

gression, Invasion und der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) sowie dem Umbau der extrazellulären Matrix beteiligt (Sugihara *et al.*, 2015; Alba-Castellón *et al.*, 2016; Erdogan and Webb, 2017). Knuchel *et al.* konnten 2015 einen direkten Kontakt von CAFs zu Tumorzellen nachweisen und somit die dynamischen Möglichkeiten der interzellulären Kommunikation in der Tumornische demonstrieren.

An der Aktivierung Krebs-assoziiierter Fibroblasten sind vermutlich eine Vielzahl von Mechanismen beteiligt (Sahai *et al.*, 2020). Unter anderem konnte ein Beitrag physischer Veränderungen der ECM zur Fibroblasten-Aktivierung nachgewiesen werden (Calvo *et al.*, 2013; Wei *et al.*, 2015). Demnach führen die mechanischen Veränderungen der ECM zu einer verstärkten Aktivierung des Transkriptionsfaktors YAP1 (*yes-associated protein 1*) und der damit verbundenen Downstream-Effektoren, die die Krebs-assoziierten Fibroblasten charakterisieren und gleichzeitig eine weitere Festigung der extrazellulären Matrix zur Folge haben. In einem Feed-Forward-Loop wird die Expression von YAP1 weiter verstärkt (Calvo *et al.*, 2013). Darüber hinaus sind auch Zytokine wie TGF- $\beta$  an der Aktivierung von CAFs beteiligt (Chen *et al.*, 2009).

Gleichzeitig werden einige dieser löslichen Faktoren aber auch von den Krebs-assoziierten Fibroblasten selbst sezerniert und tragen zu deren Funktion bei. Die Effekte von CAFs in der Tumornische können funktionell in die Interaktion mit Tumorzellen, die Beeinflussung des Immunsystems, die Förderung der Angiogenese und die Umstrukturierung der ECM eingeteilt werden (Kobayashi *et al.*, 2019). Sezerniertes IL-6 und Wnt können durch Interaktion mit Krebszellen die Tumorprogression fördern (Fu *et al.*, 2011; Qin *et al.*, 2018). Lösliche Faktoren der CAFs werden häufig auch in Exosomen freigesetzt. Auch eine direkte Interaktion von CAFs und Tumorzellen, die unmittelbar zur Invasion letzterer führt, konnte gezeigt werden. Dabei kann es durch Ausübung von Zugkräften zur MMP-unabhängigen Perforation und Remodellierung der Basalmembran kommen (Glentis *et al.*, 2017). Zudem kann eine Cadherin-vermittelte Bildung von Zell-Zell-Verbindungen eine durch „Ziehen“ bewirkte Invasion der Tumorzellen hervorrufen (Ewald, 2017). Eine Freisetzung des Chemokins CXCL12 trägt in unterschiedlicher Weise zur Tumorgenese bei, indem einerseits eine direkte Wirkung auf die Invasion von Tumorzellen genommen wird sowie andererseits eine immunsupprimierende Wirkung durch Beeinträchtigung der T-Zell-Immunantwort erfolgt

(Feig *et al.*, 2013; Fearon, 2014). Die T-Zell-Proliferation und damit verbundene Immunantwort wird zudem durch die Expression von TGF- $\beta$  weiter unterdrückt (Takahashi *et al.*, 2017). Die Angiogenese im Tumorgewebe wird unter anderem durch Freisetzung von CXCL12 und VEGF initiiert, wobei letzterer durch weitere Signale aus der Tumormikroumgebung in CAFs verstärkt aktiviert wird und gemeinsam mit der Matrixmetalloprotease MMP-7 die Gefäßbildung fördert (Ito *et al.*, 2007). Die Umgestaltung der extrazellulären Matrix stellt einen kritischen Schritt in der Migration und Invasion von Tumorzellen dar und wird unter anderem durch eine CAF-vermittelte Quervernetzung von Kollagen sowie eine veränderte Anordnung von Fibronectin unterstützt (Pankova *et al.*, 2016; Attieh *et al.*, 2017; Erdogan, Ao, Lauren M White, *et al.*, 2017).

## **1.6 Bedeutende Signalwege in der Karzinogenese der Zervix und des Kopf-Hals-Bereiches**

### **1.6.1 Der STAT3-Signalweg**

Der *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) ist in verschiedenen Karzinomen aktiviert und trägt auf unterschiedliche Weise zu deren Progression bei. Eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors erfolgt als Reaktion auf verschiedene Stimuli wie Stress, Onkogene und UV-Exposition mithilfe verschiedener spezifischer Rezeptoren (Yu, Pardoll and Jove, 2009). Zytokinrezeptoren, die auf eine Stimulation mit Zytokinen der IL-6-Familie – wie OSM, IL-6 und LIF – reagieren, führen zu einer Januskinase (JAK)-vermittelten STAT3-Aktivierung durch Phosphorylierung, beispielsweise des Tyrosinrests 705 (pTyr705-STAT3) (Hibi, Nakajima and Hirano, 1996). Durch diese Phosphorylierung kommt es zu einer Bildung von Dimeren, welche in den Nukleus translozieren und dort die Expression verschiedener Zielgene aktivieren.

STAT3 wird eine meist tumorfördernde Rolle in verschiedenen Krebsarten zugeschrieben. Dabei trägt eine STAT3-Aktivierung überwiegend zur Proliferation der Tumorzellen sowie der Regulation inflammatorischer Signalwege bei. In Kolitis-assoziierten Karzinomen sowie in Glioblastomen konnte eine Korrelation der STAT3-Aktivierung mit einer schlechten klinischen Prognose gezeigt werden (Grivennikov *et al.*, 2009; Fan *et al.*, 2015). In Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs

zeigte sich, dass eine STAT3-Aktivierung durch verstärkte Expression des *programmed cell death protein 1* (PD-1) und dessen Liganden an der Induktion einer immunsupprimierenden Antwort beteiligt ist und gleichzeitig als potentielles Therapie-Target dienen kann, da sie essentiell an der Förderung des Tumorzustands beteiligt ist (Rubin Grandis *et al.*, 1998; Fan *et al.*, 2015; Bu *et al.*, 2017). Die Rolle von STAT3 in der Immunmodulation und -evasion von Tumoren trägt gleichzeitig zu dessen protumorigener Funktion bei (T. Wang *et al.*, 2004; Schröder *et al.*, 2011). In B-Zellen einer chronischen lymphatischen Leukämie sind STAT1 und STAT3 im Vergleich zu normalen B-Zellen verstärkt aktiviert (Frank, Mahajan and Ritz, 1997). Auch in der Hautkarzinogenese zeigte sich mithilfe von *knock-out*- und Überexpressionsexperimenten eine Beteiligung von STAT3 (Chan *et al.*, 2004). Die Arbeitsgruppe um Andrea *et al.* konnte zeigen, dass HPV8-transgene Mäuse mit einer Keratinozyten-spezifischen STAT3-Heterozygotie gegenüber HPV8-transgenen STAT3-Wildtyp-Mäusen eine deutlich höhere Überlebenschance haben und weniger häufig Tumore entwickeln. Hier zeigt sich die Bedeutung von STAT3 an der HPV8-vermittelten Hautkarzinogenese (Andrea *et al.*, 2010).

Auch die Mikroumgebung eines Tumors wird durch die Regulierung von STAT3 beeinflusst. So kommt es in aktivierten Fibroblasten durch die Expression von FAP, welches auch als CAF-Marker dient, zur pSTAT3-vermittelten CCL2-Induktion, die zur Rekrutierung von myeloiden Suppressorzellen führt und somit letztlich zur Tumorprogression beiträgt (Yang *et al.*, 2016). *In vivo* korreliert eine starke FAP-Expression mit einer schlechten Überlebenschance.

Allerdings konnte der STAT3-Aktivierung in einigen Tumoren auch eine positive Auswirkung auf das Überleben zugeschrieben werden. In nodal-negativem Brustkrebs zeigte sich, dass eine Kernlokalisation von pTyr705-STAT3 mit einem längeren Überleben assoziiert ist (Dolled-Filhart *et al.*, 2003).

Die Aktivierung von pSTAT3 spielt auch in der zervikalen Karzinogenese eine zentrale Rolle. So konnte eine verstärkte pSTAT3-Aktivierung im Zervixkarzinom als förderlich für die Karzinogenese identifiziert werden und eine IL-6-vermittelte pSTAT3-Aktivierung zur Induktion von VEGF – und somit einer verstärkten Angiogenese und potentiellen Metastasierung – beitragen (Wei *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2007). Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Aktivierung von pTyr705-

STAT3 mit zunehmendem Schweregrad der präkanzerogenen Läsion zunimmt. Zum Zervixkarzinom hin nimmt sie allerdings wieder ab (Walch-Rückheim *et al.*, 2016). Dabei geht in Karzinomen eine durch IL-6-*Trans-Signaling* verstärkte pSTAT3-Aktivierung mit einer nukleären IRF1-Expression einher und ist mit einem besseren chemotherapeutischen Ansprechen assoziiert. Demnach könnte sich eine prätherapeutische Analyse der IRF1-Expression als vielversprechender Biomarker für das Ansprechen auf eine Radiochemotherapie erweisen.

### 1.6.2 Die IL-6-Rezeptoruntereinheit gp80 und *Trans-Signaling*

Die IL-6-Zytokinfamilie umfasst mehrere Zytokine wie IL-6, LIF und OSM, die sowohl eine strukturelle als auch funktionelle Ähnlichkeit aufweisen (Taga and Kishimoto, 1997). Bestandteil aller Rezeptoren der IL-6-Familie ist die Rezeptoruntereinheit gp130, welche ubiquitär exprimiert und deren Deletion in Mäusen letal ist (Yoshida *et al.*, 1996; Taga, 2002). Durch die jeweils spezifischen Rezeptoren, welche zelltyp- und gewebespezifisch exprimiert sind, vermitteln die Zytokine der IL-6-Familie die Bildung von gp130-Homo- oder Heterodimeren, welche die Aktivierung spezifischer Kinasen und Signalwege zur Folge hat. Diese sind in verschiedenste biologische Prozesse und Krankheiten involviert (Tanaka, Narazaki and Kishimoto, 2014).

Im Falle von IL-6 kommt es zunächst zur Bildung eines IL-6/IL-6R $\alpha$ -Komplexes, welcher dann an gp130 bindet und dessen Homodimerisierung induziert (Taga *et al.*, 1989; Murakami *et al.*, 1993). Der IL-6-Rezeptorkomplex besteht aus der 80 kDa schweren IL-6R $\alpha$ -Untereinheit (gp80, auch CD126) und den jeweils 130 kDa schweren IL-6R $\beta$ -Untereinheiten (gp130, auch CD130). Dabei ist die Expression von gp80 im Gewebe stärker limitiert als die gp130-Expression (Rose-John, 2012). Eine Sensibilität für IL-6 ist dennoch in vielen Geweben durch den Prozess des sogenannten *Trans-Signalings* möglich. Während die klassische IL-6-Signaltransduktion durch die membrangebundene gp80-Untereinheiten vermittelt wird, wird das *Trans-Signaling* durch die lösliche Form sgp80 (*soluble gp80*) ermöglicht, welche gleichzeitig die Halbwertszeit von IL-6 steigert (Peters *et al.*, 1996). Klassisches und *Trans-Signaling* sind an jeweils unterschiedlichen weiteren Signalwegen und Krankheiten beteiligt (Rose-John, 2012).

Die lösliche IL-6-Rezeptor-Untereinheit sgp80 kann sowohl durch alternatives

Spleißen als auch durch die proteolytische Spaltung durch die ADAM-Metalloproteasen (*A disintegrin and metalloproteinase*) ADAM10 und ADAM17 – in einem Vorgang der als *Shedding* bezeichnet wird – vermittelt werden (Lust *et al.*, 1992; Mülberg *et al.*, 1993). Letztere ist vor allem für die regulierte Freisetzung von gp80 zuständig (Dimitrov *et al.*, 2006). ADAM-vermitteltes *Shedding* führt zur enzymatischen Spaltung des N-terminalen Teils des membranständigen gp80, welcher dann in löslicher Form für andere Zellen frei verfügbar ist. ADAM17 wurde als erstes bekanntes *Shedding*-Enzym ausführlich charakterisiert und besteht aus einer N-terminalen Prodomäne, die zur Aktivierung zunächst enzymatisch gespalten werden muss, sowie einer Metalloprotease-, Disintegrin- und einer cysteinreichen proximalen Domäne, einer Transdomäne und einer zytoplasmatischen Domäne (Black *et al.*, 1997; Wong *et al.*, 2015; Zunke and Rose-John, 2017). Als membrangebundene Metalloprotease ist ADAM17 zudem auch an der proteolytischen Spaltung und Aktivierung von TNF $\alpha$  beteiligt (Kriegler *et al.*, 1988).

## 1.7 Ziel der Arbeit

Die *squamocolumnar junction* im Bereich der zervikalen Transformationszone ist bereits seit längerem als möglicher Ort für eine transformierende HPV-Infektion von Interesse. Im Rahmen dieser Dissertation soll die mögliche Beteiligung einer bestimmten Population stromaler Fibroblasten an der Konstitution einer definierten Nische in der zervikalen Transformationszone untersucht werden. Ziel dieser Arbeit ist es diese zervikale Fibroblasten-Population genauer zu charakterisieren und zudem eine gemeinsame, spezielle Nischenumgebung in Zervix und Tonsille zu beschreiben.

Eine detaillierte Analyse und Charakterisierung der Transformationszone und der speziellen Transformationszonen-Fibroblasten soll dabei sowohl *in vitro* mittels Protein- und RNA-Analysen als auch *in vivo* mittels immunhistochemischen Färbungen erfolgen. Eine besondere Technik der *in-vitro*-Analysen stellt dabei die organotypische 3D-Kultur dar, welche eine genaue Nachahmung der *in-vivo*-Situation erlaubt und eine einzigartige, separate Analyse unterschiedlicher Kompartimente ermöglicht. Letztlich soll die Charakterisierung der Transformationszonen-Fibroblasten durch eine Analyse funktioneller Effekte vervollständigt werden.

Da die Zervix und die Tonsille morphologische Ähnlichkeiten sowie eine Suzeptibilität für HPV-Infektionen aufweisen, soll in einem zweiten Abschnitt auch untersucht werden, ob es eine gemeinsame Nische in beiden Geweben gibt, die sich durch die Expression bestimmter Marker auszeichnet. Hierzu sollen *in-vivo*-Analysen verschiedener Marker in beiden Gewebetypen durchgeführt werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Zellkultur

#### 2.1.1 Eukaryotische Zelllinien

CaSki:	HPV16-positive Zervixkarzinom-Zelllinie, die aus einer Metastase im Dünndarm isoliert wurde (RRID:CVCL_1100)
HeLa:	HPV18-positive Zervixkarzinom-Zelllinie, die aus einem zervikalen Adenokarzinom isoliert wurde (RRID:CVCL_0030)
HPK1A:	<i>in vitro</i> HPV16-transformierte, nicht-maligne humane Vorhautkeratinozyten (RRID:CVCL_D890)
K51:	<i>in vitro</i> HPV18-transformierte, nicht-maligne humane Vorhautkeratinozyten
NIKS:	HPV-negative, spontan immortalisierte Vorhautkeratinozyten-Zelllinie
SW756:	HPV18-positive Zervixkarzinom-Zelllinie (RRID:CVCL_1727)

Mit Ausnahme von NIKS und K51 wurden alle Zelllinien von Herrn Prof. Dr. von Knebel Doeberitz (DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellt. NIKS-Zellen wurden von Prof. Dr. Gariglio (Università del Piemonte Orientale, Italien) zur Verfügung gestellt. Die Zelllinie K51 wurde von L. Laimins (Feinberg School of Medicine, Chicago, USA) zur Verfügung gestellt.

Alle Zellen wurden regelmäßig getestet, um potentielle Mykoplasma-Kontaminationen auszuschließen.

### 2.1.2 Primäre Zellen und Gewebe

- ExF: Primäre Fibroblasten, die aus der Exozervix von anonymisierten Spenderinnen isoliert wurden
- TZF: Primäre Fibroblasten, die aus der Transformationszone der Zervix anonymisierter Spenderinnen isoliert wurden

Die Zellen ExF und TZF wurden von Frau Barbara Best isoliert.

Gewebeschnitte von Formalin-fixiertem Paraffin-eingebetteten (FFPE) Zervixmaterial wurden freundlicherweise vom Institut für Pathologie, Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar bereitgestellt.

PatientInnen-Material aus Rachenmandeln wurde freundlicherweise von Priv.-Doz. Dr. Maximilian Linxweiler (HNO, Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar) zur Verfügung gestellt.

Die vorliegende Doktorarbeit wurde in Übereinstimmung mit den Prinzipien der Deklaration von Helsinki durchgeführt und von der Ethikkommission der Universität des Saarlandes genehmigt.

### 2.1.3 Zellkulturmedien und Reagenzien

#### Medien

<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose (4,5g/L) with L-Glutamine</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 10x</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>DMEM/Ham's F-12 Nutrient Mixture</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>KBM-Gold™ Keratinocyte Growth Medium</i>	Lonza, Köln

## Reagenzien

Adenin [ $1.8 \times 10^{-4}$ M]	Sigma-Aldrich, Steinheim
Choleratoxin [ $10^{-10}$ M]	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)</i>	Gibco, Karlsruhe
<i>Epidermal Growth Factor</i> [10 ng/ml]	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fötale Kälberserum (FKS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Hydrocortison [0,4 µg/ml]	Sigma-Aldrich, Steinheim
Insulin [5 µg/ml]	Sigma-Aldrich, Steinheim
KBM-Gold <i>Single Quots</i>	Lonza, Köln
Natriumpyruvat [100 nM]	Sigma-Aldrich, Steinheim
Penicillin/Streptomycin (Penicillin: 10 000 U/ml; Streptomycin: 10 mg/ml)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Transferrin [5 µg/ml]	Sigma-Aldrich, Steinheim
Triiodothyronin [ $2 \times 10^{-11}$ M]	Sigma-Aldrich, Steinheim
TrypLE™ Express	Gibco, Karlsruhe
Trypsin-EDTA (1×) (0,5 % Trypsin and 0,2 % EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin/EDTA 0,25 mg/ml	Lonza, Köln
<i>Trypsin neutralizing solution (TNS)</i>	Lonza, Köln
<i>Opti-MEM Reduced Serum Medium, GlutaMAX</i>	Gibco, Karlsruhe

## Vollmedium

### DMEM Vollmedium

Zu 500 ml DMEM *High Glucose with L-Glutamine*, wurden folgende Reagenzien hinzugegeben:

10 %	FKS
1 mM	Natriumpyruvat

1 % Penicillin/Streptomycin

### **DMEM-Vollmedium ohne Antibiotika**

Zu 500 ml DMEM *High Glucose with L-Glutamine*, wurden folgende Reagenzien hinzugegeben:

10 % FKS

1 mM Natriumpyruvat

### **FAD-Medium**

Zu 500 ml DMEM *High Glucose with L-Glutamine*, wurden folgende Reagenzien hinzugegeben:

500 ml *DMEM/Ham's F-12 Nutrient Mixture*

10 % FKS

1 % Penicillin/Streptomycin

1 mM Natriumpyruvat

0,4 µg/ml Hydrocortison

$10^{-10}$  M Choleratoxin

10 ng/ml EGF

5 µg/ml Transferrin

$1,8 \times 10^{-4}$  M Adenin

5 µg/ml Insulin

$2 \times 10^{-11}$  M Triiodothyronin

### **Einfriermedium**

Zellen wurden in einem Medium aus 90 % hitzeinaktiviertem FKS und 10 % sterilem DMSO eingefroren.

## 2.1.4 Antikörper

### 2.1.4.1 Western Blot

Alle primären und sekundären Antikörper, die im Western Blot eingesetzt wurden, sind in Tabelle 1 und Tabelle 2 dargestellt.

**Tabelle 1: Primärantikörper für Western Blot**

	<b>Klonalität, Katalognummer</b>	<b>Spezies</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Waschpuffer</b>
$\alpha$ -SMA	monoklonal, M0851	Maus-IgG	1:1000	Dako Agilent Pathology Solutions, Santa Clara, USA	PBST
$\beta$ -Aktin	monoklonal, A5441	Maus-IgG	1:5000	Sigma Aldrich, Steinheim	PBST
gp80	polyklonal, sc-13947	Kaninchen- IgG	1:2000	Santa Cruz, USA	PBST
pSTAT3 (Tyr705)	monoklonal, #9145	Kaninchen- IgG	1:2000	Cell Signaling Technology, Beverly, MA	TBST

**Tabelle 2: Sekundärantikörper für Western Blot**

	<b>Klonalität</b>	<b>Spezies</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-Maus- peroxidase	monoklonal	Kaninchen- IgG	1:2000	Sigma Ald- rich, Stein- heim
Anti- Kaninchen- peroxidase	monoklonal	Ziege-IgG	1:2000	Sigma Ald- rich, Stein- heim

### 2.1.4.2 Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

In den folgenden Tabellen sind alle zur Immunhistochemie und -fluoreszenz verwendeten Primärantikörper (Tabelle 3) und Sekundärantikörper (Tabelle 4) dargestellt.

**Tabelle 3: Primärantikörper für Immunhistochemie und -fluoreszenz**

	<b>Klonalität, Katalognummer</b>	<b>Spezies</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
ADAM17	monoklonal, ab57484	Maus-IgG	1:250	Abcam, Cambridge
$\alpha$ -SMA	monoklonal, M0851	Maus-IgG	1:6000	Dako Agilent Pa- thology Solutions, Santa Clara, USA
CD20	monoklonal, M0755	Maus-IgG	1:200	Dako Agilent Pa- thology Solutions, Santa Clara, USA
CD79a	monoklonal, M7050	Maus-IgG	1:100	Dako Agilent Pa- thology Solutions, Santa Clara, USA
gp80	polyklonal, sc-13947	Kaninchen-IgG	1:300	Santa Cruz, USA
Lgr6	monoklonal, ab126746	Kaninchen-IgG	1:400 (IHC) 1:500 (IF)	Abcam, Cambridge
p63	monoklonal, ab735	Maus-IgG	1:2000 (IHC), 1:100 (IF)	Abcam, Cambridge
Pan-Cytokeratin	monoklonal, sc-81714	Maus-IgG	1:800	Santa Cruz, USA
pSTAT3 (Tyr705)	monoklonal, #9139	Kaninchen-IgG	1:1000	Cell Signaling Technology, Bev- erly, MA

**Tabelle 4: Sekundärantikörper für Immunfluoreszenz**

	<b>Klonalität</b>	<b>Spezies</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Waschpuffer</b>
$\alpha$ -Maus Alexa Fluor® 488	polyklonal	Ziege-IgG	1:500	Thermo Scien- tific, Rockford, USA	TBST
$\alpha$ -Maus Alexa Fluor® 546	polyklonal	Ziege-IgG	1:500	Thermo Scien- tific, Rockford, USA	TBST
$\alpha$ -Kaninchen Alexa Fluor® 546	polyklonal	Ziege-IgG	1:500	Thermo Scien- tific, Rockford, USA	TBST

### 2.1.5 Oligonukleotide

Im Folgenden sind alle mittels qRT-PCR getesteten Gene samt ihrer Primer, Sonden und passenden MgCl<sub>2</sub> Konzentrationen angegeben (Tabelle 5).

**Tabelle 5: Zur qRT-PCR verwendete Oligonukleotide, Sonden und MgCl<sub>2</sub> Konzentrationen**

Gen	<i>forward-Primer</i> 10 µM (5' - 3')	<i>reverse-Primer</i> 10 µM (3' - 5')	Sonde	MgCl <sub>2</sub>
Lgr4	AGGCCTGTCTGGGTTGAA	TGGCTTCACTGGGTACTGTTT	50	2 mM
Lgr5	CCCTTCATTGAGTGCAGTGTT	ATTCTGATCAGCCAGCCATC	60	5 mM
Lgr6	GTGCTGCATTTGCAAACAAC	CCTGCAGCTTGTATAAATTCAGG	42	3 mM
miR-375	AGCCGTTTGTTCGTTCCGGCT	GTGCAGGGTCCGAGGT	<i>Taq Man</i>	
RNU6B	CTCGCTTCGGCAGCACA	AACGCTTCACGAATTTGCGT	<i>Taq Man</i>	
RPL13a	AGCGGATGAACACCAACC	TTTGTGGGGCAGCATACTC	28	4 mM
Twist1	GGCTCAGCTACGCCTTCTC	CCTTCTCTGGAAACAATGACATCT	88	3 mM

Mit Ausnahme von miR-375 und RNU6B wurden alle Primer samt zugehöriger Sonden mithilfe der *Universal Probe Library* Website und durch Sigma-Aldrich (Steinheim) hergestellt. Die Sonden für miR-375 und RNU6B wurden von Thermo Scientific (Rockford, USA) hergestellt.

### 2.1.6 Standards zur Quantifizierung der qRT-PCR

Die zur Quantifizierung von qRT-PCRs verwendeten Standardplasmide sind in Tabelle 6 dargestellt.

**Tabelle 6: Standards zur Quantifizierung von qRT-PCRs**

Gen	Plasmid	Vektorgroße	Insertgröße
Lgr4	pBluescriptII-huLgr4	2990 bp	5041 bp
Lgr5	pCRBluntII-Topo-huLgr5	3519 bp	2872 bp
Lgr6	pCMV-SPORT6-huLgr6	4396 bp	3286 bp
RPL13a	pCMV-SPORT6-huRPL13a	4396 bp	663bp
Twist1	pOTB7-TWIST1	1815 bp	1517 bp

## 2.1.7 Reagenziensysteme

### 2.1.7.1 Western Blot

SuperSignal West Dura  
Extended Duration Substrate

Thermo Scientific,  
Rockford, USA

### 2.1.7.2 Immunzytochemie

*2,5 % Normal horse serum*  
*ImmEdge Hydrophobic Barrier Pen*  
ImmPACT DAB Peroxidase Substrate  
ImmPRESS™ Anti-Maus IgG Peroxidase  
ImmPRESS™ Anti-Kaninchen IgG Peroxidase  
ImmPRESS™-AP Anti-Maus IgG  
ImmPRESS™-AP Anti-Kaninchen IgG  
*VectaMount Permanent Mounting Medium*  
*VECTOR Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit*

Vector Laboratories, Eching  
Vector Laboratories, Eching

### 2.1.7.3 Immunfluoreszenz

*VECTASHIELD Mounting Medium*

Vector Laboratories, Eching

### 2.1.7.4 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Human IL-6R alpha DuoSet ELISA  
(#DY227)

R&D Systems, Minneapolis,  
USA

Human MMP-9 DuoSet ELISA  
(#DY911)

R&D Systems, Minneapolis,  
USA

### 2.1.7.5 RNA-Isolation

NucleoSpin® miRNA

Machery-Nagel, Düren

### 2.1.7.6 cDNA-Synthese

5× RT Puffer	Thermo Scientific, Rockford, USA
Maxima Reverse Transkriptase	Thermo Scientific, Rockford, USA
Random Hexamer Primer	Sigma-Aldrich, Steinheim
RiboLock RNase Inhibitor	Thermo Scientific, Rockford, USA

### 2.1.7.7 qRT-PCR

10× Taq Puffer	Roche, Mannheim
dNTP Mix	Roche, Mannheim
FastStart Taq DNA Polymerase	Roche, Mannheim
Universal Probe Library (UPL), human	Roche, Mannheim

### 2.1.7.8 cDNA-Synthese aus miRNA

TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit	Thermo Scientific, Rockford, USA
--	----------------------------------

### 2.1.7.9 miR-qRT-PCR

TaqMan® Universal PCR Master Mix	Thermo Scientific, Rockford, USA
----------------------------------	----------------------------------

### 2.1.8 Chemikalien

2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Agarose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim

---

Bromophenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich, Steinheim
DAPI	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DPBS	Gibco, Karlsruhe
Essigsäure (C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> )	VWR, Darmstadt
Ethanol, absolut (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)	Roth, Karlsruhe
Ethanol, denaturiert (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Gibco, Karlsruhe
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glyzin	Merck, Darmstadt
Hämatoxylin	Vector Laboratories, Eching
Lachssperma	Invitrogen, Karlsruhe
Magermilchpulver	Heirler Cenovis, Radolfzell
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt
Methanol (CH <sub>3</sub> OH)	VWR, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF)	Serva, Heidelberg
Ponceau S Solution	Sigma-Aldrich, Steinheim
Rotiophorese Gel 30 (37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	AppliChem, Darmstadt

Tris-EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween20	Serva, Heidelberg
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt
Xylol	Fischar, Saarbrücken
Zitronensäure	Serva, Heidelberg

### 2.1.9 Puffer und Lösungen

#### Zellzählen

Trypanblau: 0,5 % Trypanblau in PBS, sterilfiltriert

#### Organotypische 3D-Kultur

Kollagen: 4 mg/ml Rattenkollagen  
in 0,1 M Essigsäure  
1 N NaOH, sterilfiltriert

Fixierung: 4 % (w/v) Formaldehyd in H<sub>2</sub>O

#### Proteinextraktion

10 % SDS: 10 g SDS in 100 ml H<sub>2</sub>O

2x SDS Probenpuffer:

Glyzerin	10 % (v/v)
10 % SDS	6 % (v/v)
2-Mercaptoethanol	10 % (v/v)
Tris/HCl pH 6,8	130 mM

**SDS-PAGE**

Sammelgelpuffer:	Tris/HCl pH 6,8	0,5 M
	SDS	0,4 %
Trenngelpuffer:	Tris/HCl pH 8,8	1,5 M
	SDS	0,4 %
Sammelgel:	H <sub>2</sub> O	4,15 ml
	Sammelgelpuffer	2,5 ml
	Rotiophoresegel 30	3,35 ml
	10 % APS	0,05 ml
	TEMED	0,01 ml
Trenngel:	H <sub>2</sub> O	3,075 ml
	Trenngelpuffer	0,625 ml
	Rotiophoresegel 30	0,750 ml
	10 % APS	45 µl
	TEMED	5 µl
10× Laufpuffer:	Tris/HCl	25 mM
	Glyzin	192 mM
1× Laufpuffer:	10× Laufpuffer	100 ml
	10 % SDS	10 ml
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l

**Western Blot**

Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS):	NaCl	140 mM
	KCl	25 mM
	MgCl <sub>2</sub>	0,5 mM
	CaCl <sub>2</sub>	1 mM
	NaKPO <sub>4</sub>	10 mM
PBS/T Blockierpuffer:	Magermilchpulver	0,05 %
	1× PBS/T Waschpuffer	
PBS/T Waschpuffer:	0,05 % Tween20 in PBS	
Strippingpuffer:	10 % SDS	20 ml
	0,5 mM Tris-HCl pH 6,8	12,5 ml
	H <sub>2</sub> O	67,5 ml
Transferpuffer:	1× Laufpuffer	800 ml
	Methanol	200 ml
10× Tris-gepufferte Salzlösung (TBS):	Tris	24,2 g
	NaCl	80 g
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l
	pH 7,6	
1× TBS:	10× TBS	100 ml
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l

TBS/T Blockierpuffer:	Magermilchpulver	0,05 %
	1× TBS/T Waschpuffer	

TBS/T Waschpuffer:	0,05 % Tween20 in 1× TBS
--------------------	--------------------------

### **Immunhistochemie**

Citratpuffer pH 6,0:	Trinatriumcitrat-	2,94 g
	dehydrat pH 6,0	
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l

Tris-EDTA (TE) Puffer pH 9,0:	Tris	10 mM
	EDTA	1 mM
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l

10x Tris-buffered saline (TBS) pH 7,6:	Tris	24,2 g
	NaCl	80 g
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l

### **Immunfluoreszenz**

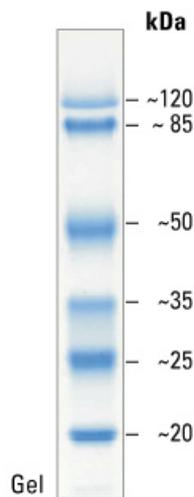
Blockierlösung:	BSA	1 %
	PBS	

DAPI:	DAPI	1 µl
	Methanol	50 ml

## 2.1.10 Molekulargewichtsmarker

### 2.1.10.1 Pierce™ Prestained Protein MW Marker

Zur Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen im Western Blot wurde der Molekulargewichtsmarker Pierce™ Prestained Protein MW Marker (Thermo Scientific, Rockford, USA) benutzt (Abbildung 5).



**Abbildung 5: Pierce™ Prestained Protein MW Marker**

Der Molekulargewichtsmarker wurde zur Bestimmung des molekularen Gewichts von Proteinen verwendet (Abbildung von [www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)).

### 2.1.11 Laborgeräte

BioRad Trans-Blot SemiDry	BioRad, München
ChemiDoc™XRS+ Gel Dokumentation	BioRad, München
Gelelektrophorese Kammern	BioRad, München
Leica DMI 6000B Inversmikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar
LightCycler® 480	Roche, Mannheim
Microtome Leica RM2235	Leica Microsystems, Wetzlar
NanoDrop™ Spektrophotometer	Thermo Scientific, Rockford, USA

Tissue TEK Cryo Console	Miles Scientific
Ultraschallgerät	Branson Ultrasonic, Danbury, USA
Victor X4 Multilabel Plate Reader	Perkin, Elmer, Massachusetts, USA

### 2.1.12 Gebrauchsmaterialien

Amersham Protran 0,45 µm Membran	GE Healthcare Life Sciences, Solingen
Deckgläschen	Menzel-Glaser, Braunschweig
Papierfilter	Whatman, Kent, UK
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim
SuperFrost Plus® Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen

Plastikwaren wurden von Greiner Bio-One (Frickenhausen), Roche (Mannheim), Sarsted (Nümbrecht), TPP (Trasadingen, Switzerland) and VWR (Darmstadt) bezogen.

### 2.1.13 Software

GraphPad Prism 8.0	GraphPad Software, San Diego, USA
ImageJ	Wayne Rasband, USA
Leica Application Suite 3.6.0	Leica Microsystems, Wetzlar
Leica Application Suite X	Leica Microsystems, Wetzlar
LightCycler® 480 Software 1.5	Roche, Mannheim

MS Office 2019	Microsoft, Redmond, USA
NanoDrop 2000	ThermoScientific, Rockford, USA
QuantityOne Software	BioRad, München
WorkOut 2.5 Software	Dazdaq, Brighton, GB

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

#### 2.2.1.1 Kultivierung von Zelllinien

Alle in dieser Arbeit erwähnten Zelllinien wachsen als adherente *Monolayer*. Mit Ausnahme von K51, welche in FAD-Vollmedium kultiviert wurden, wurden alle Zelllinien in DMEM-Vollmedium kultiviert. Die Zellen wurden alle zwei bis fünf Tage in einem den Zellen entsprechenden Verhältnis subkultiviert.

Zum Passagieren der Zellen wurde das Zellkulturmedium zunächst verworfen bevor die Zellen mit 1× PBS gewaschen wurden. Anschließend wurden die Zellen zum Lösen vom Boden der Zellkulturflasche in Trypsin/EDTA bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die vereinzelt Zellen wurden in DMEM-Vollmedium resuspendiert und bei 300 g für 5 min zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde anschließend in DMEM-Vollmedium resuspendiert und die Zellen in einem angemessenen Verhältnis subkultiviert oder gezählt und für weitere Versuche eingesetzt.

#### 2.2.1.2 Isolierung und Kultivierung primärer Zellen

Primäre Zellen aus Zervixgewebe wurden von Barbara Best isoliert.

Primäre Fibroblasten wurden in DMEM-Vollmedium kultiviert und bis zur Passage 7 in Experimenten eingesetzt.

#### 2.2.1.3 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren von Zellen wurden diese, wie in Abschnitt 2.2.1.1 beschrieben, trypsiniert und in einer definierten Zellzahl anschließend bei 300 g für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in Einfriermedium resuspendiert und jeweils eine bekannte Zellzahl in Cryovials überführt. Zum zellschonenden Einfrieren wurden die Zellen zunächst kurz auf Eis gelagert, bevor sie bei -80°C eingefroren wurden und zur Langzeitlagerung bei -150°C oder in Stickstoff aufbewahrt wurden.

#### 2.2.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Die für Experimente eingesetzte Zellzahl wurde mittels Neubauer-Zählkammer ermittelt. Hierzu wurde die Zellsuspension in einem Verhältnis von 1:1 in 0,5%igem Trypanblau verdünnt und 10 µl in die Zählkammer pipettiert. Nach Auszählung der vier Quadranten wurde die Zellzahl mittels folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellkonzentration} \left[ \frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} \right] = \frac{\text{Zellzahl in 4 Quadranten}}{4} \times 2 \times 1 \times 10^4$$

#### 2.2.1.5 Herstellung der HPV18-positiven NIKS

Die spontan immortalisierte Zelllinie NIKS (*normal immortal keratinocytes*) wurde erstmals von Allen-Hoffmann *et al.* beschrieben und ist von großer Bedeutung in der Untersuchung von Keratinozyten in einem geschichteten Epithel. Die Zellen sind nicht-maligne Keratinozyten und wurden aus der humanen Vorhaut gewonnen.

Die Herstellung der HPV18-positiven NIKS wurde im Rahmen ihrer Doktorarbeit von Dr. Marta Podgórska am Institut für Virologie der Universität des Saarlandes (Homburg/Saar) mithilfe des Cre/loxP-Systems durchgeführt. Die Plasmide zur Transfektion der Zellen wurden dabei basierend auf der Publikation von Wang *et al.* hergestellt. Die Transfektion der NIKS mit dem Leervektor pNeo oder pNeo-loxP HPV18 erfolgte mittels *amaxa* Nucleofektion. Nach der Transfektion wurden die Zellen auf *Feedern*, wie in Abschnitt 2.2.1.6 beschrieben, in FAD-Vollmedium kultiviert und zunächst mithilfe von G-418 (100 µg/ml) selektioniert. Nach längerer Selektion konnten die Zellen schließlich in FAD-Vollmedium auf *Feedern* kultiviert werden.

#### 2.2.1.6 Herstellung von *Feeder* Zellen für die Kultivierung von NIKS-Zellen

Um eine Ausdifferenzierung der NIKS-Zellen zu verhindern, wurden sogenannte *Feeder* aus wachstumsarretierten Fibroblasten hergestellt, welche die Keratinozyten mit Wachstumsfaktoren versorgen. Hierzu wurden in einer 10 cm<sup>2</sup> Zellkulturschale  $2,6 \times 10^6$  exozervikale Fibroblasten in DMEM-Vollmedium ausgesät und nach einer 24-stündigen Inkubation bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> mit dem Zytostatikum Mi-

tomycin C behandelt. Die Zugabe von Mitomycin C erfolgte in DMEM-Vollmedium in einer Konzentration von 8 µg/ml. Anschließend wurden die Zellen über Nacht inkubiert und am nächsten Tag zur Entfernung des Zytostatikums fünfmal mit 1× PBS gewaschen. Die *Feeder* wurden anschließend bis zum Auftauen der NIKS in DMEM-Vollmedium kultiviert.

#### **2.2.1.7 Partielle Trypsinierung von NIKS auf *Feedern***

Bevor die auf *Feedern* gewachsenen NIKS für weitere Experimente verwendet werden konnten, mussten sie von den wachstumsarretierten Fibroblasten getrennt werden. Dazu wurde das Kulturmedium verworfen und die Zellen mit 1× PBS gewaschen bevor 3 mL einer 2 mM EDTA/PBS-Lösung hinzugegeben wurden, um die Fibroblasten zu lösen. Nach etwa zwei Minuten wurde die Lösung verworfen und die Fibroblasten vorsichtig mit 3 mL einer 1:1 in PBS verdünnten Trypsinlösung inkubiert. Die Reaktion wurde dabei regelmäßig beobachtet und abgestoppt bevor sich die Keratinozyten ablösten. Nachdem die Suspension verworfen wurde, wurden die NIKS-Zellen mithilfe von Trypsin/EDTA abgelöst und in FAD-Kulturmedium resuspendiert und bei 300 g für 5 min pelletiert. Die Zellen wurden anschließend in FAD-Medium resuspendiert, gezählt und dann in weiteren Experimenten verwendet.

#### **2.2.1.8 Kollagenherstellung für organotypische 3D-Kulturen**

Das zur Herstellung von organotypischen 3D-Kulturen benötigte Kollagen, das die extrazelluläre Matrix nachstellt, wurde aus Rattenschwänzen isoliert. Hierzu wurden zunächst die Sehnen aus den Schwänzen gelöst und in 1× PBS gewaschen, bevor sie unter der Sterilbank getrocknet wurden. Die isolierten Sehnen wurden anschließend in 99%igem Ethanol gewaschen und in einer Konzentration von 4 mg/ml in steriler 0,1 M Essigsäure durch ständiges Rühren bei 4°C gelöst. Das isolierte Rattenkollagen wurde bei 4°C gelagert.

### 2.2.1.9 Herstellung organotypischer 3D-Kulturen

Die organotypischen 3D-Kulturen (kurz: 3D-Kulturen) dienen dem Imitieren des Wachstums von Zellen *in vivo*. Dabei wurden Fibroblasten-Kollagen-Matrices hergestellt, auf denen Keratinozyten unter Einfluss eines Luftreizes wachsen konnten. Die 3D-Kultur bildet so ein Dermismodell nach, in welchem Zell-Zell- und Zell-ECM-Kontakte sowie ein Nährstoffgradient durch das Wachstum an der Luft-Medium-Grenze simuliert werden (Langhans, 2018). Es entsteht ein mehrschichtiges Epithel, in welchem sowohl die Fähigkeit zur Proliferation der Zellen als auch zur Differenzierung besteht und dessen Morphologie die *in-vivo*-Situation nachahmt (Carlson *et al.*, 2008).

Zur Herstellung der Fibroblasten-Kollagen-Matrices wurden Fibroblasten der Passagen drei bis sieben verwendet. An Tag eins des Versuches wurden pro 3D-Kultur jeweils 500 000 Fibroblasten in eine Kollagen-Matrix im Well einer 24-Well Platte eingebettet. Hierzu wurden 800 µl Rattenkollagen (4 mg/ml) – wie unter Abschnitt 2.2.1.8 beschrieben isoliert – mit 100 µl 10× DMEM vermischt und die Lösung durch Zugabe von 0,1 M NaOH allmählich auf den richtigen pH-Wert eingestellt, welcher bei einer Rosafärbung der Lösung erreicht war. 500 000 Fibroblasten wurden pelletiert und in 100 µl FKS resuspendiert, bevor sie mit der Kollagen-Lösung vermischt wurden und in das Well einer 24-Well Zellkulturplatte pipettiert wurden. Die Suspension wurde bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> bis zur Aushärtung der Matrix inkubiert und anschließend 1 ml DMEM Vollmedium zugegeben.

Nach 24-stündiger Inkubation wurden 700 000 Keratinozyten in geeignetem Kulturmedium auf die Kollagen-Fibroblasten-Matrix ausgesät und für weitere 24h bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Nach weiteren 24h wurden die 3D-Kulturen auf Metallgitter an die Luft-Medium-Grenze gesetzt, sodass sie lediglich von Seite der Fibroblasten-Kollagen-Matrix mit Medium versorgt werden und die Keratinozyten einem Luftreiz ausgesetzt sind, der das natürliche, differenzierungsabhängige Wachstum der Keratinozyten induziert. Die 3D-Kulturen wurden je nach Versuch in DMEM-Vollmedium oder FAD-Medium für eine Dauer von sieben bis 14 Tagen kultiviert, wobei an jedem zweiten Tag das Kulturmedium ausgetauscht wurde.

Im Anschluss wurde die 3D-Kultur entweder zur Herstellung von Formalinfixierten Paraffinschnitten (FFPE) fixiert oder die Kompartimente der 3D-Kultur

zur Isolation von Protein- oder RNA-Extrakten getrennt. Zur Fixierung der 3D-Kultur wurde das Medium nach der entsprechenden Wachstumsdauer durch eine 4%ige Paraformaldehyd-Lösung ersetzt und am folgenden Tag komplett mit 4 % Paraformaldehyd bedeckt. Die 3D-Kultur wurde anschließend in Kooperation mit der Dermatologie des Universitätsklinikums des Saarlandes sowie der Experimentellen Chirurgie in Paraffin eingebettet. Zur weiteren Analyse mittels HE oder Immunhistochemie wurden mithilfe eines Mikrotoms Schnitte einer Dicke von 5  $\mu\text{m}$  angefertigt und auf SuperFrost®Plus-Objektträger aufgebracht.

Die Trennung der 3D-Kulturen in ihre einzelnen Kompartimente und folgende Protein- und RNA-Isolation wird in Abschnitt 2.2.1.10 beschrieben.

Die Überstände der 3D-Kultur wurden bis zur Analyse mittels ELISA bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

#### **2.2.1.10 Isolation von Protein- und RNA-Extrakten aus organotypischen 3D-Kulturen**

Um Proteine und RNA aus 3D-Kulturen zu isolieren, wurde mithilfe einer sterilen Pinzette das Epithel von der Fibroblasten-Kollagen-Matrix getrennt. Die jeweiligen Kompartimente wurden dann getrennt voneinander entweder in  $2\times$  Sample Puffer oder Lysepuffer der Kits zur RNA-Isolierung gegeben und durch starkes Vortexen gelöst. Die weitere Isolation erfolgte dann wie in den Abschnitten 2.2.3.1 und 2.2.4.1 beschrieben.

#### **2.2.2 Histologische Analyse von Gewebe und organotypischen 3D-Kulturen**

FFPE-eingebettete Gewebeproben der Tonsille sowie 3D-Kulturen wurden zur Betrachtung histologischer Strukturen und Veränderungen mithilfe einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) gefärbt. Dabei kommt es zu einer Blaufärbung aller basophilen Strukturen, wie z.B. den Zellkernen und einer Rotfärbung aller eosinophilen Strukturen.

Für die HE Färbung wurden FFPE-Schnitte einer Dicke von 5  $\mu\text{m}$  zunächst in drei aufeinanderfolgenden Xylolbädern je 5 min deparaffinisiert und anschließend in einer aufsteigenden Ethanolreihe (99 %, 90 %, 80 %, 70 % und 50 %) für je 2 min rehydriert. Die Schnitte wurden anschließend 5 min in destilliertem Wasser gewa-

schen bevor sie für 2 min in Hämatoxylin inkubiert wurden. Die Hämatoxylin-Färbung wurde durch fünfminütiges Spülen in Leitungswasser durch die Erhöhung des pH-Wertes abgeschlossen. Anschließend wurden die Schnitte 10 min in einer Eosinlösung inkubiert und in einer absteigenden Ethanolreihe (50 %, 70 %, 80 %, 90 % und 99 %) je 2 min dehydriert. Die Dehydration wurde durch eine mindestens fünfminütige Inkubation in Xylol abgeschlossen. Die Schnitte konnten dann mithilfe von VectaMount™ eingedeckelt werden und mikroskopisch analysiert werden.

### **2.2.3 Analyse von Proteinen**

#### **2.2.3.1 Herstellung von Ganzzellextrakten**

Zuvor in einer 6-Well Platte ausgesäte Zellen in einer Zellzahl von  $5 \times 10^5$  Fibroblasten pro Well wurden zweimal mit  $1 \times$  PBS gewaschen und anschließend mithilfe eines Zellschabers in 1 ml  $1 \times$  PBS aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Well wurde anschließend mit 500  $\mu$ l  $1 \times$  PBS gespült, welche ebenfalls in das Reaktionsgefäß überführt wurden. Die Zellsuspension wurde anschließend bei 300g für 5 min zentrifugiert und das Pellet in 100  $\mu$ l  $2 \times$  Sample Puffer resuspendiert. Die 2D-Lysate oder die zuvor in Abschnitt 2.2.1.9 beschriebenen 3D-Lysate wurden im folgenden Versuchsablauf auf Eis gehalten. Mithilfe von Ultraschall (alternierende Ultraschallzyklen von 5 sec An/Aus, jeweils dreimal) wurden die Zellen aufgeschlossen und anschließend zunächst für 5 min bei  $99^\circ\text{C}$  gekocht, kurz auf Eis gelagert und schließlich 10 min bei 14 000 rpm,  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Der resultierende Überstand, der die Proteinlysate enthält, wurde dann in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei  $-20^\circ\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### **2.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Proteinkonzentration der gewonnen Lysate wurde mithilfe des NanoDrop™ Spektrophotometers gemessen. Hierzu wurde eine 1:100 Verdünnung der Lysate in 0,1 M NaOH hergestellt, wovon 2  $\mu$ l zur Messung der Absorption bei 280 nm im NanoDrop™ eingesetzt wurden. Die resultierende Absorption wurde zur Berechnung der Proteinkonzentration wie folgt eingesetzt:

$$15 \mu\text{g Protein [X } \mu\text{l]} = \frac{3,2}{\text{OD}_{280}}$$

### 2.2.3.3 SDS-PAGE

Für die Analyse von Proteinextrakten mittels SDS-PAGE wurden 10,5%ige Gele verwandt. Die Gele wurden wie in Abschnitt 2.1.9 beschrieben hergestellt. Es wurden jeweils 15  $\mu\text{g}$  Proteinisolat zur Analyse eingesetzt. Die Auftrennung der Proteine wurde im Sammelgel bei 15 mA, im Trenngel bei 25 mA durchgeführt. Zur Bestimmung des Molekulargewichts einzelner Proteine wurde ein Molekulargewichtsstandard mitgeführt.

### 2.2.3.4 Western Blot

Nach dem Gellauf wurden die Proben mithilfe des *SemiDry* Transfergerätes bei 15 V für 35 min auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Hierzu wurden sowohl Gel als auch Membran zunächst für wenige Minuten in Transferpuffer äquilibriert. Der Transferaufbau bestand in folgender Reihenfolge aus vier mit Transferpuffer getränkten Papierfiltern, der äquilibrierten Membran und Gel, sowie weiteren vier getränkten Papierfiltern, welche luftblasenfrei im Transfergerät angeordnet wurden. Der erfolgreiche Transfer und die gleichmäßige Beladung wurde mithilfe einer PonceauS-Färbung kontrolliert, welche anschließend mit destilliertem Wasser herausgewaschen wurde. Die Membran wurde, um eine unspezifische Bindung des Antikörpers zu verhindern, eine Stunde in 5 % (w/v) Magermilchpulver in Waschpuffer bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Der primäre Antikörper wurde in 5 % (w/v) Magermilchpulver in Waschpuffer verdünnt und über Nacht bei 4°C auf einem Orbitalschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Blot dreimal mit Waschpuffer gewaschen, bevor der Sekundärantikörper, ebenfalls verdünnt in 5 % (w/v) Magermilchpulver in Waschpuffer, für eine Stunde bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert wurde. Nach erneutem, dreimaligem Waschen wurden die Proteine mithilfe des ChemiDoc XRS+ unter Zugabe des Substrates detektiert. Die Quantifizierung erfolgte mithilfe der Software ImageJ, wobei die Proteinexpression jeweils auf das Haushaltsgen  $\beta$ -Aktin normiert wurde.

Waschpuffer, Antikörper und entsprechende Konzentrationen sind in Tabelle 1 und Tabelle 2 angegeben.

### 2.2.3.5 Immunhistochemische Färbung

Zur Analyse von Proteinen in FFPE-Gewebe oder 3D-Kultur-Schnitten wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Die Färbungen wurden hierbei in der Umsetzung ihres Substrates in die DAB-Färbung (Umsetzung von Meerrettichperoxidase durch DAB) und die AP-Färbung (Umsetzung des von Alkaliner Phosphatase) unterschieden. Zudem wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt.

#### DAB

FFPE-Schnitte wurden durch dreimalige Inkubation in Xylol (je 10 min) und eine anschließende absteigende Ethanolreihe (99 %, 90 %, 80 %, 70 % und 50 %) rehydriert und anschließend 5 min in destilliertem Wasser gewaschen. Zur Antigen-demaskierung wurden die Schnitte je nach zu verwendendem Antikörper in Citratpuffer oder TE-Puffer einer Antigen-demaskierung unterzogen. Die Antigen-demaskierung erfolgte dabei jeweils durch Aufkochen des Puffers in der Mikrowelle für 10 min (Citratpuffer) oder 15 min (TE-Puffer). Die Schnitte wurden anschließend 15 min im Antigen-demaskierungspuffer allmählich abgekühlt. Um eine unspezifische Umsetzung des Substrates DAB durch endogene Peroxidasen zu verhindern, wurden diese mithilfe einer 3%igen  $H_2O_2$ -Lösung geblockt. Die Schnitte wurden dann einmal 5 min in  $1\times$  TBS gewaschen und dann zur Blockierung unspezifischer Bindungen mit einer 2,5%igen *Normal Horse Serum*-Lösung inkubiert. Der primäre Antikörper wurde dann entsprechend Tabelle 3 in 0,25 % BSA/TBS verdünnt und auf den Schnitten über Nacht bei 4°C in einer Feuchtkammer inkubiert. Am Folgetag wurden die Schnitte zunächst mit  $1\times$  TBS gewaschen, bevor der entsprechende *ready-to-use* Sekundärantikörper zugegeben wurde. Nach 30-minütiger Inkubation wurden die Schnitte erneut zweimal in  $1\times$  TBS gewaschen und dann durch Zugabe des *ImmPACT™*DAB (3,3'-Diaminobenzidin) Substrates entwickelt. Die Inkubationszeiten unterschieden sich hierbei je nach verwendetem Primärantikörper und sind in Tabelle 7 dargestellt:

**Tabelle 7: Inkubationszeiten des *ImmPACT™ DAB Substrate Kit* in der immunhistochemischen Färbung**

Primärantikörper	Inkubationszeit im Gewebe	Inkubationszeit in der 3D-Kultur
$\alpha$ -SMA	/	1 min
gp80	5 min	/
p63	5 min	/
pSTAT3 (Tyr705)	/	1 min

Nach der Inkubation wurden die Schnitte 5 min in destilliertem Wasser gewaschen und anschließend 40 sec in Hämatoxylin inkubiert, bevor die Schnitte durch Spülen in Leitungswasser „gebläut“ wurden. Anschließend wurden die Schnitte mithilfe einer aufsteigenden Ethanolreihe (50 %, 70 %, 80 %, 90 % und 99 %, je 2 min) und Xylol dehydriert bevor sie mit VectaMount *Permanent Mounting Medium* eingedeckt wurden und mikroskopisch analysiert werden konnten.

### Alkaline Phosphatase

Die Rehydrierung und Antigendemaskierung der FFPE-Schnitte erfolgten wie im vorherigen Abschnitt beschrieben. Eine Blockierung endogener Peroxidasen ist hierbei nicht notwendig, weswegen die Schnitte nach dem Abkühlen direkt mit *Normal Horse Serum* geblockt wurden. Die Inkubationsschritte der Antikörper erfolgten ebenfalls wie im vorherigen Abschnitt beschrieben. Die Inkubation zur Entwicklung der Färbung erfolgte mithilfe des *ImmPRESS®-AP Kit* entsprechend folgender Inkubationszeiten:

**Tabelle 8: Inkubationszeiten des *ImmPRESS®-AP Substrate Kit* in der immunhistochemischen Färbung**

Primärantikörper	Inkubationszeit im Gewebe	Inkubationszeit in der 3D-Kultur
ADAM17	3 min	3 min
Lgr6	4 min	/

Im Anschluss wurden die Schnitte nur kurz in destilliertem Wasser gespült, bevor sie wie bereits beschrieben mit Hämatoxylin gefärbt, dehydriert und mit VectaMount *Permanent Mounting Medium* eingedeckt wurden.

## **Immunfluoreszenz**

Zur Analyse von Gewebeschnitten und 3D-Kulturen mittels Immunfluoreszenz wurden die Zellen wie in den vorherigen Abschnitten rehydriert und eine Antigendemaskierung durchgeführt. Die nachfolgende Färbung erfolgte mithilfe des *Tyramide SuperBoost* Kits entsprechend dem Herstellerprotokoll.

### **2.2.3.6 ELISA**

Zur Analyse von Zellkulturüberständen mittels ELISA wurde das Medium von organotypischen 3D-Kulturen verwendet. Die ELISAs wurden entsprechend des Herstellerprotokolls durchgeführt und im Victor X4 Multilabel Plate Reader gemessen.

## **2.2.4 Analyse von RNA**

### **2.2.4.1 Isolation von Gesamt-RNA**

Die Isolation von Gesamt-RNA wurde mithilfe des *NucleoSpin® miRNA* Kits entsprechend dem Herstellerprotokoll durchgeführt.

### **2.2.4.2 RNA-Quantifizierung**

Die RNA-Konzentration und Reinheit von Isolaten wurde im NanoDrop™ Spektrophotometer bestimmt, wozu die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm (RNA), 280 nm (DNA) und 230 nm (organische Substanzen) bestimmt wurde. Der Quotient der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm erlaubt eine Aussage über die Reinheit des RNA-Isolats, wobei ein Quotient > 2,0 eine Verunreinigung durch organische Substanzen andeutet. RNA-Isolate wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### **2.2.4.3 cDNA-Synthese**

Zur cDNA-Synthese wurden 1 µl Random Hexamer Primer und 1 µl dNTPs zu 100 bis 500 ng RNA gegeben und mit RNase-freiem Wasser auf 15,4 µl aufgefüllt.

Die Proben wurden dann bei 65°C 5 min lang inkubiert, kurz abzentrifugiert und auf Eis gelagert. Zu jeder Probe wurden 4 µl 5× RT Puffer, 0,5 µl RiboLock RNase Inhibitor und 0,1 µl Maxima Reverse Transkriptase gegeben und bei 25°C 10 min lang inkubiert. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei 50°C bevor die Reaktion bei 85°C 5 min gestoppt wurde. Die cDNA-Proben wurden bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Mit Ausnahme der Analyse von miRNAs, wurden alle RNA-Isolate nach diesem Protokoll in cDNA umgeschrieben.

#### **2.2.4.4 cDNA-Synthese mittels TaqMan Assay**

Zur Synthese von cDNA zur Analyse von miRNAs aus Gesamt-RNA-Isolaten, wurde das *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription* Kit verwendet. Die PCR-Reagenzgefäße wurden vor der Verwendung zunächst einem UV-Crosslinking unterzogen. Pro Ansatz wurden 500 ng RNA verwendet und mit 1 µl RNU6B-Primer sowie 1 µl miR-375-Primer vermischt. Der RT-Mastermix wurde dem Herstellerprotokoll entsprechend hergestellt und 7 µl des Mastermixes zu dem Probenansatz gegeben. Die Reverse Transkription wurde in einem Thermocycler entsprechend dem Herstellerprotokoll durchgeführt.

#### **2.2.4.5 Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR)**

Zur Durchführung der qRT-PCR wurden die cDNA-Proben 1:10 in Nukleasefreiem Wasser verdünnt. Die Herstellung eines Mastermixes wurde entsprechend den Angaben in Tabelle 9 durchgeführt. Spezifische Primer und Sonden wurden mithilfe der *Universal Probe Library*, wie in Tabelle 5 dargestellt, ausgewählt.

In eine 96-Well Platte wurden jeweils 15 µl des Mastermixes zu 5 µl der Probe gegeben und die Proben mithilfe des *LightCycler® 480* unter den in Tabelle 10 bzw. Tabelle 11 beschriebenen Konditionen gemessen. Wenn vorhanden, wurde ein Standard des Zielgens mit definierter Kopienzahl pro 5 µl verwendet, um eine genaue Berechnung der Kopienzahl in den Proben zu ermöglichen. Das Haushaltsgen  $\beta$ -Aktin wurde zur Normalisierung der Ergebnisse verwendet. Die relative Expression eines Zielgens wurde als Quotient aus Zielgenexpression zu Haushaltsgenexpression dargestellt und auf einen Kontrollwert normiert.

**Tabelle 9: Reagenzien und Konzentrationen zur Herstellung eines qRT-PCR-Mastermixes**

<b>Reagenz</b>	<b>Endkonzentration</b>	<b>Volumen pro Well einer 96-Well Platte</b>
MgCl <sub>2</sub>	siehe Tabelle 5	
10× Taq Puffer	1×	2 µl
TE-SS (40 ng/µl)	2 ng/µl	1 µl
DMSO	5 %	1 µl
Tween20 (10 %)	0,5 %	1 µl
BSA (20 ng/µl)	0,5 ng	0,5 µl
dNTP (10 mM)	200 nmol	0,4 µl
Sonde (1 mM)	20 nmol	0,4 µl
<i>Forward</i> -Primer (10 µM)	250 nmol	0,5 µl
<i>Reverse</i> -Primer (10 µM)	250 nmol	0,5 µl
<i>Taq</i> Polymerase (5 U/µl)	0,5 U	0,1 µl
H <sub>2</sub> O		ad 15 µl

**Tabelle 10: Thermocycler-Konditionen zur qRT-PCR-Analyse**

<b>Programm</b>	<b>Funktion</b>	<b>Temperatur (°C)</b>	<b>Dauer</b>	<b>Zyklen</b>
<i>Pre-incubation</i>		95	10 min	1
<i>Touchdown</i>	Denaturierung	95	5 sec	10
	Primerhybridisierung	65	5 sec	
	Primerhybridisierung	62	10 sec	
<i>Amplification</i>	Denaturierung	95	15 sec	45
	Primerhybridisierung	55	30 sec	
	Elongation	62	30 sec	
<i>Cooling</i>		37	30 sec	1
		4	∞	

**Tabelle 11: Thermocycler-Konditionen zur qRT-PCR-Analyse von miRNAs**

Programm	Funktion	Temperatur (°C)	Dauer	Zyklen
<i>Pre-incubation</i>		95	10 min	1
<i>Touchdown</i>	Denaturierung	95	15 sec	45
	Primerhybridisierung	60	1 min	
<i>Cooling</i>		37	1 min	1
		4	∞	

### 2.2.5 Statistische Analyse

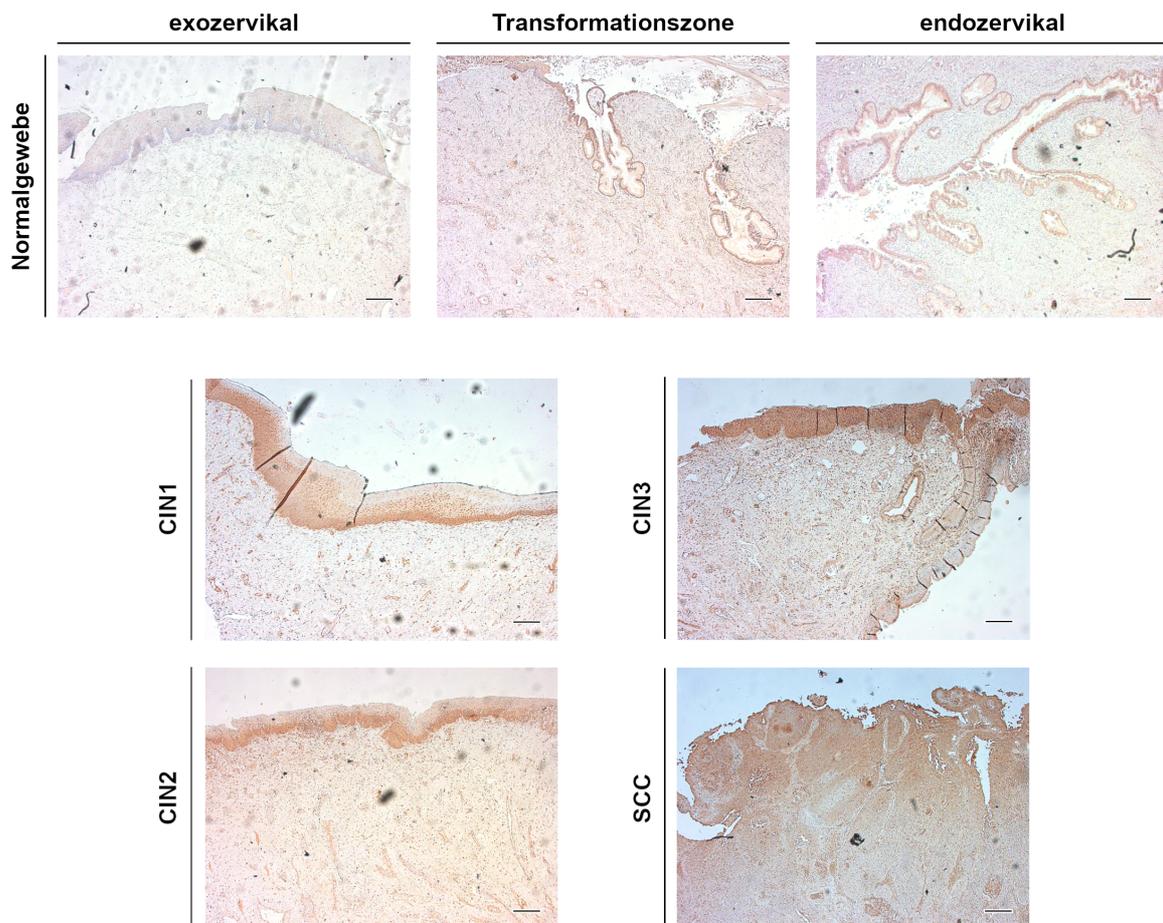
Die statistische Analyse der Ergebnisse wurde mithilfe der Software GraphPad Prism 8.0 durchgeführt. Unterschiede zwischen zwei unterschiedlichen Sets unabhängiger Proben mit parametrischer Normalverteilung wurden mit dem ungepaarten *t*-Test analysiert. Unterschiede zwischen mehr als zwei, nicht-parametrischen Sets wurden mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests analysiert. Bei erfolgreicher Signifikanzprüfung im Kruskal-Wallis-Test wurde *post hoc* ein *Dunn's*-Test durchgeführt, um die *p*-Werte zwischen einzelnen Paaren zu bestimmen. Die Normalverteilung von Ergebnissen wurde mithilfe des Kolmogorov-Smirnoff-Tests bestimmt. Signifikanzen sind in Graphen mit Sternchen angegeben (\**p* < 0,05; \*\**p* < 0,01; \*\*\**p* < 0,001).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Charakterisierung von zervikalen Transformationszonen-Fibroblasten

##### 3.1.1 Expression des IL-6-Rezeptors gp80 im Zervixgewebe

Eine Analyse der *in-vivo*-Expression der IL-6-Rezeptoruntereinheit gp80 zeigte eine kontinuierliche Zunahme der Färbintensität vom Normalgewebe über CIN1 und CIN2 zur hochgradigen CIN3-Läsion (Abbildung 6). Die Expression nimmt dabei insbesondere in den Keratinozyten, aber auch im Stroma, zu. Zum zervikalen Plattenepithelkarzinom SCC nimmt die Expression von gp80 gegenüber der CIN3 hingegen wieder ab.



**Abbildung 6: Expression der IL-6-Rezeptoruntereinheit gp80 *in vivo***

FFPE-Schnitte von Gewebeproben der normalen Zervix, CIN1, CIN2 und CIN3 sowie dem Plattenepithelkarzinom der Zervix (SCC) wurden immunhistochemisch mit einem spezifischen gp80-

Antikörper gefärbt. Dargestellt ist jeweils eine repräsentative Färbung. Normalgewebe n=12, CIN1 n=10, CIN2 n=6, CIN3 n=19, SCC n=42. Maßstabsbalken 100  $\mu\text{m}$ .

Die Expression von gp80 im Zervixgewebe *in vivo* wurde im Detail von Frau Katharina Metzger im Rahmen ihrer Dissertation analysiert.

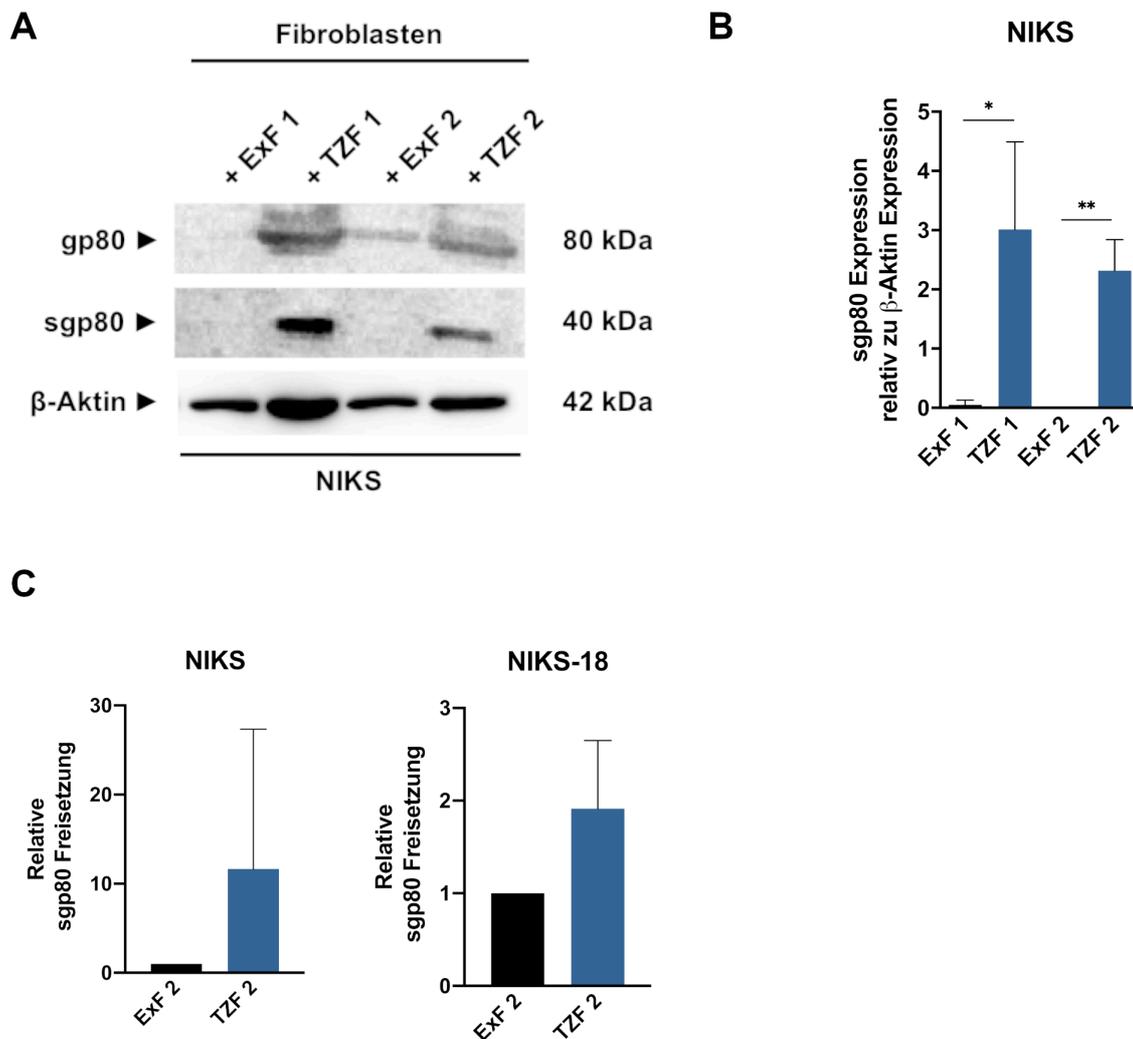
Auch innerhalb des Normalgewebes zeichnet sich eine unterschiedliche Färbintensität und Expression von gp80 ab. Es kommt insbesondere im Bereich um die Transformationszone zu einer leicht erhöhten Expression von gp80, sowohl im Epithel als auch im Stroma, gegenüber dem exozervikalen Gewebe.

### **3.1.2 In Gegenwart von Transformationszonen-Fibroblasten wird vermehrt lösliches sgp80 gebildet**

Mithilfe des organotypischen 3D-Kulturmodells sollte eine Analyse der Unterschiede zwischen Fibroblasten der Exozervix und der Transformationszone erfolgen. Hierzu wurden die organotypischen 3D-Kulturen in ihre einzelnen Kompartimente getrennt und dann analysiert. Dabei sollte ein möglichst stabiles Keratinozyten-System gewählt werden, welches eine möglichst genaue Analyse des Stromalen Kompartiments und dessen Effekte ermöglicht. Da primäre Zellen stetigen Veränderungen unterliegen, wurde die spontan immortalisierte Keratinozyten-Zelllinie NIKS als Konstante im System ausgewählt. Somit wurden auch Spenderunterschiede im epithelialen Kompartiment eliminiert. Die humane Vorkhaut-Keratinozytenzelllinie NIKS hat sowohl die Fähigkeit zur Differenzierung als auch zur Proliferation und eignet sich somit hervorragend zur Analyse des Einflusses Stromaler Zellen auf das Epithel.

Zur detaillierteren Analyse der Expression des IL-6-Rezeptors gp80 in den 3D-Kulturen in Ergänzung zur *in-vivo*-Analyse wurden die einzelnen 3D-Kultur-Kompartimente aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert (Abbildung 7 A und B). Die Gesamt-Expression von gp80 ist dabei in 3D-Kulturen mit TZ-Fibroblasten deutlich stärker. Der lösliche Rezeptor sgp80 einer Größe von 40 kDa konnte vor allem in den Fibroblasten-Kompartimenten mit TZ-Fibroblasten detektiert werden. Für die Spenderin 1 erfolgte dabei eine relative sgp80-Expression gegenüber  $\beta$ -Aktin von 3,01 in TZ-Fibroblasten, wohingegen in Ex-Fibroblasten eine 0,05-fache Expression gegenüber  $\beta$ -Aktin zu detektieren war (Abbildung 7 B).

Für die Spenderin 2 konnte in Ex-Fibroblasten mittels Western Blot keine sgp80-Expression detektiert werden, wohingegen die relative Expression in TZ-Fibroblasten hier das 2,3-Fache der  $\beta$ -Aktin Expression betrug (Abbildung 7 B). In beiden Spenderinnen erfolgte demnach eine signifikant stärkere Expression von sgp80 in TZ-Fibroblasten gegenüber den exozervikalen Fibroblasten.



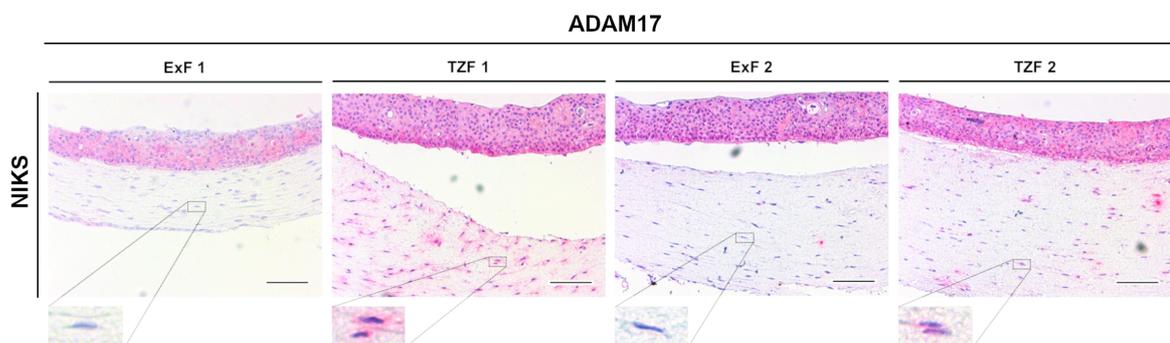
**Abbildung 7: Die Gegenwart von Transformationszonen-Fibroblasten führt zur Bildung von sgp80**

Organotypische 3D-Kulturen von NIKS-Zellen und unterschiedlichen exozervikalen (Ex) oder Transformationszonen (TZ) Fibroblasten wurden 14 Tage in FAD-Medium kultiviert und dann Keratinozyten-Kompartiment und Fibroblasten-Kompartiment voneinander gelöst. Aus dem Fibroblasten-Kompartiment wurde eine separate Proteinisolierung durchgeführt und diese Isolate mittels Western Blot auf die Expression von gp80 untersucht. (A) zeigt einen exemplarischen Western Blot von n=3. In (B) ist die statistische Auswertung von sgp80 in n=3 Western Blots relativ zu  $\beta$ -Aktin dargestellt. (C) Die Überstände von NIKS- und NIKS-18-3D-Kulturen wurden mittels ELISA auf die Freisetzung von löslichem sgp80 analysiert. Die Graphen stellen die Mittelwerte mit Standardabweichung von n=3 unabhängigen Experimenten dar. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, ungepaarter t-Test.

Auch in der Analyse der 3D-Kultur-Überstände zeigte sich eine deutliche Steigerung der Freisetzung von sgp80 in Gegenwart von TZ-Fibroblasten. In den Überständen von NIKS-3D-Kulturen kam es dabei zu einer 11,7-fach höheren, mittleren Freisetzung in TZ-Fibroblasten gegenüber Ex-Fibroblasten, wohingegen die mittlere Freisetzung in NIKS-18-3D-Kulturen um das 1,91-Fache höher lag (Abbildung 7C).

### 3.1.3 Erhöhte Expression der Metalloprotease ADAM17 in Transformationszonen-Fibroblasten

Nachdem eine höhere Expression des löslichen IL-6-Rezeptors sgp80 in Gegenwart von TZ-Fibroblasten gezeigt werden konnte, wurde die Expression der *Shedding*-Metalloprotease ADAM17 in organotypischen 3D-Kulturen untersucht (Abbildung 8). In NIKS-3D-Kulturen konnte eine stärkere ADAM17-Färbung in 3D-Kulturen mit TZ-Fibroblasten gegenüber solchen mit Ex-Fibroblasten beobachtet werden (Abbildung 8, untere Bildausschnitte). Die Expression im Epithel hingegen war weitestgehend gleich beziehungsweise lag bei TZ-Fibroblasten der Spenderin 1 leicht über der Expression in 3D-Kulturen mit Ex-Fibroblasten.



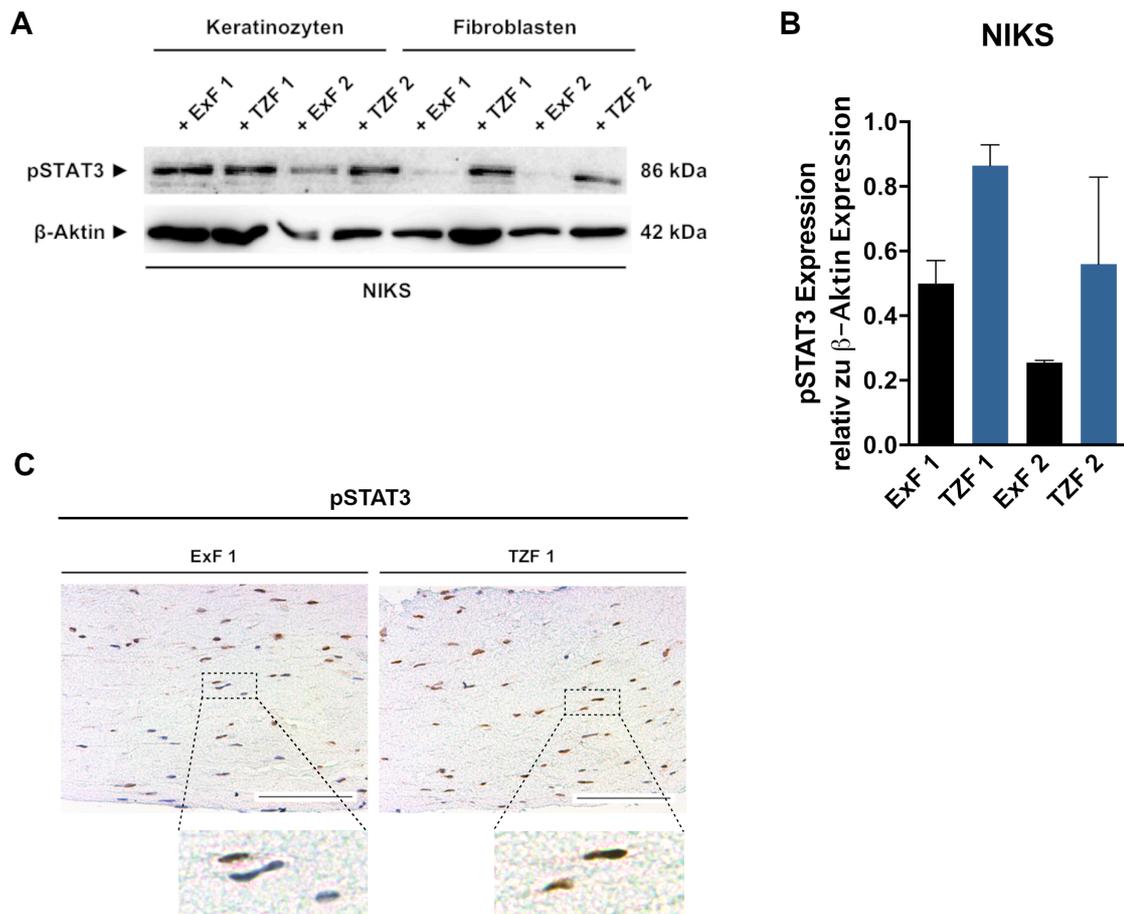
**Abbildung 8: Expression von ADAM17 in organotypischen 3D-Kulturen nimmt in Gegenwart von Transformationszonen-Fibroblasten zu**

Organotypische 3D-Kulturen von NIKS mit unterschiedlichen exozervikalen (Ex) oder Transformationszonen (TZ) Fibroblasten wurden 14 Tage in FAD-Medium kultiviert und anschließend immunhistochemisch für ADAM17 gefärbt. Dargestellt ist jeweils ein Versuch aus n=2 unabhängigen Experimenten. Maßstabsbalken 100 µm.

### **3.1.4 Aktivierung von pTyr705-STAT3 in Transformationszonen-Fibroblasten gleicht dem Verhalten von CAFs**

Da die IL-6-Signaltransduktion zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 führen kann und eine verstärkte Expression des löslichen IL-6-Rezeptors in TZ-Fibroblasten nachgewiesen werden konnte, wurde aktiviertes STAT3 in Form von pTyr705-STAT3 in den unterschiedlichen 3D-Kultur-Kompartimenten mittels Western Blot untersucht. In den Keratinozyten aus NIKS-3D-Kulturen zeigte sich zunächst kein Unterschied unter dem Einfluss exozervikaler und TZ-Fibroblasten (Abbildung 9 A). In den TZ-Fibroblasten hingegen zeigte sich eine deutliche Induktion der pTyr705-STAT3-Aktivierung gegenüber Ex-Fibroblasten der jeweils selben Spenderin (Abbildung 9 B). Dabei erfolgte in Ex-Fibroblasten der Spenderin 1 eine 0,5-fache Aktivierung von pTyr705-STAT3 gegenüber der  $\beta$ -Aktin-Expression und eine 0,87-fache Aktivierung gegenüber  $\beta$ -Aktin in TZ-Fibroblasten (Abbildung 9 B). Für die Spenderin 2 konnte eine 0,25-fache pTyr705-STAT3-Aktivierung in Ex-Fibroblasten und eine 0,56-fache Aktivierung in TZ-Fibroblasten gegenüber der  $\beta$ -Aktin-Expression detektiert werden (Abbildung 9 B). Demnach kam es in Fibroblasten der Spenderin 1 zu einer 1,73-fach stärkeren pTyr705-STAT3-Aktivierung in TZ-Fibroblasten gegenüber Ex-Fibroblasten und in der Spenderin 2 zu einer 2,2-fach stärkeren Aktivierung.

Die Aktivierung von STAT3 durch Phosphorylierung am Tyrosin-Rest 705 konnte auch in immunhistochemischen Färbungen der organotypischen 3D-Kulturen von NIKS-Zellen mit den jeweiligen Fibroblasten gesehen werden (Abbildung 9 C). Hier war die Intensität der Färbung in TZ-Fibroblasten gegenüber Ex-Fibroblasten deutlich erhöht.



**Abbildung 9: Aktivierung des Transkriptionsfaktors pSTAT3 in den Transformationszonen-Fibroblasten**

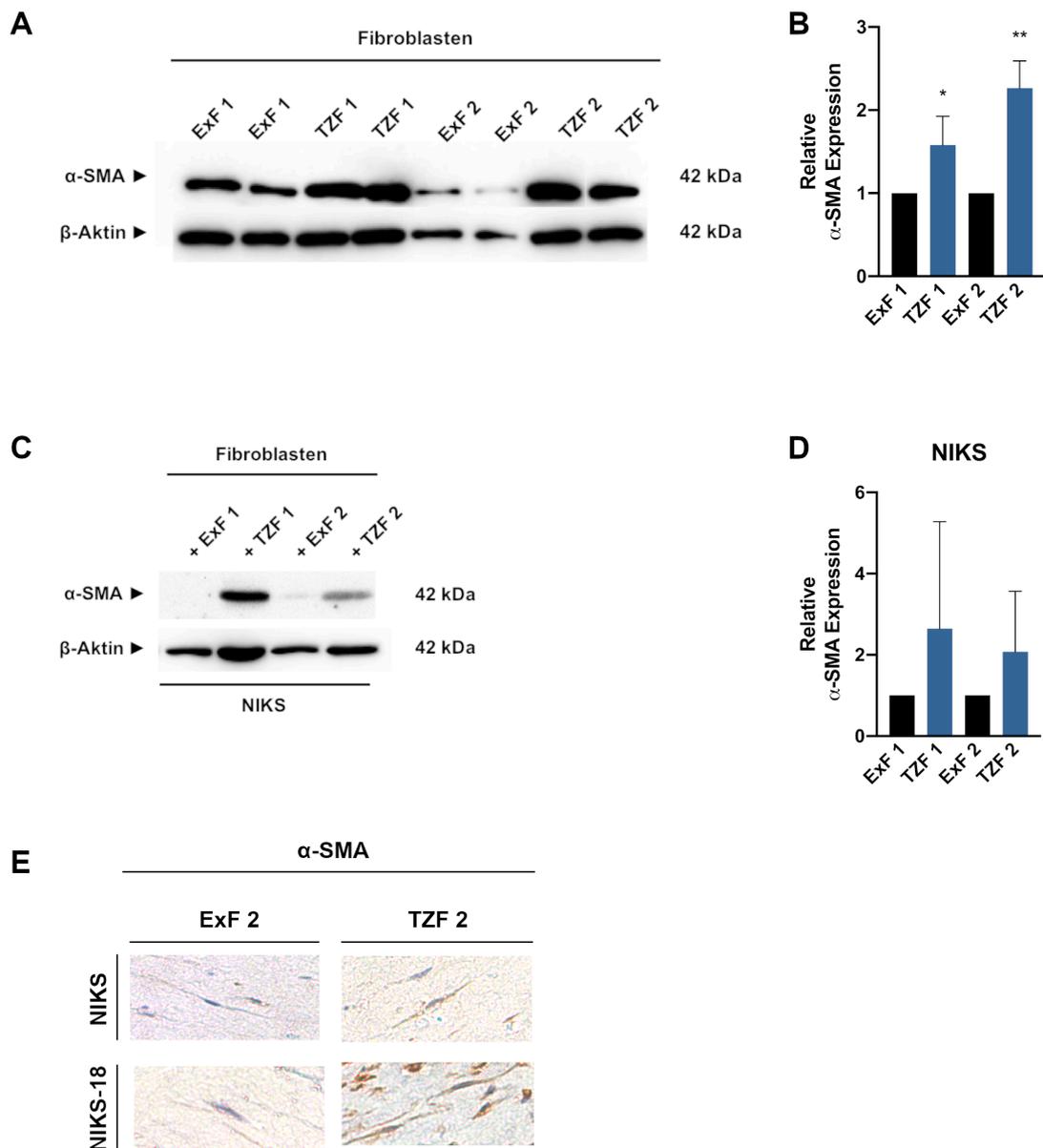
Organotypische 3D-Kulturen von NIKS-Zellen und unterschiedlichen exozervikalen (Ex) oder Transformationszonen (TZ) Fibroblasten wurden 14 Tage in FAD-Medium kultiviert und dann Keratinozyten-Kompartiment und Fibroblasten-Kompartiment voneinander gelöst. Aus dem Fibroblasten-Kompartiment wurde eine separate Proteinisolation durchgeführt und diese Isolate mittels Western Blot auf die Expression von pTyr705-STAT3 (hier abgekürzt als pSTAT3 bezeichnet) untersucht. (A) zeigt einen Versuch aus n=2 unabhängigen Experimenten. (B) zeigt die statistische Auswertung der pTyr705-STAT3-Expression in den Fibroblasten-Kompartimenten der NIKS-3D-Kultur von n=2 unabhängigen Experimenten. In (C) ist die immunhistochemische Färbung der organotypischen 3D-Kulturen mit einem spezifischen anti-pTyr705-STAT3-Antikörper dargestellt (n=3). Maßstabsbalken 100 µm.

### 3.1.5 Expression des CAF-assoziierten Markers $\alpha$ -SMA in Transformationszonen-Fibroblasten

Krebs-assoziierte Fibroblasten zeichnen sich durch ein besonderes Markerprofil aus. Unsere Arbeitsgruppe konnte dabei eine Veränderung der Expression in normalen Fibroblasten von NF- $\kappa$ B zu pTyr705-STAT3 in Krebs-assoziierten Fibroblasten nachweisen (Bastuck, 2016). Nachdem auch in den Fibroblasten der Transformationszone eine Aktivierung von pSTAT3 festgestellt werden konnte, wurde daher die Expression des CAF-assoziierten Markers  $\alpha$ -SMA in Ex- und TZ-Fibroblasten untersucht.

Bereits in 2D zeigte sich eine deutliche höhere  $\alpha$ -SMA-Expression in TZ-Fibroblasten bei beiden getesteten Spenderinnen um das 1,58- bis 2,26-Fache (Abbildung 10 A und B). Auch in den organotypischen 3D-Kulturen von NIKS-Zellen mit den jeweiligen Fibroblasten konnte mittels Western Blot eine deutlich höhere Expression von  $\alpha$ -SMA in TZ-Fibroblasten gegenüber Ex-Fibroblasten nachgewiesen werden (Abbildung 10 C). Die relative Expression betrug hier für TZ-Fibroblasten der Spenderin 1 das 2,65-Fache der Expression in Ex-Fibroblasten und für Fibroblasten der Spenderin 2 das 2,08-Fache (Abbildung 10 D).

Um auch einen Einfluss von HPV auf die  $\alpha$ -SMA-Expression in Fibroblasten zu untersuchen, wurden zudem immunhistochemische Färbungen der organotypischen 3D-Kulturen mit NIKS und NIKS-18 durchgeführt (Abbildung 10 E). In den Fibroblasten zeigte sich hier, ebenso wie bereits im Western Blot, eine höhere  $\alpha$ -SMA-Expression in TZ-Fibroblasten gegenüber Ex-Fibroblasten in Gegenwart von NIKS-Zellen (Abbildung 10 E, obere Reihe). Die Färbung in den organotypischen 3D-Kulturen mit NIKS-18 zeigten zudem, dass der Effekt der höheren  $\alpha$ -SMA-Expression in TZ-Fibroblasten gegenüber Ex-Fibroblasten hier noch weiter verstärkt ist (Abbildung 10 E, untere Reihe). Die höchste Expression erfolgte demnach in TZ-Fibroblasten in Gegenwart von NIKS-18.

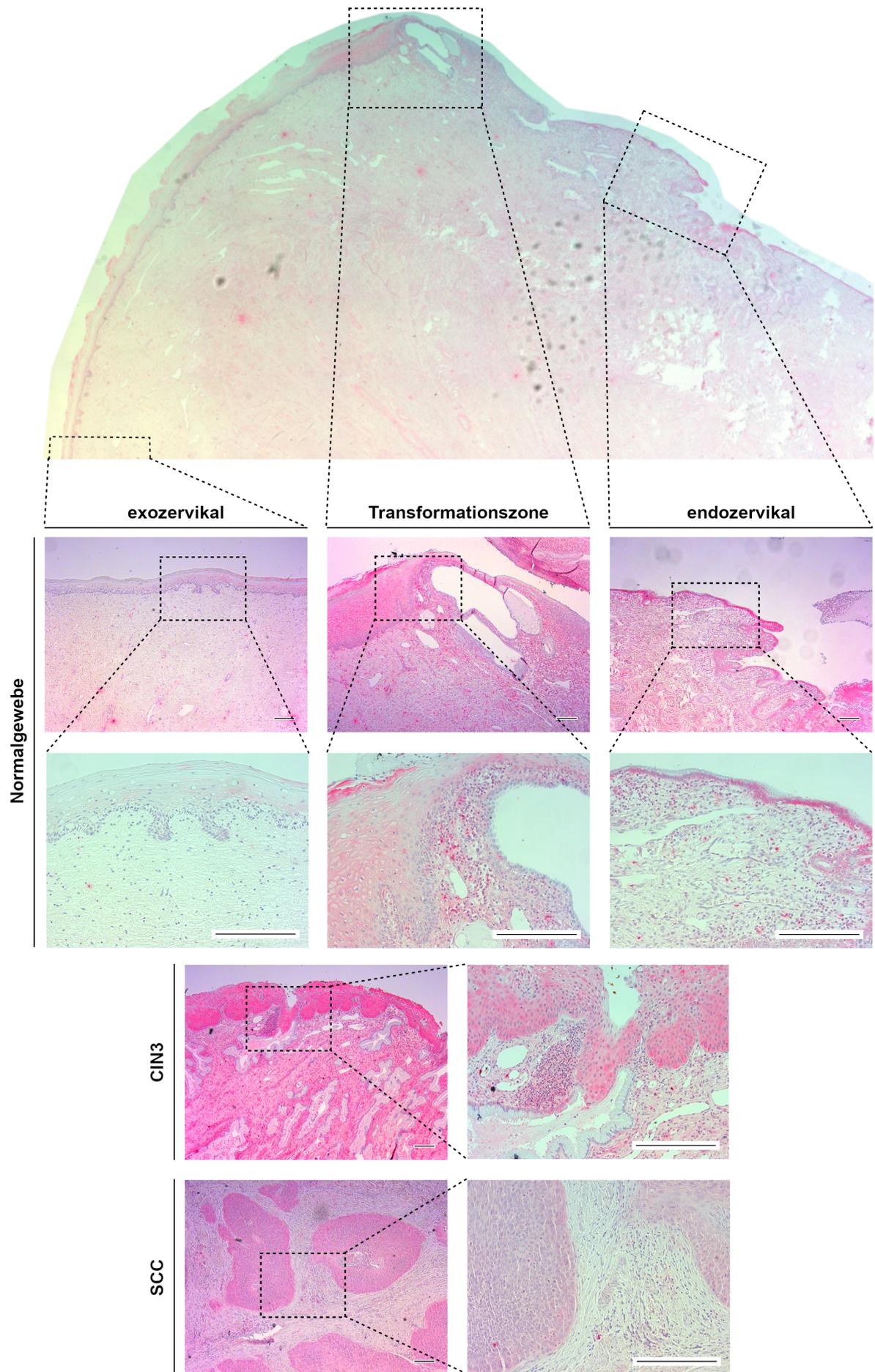


**Abbildung 10: Induktion des CAF-Markers  $\alpha$ -SMA in Transformationszonen-Fibroblasten**

(A, B) Aus exozervikalen (Ex) und Transformationszonen (TZ) Fibroblasten wurden Protein-Extrakte isoliert und diese mittels Western Blot auf die Expression von  $\alpha$ -SMA in 2D untersucht. (A) zeigt einen repräsentativen Versuch aus  $n \geq 3$  unabhängigen Experimenten. (B) zeigt die statistische Auswertung der  $\alpha$ -SMA-Expression in den Fibroblasten ( $n=3$ ). (C, D) Organotypische 3D-Kulturen von NIKS-Zellen und unterschiedlichen exozervikalen (Ex) oder Transformationszonen (TZ) Fibroblasten wurden 14 Tage in FAD-Medium kultiviert und dann Keratinozyten-Kompartiment und Fibroblasten-Kompartiment voneinander gelöst. Aus dem Fibroblasten-Kompartiment wurde eine separate Proteinisolierung durchgeführt und diese Isolate mittels Western Blot auf die Expression von  $\alpha$ -SMA untersucht. (C) zeigt einen repräsentativen Versuch aus  $n=3$  unabhängigen Experimenten. (D) zeigt die statistische Auswertung der  $\alpha$ -SMA-Expression in den Fibroblasten der NIKS-3D-Kultur ( $n=3$ ). (E) Organotypische 3D-Kulturen von NIKS- sowie NIKS-18-Zellen mit Ex- und TZ-Fibroblasten wurden nach 14-tägigem Wachstum in FAD-Medium immunhistochemisch für  $\alpha$ -SMA gefärbt. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von  $n=3$  unabhängigen Experimenten. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , ungepaarter t-Test.

### 3.1.6 Das Expressionsmuster von ADAM17 entspricht der Expression *in vivo*

Zur weiteren Untersuchung der ADAM17-Expression im Zusammenhang mit Transformationszonen-Fibroblasten der Zervix wurden FFPE-Gewebeschnitte angefertigt und mittels immunhistochemischer Färbung für ADAM17 analysiert. Dabei zeigte sich eine spezifische Zunahme der stromalen ADAM17-Expression von der Exozervix hin zur Transformationszone in derselben Spenderin (Abbildung 11, Übersichtsbild und obere Reihen). Auch im endozervikalen Bereich war eine stromale ADAM17-Expression zu beobachten, wenn auch schwächer als an der Transformationszone (Abbildung 11, Detailaufnahme zweite Reihe). Im Plattenepithel der Transformationszone sowie im endozervikalen Säulenepithel konnte eine verstärkte ADAM17-Expression detektiert werden. Dabei exprimierten im Plattenepithel vor allem basale und parabasale Zellen die Metalloprotease, während im endozervikalen Bereich häufig die Reservezellen eine Expression zeigten. Interessanterweise zeigte sich nicht nur eine räumliche Veränderung der ADAM17-Expression, sondern auch eine Veränderung während der zervikalen Karzinogenese. Hierbei war die Expression in CIN3-Läsionen im Vergleich zu Normalgewebe, sowohl stromal als auch im prä malignen Epithel, deutlich verstärkt (Abbildung 11, dritte Reihe). In Plattenepithelkarzinomen hingegen nahm die Expression von ADAM17 erneut ab (Abbildung 11, untere Reihe). Dieses spezifische Expressionsmuster, bei dem die Expression vom Normalgewebe hin zur CIN3 kontinuierlich zunimmt und zum invasiven Plattenepithelkarzinom hin wieder abnimmt, entspricht den früheren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe bei der Untersuchung der pTyr705-STAT3-Expression (Walch-Rückheim *et al.*, 2016).



**Abbildung 11: Zunahme der ADAM17-Expression von *in vivo***

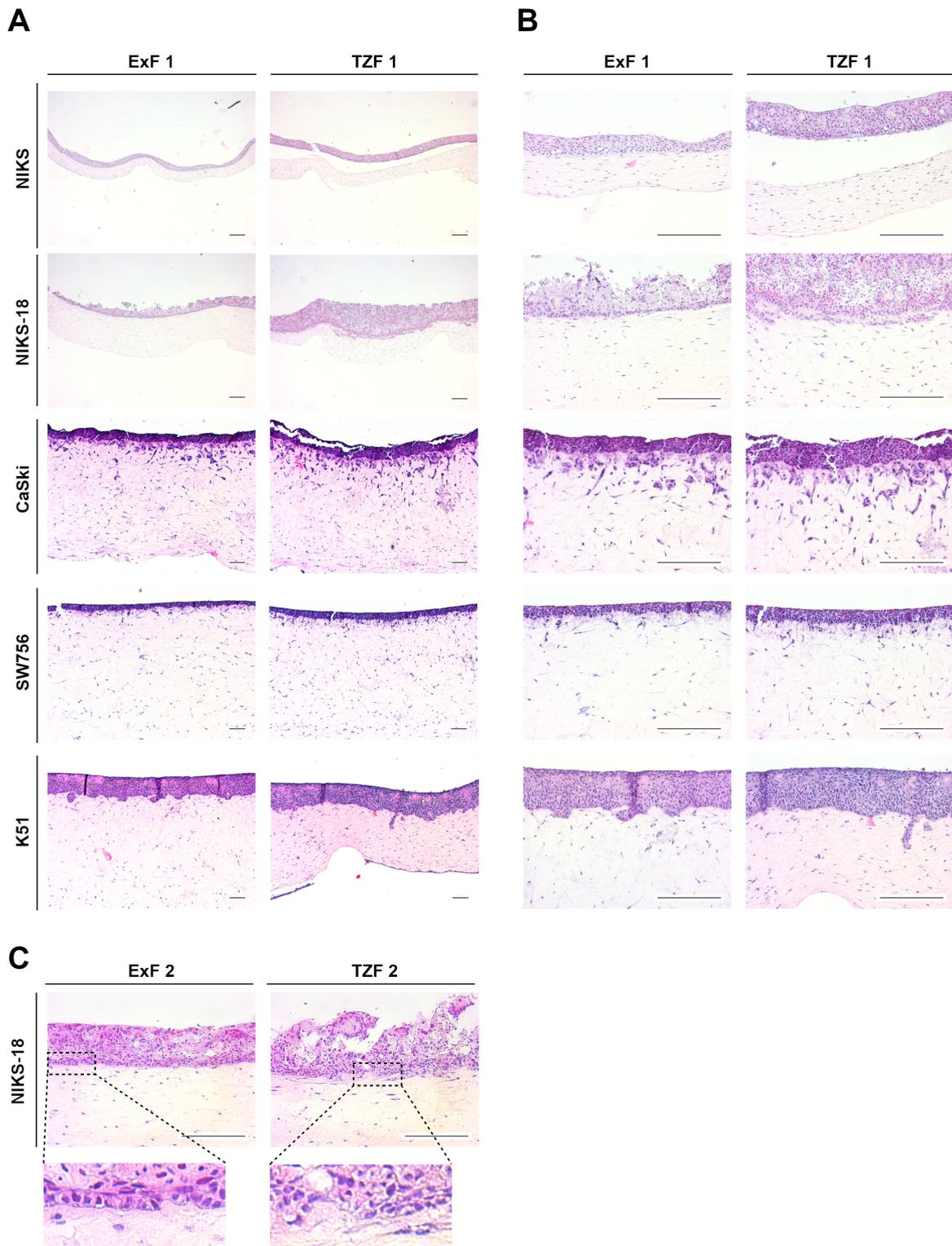
FFPE-Schnitte von Gewebeproben der normalen Zervix, CIN3 und dem Plattenepithelkarzinom der Zervix (SCC) wurden immunhistochemisch mit einem spezifischen ADAM17 Antikörper gefärbt. Für das Normalgewebe ist ein Übersichtsbild dargestellt, das aus mehreren Einzelbildern zusammengesetzt ist. Dargestellt ist jeweils eine repräsentative Färbung. Normalgewebe n=6, CIN3 n=3, SCC n=3. Maßstabsbalken 100  $\mu\text{m}$ .

**3.1.7 In Gegenwart von gerichtet angeordneten Transformationszonen-Fibroblasten kommt es korrelierend zum Verhalten von CAFs zum verstärkten Invasionsverhalten von Keratinozyten und einer diskontinuierlichen Basalmembran**

Nachdem sich in den Transformationszonen-Fibroblasten eine ähnliche Proteinsignatur im Vergleich zu CAFs gezeigt hat und die Expression der Metalloprotease ADAM17 nachgewiesen werden konnte, wurden organotypische 3D-Kulturen morphologisch auf ihre Invasivität untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Invasivität von NIKS-18, HPV16-positiven CaSki und HPV18-positiven SW756 in 3D-Kulturen mit TZ-Fibroblasten deutlich erhöht ist (Abbildung 12 A und B).

Krebs-assoziierte Fibroblasten können die Invasion und Migration von Tumorzellen fördern, indem sie die stromale Umgebung umstrukturieren und stromale Komponenten gerichtet anordnen sowie ein Metalloprotease-unabhängiges Durchbrechen der Basalmembran durch Ausübung von Zugkräften begünstigen (Attieh *et al.*, 2017; Glentis *et al.*, 2017). In diesem Zusammenhang wurden organotypische 3D-Kulturen auf Fibroblasten-abhängige Unterschiede bezüglich ihrer Morphologie untersucht. TZ-Fibroblasten zeigten, insbesondere in Gegenwart der HPV-transformierten NIKS-18 und der Zervixkarzinomzelllinie SW756, eine vertikale Ausrichtung im Kollagen-Fibroblasten Kompartiment, wohingegen Ex-Fibroblasten eine ungerichtete oder horizontale Anordnung zeigten (Abbildung 12 B). Insbesondere in NIKS- und NIKS-18-3D-Kulturen zeigte sich eine weniger starke Abgrenzung von Epithel und Kollagen-Fibroblasten-Kompartiment durch die Basalmembran in Gegenwart von TZ-Fibroblasten (Abbildung 12 C). Die Basalmembran erlaubt hier keine klare Abtrennung der beiden 3D-Kultur Bestandteile mehr, sondern zeigt eine weniger durchgehende, diskontinuierliche Morphologie. Zudem konnte gezeigt werden, dass Fibroblasten in direktem Kontakt mit dem Epithel standen. Die Effekte der Fibroblasten-Anordnung und der verstärkten Invasion zeigten sich jedoch bei 3D-Kulturen einiger Zelllinien wie den

HPV18-transformierten K51 nicht.



**Abbildung 12: Transformationszonen-Fibroblasten ordnen sich im organotypischen 3D-Kulturmodell gerichtet an und führen zu einer veränderten Struktur der Basalmembran**

(A, B) Organotypische 3D-Kulturen von NIKS, NIKS-18, CaSki, SW756 und K51 mit unterschiedlichen exozervikalen (Ex) oder Transformationszonen (TZ) Fibroblasten wurden 7 Tage in DMEM-Vollmedium (CaSki, SW756 und K51) oder 14 Tage in FAD-Medium kultiviert (NIKS, NIKS-18)

und mittels HE-Färbung morphologisch analysiert. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Versuch von n=3 unabhängigen Versuchen. In (C) ist eine vergrößerte Aufnahme der Basalmembran der NIKS-18-3D-Kulturen dargestellt. Maßstabsbalken 100 µm.

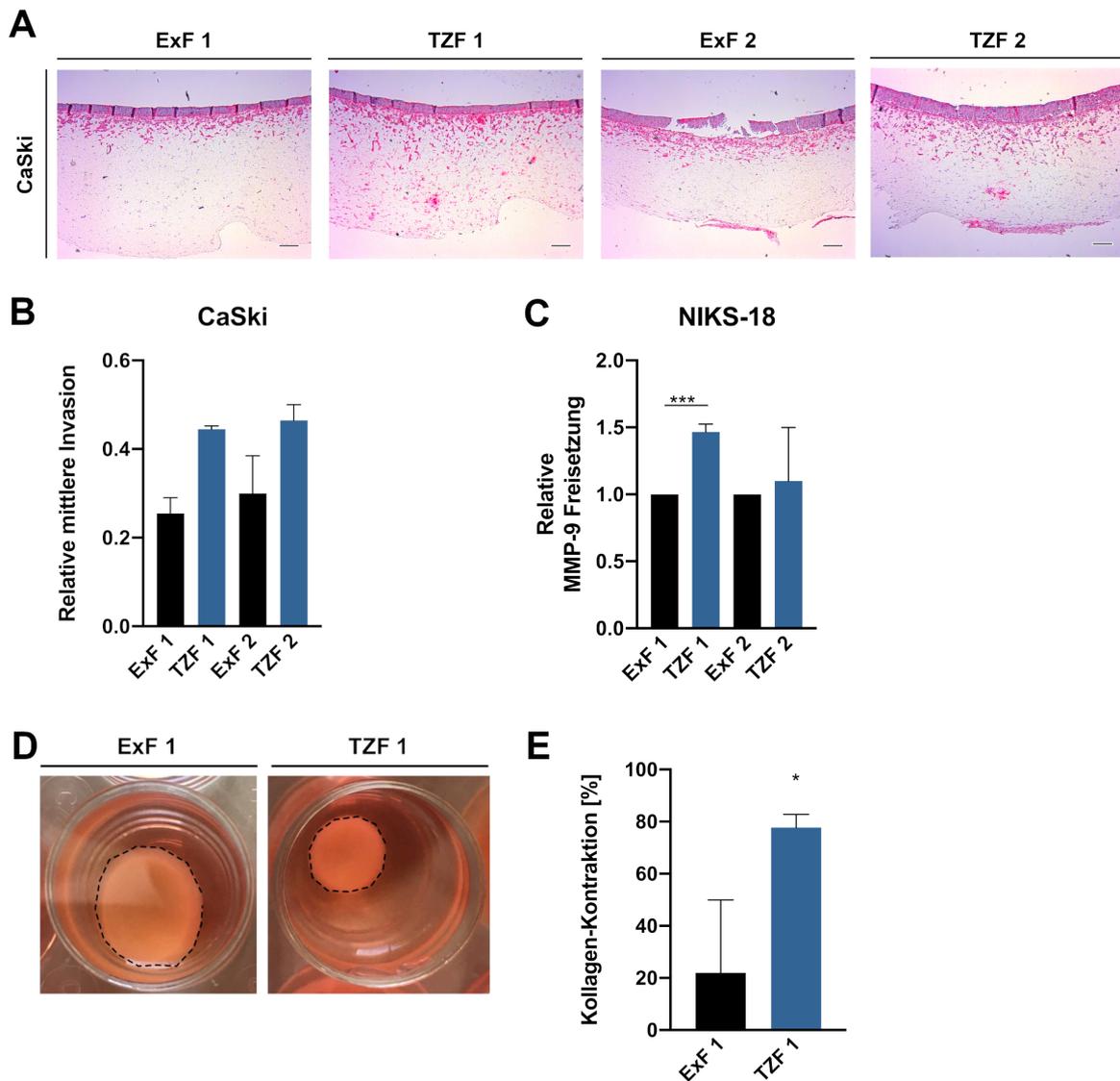
### **3.1.8 Transformationszonen-Fibroblasten fördern Invasion, Expression und Freisetzung von Metalloproteasen sowie eine verstärkte Kollagen-Kontraktion**

In Gegenwart von Transformationszonen-Fibroblasten war die Invasion von CaSki Zellen in organotypischen 3D-Kulturen stark erhöht (Abbildung 13 A). Die Messung und statistische Auswertung der mittleren Invasion (als Anteil an der gesamten 3D-Kultur) ergab eine Zunahme von 0,255 auf 0,455 für Fibroblasten der Spenderin 1 und eine Zunahme von 0,3 auf 0,465 für Fibroblasten der Spenderin 2 (Abbildung 13 B).

Zudem korrelierte die stärkere Invasion in CaSki-3D-Kulturen mit TZ-Fibroblasten mit einer stärkeren ADAM17-Expression in Fibroblasten und im invasiven Bereich der 3D-Kultur (Abbildung 13 A).

Neben ADAM17 ist auch die Matrixmetalloprotease MMP-9 an der Invasion unter anderem von Zervixkarzinomen beteiligt (Schröer *et al.*, 2011). Zur Analyse der MMP-9-Freisetzung in organotypischen NIKS-18-3D-Kulturen wurden die Überstände mittels ELISA untersucht. Hierbei zeigte sich eine 1,5-fach signifikant höhere MMP-9-Freisetzung in TZ-Fibroblasten gegenüber Ex-Fibroblasten der Spenderin 1 beziehungsweise eine 1,1-fach höhere MMP-9-Freisetzung in Fibroblasten der Spenderin 2 (Abbildung 13 C).

Um die Kontraktionsfähigkeit der Fibroblasten zu untersuchen, wurden Ex- und TZ-Fibroblasten in Kollagenmatrices eingebettet, mit HPV16-positiven CaSki kultiviert und die Veränderung der Oberfläche der Kollagenmatrices nach 3 Tagen analysiert (Abbildung 13 D). Hierbei ergab sich eine signifikante Zunahme der Kollagen-Kontraktion von 22 % bei Ex-Fibroblasten-Matrices auf 77,68 % bei TZ-Fibroblasten-Matrices (Abbildung 13 E).

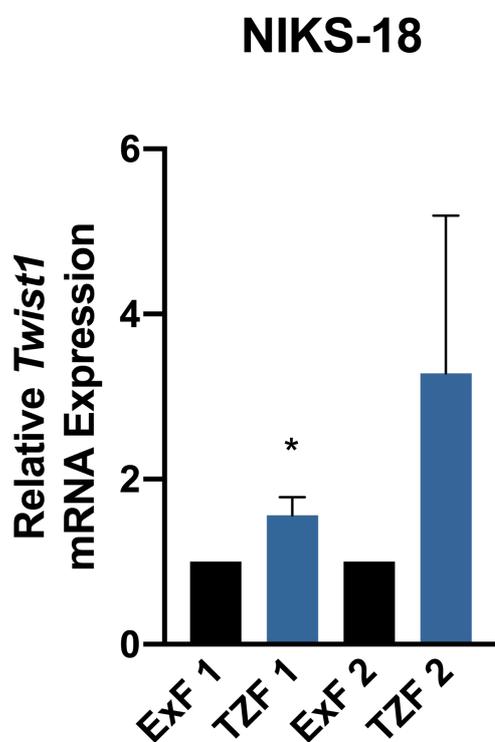


**Abbildung 13: Transformationszonen-Fibroblasten fördern Invasion, ADAM17 Expression, MMP-9-Freisetzung und Kollagen-Kontraktion**

(A) Organotypische 3D-Kulturen von CaSki mit unterschiedlichen exozervikalen (Ex) oder Transformationszonen (TZ) Fibroblasten wurden 14 Tage in FAD-Medium kultiviert und immunhistochemisch mit einem spezifischen ADAM17-Antikörper gefärbt. Dargestellt ist jeweils ein Versuch von n=2 unabhängigen Versuchen. (B) Die relative mittlere Invasion der Keratinozyten der in (A) dargestellten 3D-Kulturen wurde als Anteil an der organotypischen 3D-Kultur gemessen und statistisch ausgewertet (n=2). (C) Organotypische 3D Kulturen von NIKS-18 mit unterschiedlichen Ex- oder TZ-Fibroblasten wurden 7 Tage in FAD-Medium kultiviert und deren Überstände zur Analyse der MMP-9-Freisetzung mittels ELISA verwendet. Es erfolgte jeweils eine Normierung auf die Werte der 3D-Kultur-Überstände der exozervikalen Fibroblasten. Zusammengefasst sind n=3 unabhängige Versuche. (D) Ex- oder TZ-Fibroblasten wurden in eine Kollagen-Matrix eingebettet und nach einem Tag mit CaSki kokultiviert. Nach insgesamt dreitägigem Wachstum wurde die Kollagen-Kontraktion als Veränderung der Kollagenoberfläche bezogen auf die Anfangsoberfläche gemessen und statistisch analysiert (E). Zusammengefasst sind n=3 unabhängige Versuche. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, ungepaarter t-Test. Maßstabsbalken 100 µm.

### 3.1.9 Regulation von *Twist1* in Transformationszonen-Fibroblasten aus 3D-Kulturen mit NIKS-18

In vielen Karzinomen ist eine erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors *Twist1* zu verzeichnen (Kwok *et al.*, 2005; Sung *et al.*, 2011). Auch in CAFs einiger Gewebe konnte eine verstärkte *Twist1*-Expression nachgewiesen werden, wie zum Beispiel im Ösophagus (Yeo *et al.*, 2017). Vor diesem Hintergrund wurde die *Twist1*-mRNA-Expression in Fibroblasten aus NIKS-18-3D-Kulturen analysiert (Abbildung 14). Hierbei zeigte sich in TZ-Fibroblasten der Spenderin 1 eine 1,6-fach signifikant höhere *Twist1*-Expression gegenüber Ex-Fibroblasten. Für die Spenderin 2 zeigte sich eine 3,3-fach höhere Expression.

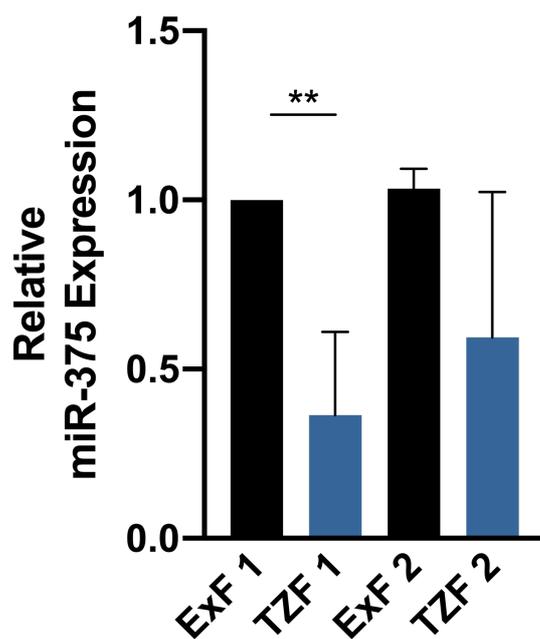


**Abbildung 14: Erhöhte Expression von *Twist1* -mRNA in Transformationszonen-Fibroblasten aus NIKS-18 3D-Kulturen**

Organotypische 3D-Kulturen von NIKS-18-Zellen und unterschiedlichen exozervikalen (Ex) oder Transformationszonen (TZ) Fibroblasten wurden 14 Tage in FAD-Medium kultiviert und dann Keratinozyten-Kompartiment und Fibroblasten-Kompartiment voneinander gelöst. Aus dem Fibroblasten-Kompartiment wurde eine RNA-Isolation durchgeführt und diese Isolate mittels qRT-PCR auf die Expression von *Twist1*-mRNA untersucht. Dargestellt ist die relative *Twist1*-mRNA-Expression normalisiert auf das Haushaltsgen RPL13A im Bezug zu den Ex-Fibroblasten der jeweiligen Spenderin. Zusammengefasst sind n=3 unabhängige Versuche. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, ungepaarter *t*-Test.

### 3.1.10 Regulation der miR-375-Expression in Transformationszonen-Fibroblasten

Um eine mögliche Regulation des Wnt-induzierbaren Transkriptionsfaktors *Twist1* zu klären, wurde die Expression der miR-375 in den Fibroblasten untersucht (Reinhold *et al.*, 2006). Ein Einfluss dieser auf den kanonischen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg konnte bereits zuvor gezeigt werden (Miao *et al.*, 2015). Verschiedene Studien konnten zudem eine Herabregulation der miR-375 in Plattenepithelkarzinomen zeigen (Ding *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2014). Auch unserer Arbeitsgruppe konnte eine 1,14-fach verringerte miR-375-Expression in zytologischen Abstrichen hochgradiger Läsionen (Pap IV a-p) gegenüber unauffälligen Abstrichen (Pap I) feststellen (Treitz, 2016). In TZ-Fibroblasten zeigte sich eine um das 0,37- (Spenderin 1, signifikant) beziehungsweise 0,59-fache (Spenderin 2) niedrigere miR-375 Expression gegenüber Ex-Fibroblasten derselben Spenderin (Abbildung 15).



**Abbildung 15: Suppression der miR-375 in Transformationszonen-Fibroblasten**

Fibroblasten verschiedener Spenderinnen wurden in einer Dichte von 100 000 Zellen pro Nöpfchen einer 12-Well Platte ausgesät und deren gesamte RNA nach 24h isoliert und mithilfe des *TaqMan* PCR Assays für die Expression der miR-375 untersucht. Der Graph stellt die relative miR-375-Expression normalisiert auf das Haushaltsgen RNU6B im Bezug zu den Ex-Fibroblasten der jeweiligen Spenderin dar. Zusammengefasst sind  $n \geq 3$  unabhängige Versuche. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , ungepaarter *t*-Test.

## 3.2 Charakterisierung und Vergleich spezifischer Nischen in der Zervix und der tonsillären Krypte

Da im Rahmen dieser Dissertation die Nische als Gesamtheit der einzelnen, in ihr enthaltenen Zellen beschrieben werden sollte, sollte auch ein Zusammenhang von Zellen im Stroma und epithelialen Zellen hergestellt werden. Daher wurde auch eine genauere Betrachtung verschiedener epithelialer Marker in der Zervix und tonsillären Krypte vorgenommen.

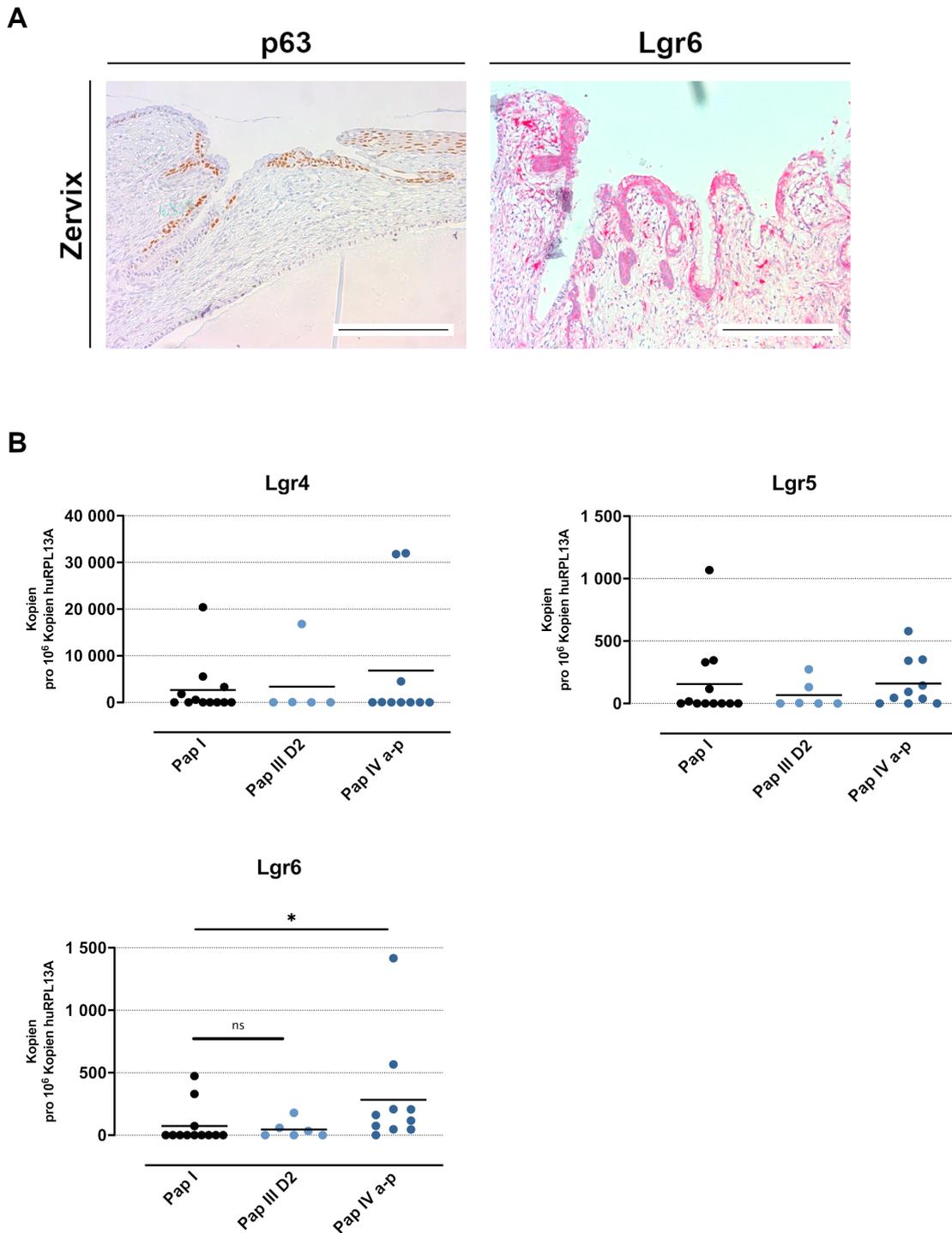
### 3.2.1 Die zervikale Nische ist durch die Expression von Lgr6 und p63 charakterisiert

Die Transmembran-Rezeptoren der Lgr (*leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptors*) Familie sind in einigen Gewebearten als Marker für Stammzellen beschrieben (Barker *et al.*, 2007; Jaks *et al.*, 2008; Guinot, Oeztuerk-Winder and Ventura, 2016). Auch in unserer Arbeitsgruppe wurden die Lgr-Proteine in der Zervix sowie der zervikalen Karzinogenese untersucht, wobei sich die Expression von Lgr6 während der gesamten zervikalen Karzinogenese zeigte und auch eine Expression von Lgr6 in Reservezellen nachgewiesen werden konnte (Kamionka, 2014).

In immunhistochemischen Färbungen von normalem Zervixgewebe zeigte sich eine Expression sowohl des Stammzellmarkers p63 als auch von Lgr6 in Reservezellen (Abbildung 16 A).

Als diagnostischer Goldstandard zur Früherkennung von Gebärmutterhalskrebs dient der sogenannte Pap-Abstrich, bei dem Zervixmaterial im Bereich der SCJ entnommen und lichtmikroskopisch analysiert wird. Eine weiterentwickelte Testmöglichkeit stellt die Dünnschichtzytologie dar, wie zum Beispiel das Thin-Prep<sup>®</sup>-Verfahren des Herstellers Hologic, bei der das entnommene Probenmaterial vor Auftragung auf den Objektträger in einer Fixierlösung fixiert wird. Das fixierte Probenmaterial kann gelagert und anschließend für weitere Tests herangezogen werden. Die Expressionsanalyse verschiedener Lgrs in diesen zytologischen Thin-Prep<sup>®</sup> Abstrichen zeigte eine signifikante Steigerung der LGR6-Expression in Pap IV a-p Abstrichen hochgradiger Läsionen mit einer mittleren Expression von 284 Kopien pro 10<sup>6</sup> Kopien RPL13A gegenüber normaler Pap I und niedriggradigerer

Pap II D2 Abstriche (Abbildung 16 B). Zwischen Pap I und Pap III D2 Abstrichen ebenso wie für *LGR4* und *LGR5* konnte keine signifikante Veränderung der Lgr-Expression festgestellt werden.



**Abbildung 16: Expression von Lgr6 und p63 charakterisiert die zervikale Nische**

(A) FFPE-Schnitte von Gewebeproben der normalen Zervix wurden immunhistochemisch mit spezifischen p63- und Lgr6-Antikörpern gefärbt. Dargestellt ist jeweils eine repräsentative Färbung. (B) RNA aus zytologischen ThinPrep® Abstrichen wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben

und die Expression von *LGR4*, *LGR5* und *LGR6* mittels qRT-PCR analysiert und jeweils auf das Haushaltsgen *RPL13A* normiert. Jeder Punkt repräsentiert eine Patientinnenprobe. Pap I: n=12, Pap IIID2: n=6, Pap IV a-p: n=10. Die in (B) dargestellten Daten sind im Rahmen meiner Masterarbeit untersucht worden (Treitz, 2016). Für jede Probengruppe ist der jeweilige Mittelwert im Graphen dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test und als Post-Test dem Dunn-Test zur Bestimmung von Signifikanzen.  $p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$ . Maßstabsbalken 100  $\mu\text{m}$ .

Eine genauere Analyse zeigte, dass eine *LGR6*-Expression in 25 % der Abstriche normaler Zytologie (Pap I), 50 % der Abstriche einer mäßigen Dysplasie (Pap III D2) und 90 % der Abstriche einer hochgradigen Läsion (Pap IV a-p) detektiert wurde (Tabelle 12).

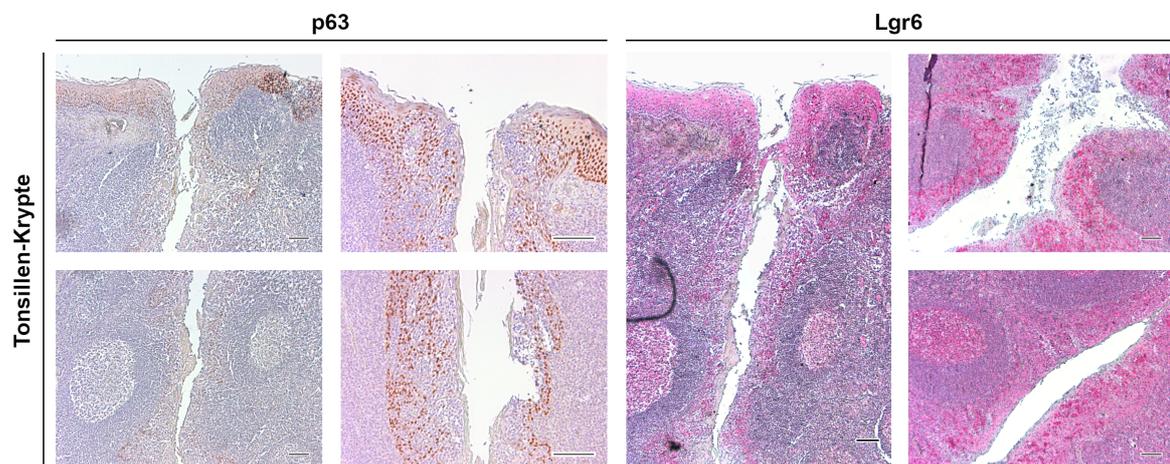
**Tabelle 12: Statistische Analyse der *LGR*-Genexpression in zytologischen Abstrichen der Zervix**

Relative Anzahl <i>LGR</i> -positiver Proben (% der Gesamt-Probenzahl)			
	<b>Pap I</b>	<b>Pap III D2</b>	<b>Pap IV a-p</b>
<i>LGR4</i>	5 (41,67 %)	1 (16,67 %)	3 (30 %)
<i>LGR5</i>	4 (33,33 %)	2 (33,33 %)	7 (70 %)
<i>LGR6</i>	3 (25 %)	3 (50 %)	9 (90 %)
Anzahl der Proben ( $\Sigma$ )	12	6	10

### 3.2.2 Die tonsilläre Nische weist dieselben Charakteristika der zervikalen Nische auf

Sowohl die tonsilläre Krypte als auch die zervikale Transformationszone gelten als möglicher Infektionsort für eine HPV-Infektion und weisen eine ähnliche Expression verschiedener, charakteristischer Marker auf (Morbini *et al.*, 2015). Die genauere Analyse der Expression der potentiellen Stammzellmarker p63 und Lgr6 zeigte ein ähnliches Expressionsmuster in Zervix und Tonsille (Abbildung 16 A, Abbildung 17). In der Tonsille geht am äußeren Teil der Krypte das mehrschichtige Plattenepithel in ein netzartiges Epithel aus einzelnen Keratinozyten entlang der Krypte über. Die Expression von p63 im Plattenepithel der Tonsille erfolgt hierbei ähnlich wie im zervikalen Plattenepithel an der Transformationszone in basalen und parabasalen Zellen (Abbildung 17). Auch in der Krypte selbst zeigte sich eine p63-Expression, allerdings nicht direkt an der Krypten-Oberfläche, sondern tiefer

im netzartigen Kryptenepithel. Auch die Expression von Lgr6 ähnelte sich in Tonsillen-Krypte und zervikaler Transformationszone (Abbildung 16 A und Abbildung 17, rechte Spalte). Im Bereich der Krypte kommt es zur verstärkten Lgr6-Expression im Vergleich zum umliegenden Stroma.



**Abbildung 17: Die zervikale und Krypten-Nische ähneln sich in Morphologie und Expression charakteristischer Marker**

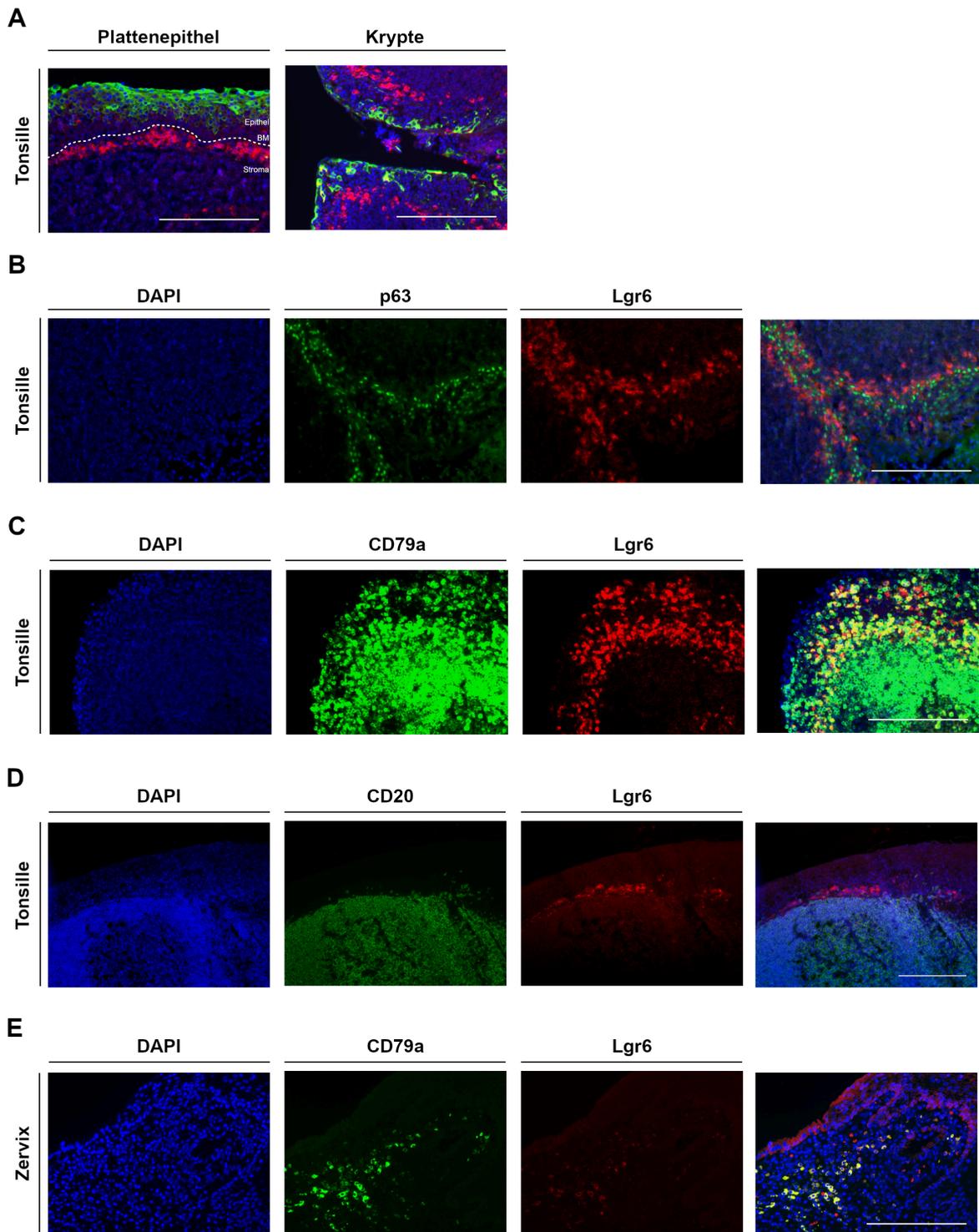
FFPE-Schnitte von Gewebeproben der normalen Gaumenmandel (A) und der normalen Zervix (B), wurden immunhistochemisch mit spezifischen p63- und Lgr6-Antikörpern gefärbt. Dargestellt sind jeweils repräsentative Färbungen von Tonsillengewebe (n=8). Maßstabsbalken 100  $\mu$ m.

### 3.2.3 Die Präsenz von subepithelialen CD79a<sup>+</sup>-Lgr6<sup>+</sup>-Zellen charakterisiert die HPV-susceptible Nische in Zervix und Tonsille

Nachdem eine ähnliche Morphologie und Expression verschiedener Proteine in der Zervix und der tonsillären Krypte gezeigt werden konnte, wurde eine genauere Analyse der Lgr6-Expression durchgeführt. Hierbei zeigten sich in der tonsillären Krypte zwei unterschiedliche Lokalisationen der Lgr6-Expression (Abbildung 18 A). Unterhalb der Basalmembran des Plattenepithels befinden sich in inselartiger Anordnung subepitheliale Lgr6<sup>+</sup>-Zellen. Eine zweite Lgr6<sup>+</sup>-Zellpopulation befindet sich entlang der tonsillären Krypten (Abbildung 17, Abbildung 18 A). Bei genauerer Betrachtung konnte mithilfe einer Ko-Immunfluoreszenz keine Ko-Lokalisierung der Lgr6- und p63-Expression festgestellt werden (Abbildung 18 B). Stattdessen sind die beiden Proteine in jeweils benachbarten Zellen exprimiert. Diese Beobachtung unterscheidete sich von der beobachteten Ko-Expression in zervikalen Reservezellen (Abbildung 16 A). Bei der anschließenden Analyse ver-

schiedener Marker erwies sich der B-Zellmarker CD79a als Protein, welches in den Lgr6<sup>+</sup>-subepithelialen Zellen ko-exprimiert wird (Abbildung 18 C). Die Lgr6<sup>+</sup>-Zellen entlang der tonsillären Krypte sind demnach keine Keratinozyten, sondern subepitheliale B-Zellen, die sich in direkter Nachbarschaft zu p63-positiven Zellen befinden. Eine Ko-Immunfluoreszenz von Lgr6 und dem B-Zellmarker CD20 zeigte jedoch keine Ko-Expression (Abbildung 18 D).

Immunhistochemische Färbungen von Lgr6 in der zervikalen Transformationszone zeigten, dass Lgr6 nicht nur in Plattenepithel- und Reservezellen exprimiert wird, sondern auch hier eine Lgr6-Expression im Stroma zu verzeichnen ist. Mittels Immunfluoreszenz-Färbung konnte die Existenz der subepithelialen CD79a<sup>+</sup>-Lgr6<sup>+</sup>-Zellpopulation auch an der zervikalen Transformationszone gezeigt werden (Abbildung 18 E).



**Abbildung 18: Subepitheliale CD79a<sup>+</sup>-Lgr6<sup>+</sup>-Zellen charakterisieren die HPV-susceptible Nische in Zervix und Tonsille**

FFPE-Schnitte von Gewebeproben der normalen Gaumenmandel (A-D) und der normalen Zervix (E), wurden mittels Ko-Immunfluoreszenz-Färbungen analysiert. (A) zeigt eine Ko-Färbung von Pan-Cytokeratin (grün), Lgr6 (rot) und DAPI (blau) einer tonsillären Krypte. Die gestrichelte Linie zeigt die Position der Basalmembran im Gewebe an. (B) zeigt eine Ko-Färbung von p63 (grün), Lgr6 (rot) und DAPI (blau), (C) eine Ko-Färbung von CD79a (grün), Lgr6 (rot) und DAPI (blau) einer tonsillären Krypte. (D) zeigt eine Ko-Immunfluoreszenz für CD20 (grün), Lgr6 (rot) und

DAPI (blau) einer tonsillären Krypte. (E) zeigt eine Ko-Färbung von CD79a (grün), Lgr6 (rot) und DAPI (blau) in der zervikalen Transformationszone. Dargestellt sind jeweils repräsentative Färbungen von (A) n=3, (B) n=3, (C) n=6, (D) n=1, (E) n=1. Maßstabsbalken 100 µm.

## 4 Diskussion

Die *squamocolumnar junction*, die den Übergang vom mehrschichtigem Platten- zum einschichtigem Säulenepithel der Zervix bildet, gilt bereits lange als potentieller Infektionsort für eine transformierende HPV-Infektion. Aufgrund ihrer ähnlichen Merkmale bezüglich HPV-Assoziation und morphologischer Gemeinsamkeiten rückt die Existenz einer möglichen Nische in Zervix und Tonsille immer mehr in den Fokus ätiologischer Studien. Sowohl in der zervikalen SCJ als auch in der tonsillären Krypte zeigte sich die Beteiligung spezialisierter Zellen an der HPV-Infektion und Karzinogenese (Martens *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2015; Mirkovic *et al.*, 2015). Herfs *et al.* postulierten die Expression einer bestimmten Marker-Signatur in spezialisierten Säulenepithelzellen, die eine besondere HPV-Suszeptibilität zeigten. Diese Marker würden demnach auch in Zervixkarzinomen vermehrt exprimiert. Die Untersuchung dieser Markerproteine in der tonsillären Krypte und im Tonsillenkarzinom zeigte eine partielle Expression mehrerer Marker, wobei jedoch keine Zellen identifiziert werden konnten, die die vollständige Signatur exprimierten (Morbini *et al.*, 2015).

Sowohl die zervikale SCJ als auch die obere tonsilläre Krypte stellen einen Übergang vom mehrschichtigem Plattenepithel zu einem einschichtigen Säulenepithel beziehungsweise retikulären Epithel dar. Auch aufgrund dieser morphologischen Gemeinsamkeiten ist die Existenz einer gemeinsamen Nische, die zur HPV-Suszeptibilität und Karzinogenese in beiden Geweben beiträgt, vorstellbar.

Um zunächst die zervikale Nische weiter zu charakterisieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit Fibroblasten der Transformationszone analysiert. Diese bezeichnet den Bereich zwischen der ursprünglichen SCJ und der nach metaplastischen Veränderungen verlagerten SCJ und umfasst somit einen räumlich größeren epithelialen und stromalen Bereich der Zervix als die eigentliche SCJ (Singer, 1975). Im Bereich der Transformationszone ist folglich auch das Stroma unterhalb der ursprünglichen SCJ vor metaplastischen Veränderungen eingeschlossen, wodurch eine detailliertere Analyse ermöglicht wird. Insbesondere das Vorkommen potentieller Stammzellen legt eine besondere Vulnerabilität der Transformationszone nahe (Smedts *et al.*, 1992; Martens *et al.*, 2004). Zur

Untersuchung der Transformationszonen-Fibroblasten wurden unter anderem organotypische 3D-Kulturen herangezogen. Da Humane Papillomviren an die natürliche Differenzierung eines Epithels gebunden sind, besteht die Notwendigkeit eines adäquaten Zellkulturmodells zur Analyse HPV-induzierter Veränderungen (Taichman, Reilly and LaPorta, 1983; Lambert *et al.*, 2005).

Organotypische 3D-Kulturen der immortalisierten humanen Keratinozytenzelllinie NIKS, welche normale Differenzierungseigenschaften besitzen, ermöglichten eine Trennung von Keratinozyten-Kompartiment und Fibroblasten-Kompartiment zur weiteren Analyse der einzelnen Bestandteile. Die getrennte Analyse der Zellen beider Kompartimente mittels Western Blot und qRT-PCR erlaubt eine exaktere Charakterisierung im Vergleich zur 2D-*in-vitro*-Analyse. Mithilfe dieses Systems werden gegenseitige Interaktionen bei der Untersuchung von Zellen berücksichtigt und die *in-vivo*-Situation genauer wiedergespiegelt.

#### **4.1 ADAM-Metalloprotease-vermitteltes *Shedding* des löslichen IL-6-Rezeptors sgp80 in Transformationszonen-Fibroblasten**

Das pleiotrope Zytokin IL-6 ist in vielen Gewebetypen und Karzinomen von großer Bedeutung, wie zum Beispiel in Myelomen und Nierenkarzinomen (Kawano *et al.*, 1988; Miki *et al.*, 1989). Dabei hat IL-6 meist eine tumorfördernde Funktion, wie beispielsweise in Brust- und Hautkarzinomen, wo es das maligne Wachstum fördern kann, indem es sowohl auto- als auch parakrine Zytokine reguliert (Sansone *et al.*, 2007; Lederle *et al.*, 2011). Auch in der Zervix zeigte sich eine Beteiligung des IL-6-Signalweges in der zervikalen Karzinogenese (Hess *et al.*, 2000). HPV-transformierte Keratinozyten produzieren verstärkt IL-6, welches parakrin an der Regulation der chronischen Inflammation im Tumorstroma beteiligt ist (Smola, 2019). Es kommt zu einer IL-6-vermittelten STAT3-Aktivierung in inflammatorischen Monozyten, welche wiederum zu einer autokrinen CCL2-vermittelten MMP-9-Produktion führt und maßgeblich an der Umgestaltung der extrazellulären Matrix beteiligt ist (Schröer *et al.*, 2011). Gleichzeitig wird eine autokrine Stimulation der Zervixkarzinomzellen durch den Verlust der IL-6-Rezeptoruntereinheit gp80 verhindert und so eine konstitutive Produktion des

*monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) unterbunden (Hess *et al.*, 2000). Diese balancierte Regulation ermöglicht ein Entkommen der Tumorzellen vor der Immunantwort.

Die Analyse der Expression der IL-6 $\alpha$ -Untereinheit gp80 im Zervixgewebe zeigte eine stetige Zunahme vom Normalgewebe über die niedriggradigen Vorstufen CIN1 und CIN2 zur hochgradigen Läsion CIN3 – sowohl im Epithel als auch in geringerem Maße im Stroma. Zum invasiven Plattenepithelkarzinom nahm die Expression von gp80 dann wieder leicht ab. Dieses Expressionsmuster entspricht dem von pTyr705-STAT3 in der Zervix und zeigt die Bedeutung von gp80 in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 im Zervixgewebe (Walch-Rückheim *et al.*, 2016). Auch im Normalgewebe konnte eine differenzielle Expression von gp80 beobachtet werden. Während im exozervikalen Epithel eine äußerst geringe bis keine Expression von gp80 zu verzeichnen war, nahm die Expression an der Transformationszone sowohl im Epithel als auch leicht im Stroma zu. Im Bereich der Endozervix nahm die gp80-Expression hingegen vor allem im Stroma wieder leicht ab.

Um eine genauere Betrachtung der gp80-Expression *in vivo* zu ermöglichen und Epithel und Stroma separat nachzuahmen und zu analysieren, wurden organotypische 3D-Kulturen zur Analyse herangezogen.

In Abwesenheit der IL-6-bindenden IL-6 $\alpha$ -Untereinheit gp80 hat die ubiquitär exprimierte IL-6 $\beta$ -Untereinheit gp130 keine IL-6-Affinität. Eine IL-6-vermittelte Signaltransduktion kann somit ausschließlich in Gegenwart von gp80 erfolgen (Taga *et al.*, 1989). Allerdings besteht durch die Komplexbildung von IL-6 und einer – unter anderem in Blut und Serum zirkulierenden – löslichen Rezeptoruntereinheit sgp80 (*soluble* gp80) die Möglichkeit der IL-6-Signaltransduktion. Dieser Komplex kann dann mit hoher Affinität, in einem Vorgang der als *Trans-Signaling* bezeichnet wird, an gp130 binden.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnte eine deutlich erhöhte Expression von sgp80 in Fibroblasten-Kollagen-Kompartimenten organotypischer 3D-Kulturen in Gegenwart von Fibroblasten der Transformationszone gezeigt werden, wohingegen sich in entsprechenden Kompartimenten mit exozervikalen Fibroblasten kein sgp80 nachweisen ließ. Die organotypische 3D-Kultur bietet hierbei den erheblichen Vorteil gegenüber 2D-*in-vitro*-Versuchen, dass auch freigesetzte,

lösliche Faktoren innerhalb der 3D-Kultur detektiert werden können. Ob das im Fibroblasten-Kollagen-Kompartiment befindliche sgp80 von den Keratinozyten oder Fibroblasten freigesetzt wird, muss in weiteren Versuchen untersucht werden. Auch in Zellkulturüberständen sowohl von NIKS- als auch NIKS-18-3D-Kulturen konnte eine deutlich erhöhte Freisetzung von sgp80 in Gegenwart von Transformationszonen-Fibroblasten detektiert werden, wobei die Expression in NIKS-3D-Kulturen deutlich höher war als in solchen mit NIKS-18. Hierdurch zeigt sich, dass die sgp80-Freisetzung sowohl eine Bedeutung in der interzellulären Kommunikation zwischen Keratinozyten und Fibroblasten als auch bei der Beeinflussung des Mikromilieus durch distale Weiterleitung haben kann.

Die lösliche Form des IL-6R wird überwiegend durch proteolytische Spaltung des membrangebundenen gp80 kontrolliert synthetisiert (Althoff *et al.*, 2000). Diese proteolytische Spaltung von gp80 erfolgt zwischen den Aminosäureresten Pro-355 und Val-356 und erfordert die Glykosylierung nahe der Schnittstelle (Müllberg *et al.*, 1994; Riethmueller *et al.*, 2017). An der proteolytischen Spaltung von Transmembranproteinen sind sogenannte *Sheddases* beteiligt, die sowohl Rezeptoren, wie IL-6R und CD40, als auch lösliche Faktoren, wie das Zytokin TNF- $\alpha$ , freisetzen können (Black *et al.*, 1997; Contin *et al.*, 2003; Schumacher *et al.*, 2015). Die Metalloprotease ADAM17 ist das vorrangig für die als *Shedding* bezeichnete proteolytische Freisetzung von sgp80 verantwortliche Enzym (Müllberg *et al.*, 1993). Analog zur Induktion von löslichem sgp80 in Gegenwart von Transformationszonen-Fibroblasten kommt es in diesen zu einer erhöhten Expression von ADAM17 im 3D-Kulturmodell sowohl mit HPV-negativen NIKS als auch HPV16-positiven CaSki. Demnach kann die Freisetzung von sgp80 im 3D-Kulturmodell durch das ADAM17 der Transformationszonen-Fibroblasten vermittelt sein. Auch *in vivo* zeigte sich eine verstärkte Expression von ADAM17 im Bereich der Transformationszone, was die mögliche Bedeutung der Metalloprotease in der *Shedding*-vermittelten sgp80-Freisetzung in der Zervix hervorhebt.

ADAM17 wurde ursprünglich als wichtiger Faktor bei der Prozessierung von TNF- $\alpha$  identifiziert und als *tumor necrosis factor- $\alpha$  converting enzyme* (TACE) bezeichnet (Kriegler *et al.*, 1988). Neben ADAM17 kann auch ADAM10 am IL-6-*Trans-Signaling* beteiligt sein (Garbers *et al.*, 2011). Insgesamt hat ADAM17 mehr als 80 Substrate, neben TNF $\alpha$  und IL-6R $\alpha$  unter anderem auch EGFR (Zunke and Rose-John, 2017). ADAM10 ist zudem an der Regulation von Notch, welches das

Zellschicksal während der Entwicklung bestimmt, und E- sowie N-Cadherin beteiligt (Maretzky *et al.*, 2005; Reiss *et al.*, 2005; van Tetering *et al.*, 2009; Groot *et al.*, 2014). ADAM-Proteasen zeichnen sich durch eine N-terminale Pro-Domäne aus, welche durch die Proprotein-Konvertase Furin gespalten werden muss, um eine proteolytisch aktive ADAM-Protease zu induzieren (Srouf *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 2015). Um ihre enzymatische Aktivität auszuüben, muss ein Transport der ADAM-Proteasen zur Zellmembran erfolgen (Matthews *et al.*, 2017). Die daran beteiligten Faktoren unterscheiden sich für ADAM10 und ADAM17. So assoziiert ADAM10 mit Vertretern der TetraspaninC8-Gruppe (TSpan) zu Nanoclustern, wohingegen es bei ADAM17 zu einer Assoziation mit den inaktiven Rhomboiden iRhom1 und iRhom2 kommt (Adrain *et al.*, 2012; Haining *et al.*, 2012). Es kommt zum Austritt aus dem endoplasmatischen Retikulum, der enzymatischen Reifung und Furin-abhängigen Aktivierung im Golgi sowie letztlich zum Transport zur Zellmembran.

Ob es tatsächlich zu einer proteolytischen Spaltung von gp80 an der Zellmembran der Transformationszonen-Fibroblasten kommt, muss weiter untersucht werden. Da sgp80 im gesamten Fibroblasten-Kollagen-Kompartiment nachgewiesen wurde, ist auch eine proteolytische Spaltung von der Zellmembran der Keratinozyten denkbar, wodurch das lösliche sgp80 für die Fibroblasten zur Verfügung stünde und es zur STAT3-Aktivierung kommen kann. Die Untersuchung der Proteinisolate aus Fibroblasten-Kollagen-Kompartimenten von NIKS-3D-Kulturen zeigte die Expression von membrangebundenen gp80 sowohl in exozervikalen als auch in Transformationszonen-Fibroblasten. Das IL-6-*Trans-Signaling* bewirkt eine deutlich stärkere Signaltransduktion als der klassische IL-6-Signalweg und kann nachgeschaltete Faktoren deutlich schneller beeinflussen (Reeh *et al.*, 2019).

In verschiedenen Körperflüssigkeiten wie Plasma, Urin und dem Serum von Tumor-PatientInnen konnte ein Vorkommen von extrazellulären Vesikeln (EV) nachgewiesen werden (Pisitkun, Shen and Knepper, 2004; Caby *et al.*, 2005; Taylor and Gercel-Taylor, 2008). Auch ADAM-Metalloproteasen können in solchen EVs vorkommen. So finden sich ADAM10-Exosomen unter anderem in Ovarialkarzinomen, wohingegen ADAM17-Exosomen neben dem Ovarialkarzinom vor allem von Lungenkarzinomzellen, Monozyten und Endothelzellen freigesetzt werden (Keller *et al.*, 2006; Stoeck *et al.*, 2006; Groth *et al.*, 2016). Metalloprotease-assoziierte Exosomen können ihre Funktionen auf unterschiedliche Weise ausüben (Shimoda

and Khokha, 2017). So kann es an den Exosomen selbst zur Umgestaltung der extrazellulären Matrix und der proteolytischen Spaltung und Freisetzung von Transmembranproteinen kommen. Daneben kann auch ein interzellulärer Transfer von Metalloproteasen auf Zielzellen stattfinden und dort das *Shedding* von Rezeptoren und Zytokinen induziert werden (Al-Nedawi *et al.*, 2008; Skog *et al.*, 2008). Die vielfältigen Möglichkeiten der Funktion von EV-vermittelten Metalloproteasen machen ihre große Bedeutung bei der Regulation des Mikromilieus deutlich.

Basierend auf den Beobachtungen, dass in Gegenwart von Transformationszonen-Fibroblasten verstärkt sgp80 freigesetzt wird, während membranständiges gp80 sowohl in exozervikalen als auch Transformationszonen-Fibroblasten exprimiert wird, ist ein Mechanismus des distalen *Sheddings*, wie im oberen Abschnitt beschrieben, denkbar. Im Gegensatz zu exozervikalen Fibroblasten exprimieren Transformationszonen-Fibroblasten verstärkt ADAM17, welches über einen Exosomen-vermittelten Transfer zu Keratinozyten gelangen und dort membranständiges gp80 proteolytisch spalten und somit sgp80 freisetzen könnte. Das lösliche sgp80 könnte dann wiederum mit hoher Affinität mit IL-6 an die IL-6R $\beta$ -Untereinheit gp130 der Transformationszonen-Fibroblasten binden und IL-6-vermittelte Signalwege aktivieren. Ob dieser mögliche Mechanismus eines Exosomen-vermittelten Transfers und *Sheddings* hier von Bedeutung ist, bedarf weiterer Untersuchungen.

Während in Zervixkarzinomzelllinien keine Expression der IL-6R $\alpha$ -Untereinheit gp80 nachgewiesen werden konnte, kommt es in den HPV-transformierten HPK1A und K51 weiterhin zur gp80-Expression (Hess *et al.*, 2000). Eine genauere Untersuchung der gp80-Expression auf NIKS, NIKS-18 und anderen zervikalen Zellen ist in diesem Kontext notwendig.

## **4.2 pSTAT3-Aktivierung und Expression des CAF-assoziierten Markers $\alpha$ -SMA in Transformationszonen-Fibroblasten**

Neben der Induktion von löslichem sgp80 in organotypischen 3D-Kulturen in Gegenwart von Transformationszonen-Fibroblasten kommt es in diesen Transformationszonen-Fibroblasten auch zur STAT3-Aktivierung durch Phosphorylierung

des Tyrosins 705. Während unter normalen Bedingungen eine genaue Kontrolle des JAK-STAT3-Signalweges erfolgt, kommt es in Karzinomen häufig zu einer starken STAT3-Aktivierung (Bournazou and Bromberg, 2013). Hierzu können genetische Veränderungen beitragen, wie zum Beispiel im Falle einer *gain-of-function*-Mutation von STAT3 im hepatozellulären Adenom (Sommer *et al.*, 2012). Häufig ist jedoch eine verstärkte STAT3-Aktivierung Folge einer gesteigerten IL-6-Signaltransduktion (Berishaj *et al.*, 2007; Grivennikov *et al.*, 2009). Auch in Gegenwart von Transformationszonen-Fibroblasten kam es zu einer verstärkten Freisetzung der IL-6 $\alpha$ -Untereinheit sgp80, welche die STAT3-Aktivierung demnach fördern kann.

Eine Expression und Aktivierung von STAT3 ist für viele Tumore in den Karzinomzellen selbst beschrieben. Das stimulierende IL-6 wird dabei oft durch stromale Zellen bereitgestellt. So tragen Fibroblasten durch Produktion von IL-6 direkt zum Wachstum und zur Invasion von Mammakarzinomen bei, während myeloide Zellen im Pankreas durch IL-6-Produktion und *Trans-Signaling* an der Entstehung pankreatischer intraepithelialer Neoplasien (PanIN) beteiligt sind (Studebaker *et al.*, 2008; Lesina *et al.*, 2011). Neben IL-6 sind auch andere stromale STAT3-Regulatoren, wie TNF- $\alpha$  und CCL2, bekannt (Miscia *et al.*, 2002; Bournazou and Bromberg, 2013; Yang *et al.*, 2016). Die Aktivierung von STAT3 kann die Karzinogenese sowohl durch tumor-intrinsische Effekte, wie gesteigerte Proliferation und verringerte Apoptose, sowie durch tumor-extrinsische Effekte, wie verstärkte Angiogenese, fördern (Grandis *et al.*, 2000; Niu *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2011).

In Mamma- und Zervixkarzinomen konnte eine tumorrandständige Aktivierung von STAT3 nachgewiesen werden, die auf eine mögliche Interaktion mit Zellen des Tumor-Stromas hindeutet (Azare *et al.*, 2011; Walch-Rückheim *et al.*, 2016). Ein Mechanismus, wie im Rahmen dieser Dissertation beobachtet, bei dem es zur sgp80-Freisetzung in Gegenwart von speziellen Transformationszonen-Fibroblasten kommt, könnte demnach auch bei der tumorrandständigen Aktivierung von STAT3 *in vivo* von Bedeutung sein. Eine Beteiligung stromaler Zellen im Rahmen des Tumormikromilieus zeigt sich auch durch die Freisetzung von IL-6 durch adipöse stromale Zellen im Östrogenrezeptor-negativen Brustkrebs, welche Migration und Invasion fördert (Walter *et al.*, 2009). Auch in HNSCC-Zelllinien konnte eine Aktivierung von STAT3 durch das von primären Endothelzellen se-

zernierte IL-6 gezeigt werden (Neiva *et al.*, 2009). Zentraler Bestandteile der Tumornische sind die Krebs-assoziierten Fibroblasten (CAFs). Korrelierend zu der im Rahmen dieser Dissertation beobachteten STAT3-Aktivierung in Transformationszonen-Fibroblasten wurde diese auch in CAFs beobachtet (K. W. Lee *et al.*, 2015). Im Magen wurde eine Transdifferenzierung von normalen Fibroblasten durch Stimulation mit IL-6 zu CAFs induziert, welche sich durch Expression von pSTAT3 auszeichnet. Die Transdifferenzierung erfolgt in Abhängigkeit des Transkriptionsfaktors Twist1 und dessen Effektors CXCL12 (CXC-Motiv-Chemokin 12, auch *stromal cell-derived factor 1* SDF-1) und fördert den malignen Charakter der gastrischen Tumorzellen. Die Expression von Twist1 beeinflusst demnach die Homöostase zwischen normaler Gewebeentwicklung und EMT. Diese von K.-W. Lee *et al.* beschriebene Aktivierung von STAT3 durch Phosphorylierung in CAFs entspricht derer in Transformationszonen-Fibroblasten in NIKS-3D-Kulturen. Zudem konnte in 3D-Kulturen mit NIKS-18-Zellen eine deutlich verstärkte Expression von *Twist1*-mRNA in Transformationszonen-Fibroblasten nachgewiesen werden.

Twist1 gehört zu der Familie der Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktoren und spielt eine wichtige Rolle während der Entwicklung von Geweben mesodermalen Ursprungs (Thisse, Messal and Perrin-Schmitt, 1987). Eine heterozygote *loss-of-function*-Mutation führt zu schweren Krankheitsbildern (Qin *et al.*, 2012). Eine verstärkte Twist1-Expression findet sich häufig in Karzinomen und korreliert mit einer schlechten Prognose, unter anderem im Prostata-, Magen- und Ösophaguskarzinom (Kwok *et al.*, 2005; Yuen *et al.*, 2007; Sung *et al.*, 2011). In letzterem kommt es in fast 90 % der CAFs zur Twist1-Expression, welche mit ungünstigen klinopathologischen Parametern wie Invasionsstärke und Lymphknotenmetastasierung assoziiert ist (Yeo *et al.*, 2017). Eine Stilllegung des *Twist1*-Gens in diesen Zellen mittels shRNA reicht aus, um die tumorfördernden Eigenschaften kokultivierter Tumorzellen zu verringern. Durch die Expression von *Twist1* in Fibroblasten der Transformationszone zeigt sich, dass diese eine besondere Fibroblasten-Population darstellen. Diese Population kann möglicherweise für die Bildung einer speziellen Nische von Bedeutung sein, in welcher präferenziell eine transformierende HPV-Infektion erfolgen kann. Eine Beteiligung der Sekretion des Twist-Effektors CXCL12 in CAFs am Tumorwachstum und der Angiogenese zeigt sich auch im Mammakarzinom (Orimo *et al.*, 2005). In mammlären Fibroblasten trägt

die Differenzierung zu CAFs zur autokrinen TGF- $\beta$ - und CXCL12-Signaltransduktion bei, welche sich tumorfördernd auswirkt (Kojima *et al.*, 2010). Twist1 stellt somit ein potentielles therapeutisches *Target* dar (K. W. Lee *et al.*, 2015). Gleichzeitig ist auch CXCL12 als potentieller Nischenfaktor in HPV-suzzeptiblen Geweben von Interesse und bedarf weiterer Untersuchungen.

Die funktionelle Ähnlichkeit von Transformationszonen-Fibroblasten und CAFs zeigt sich weiterhin durch die Expression des Myofibroblastenmarkers  $\alpha$ -SMA. Unsere Arbeitsgruppe konnte in  $\alpha$ -SMA-exprimierenden, zervikalen CAFs in 3D-Kulturen mit CaSki-Zellen eine verstärkte Aktivierung von STAT3 in Form von Tyr705-Phosphorylierung gegenüber normalen exozervikalen Fibroblasten feststellen (Bastuck, 2016). Diese geht mit einer verstärkten Proliferation und Herabregulation der E-Cadherin-Expression in Keratinozyten einher. In zervikalen Fibroblasten kommt es demnach während der Differenzierung von normalen Fibroblasten zu CAFs zu einem NF $\kappa$ B-pSTAT3-*Switch*. Die in Transformationszonen-Fibroblasten deutlich verstärkte Expression des CAF-Markers  $\alpha$ -SMA legt nahe, dass erstere in ihrer Funktion und ihrem Verhalten den CAFs gleichen. Bereits im 2D-Kulturmodell zeigte sich eine deutliche Steigerung der  $\alpha$ -SMA-Expression in Transformationszonen- gegenüber exozervikalen Fibroblasten, welche im 3D-Kulturmodell mit NIKS-Zellen noch deutlicher wurde. Im Rahmen dieser Dissertation konnte zudem gezeigt werden, dass die  $\alpha$ -SMA-Expression in den Transformationszonen-Fibroblasten unter Einfluss von HPV-positiven NIKS-18-Zellen weiter verstärkt wird. Die Präsenz von Transformationszonen-Fibroblasten kann demnach zur Bildung einer geeigneten Nische beitragen, die möglicherweise sowohl die Suzeptibilität für eine transformierende HPV-Infektion als auch die potentielle Entwicklung präkarzinogener Vorstufen fördert.

In Gallengangskarzinomen konnte auch eine Twist1-unabhängige STAT3-Aktivierung in Fibroblasten durch den CAF-Marker FAP gezeigt werden, die zu CCL2-Produktion und der Rekrutierung myeloider Suppressorzellen, einhergehend mit einer schlechten Prognose, führt (Yang *et al.*, 2016). Demnach kann sowohl die IL-6-induzierte als auch die IL-6-unabhängige STAT3-Aktivierung in CAFs zur Umgestaltung der Mikroumgebung und der Tumornische beitragen.

### **4.3 Anisotrop gerichtete Transformationszonen-Fibroblasten fördern die Expression von Metalloproteasen sowie die Invasion**

Die erfolgreiche Invasion von Tumorzellen erfordert eine Umstrukturierung der ECM, unter anderem durch Metalloproteasen, wie Vertreter der ADAM- oder MMP-Familien.

Während zu Beginn einer HPV-Infektion und in frühen CIN-Läsionen eine Immunsuppression von großer Bedeutung ist, beginnt in der hochgradigen CIN3-Läsion ein Wechsel zur Stromalen Inflammation und Immunezellinfiltration (Schröer *et al.*, 2011). Auch Metalloproteasen spielen in der zervikalen Karzinogenese eine wichtige Rolle. So konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass es in CIN3-Läsionen durch parakrine Signale von den Tumorzellen zur Aktivierung von STAT3 in Stromalen, perivaskulären Immunezellen kommt, die wiederum in einem autokrinen CCL2-abhängigen Signalweg die Produktion und Freisetzung von MMP-9 fördern (Schröer *et al.*, 2011). Zur tumorfördernden Mikroumgebung trägt zudem die Induktion der CCL20-Produktion durch parakrines IL-6 sowie C/EBP- $\beta$ -Induktion in Fibroblasten bei, welche die Infiltration von T<sub>H</sub>17-Zellen fördert (Walch-Rückheim *et al.*, 2015). In diesen Kontext lässt sich auch die *in vivo* während der Karzinogenese zur CIN3-Läsion zunehmende ADAM17-Expression einordnen. Gerade am Übergang der zervikalen Krebsvorstufen hin zum invasiven Zervixkarzinom kommt es demnach zur verstärkten Inflammation, welche mit einer Induktion der Metalloprotease ADAM17 einhergeht. Im Normalgewebe scheint insbesondere die Transformationszone für inflammatorische Signalwege von Bedeutung zu sein, da sich hier sowohl im Epithel als auch im Stroma eine starke Induktion der ADAM17-Expression im Vergleich zur Endozervix, vor allem aber gegenüber der Exozervix zeigt. ADAM-Proteasen können einen wesentlichen Einfluss auf die Gestaltung der Mikroumgebung und die inflammatorische Immunantwort nehmen. So kann membrangebundenes TNF- $\alpha$ , im Gegensatz zu *Shedding*-vermitteltem, antiinflammatorisch wirken (Alexopoulou *et al.*, 2006). ADAM17 kann indirekt die Balance zwischen T<sub>reg</sub>- und T<sub>H</sub>17-Zellen beeinflussen, indem *IL-6-Trans-Signaling*, nicht aber die klassische IL-6-Signaltransduktion, die Entwicklung neuer T<sub>reg</sub>-Zellen durch Herabregulation von FoxP3 blockiert (Dominitzki *et al.*, 2007). Die verstärkte ADAM17-Expression an der Transformationszone und insbesondere in CIN3-Läsionen und SCCs lässt auf eine Beteiligung

der Metalloprotease am Invasionsverhalten schließen. In der Tat zeigte sich auch in 3D-Kulturen mit NIKS-18, CaSki und SW756 eine verstärkte Invasion in Gegenwart von Transformationszonen-Fibroblasten. Eine genauere morphologische Betrachtung der Basalmembran in NIKS-18-3D-Kulturen zeigte zudem, dass die Struktur der Basalmembran in Gegenwart von Transformationszonen-Fibroblasten stark verändert und weniger kontinuierlich ist. In diesem Kontext ist eine weitere Betrachtung von Markern wie Laminin und Kollagen IV notwendig, welche die Basalmembran charakterisieren (Berning *et al.*, 2015).

In Leukozyten zeigte sich, dass ADAM10, nicht aber ADAM17, für die Migration von Bedeutung ist und die hierfür charakteristische Polymerisation von F-Actin und Adhesion an Fibronectin induziert sowie eine Hochregulation des  $\alpha_5$ -Integrins bewirkt (Pruessmeyer *et al.*, 2014). Zudem ist ADAM10 am *Shedding* des Adhäsionsproteins E-Cadherin in embryonalen Maus-Fibroblasten beteiligt (Maretzky *et al.*, 2005). Es zeigte sich, dass E-Cadherin-*Shedding* ADAM10-abhängig ist und die Freisetzung und Translokation von  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma bewirken kann. Gerade im Hinblick auf die von Chumduri *et al.* beschriebene differenzielle Wnt-Aktivierung im zervikalen Stroma könnte die ADAM10-Metalloprotease im Zusammenhang mit einer  $\beta$ -Catenin-Regulation möglicherweise von Interesse sein und sollte weiter untersucht werden. In Abwesenheit von proteolytisch aktivem ADAM10 verhindert die Bindung von  $\beta$ -Catenin an die intrazelluläre E-Cadherin-Domäne eine Kerntranslokation (Orsulic *et al.*, 1999).

Im Ösopharyngealkarzinom ist die ADAM10-vermittelte E-Cadherin-Herabregulation mit Invasion, Lymphknotenmetastasierung und einer hohen TNM-Klassifikation assoziiert, während in Pankreastumorzellen der Einsatz des Kalziumkanalblockers Fendilin invasives Wachstum durch Inhibition dieses ADAM10-vermittelten *Sheddings* verhindert (Woods *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2016). Neben der  $\alpha_5\beta_1$ -abhängigen ADAM10-vermittelten Migration kann eine Umstrukturierung der Mikroumgebung auch durch Interaktion der Metalloprotease mit ihrem Substrat CD44 erfolgen (Jouannet *et al.*, 2016). Interessanterweise konnten in der Tonsille CD44-exprimierende Progenitorzellen charakterisiert werden, deren Differenzierungspotential durch eine lentivirale HPV-Onkogen-Transduktion gestört wird (Kang *et al.*, 2015). Die CD44-vermittelte Zelladhäsion kann durch Kalzium-induziertes ADAM10 und PMA-induziertes ADAM17 unterbrochen werden, was eine Ablösung von einer Hyaluronsäure(HA)-Matrix zur Folge hat

(Nagano *et al.*, 2004). ADAM-Proteasen wird hierbei eine besondere Bedeutung bei der CD44-abhängigen Migration von Tumorzellen auf HA-beschichteten, nicht aber Fibronectin-beschichteten, Oberflächen zugeschrieben. Dieser Mechanismus spielt auch in Tumoren eine Rolle und ist insbesondere vor dem Hintergrund des Vorkommens der CD44-exprimierenden, HPV-suszeptiblen Stammzellen in der tonsillären Nische interessant (Pan *et al.*, 2012; Kang *et al.*, 2015). Aufgrund der Ähnlichkeit der zervikalen und tonsillären Nische ist eine Untersuchung, ob eine solche CD44-positive Zellpopulation auch im zervikalen Gewebe vorkommt und gegebenenfalls für die transformierende HPV-Infektion und Invasion von Bedeutung sein könnte, von Interesse. In der Zervix konnte eine Abnahme der CD44-Expression in CIN3-Läsionen und mikroinvasiven Karzinomen im Vergleich zu CIN1-Läsionen nachgewiesen werden (Callagy *et al.*, 2000). In Nasopharyngealkarzinomzellen konnte zudem eine Beteiligung von ADAM17 an der Invasion gezeigt werden (Wu *et al.*, 2015). Ob CD44-exprimierende Zellen und ein ADAM-vermittelter Mechanismus zur Migration auch in der Zervix von Bedeutung sind, sollte weiter untersucht werden, da eine ähnliche Konstitution der zervikalen und tonsillären Nische auch im Rahmen dieser Dissertation nachgewiesen werden konnte.

Auch die Rolle der Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 in der beobachteten Invasion und Kollagen-Kontraktion sollte in *knock-down*-Experimenten weiter analysiert werden. Eine Behandlung der Transformationszonen-Fibroblasten mit spezifischen ADAM-Inhibitoren und shRNA könnte Aufschluss darüber geben, ob dadurch die Kontraktionsfähigkeit im Kollagen beziehungsweise die Invasion von Keratinozyten in 3D-Kulturen gestört ist.

Auch die Freisetzung von MMPs trägt dazu bei, dass das Tumorwachstum und die Invasion gefördert, die Angiogenese reguliert sowie die erneute Adhäsion der Tumorzellen während der Metastasierung unterstützt wird (Gialeli, Theocharis and Karamanos, 2011). Im Zervixkarzinom wurde eine Zunahme der MMP-2- und MMP-9-Expression gezeigt, wobei mehr als 90 % der SCC und mehr als 83 % der HSIL eine MMP-9-Expression zeigten (Sheu *et al.*, 2003; Rauvala *et al.*, 2006). Zudem war die enzymatische Aktivität der Gelatinase MMP-9 in HSIL und SCC im Vergleich zum Normalgewebe deutlich gesteigert. Unsere Arbeitsgruppe konnte ebenfalls eine Zunahme stromaler MMP-9-Expression nachweisen und zeigen, dass parakrines IL-6 die STAT3-Aktivierung in Monozyten induziert, welche wie-

derum durch eine autokrine CCL2-vermittelte Signaltransduktion die Expression von MMP-9 induziert (Schröer *et al.*, 2011). Diese Erkenntnisse zeigen eine Beteiligung von Metalloproteasen, wie MMP und ADAM, innerhalb dynamischer Nischen sowie an der Umgestaltung der ECM während der Karzinogenese. Auch in organotypischen 3D-Kulturen mit NIKS-18-Zellen konnte im Rahmen dieser Dissertation in Gegenwart von Transformationszonen-Fibroblasten eine verstärkte MMP-9-Freisetzung beobachtet werden. Dementsprechend kann eine MMP-9- und ADAM10/17-Expression innerhalb der zervikalen Nische an der Transformationszone – möglicherweise auch in der Nische der tonsillären Krypte – von Bedeutung für die dynamische Gestaltung der Mikroumgebung sein sowie möglicherweise später die Invasion begünstigen.

In der Tat ist die Metalloprotease ADAM17 zentraler Bestandteil bei der Bildung der Stammzellnische im Haarfollikel (Nagao *et al.*, 2012). In einer Studie zur Analyse der für eine erfolgreiche HPV-Infektion notwendigen endozytischen Eintrittsplattform in Zervixkarzinomzellen zeigte sich ebenfalls eine Beteiligung von ADAM17 (Mikuličić *et al.*, 2019). Die Metalloprotease ist hier unabdingbar für die endozytische Internalisierung des HPV/CD151-Clusters und ein *knock-down* von ADAM17 vermindert die Infektionseffizienz deutlich. In ihrer Untersuchung haben Mikuličić *et al.* dabei keinen Fokus auf eine mögliche ADAM17-exprimierende Zellpopulation gelegt, welche für eine erfolgreiche Infektion notwendig ist. Die Zunahme der Expression an der Transformationszone – sowohl im Epithel als auch stromal – sowie in Reservezellen legt nahe, dass die ADAM17-Expression einer bestimmten Zellpopulation *in vivo* von großer Bedeutung für die Suszeptibilität einer HPV-Infektion sein könnte.

Ein Vorkommen von ADAM-Proteasen wurde, wie bereits zuvor beschrieben, auch in extrazellulären Vesikeln nachgewiesen. Dabei leisten die EV-assoziierten Metalloproteasen auch einen Beitrag in der zervikalen Karzinogenese durch Interaktion mit Zielzellen, Umgestaltung der ECM und Förderung der Tumorprogression. Sowohl proteolytisch aktives ADAM10 als auch ADAM17 werden in Ovarialkarzinomzellen gebildet und in Form von Exosomen, gemeinsam mit dem Oberflächenprotein CD44, freigesetzt (Stoek *et al.*, 2006). Ob Exosomen-vermitteltes *Shedding* durch ADAM-Proteasen zum Beispiel in der tonsillären Nische von Bedeutung ist und gegebenenfalls die Invasion von CD44<sup>+</sup>-Stammzellen fördert, sollte genauer untersucht werden. Gleichzeitig werden von Fibroblasten sezernierte

Exosomen von Brustkarzinomzellen so modifiziert, dass sie Wnt11 exprimieren und dann anschließend autokrin zur Aktivierung der Brustkarzinomzellen und letztlich der Invasion beitragen (Luga *et al.*, 2012). In Prostatakarzinomzelllinien korreliert die Expression von ADAM17 mit einer verstärkten MMP-2- und MMP-9-Expression sowie TGF- $\beta$ -Freisetzung und Invasion (Xiao *et al.*, 2012).

Die Expression von Metalloproteasen wird unter anderem durch Vertreter der *Timp*-Genfamilie (*tissue inhibitor of metalloproteinases*) reguliert (Stetler-Stevenson, Krutzsch and Liotta, 1989). Interessanterweise induziert der vollständige Verlust dieser *Timp*-Genfamilie in Fibroblasten einen CAF-Phänotyp, der durch Expression von  $\alpha$ -SMA sowie verstärkte Kollagen-Kontraktion und CXCL12-Expression gekennzeichnet ist (Shimoda *et al.*, 2014). Diese *Timp*-„CAFs“ produzieren ADAM10-exprimierende Exosomen, die die Motilität von Krebsstammzellen und die Krebsstammzellmarker-Expression fördern. Ein *knock-down* von ADAM10 verhindert diesen Phänotyp. Auch die aus der Transformationszone isolierten Fibroblasten teilen die beschriebenen Charakteristika dieser induzierten CAFs, indem sie eine Expression von  $\alpha$ -SMA aufweisen und im Kollagen-Kontraktions-Assay eine deutlich verstärkte Kontraktion gegenüber exozervikalen Fibroblasten aufweisen. Transformationszonen-Fibroblasten stellen demnach eine besondere stromale Zellpopulation dar, die Teil einer definierten Nische ist, welche möglicherweise sowohl die Infektion durch HPV als auch die Tendenz zur HPV-induzierten Karzinogenese und Invasion begünstigt. Eine verstärkte Invasion in Gegenwart von Transformationszonen-Fibroblasten konnte in organotypischen 3D-Kulturen mit NIKS-18, CaSki und SW756 gezeigt werden.

Wie bereits beschrieben kann die Aktivierung und Differenzierung von Fibroblasten zu CAFs durch Twist1 erfolgen (K.-W. Lee *et al.*, 2015). Auch durch Transfektion von Twist1 in normalen Fibroblasten kommt es zur Induktion eines CAF-Phänotyps, der sich durch erhöhte Migration, Anordnung von Kollagen und letztlich der Versteifung der ECM auszeichnet (García-Palmero *et al.*, 2016). In Kolonkarzinom-CAFs kommt es durch verstärkte Expression von Palladin und Kollagen Typ VI  $\alpha$ 1 zu gesteigerter Orientierung und Polarität der Fibroblasten sowie zur Förderung prometastatischer Effekte wie Migration und Invasion. Die Rolle der ECM-Verfestigung in der Karzinogenese und Tumorstreuung wurde bereits kurz angesprochen (Abschnitt 1.5.1; Levental *et al.*, 2009). Auch die verstärkte Twist1-Expression und Kerntranslokation ist mit der ECM-Versteifung assoziiert (Wei *et*

*al.*, 2015). Diese Beobachtungen passen zu der in Transformationszonen-Fibroblasten beobachteten Induktion von *Twist1*-mRNA in organotypischen NIKS-18-3D-Kulturen.

In organotypischen 3D-Kulturen von NIKS-18, HPV16-positiven CaSki sowie HPV18-positiven SW756 mit Transformationszonen-Fibroblasten konnte eine gerichtete, vertikale Anordnung der Fibroblasten gegenüber einer eher horizontalen bzw. ungerichteten Anordnung bei exozervikalen Fibroblasten beobachtet werden. Diese geht einher mit einer verstärkten Invasion der Keratinozyten. Eine gerichtete Invasion und Anordnung ist auch in Gegenwart von CAFs beschrieben. Die Remodellierung der ECM kann durch die Anordnung von Fibronectin erfolgen (Erdogan, Ao, Lauren M. White, *et al.*, 2017). Primäre, aus der Prostata isolierte CAFs produzieren vermehrt Fibronectin, welches sie in die ECM abgeben und dort die gerichtete Migration von Karzinomzellen entlang der CAF-Achse fördert. Auf das sezernierte Fibronectin werden starke Zugkräfte von Seiten der CAFs durch Induktion des kontraktilitätsfördernden Myosin II ausgeübt, welche zur Organisation der Fibronectin-Fasern in anisotroper Ausrichtung beitragen. In Kollagen-Kontraktionsassays zeigte sich, dass Transformationszonen-Fibroblasten in Gegenwart von CaSki eine wesentlich stärkere Kontraktion des Kollagens bewirken als exozervikale Fibroblasten. Die Fibroblasten der Transformationszone könnten demnach ebenso wie CAFs eine deutlich höhere Kontraktilität besitzen. Erdogan *et al.* konnten zeigen, dass die Adhäsion von CAFs an Fibronectin durch eine höhere  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin-Aktivität vermittelt wird. Die Bindung der Tumorzellen an die anisotropen Fibronectin-Fasern, welche die gerichtete Migration in Anwesenheit von CAFs fördert, erfolgt über das  $\alpha_v$ -Integrin. Auch *in vivo* konnte eine Orientierung von Fibronectin im Prostatakarzinom nachgewiesen werden. Der *knock-down* von Fibronectin in Kolonkarzinom-CAFs inhibiert die Fähigkeit zur Invasion, während die Matrixkontraktion erhalten bleibt (Attieh *et al.*, 2017). Die Arbeitsgruppe um Attieh *et al.* konnte auch eine Beteiligung des  $\alpha_5\beta_3$ -Integrins an der CAF-vermittelten Fibronectin-Anordnung zeigen. Eine Analyse der Expression und Freisetzung von Fibronectin von Transformationszonen-Fibroblasten gegenüber exozervikalen Fibroblasten könnte Aufschluss über die zur Invasion beitragenden Mechanismen geben. Erste 2D-*in-vitro*-Analysen mittels FACS zeigten eine  $\alpha_5$ - und  $\beta_1$ -Integrin-Expression sowohl auf exozervikalen als auch Transformationszonen Fibroblasten. Eine genauere Untersuchung der Expression im orga-

notypischen 3D-Kulturmodell ist hier erforderlich, um mögliche Unterschiede der Integrin-Expression und -Aktivität im Kontext der veränderten Fibroblasten-Anordnung und verstärkten Invasion zu analysieren.

Im Rahmen dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass Transformationszonen-Fibroblasten besondere Eigenschaften haben, in denen sie den CAFs ähneln und in *in-vitro*-Versuchen letztlich eine verstärkte Invasion fördern. Diese korreliert mit einer Veränderung der Basalmembran in organotypischen 3D-Kulturen und der Expression der Metalloproteasen ADAM17 und MMP-9. Die verstärkte Kontraktilität und veränderte Ausrichtung der Transformationszonen-Fibroblasten im 3D-Kulturmodell weist auf eine gerichtete Invasion HPV-positiver Keratinozyten hin. Auch *in vivo* konnte eine verstärkte ADAM17-Expression im Stroma der Transformationszone nachgewiesen werden.

#### **4.4 Veränderte Expression der miR-375 in Transformationszonen-Fibroblasten und Bedeutung für den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg**

Während viele der beschriebenen Veränderungen der Expression verschiedener Faktoren und die Aktivierung von Signalwegen überwiegend exklusiv im Kontext externer Stimuli, zum Beispiel in 3D-Kulturen, zu beobachten waren, zeigte sich eine Veränderung der Expression der miR-375 in den Fibroblasten bereits ohne weitere Stimuli.

Im Zervixkarzinom konnte bereits zuvor eine Herabregulation der miR-375 sowie eine Korrelation mit klinopathologischen Faktoren, wie Lymphknotenmetastasierung und stromaler Invasion, beobachtet werden (Wang *et al.*, 2011). Auch im Rahmen meiner Masterarbeit zeigte sich eine Abnahme der miR-375-Expression von zytologischen Abstrichen mit mäßigem Dysplasiegrad (Pap IIID2) zu schweren Dysplasien (Pap IVa-p). Auch zwischen exozervikalen und Transformationszonen-Keratinozyten sowie in verschiedenen Zervixkarzinomzelllinien zeigte sich eine Abnahme der miR-375-Expression (Treitz, 2016). In unstimulierten, 2D-kultivierten Transformationszonen-Fibroblasten konnte eine signifikante Abnahme der Expression um 41 % bis 63 % beobachtet werden.

In Fibroblasten-ähnlichen Synoviozyten aus Ratten mit einer Adjuvans-induzierten Arthritis zeigte sich ebenfalls eine Herabregulation der miR-375 (Miao

*et al.*, 2015). Die Autoren konnten den Wnt-Rezeptor Fzd8 als miR-375-*Target* identifizieren und zeigen, dass die miR-375 an der Inhibition des kanonischen Wnt-Signalweges sowie der Herabregulation von Fibronectin und MMP-3 beteiligt ist. In Bezug auf die beobachtete Herabregulation der miR-375 in Transformationszonen-Fibroblasten, könnte demnach die Abnahme der miR-375-Expression in den Transformationszonen-Fibroblasten dazu führen, dass die Suppression von Fzd8 aufgehoben wird und die Zellen durch Expression dieses Rezeptors sensitiver für die Aktivierung des Wnt-Signalweges sind. Eine detaillierte Analyse der Fzd8-Expression sowohl in 2D als auch in 3D ist daher notwendig. Erste Western-Blot-Experimente hierzu zeigten, dass Fzd8 in TZ-Fibroblasten gegenüber Ex-Fibroblasten in 2D tatsächlich deutlich stärker exprimiert ist (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren könnten Transformationszonen-Fibroblasten mit einem miR-375-*Mimic* behandelt werden, um zu untersuchen, ob die Expression von Fzd8 danach auf Proteinebene herabreguliert ist. In einem ersten Experiment konnte nach erfolgreicher Transfektion des miR-375-*Mimics* in TZ-Fibroblasten eine Herabregulation von Fzd8 gegenüber der Kontrolle beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Auch hier konnte die Hypothese, dass die miR-375 an der Regulation von Fzd8 beteiligt sein kann, durch erste Experimente vorläufig bekräftigt werden. Die weitere Analyse der Fzd8-Expression in Transformationszonen-Fibroblasten und der Einfluss der miR-375 auf selbige ist daher notwendig, um die besondere Rolle der Transformationszonen-Fibroblasten weiter zu charakterisieren und hier den Einfluss des kanonischen Wnt-Signalweges zu untersuchen.

Auch in alveolaren Epithelzellen konnte eine Inhibition des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges durch die miR-375 nachgewiesen werden und gezeigt werden, dass eine Herabregulation der Expression für die Wnt/ $\beta$ -Catenin-vermittelte AEC-Transdifferenzierung notwendig ist (Wang *et al.*, 2013). Interessanterweise sind die in der zervikalen Nische bedeutenden Faktoren ADAM10, Twist1 und Fibronectin allesamt Zielgene des kanonischen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges (Howe *et al.*, 2003; Gavert *et al.*, 2007; ten Berge *et al.*, 2008). Als weiteres *Target* der miR-375 wurde JAK2 identifiziert (*miRTarBase*). Im Magenkarzinom konnte die Beteiligung einer reduzierten miR-375-Expression nach *Helicobacter-pylorii*-Infektion an der Induktion des JAK2-STAT3-Signalweges und der nachfolgenden Expression von BCL-2 und Twist1 gezeigt werden (Miao *et al.*, 2014). Die miR-375 dient hier demnach als Tumorsuppressor (Ding *et al.*, 2010). Diese Regulation ist auch in Bezug auf die

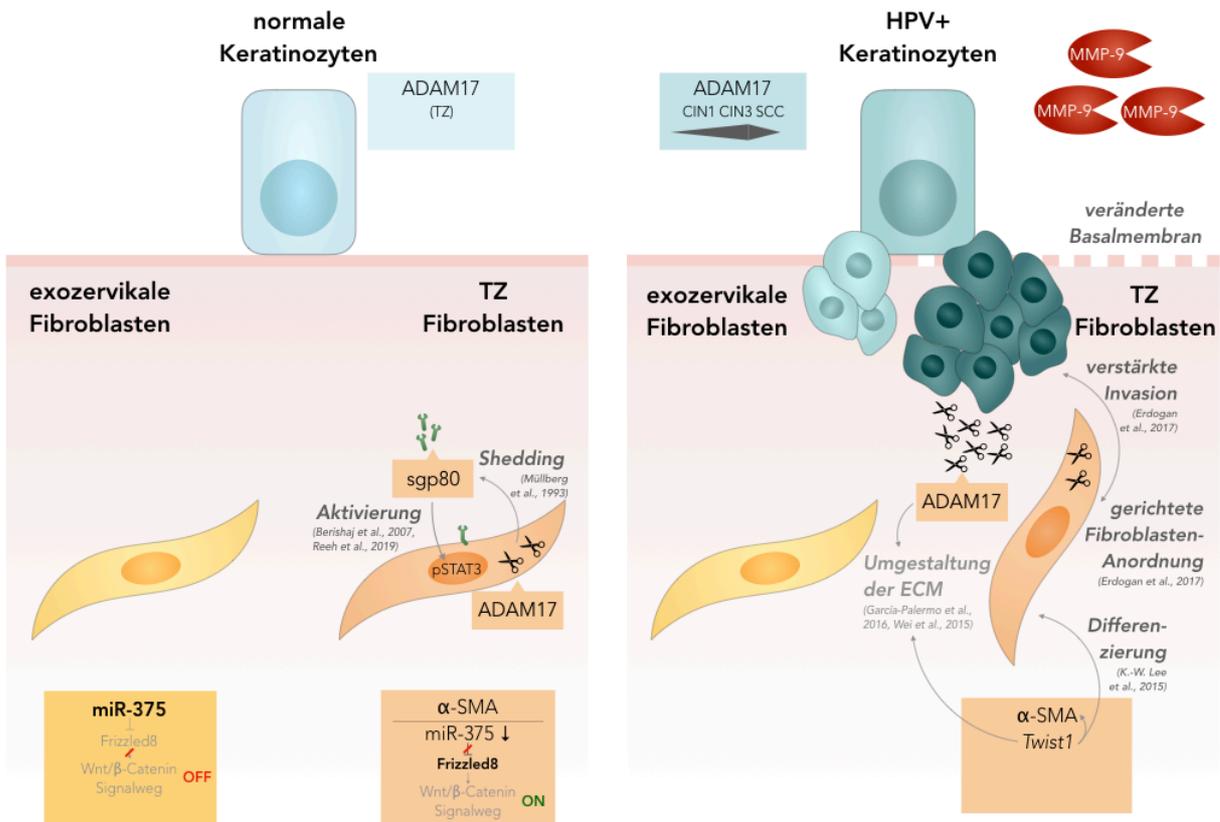
verstärkte STAT3-Aktivierung in den Transformationszonen-Fibroblasten im 3D-Kulturmodell besonders interessant.

Die Transfektion eines *miR-375-Mimics* in Transformationszonen-Fibroblasten könnte demnach auch Aufschluss über die mögliche Beteiligung der *miR-375* an der Expression von *ADAM10* und *Twist1* geben.

In einer neueren Publikation wird die Bedeutung der Homöostase des stromalen Wnt-Signals an der Transformationszone für die Gestaltung der zervikalen Mikroumgebung und das Zellschicksal verschiedener Zellpopulationen postuliert (Chumduri *et al.*, 2021). Demnach kommt es im endozervikalen Stroma zur Akkumulation der Wnt-Agonisten *Axin2*, *Dkk3* sowie *Rspo1/3*, während im exozervikalen Stroma eine Expression von *Dkk2* erfolgt. Im exozervikalen suprabasalen Epithel sowie in metaplastischen und hyperplastischen, endozervikalen Bereichen zeigte sich eine Expression von *Notch*.

Auch eine Interaktion von *STAT3* und dem kanonischen Wnt-Signalweg wurde bereits in der Literatur beschrieben. So trägt in embryonalen Maus-Stammzellen die Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges dazu bei, dass vermehrt *STAT3*-mRNA exprimiert wird (Hao *et al.*, 2006). Gleichzeitig führt die Stimulation mit LIF zur JAK-vermittelten *STAT3*-Aktivierung, welche gemeinsam mit der erhöhten *STAT3*-Expression die Differenzierung der Stammzellen verhindert. Auch in retinalem Pigmentepithel konnte eine Aktivierung und Kerntransduktion von *STAT3* durch *Wnt3a* gezeigt werden (Fragoso *et al.*, 2012).

Im Kontext der Transformationszone sind Fibroblasten demnach möglicherweise sensitiver für die Aktivierung des Wnt-Signalweges durch die erhöhte Expression des Wnt-Rezeptors *Fzd8*, welche durch die verringerte *miR-375*-Expression induziert ist. In 3D-Kulturen könnte die Freisetzung von Wnt die Aktivierung des Signalweges induzieren und somit unter anderem die Expression von *Fibronectin* fördern.



**Abbildung 19: Graphische Zusammenfassung der an der zervikalen und tonsillären Nische beteiligten Faktoren und Signalwege**

In schwarz und dunkelgrau sind die jeweils beobachteten Faktoren bzw. Veränderungen dargestellt. In hellgrau sind mögliche, in der Literatur beschriebene Veränderungen dargestellt.

#### **4.5 Subepitheliale CD79a<sup>+</sup>-Lgr6<sup>+</sup>-Zellen charakterisieren die HPV-suszeptible Nische in Tonsille und Zervix**

Sowohl die ähnliche Komposition der zervikalen Transformationszone und tonsillären Krypte als auch das ähnliche Markerprofil, welches auch im Rahmen dieser Dissertation etabliert wurde, weisen auf eine ähnliche Nischenumgebung in beiden Geweben hin.

Während die zervikale Transformationszone bereits seit längerem als putativer HPV-Infektionsort gilt, wurde der tonsillären Krypte erst in jüngerer Zeit eine verstärkte Aufmerksamkeit geschenkt (Smedts *et al.*, 1992; Martens *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2015). Das Kryptenepithel konnte als Ursprungsort einer HPV-Infektion sowie der Tumorentstehung charakterisiert werden (Kim *et al.*, 2007). Hier zeigt sich eine verstärkte p16-Expression in HPV-positiven Tonsillenkarcinomen sowie eine stärkere HIF-1 $\alpha$ -Expression bei Integration der viralen DNA in das Wirtsgenom. Humane Papillom-Virionen können sowohl im Kryptenepithel als auch frei im Krypten-auskleidenden Biofilm nachgewiesen werden (Rieth *et al.*, 2018). Eine Freisetzung von Virionen in die Glykokalyx-Matrix des Biofilms ermöglicht demnach ein Reservoir latenter Virionen, welche eine erneute Infektion epithelialer Zellen möglich macht. Weiterhin gilt das retikuläre Epithel durch die nicht-durchgängige Basalmembran als idealer Infektionsort für das Humane Papillomvirus.

Sowohl in der Zervix als auch der Tonsille zeigte sich die Präsenz Lgr6- und p63-exprimierender Zellen. Die beobachtete Zunahme der Lgr6-Expression in hochgradigen zytologischen Abstrichen lässt auf die Bedeutung während der Karzino-genese schließen. Die im Bereich der zervikalen Transformationszone vorkommende Expression vor allem in stammzellähnlichen Reservezellen konnte in der Tonsille nicht bestätigt werden. Hier stellte sich heraus, dass sich die Lgr6-exprimierenden Zellen in direkter Nachbarschaft zu den p63-exprimierenden Zellen befinden. Diese subepithelialen Zellen finden sich sowohl unterhalb des Plattenepithels in inselartiger Anordnung als auch relativ durchgehend entlang der tonsillären Krypte und exprimieren den B-Lymphozyten-Marker CD79a, nicht aber CD20.

Die Präsenz subepithelialer B-Zellen in der Gaumenmandel wurde bereits zuvor beschrieben (Dono *et al.*, 1996). Diese subepithelialen B-Lymphozyten, welche in etwa 5-10 % der gesamten B-Zellzahl der Tonsille ausmachen, sind durch die Expression eines spezifischen Markersets charakterisiert und unterscheiden sich deutlich von B-Lymphozyten des Keimzentrums und der Mantelzone, indem sie unter anderem keine CD5-Expression aufweisen. Dono *et al.* konnten auch eine kleinere Anzahl an aktivierten B-Zellen innerhalb der subepithelialen Areale vorfinden, weshalb sie die subepithelialen B-Lymphozyten-Bereiche als möglichen Ort der B-Zell-Aktivierung postulieren. Auch in der zervikalen Transformationszone wurde eine Präsenz von B-Lymphozyten im subepithelialen Stroma beschrieben (Roncalli *et al.*, 1988). Im Rahmen dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass es sich bei den subepithelialen B-Lymphozyten in Tonsille und Zervix um CD79a<sup>+</sup>-Lgr6<sup>+</sup>-Zellen handelt. Das Oberflächenprotein CD79a ist in B-Zellen während der gesamten Entwicklung exprimiert, einschließlich der Transformation zur Plasmazelle (Tanaka *et al.*, 2009). Da sich in der subepithelialen B-Zell-Population keine Expression von CD20 zeigte, welches mit Ausnahme von Plasmazellen ebenfalls in allen reifen B-Zellen exprimiert ist, lässt sich daraus schließen, dass die subepitheliale B-Zell-Nische tatsächlich eine Zone der B-Zell-Aktivierung darstellen könnte (Hoyer *et al.*, 2005; Bour-Jordan and Bluestone, 2007).

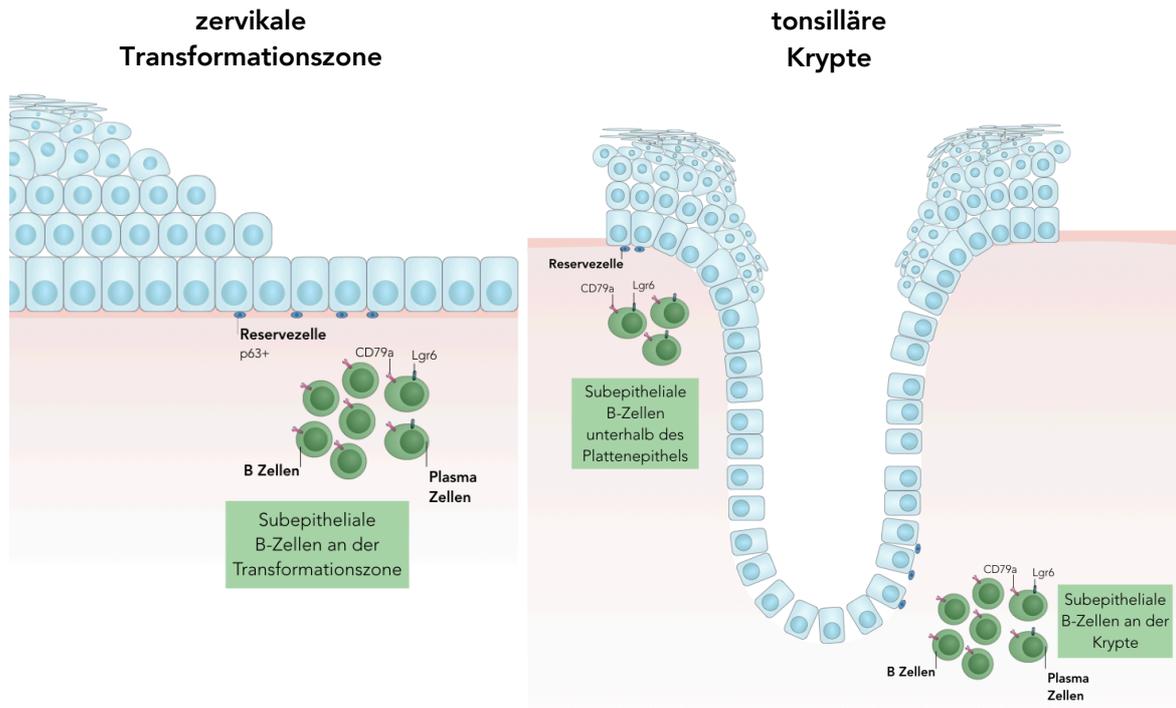


Abbildung 20: Graphische Darstellung der HPV-susceptiblen Nischen in Zervix und Tonsille

## Literaturverzeichnis

- Adrain, C. *et al.* (2012) "Tumor necrosis factor signaling requires iRhom2 to promote trafficking and activation of TACE," *Science*. American Association for the Advancement of Science, 335(6065), pp. 225–228. doi: 10.1126/science.1214400.
- Al-Nedawi, K. *et al.* (2008) "Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells," *Nature Cell Biology*. Nature Publishing Group, 10(5), pp. 619–624. doi: 10.1038/ncb1725.
- Alba-Castellón, L. *et al.* (2016) "Snail1-dependent activation of cancer-associated fibroblast controls epithelial tumor cell invasion and metastasis," *Cancer Research*. American Association for Cancer Research Inc., 76(21), pp. 6205–6217. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0176.
- Alemaný, L. *et al.* (2015) "Human papillomavirus DNA prevalence and type distribution in anal carcinomas worldwide," *International Journal of Cancer*. Wiley-Liss Inc., 136(1), pp. 98–107. doi: 10.1002/ijc.28963.
- Alexopoulou, L. *et al.* (2006) "Transmembrane TNF protects mutant mice against intracellular bacterial infections, chronic inflammation and autoimmunity," *European Journal of Immunology*. John Wiley & Sons, Ltd, 36(10), pp. 2768–2780. doi: 10.1002/eji.200635921.
- Allen-Hoffmann, B. L. *et al.* (2000) "Normal Growth and Differentiation in a Spontaneously Immortalized Near-Diploid Human Keratinocyte Cell Line, NIKS," *Journal of Investigative Dermatology*. Elsevier, 114(3), pp. 444–455. doi: 10.1046/J.1523-1747.2000.00869.X.
- Althoff, K. *et al.* (2000) "Shedding of interleukin-6 receptor and tumor necrosis factor  $\alpha$ ," *European Journal of Biochemistry*. John Wiley & Sons, Ltd, 267(9), pp. 2624–2631. doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01278.x.
- Andrea, M. De *et al.* (2010) "Keratinocyte-Specific Stat3 Heterozygosity Impairs Development of Skin Tumors in Human Papillomavirus 8 Transgenic Mice," *Cancer Research*. American Association for Cancer Research, 70(20), pp. 7938–7948. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1128.
- Attieh, Y. *et al.* (2017) "Cancer-associated fibroblasts lead tumor invasion through integrin- $\beta$ 3-dependent fibronectin asse," *Journal of Cell Biology*. Rockefeller University Press, 216(11), pp. 3509–3520. doi: 10.1083/jcb.201702033.
- Azare, J. *et al.* (2011) "Stat3 mediates expression of autotaxin in breast cancer," *PLoS ONE*, 6(11), p. e27851. doi: 10.1371/journal.pone.0027851.
- Bainbridge, P. (2013) "Wound healing and the role of fibroblasts," *Journal of Wound Care*. Mark Allen Group, 22(8), pp. 407–412. doi: 10.12968/jowc.2013.22.8.407.

- Barker, N. *et al.* (2007) "Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5," *Nature*, 449(7165), pp. 1003–1007. doi: 10.1038/nature06196.
- Bastuck, K. (2016) *Funktionale Charakterisierung der Krebs-assoziierten Fibroblasten in der zervikalen Karzinogenese*. Universität des Saarlandes.
- ten Berge, D. *et al.* (2008) "Wnt Signaling Mediates Self-Organization and Axis Formation in Embryoid Bodies," *Cell Stem Cell*. NIH Public Access, 3(5), pp. 508–518. doi: 10.1016/j.stem.2008.09.013.
- Berishaj, M. *et al.* (2007) "Stat3 is tyrosine-phosphorylated through the interleukin-6/glycoprotein 130/Janus kinase pathway in breast cancer," *Breast Cancer Research*, 9(3), p. R32. doi: 10.1186/bcr1680.
- Berning, M. *et al.* (2015) "Three-Dimensional in Vitro Skin and Skin Cancer Models Based on Human Fibroblast-Derived Matrix," *Tissue Engineering - Part C: Methods*, 21(9), pp. 958–970. doi: 10.1089/ten.tec.2014.0698.
- Berrington De González, A. and Green, J. (2007) "Comparison of risk factors for invasive squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix: Collaborative reanalysis of individual data on 8,097 women with squamous cell carcinoma and 1,374 women with adenocarcinoma from 12 epidemiological studies," *International Journal of Cancer*. John Wiley & Sons, Ltd, 120(4), pp. 885–891. doi: 10.1002/ijc.22357.
- Bhosale, P. G. *et al.* (2016) "Low prevalence of transcriptionally active human papilloma virus in Indian patients with HNSCC and leukoplakia," *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*. Mosby Inc., 122(5), pp. 609–618.e7. doi: 10.1016/j.oooo.2016.06.006.
- Black, R. A. *et al.* (1997) "A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- $\alpha$  from cells," *Nature*. Nature Publishing Group, 385(6618), pp. 729–733. doi: 10.1038/385729a0.
- Borriello, L. *et al.* (2017) "Cancer-associated fibroblasts share characteristics and protumorigenic activity with mesenchymal stromal cells," *Cancer Research*. American Association for Cancer Research Inc., 77(18), pp. 5142–5157. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-2586.
- Bour-Jordan, H. and Bluestone, J. A. (2007) "B cell depletion: a novel therapy for autoimmune diabetes?," *The Journal of clinical investigation*. American Society for Clinical Investigation, 117(12), pp. 3642–5. doi: 10.1172/JCI34236.
- Bournazou, E. and Bromberg, J. (2013) "Targeting the tumor microenvironment," *JAK-STAT*. Informa UK Limited, 2(2), p. e23828. doi: 10.4161/jkst.23828.
- Boyer, S. N., Wazer, D. E. and Band, V. (1996) "E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway," *Cancer Research*, 56(20), pp. 4620–4624.

- Brachmann, D. G. *et al.* (1992) "Occurrence of p53 Gene Deletions and Human Papilloma Virus Infection in Human Head and Neck Cancer," *Cancer Research*. American Association for Cancer Research, 52(17), pp. 4832–4836.
- Bruni, L. *et al.* (2016) "Global estimates of human papillomavirus vaccination coverage by region and income level: A pooled analysis," *The Lancet Global Health*. Elsevier Ltd, 4(7), pp. e453–e463. doi: 10.1016/S2214-109X(16)30099-7.
- Bruno, R. D. and Smith, G. H. (2011) "Role of epithelial stem/progenitor cells in mammary cancer," *Gene Expression*, 15(3), pp. 133–140. doi: 10.3727/105221611X13176664479368.
- Bu, L. L. *et al.* (2017) "STAT3 Induces Immunosuppression by Upregulating PD-1/PD-L1 in HNSCC.," *Journal of dental research*. SAGE Publications Inc., 96(9), pp. 1027–1034. doi: 10.1177/0022034517712435.
- Buck, C. B., Day, P. M. and Trus, B. L. (2013) "The papillomavirus major capsid protein L1," *Virology*. NIH Public Access, 445(1–2), pp. 169–174. doi: 10.1016/j.virol.2013.05.038.
- Caby, M. P. *et al.* (2005) "Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma," *International Immunology*, 17(7), pp. 879–887. doi: 10.1093/intimm/dxh267.
- Callagy, G. *et al.* (2000) "Expression of CD44 in uterine cervical squamous neoplasia: A predictor of microinvasion?," *Gynecologic Oncology*. Academic Press Inc., 76(1), pp. 73–79. doi: 10.1006/gyno.1999.5661.
- Calvo, F. *et al.* (2013) "Mechanotransduction and YAP-dependent matrix remodelling is required for the generation and maintenance of cancer-associated fibroblasts," *Nature Cell Biology*, 15(6), pp. 637–646. doi: 10.1038/ncb2756.
- Carlson, M. W. *et al.* (2008) "Three-Dimensional Tissue Models of Normal and Diseased Skin," *Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S. Bonifacino ... [et al.]*. NIH Public Access, CHAPTER(SUPPL. 41), p. Unit. doi: 10.1002/0471143030.CB1909S41.
- Castellsagué, X. *et al.* (2016) "HPV Involvement in Head and Neck Cancers: Comprehensive Assessment of Biomarkers in 3680 Patients," *Journal of the National Cancer Institute*. Oxford University Press, 108(6). doi: 10.1093/jnci/djv403.
- Chan, C. K. *et al.* (2019) "Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer: Epidemiology, Screening, and Vaccination-Review of Current Perspectives.," *Journal of oncology*.
- Chan, K. S. *et al.* (2004) "Disruption of Stat3 reveals a critical role in both the initiation and the promotion stages of epithelial carcinogenesis," *Journal of Clinical Investigation*, 114(5), pp. 720–728. doi: 10.1172/JCI200421032.
- Chaturvedi, A. K. *et al.* (2008) "Incidence trends for human papillomavirus-related

- and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States.," *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. American Society of Clinical Oncology, 26(4), pp. 612–9. doi: 10.1200/JCO.2007.14.1713.
- Chaturvedi, A. K. *et al.* (2011) "Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States," *Journal of Clinical Oncology*. American Society of Clinical Oncology, 29(32), pp. 4294–4301. doi: 10.1200/JCO.2011.36.4596.
- Chen, C. L. *et al.* (2007) "Stat3 activation in human endometrial and cervical cancers," *British Journal of Cancer*. Nature Publishing Group, 96(4), pp. 591–599. doi: 10.1038/sj.bjc.6603597.
- Chen, H. *et al.* (2009) "TGF- $\beta$ -induced fibroblast activation protein expression, fibroblast activation protein expression increases the proliferation, adhesion, and migration of HO-8910PM," *Experimental and Molecular Pathology*. Academic Press, 87(3), pp. 189–194. doi: 10.1016/j.yexmp.2009.09.001.
- Chumduri, C. *et al.* (2021) "Opposing Wnt signals regulate cervical squamocolumnar homeostasis and emergence of metaplasia," *Nature Cell Biology*. Nature Research, 23(2), pp. 184–197. doi: 10.1038/s41556-020-00619-0.
- Classon, M. and Harlow, E. (2002) "The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer," *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group, pp. 910–917. doi: 10.1038/nrc950.
- Combes, J. D. *et al.* (2017) "Prevalence of human papillomavirus in tonsil brushings and gargles in cancer-free patients: The SPLIT study," *Oral Oncology*. Elsevier Ltd, 66, pp. 52–57. doi: 10.1016/j.oraloncology.2017.01.001.
- Contin, C. *et al.* (2003) "Membrane-anchored CD40 is processed by the tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme: Implications for CD40 signaling," *Journal of Biological Chemistry*, 278(35), pp. 32801–32809. doi: 10.1074/jbc.M209993200.
- D'Souza, G. *et al.* (2017) "Differences in the prevalence of human papillomavirus (HPV) in head and neck squamous cell cancers by sex, race, anatomic tumor site, and HPV detection method," *JAMA Oncology*. American Medical Association, 3(2), pp. 169–177. doi: 10.1001/jamaoncol.2016.3067.
- Dahlstrom, K. R. *et al.* (2015) "Socioeconomic characteristics of patients with oropharyngeal carcinoma according to tumor HPV status, patient smoking status, and sexual behavior," *Oral Oncology*. Elsevier Ltd, 51(9), pp. 832–838. doi: 10.1016/j.oraloncology.2015.06.005.
- Dayyani, F. *et al.* (2010) "Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC)," *Head and Neck Oncology*. BioMed Central, 2(1), pp. 1–11. doi: 10.1186/1758-3284-2-15.

- Dimitrov, S. *et al.* (2006) "Sleep enhances IL-6 trans-signaling in humans.," *The FASEB journal*, 20(12), pp. 2174–2176.
- Ding, L. *et al.* (2010) "MiR-375 frequently downregulated in gastric cancer inhibits cell proliferation by targeting JAK2," *Cell Research*. Nature Publishing Group, 20(7), pp. 784–793. doi: 10.1038/cr.2010.79.
- Dolled-Filhart, M. *et al.* (2003) "Tissue microarray analysis of signal transducers and activators of transcription 3 (Stat3) and phospho-Stat3 (Tyr705) in node-negative breast cancer shows nuclear localization is associated with a better prognosis.," *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. American Association for Cancer Research, 9(2), pp. 594–600. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12576423> (Accessed: March 29, 2020).
- Dominitzki, S. *et al.* (2007) "Cutting Edge: Trans- Signaling via the Soluble IL-6R Abrogates the Induction of FoxP3 in Naive CD4 + CD25 – T Cells ," *The Journal of Immunology*. The American Association of Immunologists, 179(4), pp. 2041–2045. doi: 10.4049/jimmunol.179.4.2041.
- Dono, M. *et al.* (1996) "Subepithelial B cells in the human palatine tonsil. I. Morphologic, cytochemical and phenotypic characterization," *European Journal of Immunology*. Wiley-VCH Verlag, 26(9), pp. 2035–2042. doi: 10.1002/eji.1830260911.
- Doorbar, J. (2006) "Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer," *Clinical Science*, 110(5), pp. 525–541. doi: 10.1042/CS20050369.
- Doorbar, J. (2013) "The E4 protein; structure, function and patterns of expression," *Virology*. Academic Press, 445(1–2), pp. 80–98. doi: 10.1016/j.virol.2013.07.008.
- Doorbar, J. *et al.* (2015) "Human papillomavirus molecular biology and disease association," *Reviews in Medical Virology*, 25, pp. 2–23. doi: 10.1002/rmv.1822.
- Doorbar, J. and Griffin, H. (2019) "Refining our understanding of cervical neoplasia and its cellular origins," *Papillomavirus Research*. Elsevier B.V., pp. 176–179. doi: 10.1016/j.pvr.2019.04.005.
- Egawa, N. and Doorbar, J. (2017) "The low-risk papillomaviruses," *Virus Research*. Elsevier, 231, pp. 119–127. doi: 10.1016/J.VIRUSRES.2016.12.017.
- Erdogan, B., Ao, M., White, Lauren M, *et al.* (2017) "Cancer-associated fibroblasts promote directional cancer cell migration by aligning fibronectin.," *The Journal of cell biology*. Rockefeller University Press, 216(11), pp. 3799–3816. doi: 10.1083/jcb.201704053.
- Erdogan, B., Ao, M., White, Lauren M., *et al.* (2017) "Cancer-associated fibroblasts promote directional cancer cell migration by aligning fibronectin," *Journal of Cell Biology*. Rockefeller University Press, 216(11), pp. 3799–3816. doi: 10.1083/jcb.201704053.

- Erdogan, B. and Webb, D. J. (2017) "Cancer-associated fibroblasts modulate growth factor signaling and extracellular matrix remodeling to regulate tumor metastasis," *Biochemical Society Transactions*. Portland Press Ltd, pp. 229–236. doi: 10.1042/BST20160387.
- Ewald, A. J. (2017) "Pulling cells out of tumours," *Nature Cell Biology*. Nature Publishing Group, 19(3), pp. 147–149. doi: 10.1038/ncb3484.
- Fan, T. F. *et al.* (2015) "Tumor growth suppression by inhibiting both autophagy and STAT3 signaling in HNSCC," *Oncotarget*. Impact Journals LLC, 6(41), pp. 43581–43593. doi: 10.18632/oncotarget.6294.
- Fearon, D. T. (2014) "The carcinoma-associated fibroblast expressing fibroblast activation protein and escape from immune surveillance," *Cancer immunology research*, 2(3), pp. 187–193. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0002.
- Feig, C. *et al.* (2013) "Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma-associated fibroblasts synergizes with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 110(50), pp. 20212–20217. doi: 10.1073/pnas.1320318110.
- Fragoso, M. A. *et al.* (2012) "The Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway Cross-Talks with STAT3 Signaling to Regulate Survival of Retinal Pigment Epithelium Cells," *PLoS ONE*. Public Library of Science, 7(10). doi: 10.1371/journal.pone.0046892.
- Frank, D. A., Mahajan, S. and Ritz, J. (1997) "B lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia contain signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 and STAT3 constitutively phosphorylated on serine residues," *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation, 100(12), pp. 3140–3148. doi: 10.1172/JCI119869.
- Fu, L. *et al.* (2011) "Wnt2 secreted by tumour fibroblasts promotes tumour progression in oesophageal cancer by activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin signalling pathway," *Gut*. BMJ Publishing Group, 60(12), pp. 1635–1643. doi: 10.1136/gut.2011.241638.
- Garbers, C. *et al.* (2011) "Species specificity of ADAM10 and ADAM17 proteins in interleukin-6 (IL-6) trans-signaling and novel role of ADAM10 in inducible IL-6 receptor shedding," *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 286(17), pp. 14804–14811. doi: 10.1074/jbc.M111.229393.
- García-Palmero, I. *et al.* (2016) "Twist1-induced activation of human fibroblasts promotes matrix stiffness by upregulating palladin and collagen  $\alpha$ 1(VI)," *Oncogene*. Nature Publishing Group, 35(40), pp. 5224–5236. doi: 10.1038/onc.2016.57.
- Gat, U. *et al.* (1998) "De novo hair follicle morphogenesis and hair tumors in mice

- expressing a truncated  $\beta$ -catenin in skin," *Cell*. Elsevier B.V., 95(5), pp. 605–614. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81631-1.
- Gavert, N. *et al.* (2007) "Expression of L1-CAM and ADAM10 in human colon cancer cells induces metastasis," *Cancer Research*. *Cancer Res*, 67(16), pp. 7703–7712. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0991.
- Genders, R. E. *et al.* (2015) "The presence of betapapillomavirus antibodies around transplantation predicts the development of keratinocyte carcinoma in organ transplant recipients: A cohort study," *Journal of Investigative Dermatology*. Nature Publishing Group, 135(5), pp. 1275–1282. doi: 10.1038/jid.2014.456.
- Gialeli, C., Theocharis, A. D. and Karamanos, N. K. (2011) "Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting," *FEBS Journal*. *FEBS J*, 278(1), pp. 16–27. doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07919.x.
- Gien, L. T., Beauchemin, M. C. and Thomas, G. (2010) "Adenocarcinoma: A unique cervical cancer," *Gynecologic Oncology*. Academic Press, pp. 140–146. doi: 10.1016/j.ygyno.2009.09.040.
- Glentis, A. *et al.* (2017) "Cancer-associated fibroblasts induce metalloprotease-independent cancer cell invasion of the basement membrane," *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 8(1), p. 924. doi: 10.1038/s41467-017-00985-8.
- Grandis, J. R. *et al.* (2000) "Constitutive activation of stat3 signaling abrogates apoptosis in squamous cell carcinogenesis in vivo," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 97(8), pp. 4227–4232. doi: 10.1073/pnas.97.8.4227.
- Grivennikov, S. *et al.* (2009) "IL-6 and Stat3 Are Required for Survival of Intestinal Epithelial Cells and Development of Colitis-Associated Cancer," *Cancer Cell*. Cell Press, 15(2), pp. 103–113. doi: 10.1016/j.ccr.2009.01.001.
- Groot, A. J. *et al.* (2014) "Regulated proteolysis of NOTCH2 and NOTCH3 receptors by A-Disintegrin-And-Metalloproteinase (ADAM) 10 and Presenilins.," *Molecular and cellular biology*, (May). doi: 10.1128/MCB.00206-14.
- Groth, E. *et al.* (2016) "Stimulated release and functional activity of surface expressed metalloproteinase ADAM17 in exosomes," *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. Elsevier B.V., 1863(11), pp. 2795–2808. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.09.002.
- Guinot, A., Oeztuerk-Winder, F. and Ventura, J.-J. (2016) "miR-17-92/p38 $\alpha$  Dysregulation Enhances Wnt Signaling and Selects Lgr6+ Cancer Stem-like Cells during Lung Adenocarcinoma Progression.," *Cancer research*. *Cancer Res*, 76(13), pp. 4012–22. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-3302.
- Haegblom, L. *et al.* (2017) "Time to change perspectives on HPV in oropharyngeal cancer. A systematic review of HPV prevalence per

- oropharyngeal sub-site the last 3 years," *Papillomavirus Research*. Elsevier B.V., 4, pp. 1–11. doi: 10.1016/j.pvr.2017.05.002.
- Haining, E. J. *et al.* (2012) "The TspanC8 subgroup of tetraspanins interacts with a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10) and regulates its maturation and cell surface expression," *Journal of Biological Chemistry*, 287(47), pp. 39753–39765. doi: 10.1074/jbc.M112.416503.
- Hao, J. *et al.* (2006) "WNT/ $\beta$ -catenin pathway up-regulates Stat3 and converges on LIF to prevent differentiation of mouse embryonic stem cells," *Developmental Biology*. Academic Press Inc., 290(1), pp. 81–91. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.11.011.
- Herfs, M. *et al.* (2012) "A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 109(26), pp. 10516–10521. doi: 10.1073/pnas.1202684109.
- Hess, S. *et al.* (2000) "Loss of IL-6 Receptor Expression in Cervical Carcinoma Cells Inhibits Autocrine IL-6 Stimulation: Abrogation of Constitutive Monocyte Chemoattractant Protein-1 Production," *The Journal of Immunology*. The American Association of Immunologists, 165(4), pp. 1939–1948. doi: 10.4049/jimmunol.165.4.1939.
- Hibi, M., Nakajima, K. and Hirano, T. (1996) "IL-6 cytokine family and signal transduction: A model of the cytokine system," *Journal of Molecular Medicine*, 74(1), pp. 1–12. doi: 10.1007/BF00202068.
- Hong, A. *et al.* (2016) "Relationships between p53 mutation, HPV status and outcome in oropharyngeal squamous cell carcinoma," *Radiotherapy and Oncology*. Elsevier Ireland Ltd, 118(2), pp. 342–349. doi: 10.1016/j.radonc.2016.02.009.
- Hoppe-Seyler, K. *et al.* (2018) "The HPV E6/E7 Oncogenes: Key Factors for Viral Carcinogenesis and Therapeutic Targets," *Trends in Microbiology*, 26(2). doi: 10.1016/j.tim.2017.07.007.
- Howe, L. R. *et al.* (2003) "Cancer Research," *Cancer Res*. American Association for Cancer Research, 60(5), pp. 1332–1340.
- Hoyer, B. F. *et al.* (2005) "Long-Lived Plasma Cells and Their Contribution to Autoimmunity," *Annals of the New York Academy of Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd, 1050(1), pp. 124–133. doi: 10.1196/annals.1313.014.
- Hsu, Y. C. and Fuchs, E. (2012) "A family business: Stem cell progeny join the niche to regulate homeostasis," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, pp. 103–114. doi: 10.1038/nrm3272.
- Huang, S. *et al.* (2018) "A novel approach to the classification of epidermodysplasia verruciformis," *International Journal of Dermatology*. Blackwell Publishing Ltd, pp. 1344–1350. doi: 10.1111/ijd.14196.

- Hwang, S. G. *et al.* (2002) "Human papillomavirus type 16 E7 binds to E2F1 and activates E2F1-driven transcription in a retinoblastoma protein-independent manner," *Journal of Biological Chemistry*, 277(4), pp. 2923–2930. doi: 10.1074/jbc.M109113200.
- Ito, T. K. *et al.* (2007) "The VEGF angiogenic switch of fibroblasts is regulated by MMP-7 from cancer cells," *Oncogene*. Nature Publishing Group, 26(51), pp. 7194–7203. doi: 10.1038/sj.onc.1210535.
- Jaks, V. *et al.* (2008) "Lgr5 marks cycling, yet long-lived, hair follicle stem cells," *Nature Genetics*. Nature Publishing Group, 40(11), pp. 1291–1299. doi: 10.1038/ng.239.
- Johansson, C. *et al.* (2012) "HPV-16 E2 contributes to induction of HPV-16 late gene expression by inhibiting early polyadenylation," *EMBO Journal*. European Molecular Biology Organization, 31(14), pp. 3212–3227. doi: 10.1038/emboj.2012.147.
- Johnson, D. E. *et al.* (2020) "Head and neck squamous cell carcinoma," *Nature Reviews Disease Primers*, 6(1). doi: 10.1038/s41572-020-00224-3.
- Jones, D. L., Thompson, D. A. and Münger, K. (1997) "Destabilization of the RB tumor suppressor protein and stabilization of p53 contribute to HPV type 16 E7-induced apoptosis," *Virology*. Academic Press Inc., 239(1), pp. 97–107. doi: 10.1006/viro.1997.8851.
- Jouannet, S. *et al.* (2016) "TspanC8 tetraspanins differentially regulate the cleavage of ADAM10 substrates, Notch activation and ADAM10 membrane compartmentalization," *Cellular and Molecular Life Sciences*. Birkhauser Verlag AG, 73(9), pp. 1895–1915. doi: 10.1007/s00018-015-2111-z.
- Kamionka, E.-M. (2014) *Histologische Untersuchungen von Proteinexpressionsmustern in der zervikalen Karzinogenese*. Universität des Saarlandes.
- Kang, S. Y. C. *et al.* (2015) "Characterization of Epithelial Progenitors in Normal Human Palatine Tonsils and Their HPV16 E6/E7-Induced Perturbation," *Stem Cell Reports*. Cell Press, 5(6), pp. 1210–1225. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.09.020.
- Katoh, Masuko and Katoh, Masaru (2007) "WNT signaling pathway and stem cell signaling network," *Clinical Cancer Research*. American Association for Cancer Research, pp. 4042–4045. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2316.
- Kawano, M. *et al.* (1988) "Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas," *Nature*, 332(6159), pp. 83–85. doi: 10.1038/332083a0.
- Keller, S. *et al.* (2006) "Exosomes: From biogenesis and secretion to biological function," *Immunology Letters*. Elsevier, pp. 102–108. doi: 10.1016/j.imlet.2006.09.005.
- Kim, S.-H. *et al.* (2007) "HPV integration begins in the tonsillar crypt and leads to

- the alteration of p16, EGFR and c-myc during tumor formation," *International Journal of Cancer*. Wiley-Blackwell, 120(7), pp. 1418–1425. doi: 10.1002/ijc.22464.
- Klaes, R. *et al.* (1999) "Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes.," *Cancer research*, 59(24), pp. 6132–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10626803> (Accessed: March 17, 2020).
- Knuchel, S. *et al.* (2015) "Fibroblast surface-associated FGF-2 promotes contactdependent colorectal cancer cell migration and invasion through FGFR-SRC signaling and integrin  $\alpha\beta$ 5-mediated adhesion," *Oncotarget*. Impact Journals LLC, 6(16), pp. 1–18. doi: 10.18632/oncotarget.3883.
- Kobayashi, H. *et al.* (2019) "Cancer-associated fibroblasts in gastrointestinal cancer," *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. Nature Publishing Group, pp. 282–295. doi: 10.1038/s41575-019-0115-0.
- Kojima, Y. *et al.* (2010) "Autocrine TGF- $\beta$  and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 107(46), pp. 20009–20014. doi: 10.1073/pnas.1013805107.
- Kriegler, M. *et al.* (1988) "A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: Ramifications for the complex physiology of TNF," *Cell*, 53(1), pp. 45–53. doi: 10.1016/0092-8674(88)90486-2.
- Kumar, B. *et al.* (2008) "EGFR, p16, HPV titer, Bcl-xL and p53, sex, and smoking as indicators of response to therapy and survival in oropharyngeal cancer," *Journal of Clinical Oncology*. NIH Public Access, 26(19), pp. 3128–3137. doi: 10.1200/JCO.2007.12.7662.
- Kwok, W. K. *et al.* (2005) "Up-regulation of TWIST in prostate cancer and its implication as a therapeutic target," *Cancer Research*, 65(12), pp. 5153–5162. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3785.
- Lambert, P. F. *et al.* (2005) "Using an Immortalized Cell Line to Study the HPV Life Cycle in Organotypic," in *Human Papillomaviruses*. Humana Press, pp. 141–156. doi: 10.1385/1-59259-982-6:141.
- Langhans, S. A. (2018) "Three-Dimensional in Vitro Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning," *Frontiers in Pharmacology*. Frontiers, 9(JAN), p. 6. doi: 10.3389/FPHAR.2018.00006.
- LeBleu, V. S. and Kalluri, R. (2018) "A peek into cancer-associated fibroblasts: Origins, functions and translational impact," *DMM Disease Models and Mechanisms*. Company of Biologists Ltd, 11(4). doi: 10.1242/dmm.029447.
- Lederle, W. *et al.* (2011) "IL-6 promotes malignant growth of skin SCCs by regulating a network of autocrine and paracrine cytokines," *International Journal*

- of Cancer*, 128(12), pp. 2803–2814. doi: 10.1002/ijc.25621.
- Lee, K.-W. *et al.* (2015) “Twist1 Is a Key Regulator of Cancer-Associated Fibroblasts,” *Cancer Research*. American Association for Cancer Research, 75(1), pp. 73–85. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0350.
- Lee, K. W. *et al.* (2015) “Twist1 is a key regulator of cancer-associated fibroblasts,” *Cancer Research*. American Association for Cancer Research Inc., 75(1), pp. 73–85. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0350.
- Leemans, C. R., Snijders, P. J. F. and Brakenhoff, R. H. (2018) “The molecular landscape of head and neck cancer,” *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group. doi: 10.1038/nrc.2018.11.
- Lesina, M. *et al.* (2011) “Stat3/Socs3 Activation by IL-6 Transsignaling Promotes Progression of Pancreatic Intraepithelial Neoplasia and Development of Pancreatic Cancer,” *Cancer Cell*. Cell Press, 19(4), pp. 456–469. doi: 10.1016/j.ccr.2011.03.009.
- Leushacke, M. and Barker, N. (2012) “Lgr5 and Lgr6 as markers to study adult stem cell roles in self-renewal and cancer,” *Oncogene*. Nature Publishing Group, pp. 3009–3022. doi: 10.1038/onc.2011.479.
- Levental, K. R. *et al.* (2009) “Matrix Crosslinking Forces Tumor Progression by Enhancing Integrin Signaling,” *Cell*. Cell Press, 139(5), pp. 891–906. doi: 10.1016/j.cell.2009.10.027.
- Li, L. and Xie, T. (2005) “STEM CELL NICHE: Structure and Function,” *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. Annual Reviews, 21(1), pp. 605–631. doi: 10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131525.
- Lin, L. *et al.* (2011) “STAT3 is necessary for proliferation and survival in colon cancer-initiating cells,” *Cancer Research*. American Association for Cancer Research, 71(23), pp. 7226–7237. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-4660.
- Lopez, J. (2013) “Human Papillomavirus Infections and Cancer Stem Cells of Tumors from the Uterine Cervix,” *The Open Virology Journal*. Bentham Science Publishers Ltd., 6(1), pp. 232–240. doi: 10.2174/1874357901206010232.
- Luga, V. *et al.* (2012) “Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration,” *Cell*. Cell Press, 151(7), pp. 1542–1556. doi: 10.1016/j.cell.2012.11.024.
- Lust, J. *et al.* (1992) “Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor.,” *Cytokine*, 4(2), pp. 96–100.
- Ma, B. *et al.* (2016) “ADAM10 mediates the cell invasion and metastasis of human esophageal squamous cell carcinoma via regulation of E-cadherin activity,” *Oncology Reports*. Spandidos Publications, 35(5), pp. 2785–2794. doi: 10.3892/or.2016.4667.

- Mählck, C. G., Jonsson, H. and Lenner, P. (1994) "Pap smear screening and changes in cervical cancer mortality in Sweden," *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. John Wiley & Sons, Ltd, 44(3), pp. 267–272. doi: 10.1016/0020-7292(94)90177-5.
- Majewski, S. and Jabłońska, S. (1995) "Epidermodysplasia Verruciformis as a Model of Human Papillomavirus—Induced Genetic Cancer of the Skin," *Archives of Dermatology*. American Medical Association, 131(11), p. 1312. doi: 10.1001/archderm.1995.01690230092015.
- Maretzky, T. *et al.* (2005) "ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and  $\beta$ -catenin translocation," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(26), pp. 9182–9187. doi: 10.1073/pnas.0500918102.
- de Martel, C. *et al.* (2020) "Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis," *The Lancet Global Health*. Elsevier Ltd, 8(2), pp. e180–e190. doi: 10.1016/S2214-109X(19)30488-7.
- Martens, J. E. *et al.* (2004) "Cytokeratin 17 and p63 are Markers of the HPV Target Cell, the Cervical Stem Cell," *Anticancer Research*. International Institute of Anticancer Research, 24(2 B), pp. 771–775.
- Martinez-Zapien, D. *et al.* (2016) "Structure of the E6/E6AP/p53 complex required for HPV-mediated degradation of p53," *Nature*. Nature Publishing Group, 529(7587), pp. 541–545. doi: 10.1038/nature16481.
- Matthews, A. L. *et al.* (2017) "Regulation of A disintegrin and metalloproteinase (ADAM) family sheddases ADAM10 and ADAM17: The emerging role of tetraspanins and rhomboids," *Platelets*. Taylor & Francis, 28(4), pp. 333–341. doi: 10.1080/09537104.2016.1184751.
- McLemore, M. R. (2006) "Gardasil: Introducing the new human papillomavirus vaccine.," *Clinical journal of oncology nursing*, 10(5), pp. 559–560. doi: 10.1188/06.CJON.559-560.
- Miao, C. *gui et al.* (2015) "MiR-375 regulates the canonical Wnt pathway through FZD8 silencing in arthritis synovial fibroblasts," *Immunology Letters*. Elsevier, 164(1), pp. 1–10. doi: 10.1016/j.imlet.2015.01.003.
- Miao, L. *et al.* (2014) "miR-375 inhibits Helicobacter pylori-induced gastric carcinogenesis by blocking JAK2-STAT3 signaling," *Cancer Immunology, Immunotherapy*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 63(7), pp. 699–711. doi: 10.1007/s00262-014-1550-y.
- Middleton, K. *et al.* (2003) "Organization of Human Papillomavirus Productive Cycle during Neoplastic Progression Provides a Basis for Selection of Diagnostic Markers," *Journal of Virology*. American Society for Microbiology, 77(19), pp. 10186–10201. doi: 10.1128/jvi.77.19.10186-10201.2003.

- Miki, S. *et al.* (1989) "Interleukin-6 (IL-6) functions as an in vitro autocrine growth factor in renal cell carcinomas," *FEBS Letters*, 250(2), pp. 607–610. doi: 10.1016/0014-5793(89)80805-1.
- Mikuličić, S. *et al.* (2019) "ADAM17-dependent signaling is required for oncogenic Human Papilloma virus entry platform assembly," *eLife*, 8. doi: 10.7554/eLife.44345.
- Mikuličić, S. and Florin, L. (2019) "The endocytic trafficking pathway of oncogenic papillomaviruses," *Papillomavirus Research*. Elsevier B.V., pp. 135–137. doi: 10.1016/j.pvr.2019.03.004.
- Mirkovic, J. *et al.* (2015) "Carcinogenic HPV infection in the cervical squamocolumnar junction," *Journal of Pathology*. John Wiley and Sons Ltd, 236(3), pp. 265–271. doi: 10.1002/path.4533.
- miRTarBase* (no date). Available at: <http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/detail.php?mirtid=MIRT001749> (Accessed: April 21, 2020).
- Miscia, S. *et al.* (2002) "Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) activates Jak1/Stat3-Stat5B signaling through TNFR-1 in human B cells.," *Cell growth & differentiation: the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*, 13(1), pp. 13–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11801527> (Accessed: April 14, 2020).
- Moore, K. A. and Lemischka, I. R. (2006) "Stem cells and their niches," *Science*. American Association for the Advancement of Science, pp. 1880–1885. doi: 10.1126/science.1110542.
- Morbini, P. *et al.* (2015) "Markers of squamocolumnar junction cells in normal tonsils and oropharyngeal cancer with and without HPV infection," *Histology and Histopathology*. Histology and Histopathology, 30(7), pp. 833–839. doi: 10.14670/HH-11-590.
- Mülberg, J. *et al.* (1993) "The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding," *European Journal of Immunology*. WILEY-VCH Verlag GmbH, 23(2), pp. 473–480. doi: 10.1002/eji.1830230226.
- Müllberg, J. *et al.* (1993) "The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding.," *European Journal of Immunology*, 23(2), pp. 473–480.
- Müllberg, J. *et al.* (1994) "The soluble human IL-6 receptor. Mutational characterization of the proteolytic cleavage site.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. American Association of Immunologists, 152(10), pp. 4958–68. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8176214> (Accessed: April 9, 2020).
- Münger, K. and Howley, P. M. (2002) "Human papillomavirus immortalization and transformation functions," *Virus Research*. Elsevier, 89(2), pp. 213–228. doi:

- 10.1016/S0168-1702(02)00190-9.
- Murakami, M. *et al.* (1993) "IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase," *Science*. American Association for the Advancement of Science, 260(5115), pp. 1808–1810. doi: 10.1126/science.8511589.
- Nagano, O. *et al.* (2004) "Cell-matrix interaction via CD44 is independently regulated by different metalloproteinases activated in response to extracellular Ca<sup>2+</sup> influx and PKC activation," *Journal of Cell Biology*. The Rockefeller University Press, 165(6), pp. 893–902. doi: 10.1083/jcb.200310024.
- Nagao, K. *et al.* (2012) "Brief report: Requirement of TACE/ADAM17 for hair follicle bulge niche establishment," *Stem Cells*. John Wiley & Sons, Ltd, 30(8), pp. 1781–1785. doi: 10.1002/stem.1153.
- Nagasaki, T. *et al.* (2014) "Interleukin-6 released by colon cancer-associated fibroblasts is critical for tumour angiogenesis: Anti-interleukin-6 receptor antibody suppressed angiogenesis and inhibited tumour-stroma interaction," *British Journal of Cancer*. Nature Publishing Group, 110(2), pp. 469–478. doi: 10.1038/bjc.2013.748.
- Nave, H., Gebert, A. and Pabst, R. (2001) "Morphology and immunology of the human palatine tonsil," *Anatomy and Embryology*. Springer, pp. 367–373. doi: 10.1007/s004290100210.
- Ndiaye, C. *et al.* (2014) "HPV DNA, E6/E7 mRNA, and p16INK4a detection in head and neck cancers: A systematic review and meta-analysis," *The Lancet Oncology*. Lancet Publishing Group, 15(12), pp. 1319–1331. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70471-1.
- Neiva, K. G. *et al.* (2009) "Cross talk initiated by endothelial cells enhances migration and inhibits anoikis of squamous cell carcinoma cells through STAT3/Akt/ERK signaling," *Neoplasia*. Neoplasia, 11(6), pp. 583–593. doi: 10.1593/neo.09266.
- NIAID (2019) *Papillomavirus Episteme, National Institute of Allergy and Infectious Diseases*. Available at: [https://pave.niaid.nih.gov/#explore/taxonomy/taxonomy\\_concept](https://pave.niaid.nih.gov/#explore/taxonomy/taxonomy_concept) (Accessed: March 16, 2020).
- Nishimura, A. *et al.* (2000) "Mechanisms of Human Papillomavirus E2-Mediated Repression of Viral Oncogene Expression and Cervical Cancer Cell Growth Inhibition," *Journal of Virology*. American Society for Microbiology, 74(8), pp. 3752–3760. doi: 10.1128/jvi.74.8.3752-3760.2000.
- Niu, G. *et al.* (2002) "Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis," *Oncogene*. Nature Publishing Group, 21(13), pp. 2000–2008. doi: 10.1038/sj.onc.1205260.
- Nowak, J. A. *et al.* (2008) "Hair follicle stem cells are specified and function in early

- skin morphogenesis," *Cell Stem Cell*. Cell Press, 3(1), pp. 33–43. doi: 10.1016/j.stem.2008.05.009.
- Nurmik, M. *et al.* (2020) "In search of definitions: Cancer-associated fibroblasts and their markers," *International Journal of Cancer*. doi: 10.1002/ijc.32193.
- Orimo, A. *et al.* (2005) "Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion," *Cell*, 121(3), pp. 335–348. doi: 10.1016/j.cell.2005.02.034.
- Orsulic, S. *et al.* (1999) "E-cadherin binding prevents beta-catenin nuclear localization and beta-catenin/LEF-1-mediated transactivation.," *Journal of cell science*, 112(8), pp. 1237–45. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10085258>.
- Özdemir, B. C. *et al.* (2014) "Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival," *Cancer Cell*. Cell Press, 25(6), pp. 719–734. doi: 10.1016/j.ccr.2014.04.005.
- Palmer, E. *et al.* (2014) "Human papillomavirus infection is rare in nonmalignant tonsil tissue in the UK: Implications for tonsil cancer precursor lesions," *International Journal of Cancer*. Wiley-Liss Inc., 135(10), pp. 2437–2443. doi: 10.1002/ijc.28886.
- Palmer, T. *et al.* (2019) "Prevalence of cervical disease at age 20 after immunisation with bivalent HPV vaccine at age 12-13 in Scotland: Retrospective population study," *BMJ (Online)*. BMJ Publishing Group, 365. doi: 10.1136/bmj.l1161.
- Pan, Y. *et al.* (2012) "ADAM10 promotes pituitary adenoma cell migration by regulating cleavage of CD44 and L1," *Journal of Molecular Endocrinology*, 49(1), pp. 21–33. doi: 10.1530/JME-11-0174.
- Pankova, D. *et al.* (2016) "Cancer-associated fibroblasts induce a collagen cross-link switch in tumor stroma," *Molecular Cancer Research*. American Association for Cancer Research Inc., 14(3), pp. 287–295. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-15-0307.
- Patel, C. *et al.* (2018) "The impact of 10 years of human papillomavirus (HPV) vaccination in Australia: What additional disease burden will a nonavalent vaccine prevent?," *Eurosurveillance*. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), pp. 30–40. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.41.1700737.
- Patel, T. *et al.* (2010) "Epidermodysplasia verruciformis and susceptibility to HPV," *Disease Markers*. IOS Press, 29, pp. 199–206. doi: 10.3233/DMA-2010-0733.
- Peh, W. L. *et al.* (2004) "The Viral E4 Protein Is Required for the Completion of the Cottontail Rabbit Papillomavirus Productive Cycle In Vivo," *Journal of Virology*. American Society for Microbiology, 78(4), pp. 2142–2151. doi: 10.1128/jvi.78.4.2142-2151.2004.

- Perry, M. E. (1994) "The specialised structure of crypt epithelium in the human palatine tonsil and its functional significance," *Journal of anatomy*. Wiley-Blackwell, 185 ( Pt 1)(Pt 1), pp. 111–27. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7559106> (Accessed: March 20, 2020).
- Peters, M. *et al.* (1996) "The function of the soluble interleukin 6 (IL-6) receptor in vivo: Sensitization of human soluble IL-6 receptor transgenic mice towards IL-6 and prolongation of the plasma half-life of IL-6," *Journal of Experimental Medicine*. The Rockefeller University Press, 183(4), pp. 1399–1406. doi: 10.1084/jem.183.4.1399.
- Pett, M. R. *et al.* (2004) "Acquisition of High-Level Chromosomal Instability Is Associated with Integration of Human Papillomavirus Type 16 in Cervical Keratinocytes," *Cancer Research*, 64(4), pp. 1359–1368. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-03-3214.
- Pietras, K. and Östman, A. (2010) "Hallmarks of cancer: Interactions with the tumor stroma," *Experimental Cell Research*. Academic Press Inc., pp. 1324–1331. doi: 10.1016/j.yexcr.2010.02.045.
- Pimple, S., Mishra, G. and Shastri, S. (2016) "Global strategies for cervical cancer prevention," *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*. Lippincott Williams and Wilkins, pp. 4–10. doi: 10.1097/GCO.0000000000000241.
- Pisitkun, T., Shen, R. F. and Knepper, M. A. (2004) "Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(36), pp. 13368–13373. doi: 10.1073/pnas.0403453101.
- Pruessmeyer, J. *et al.* (2014) "Leukocytes require ADAM10 but not ADAM17 for their migration and inflammatory recruitment into the alveolar space," *Blood*. American Society of Hematology, 123(26), pp. 4077–4088. doi: 10.1182/blood-2013-09-511543.
- Pyeon, D. *et al.* (2009) "Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression," *PLoS Pathogens*, 5(2). doi: 10.1371/journal.ppat.1000318.
- Qin, Q. *et al.* (2012) "Normal and disease-related biological functions of Twist1 and underlying molecular mechanisms," *Cell Research*. Nature Publishing Group, pp. 90–106. doi: 10.1038/cr.2011.144.
- Qin, X. *et al.* (2018) "Cancer-associated Fibroblast-derived IL-6 promotes head and neck cancer progression via the osteopontin-NF-kappa B signaling pathway," *Theranostics*. Ivyspring International Publisher, 8(4), pp. 921–940. doi: 10.7150/thno.22182.
- Räsänen, K. and Vaheri, A. (2010) "Activation of fibroblasts in cancer stroma," *Experimental Cell Research*. Academic Press Inc., 316(17), pp. 2713–2722. doi: 10.1016/j.yexcr.2010.04.032.

- Rauvala, M. *et al.* (2006) "Matrix metalloproteinases-2 and -9 in cervical cancer: different roles in tumor progression," *International Journal of Gynecologic Cancer*. BMJ, 16(3), pp. 1297–1302. doi: 10.1136/ijgc-00009577-200605000-00052.
- Reeh, H. *et al.* (2019) "Response to IL-6 trans- A nd IL-6 classic signalling is determined by the ratio of the IL-6 receptor  $\alpha$  to gp130 expression: Fusing experimental insights and dynamic modelling," *Cell Communication and Signaling*. BioMed Central Ltd., 17(1), p. 46. doi: 10.1186/s12964-019-0356-0.
- Reinhold, M. I. *et al.* (2006) "The Wnt-inducible Transcription Factor Twist1 Inhibits Chondrogenesis \*," *Journal of Biological Chemistry*. Elsevier, 281(3), pp. 1381–1388. doi: 10.1074/JBC.M504875200.
- Reiss, K. *et al.* (2005) "ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and  $\beta$ -catenin nuclear signalling," *EMBO Journal*, 24(4), pp. 742–752. doi: 10.1038/sj.emboj.7600548.
- Reuschenbach, M. *et al.* (2019) "A systematic review of the HPV-attributable fraction of oropharyngeal squamous cell carcinomas in Germany," *Cancer Medicine*. Blackwell Publishing Ltd, 8(4), pp. 1908–1918. doi: 10.1002/cam4.2039.
- Rhim, A. D. *et al.* (2014) "Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma," *Cancer Cell*. Cell Press, 25(6), pp. 735–747. doi: 10.1016/j.ccr.2014.04.021.
- Richards, K. E. *et al.* (2017) "Cancer-associated fibroblast exosomes regulate survival and proliferation of pancreatic cancer cells," *Oncogene*. Nature Publishing Group, 36(13), pp. 1770–1778. doi: 10.1038/onc.2016.353.
- Rieck, T. *et al.* (2020) "Epidemiologisches Bulletin - Impfquoten von Kinderschutzimpfungen in Deutschland – aktuelle Ergebnisse aus der RKI-Impfsurveillance," *Epidemiologisches Bulletin*, 32/33. doi: 10.25646/7027.4.
- Rieth, K. K. S. *et al.* (2018) "Prevalence of High-Risk Human Papillomavirus in Tonsil Tissue in Healthy Adults and Colocalization in Biofilm of Tonsillar Crypts," *JAMA Otolaryngology–Head & Neck Surgery*. American Medical Association, 144(3), p. 231. doi: 10.1001/jamaoto.2017.2916.
- Riethmueller, S. *et al.* (2017) "Proteolytic Origin of the Soluble Human IL-6R In Vivo and a Decisive Role of N-Glycosylation," *PLoS Biology*. Edited by P. Marrack. Public Library of Science, 15(1), p. e2000080. doi: 10.1371/journal.pbio.2000080.
- Roden, R. and Wu, T.-C. (2006) "How will HPV vaccines affect cervical cancer?," *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group, 6(10), pp. 753–763. doi: 10.1038/nrc1973.
- Roncalli, M. *et al.* (1988) "Immunophenotypic analysis of the transformation zone of human cervix," *Laboratory Investigation*, 58(2), pp. 141–149.

- Ronco, G. *et al.* (2010) "Efficacy of human papillomavirus testing for the detection of invasive cervical cancers and cervical intraepithelial neoplasia: a randomised controlled trial," *The Lancet Oncology*, 11(3), pp. 249–257. doi: 10.1016/S1470-2045(09)70360-2.
- Rose-John, S. (2012) "IL-6 Trans-Signaling via the Soluble IL-6 Receptor: Importance for the Pro-Inflammatory Activities of IL-6," *International journal of biological sciences*, 8(9), pp. 1237–1247.
- Rubin Grandis, J. *et al.* (1998) "Requirement of Stat3 but not Stat1 activation for epidermal growth factor receptor-mediated cell growth in vitro," *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation, 102(7), pp. 1385–1392. doi: 10.1172/jci3785.
- Sahai, E. *et al.* (2020) "A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts," *Nature Reviews Cancer*. Nature Research, pp. 174–186. doi: 10.1038/s41568-019-0238-1.
- Sansone, P. *et al.* (2007) "IL-6 triggers malignant features in mammospheres from human ductal breast carcinoma and normal mammary gland," *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation, 117(12), pp. 3988–4002. doi: 10.1172/JCI32533.
- Sato, T. *et al.* (2011) "Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts," *Nature*. Nature Publishing Group, 469(7330), pp. 415–418. doi: 10.1038/nature09637.
- Schiffman, M. *et al.* (2016) "Carcinogenic human papillomavirus infection," *Nature Reviews Disease Primers*. Nature Publishing Group, 2. doi: 10.1038/nrdp.2016.86.
- Schlecht, N. F. *et al.* (2001) "Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia," *Journal of the American Medical Association*. American Medical Association, 286(24), pp. 3106–3114. doi: 10.1001/jama.286.24.3106.
- Schlegel, R. *et al.* (1988) "Quantitative keratinocyte assay detects two biological activities of human papillomavirus DNA and identifies viral types associated with cervical carcinoma.," *The EMBO Journal*. John Wiley & Sons, Ltd, 7(10), pp. 3181–3187. doi: 10.1002/j.1460-2075.1988.tb03185.x.
- Schofield, R. (1978) "The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. A hypothesis," *Blood Cells*, 4(1–2), pp. 7–25.
- Schröer, N. *et al.* (2011) "Molecular pathobiology of human cervical high-grade lesions: Paracrine STAT3 activation in tumor-instructed myeloid cells drives local MMP-9 expression," *Cancer Research*. American Association for Cancer Research, 71(1), pp. 87–97. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2193.
- Schumacher, N. *et al.* (2015) "Shedding of endogenous interleukin-6 receptor (IL-6R) is governed by a disintegrin and metalloproteinase (ADAM) proteases while

- a full-length IL-6R isoform localizes to circulating microvesicles," *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc., 290(43), pp. 26059–26071. doi: 10.1074/jbc.M115.649509.
- Sheu, B.-C. *et al.* (2003) "Increased expression and activation of gelatinolytic matrix metalloproteinases is associated with the progression and recurrence of human cervical cancer," *Cancer research*, 63(19), pp. 6537–42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14559848>.
- Shimoda, M. *et al.* (2014) "Loss of the Timp gene family is sufficient for the acquisition of the CAF-like cell state," *Nature Cell Biology*. Nature Publishing Group, 16(9), pp. 889–901. doi: 10.1038/ncb3021.
- Shimoda, M. and Khokha, R. (2017) "Metalloproteinases in extracellular vesicles," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. Elsevier, 1864(11), pp. 1989–2000. doi: 10.1016/J.BBAMCR.2017.05.027.
- Da Silva-Diz, V. *et al.* (2013) "Progeny of Lgr5-expressing hair follicle stem cell contributes to papillomavirus-induced tumor development in epidermis," *Oncogene*. Nature Publishing Group, 32(32), pp. 3732–3743. doi: 10.1038/onc.2012.375.
- Singer, A. (1975) "THE UTERINE CERVIX FROM ADOLESCENCE TO THE MENOPAUSE," *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*. John Wiley & Sons, Ltd, 82(2), pp. 81–99. doi: 10.1111/j.1471-0528.1975.tb02204.x.
- Skog, J. *et al.* (2008) "Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers," *Nature Cell Biology*. Nature Publishing Group, 10(12), pp. 1470–1476. doi: 10.1038/ncb1800.
- Smedts, F. *et al.* (1992) "Basal-cell keratins in cervical reserve cells and a comparison to their expression in cervical intraepithelial neoplasia," *American Journal of Pathology*, 140(3), pp. 601–612.
- Smola, S. (2019) "Immune deviation and cervical carcinogenesis," *Papillomavirus Research*. Elsevier B.V., pp. 164–167. doi: 10.1016/j.pvr.2019.03.006.
- Snippert, H. J. *et al.* (2010) "Lgr6 marks stem cells in the hair follicle that generate all cell lineages of the skin.," *Science (New York, N.Y.)*. American Association for the Advancement of Science, 327(5971), pp. 1385–9. doi: 10.1126/science.1184733.
- Sommer, J. *et al.* (2012) "Constitutively active mutant gp130 receptor protein from inflammatory hepatocellular adenoma is inhibited by an anti-gp130 antibody that specifically neutralizes interleukin 11 signaling.," *The Journal of biological chemistry*, 287(17), pp. 13743–51. doi: 10.1074/jbc.M111.349167.
- Spoden, G. *et al.* (2008) "Clathrin- and caveolin-independent entry of human papillomavirus type 16 - Involvement of tetraspanin-enriched microdomains (TEMs)," *PLoS ONE*, 3(10), p. e3313. doi: 10.1371/journal.pone.0003313.

- Srour, N. *et al.* (2003) "TACE/ADAM-17 maturation and activation of sheddase activity require proprotein convertase activity," *FEBS Letters*. Elsevier, 554(3), pp. 275–283. doi: 10.1016/S0014-5793(03)01159-1.
- Stetler-Stevenson, W. G., Kruttsch, H. C. and Liotta, L. A. (1989) "Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2). A new member of the metalloproteinase inhibitor family," *Journal of Biological Chemistry*, 264(29), pp. 17374–17378. Available at: <https://www.jbc.org/content/264/29/17374.short> (Accessed: April 16, 2020).
- Stoeck, A. *et al.* (2006) "A role for exosomes in the constitutive and stimulus-induced ectodomain cleavage of L1 and CD44," *Biochemical Journal*. Portland Press, 393(3), pp. 609–618. doi: 10.1042/BJ20051013.
- Studebaker, A. W. *et al.* (2008) "Fibroblasts isolated from common sites of breast cancer metastasis enhance cancer cell growth rates and invasiveness in an interleukin-6-dependent manner," *Cancer Research*. American Association for Cancer Research Inc., 68(21), pp. 9087–9095. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0400.
- Sturgis, E. M., Wei, Q. and Spitz, M. R. (2004) "Descriptive epidemiology and risk factors for head and neck cancer," *Seminars in Oncology*. W.B. Saunders, 31(6), pp. 726–733. doi: 10.1053/j.seminoncol.2004.09.013.
- Sugihara, H. *et al.* (2015) "Cancer-associated fibroblast-derived CXCL12 causes tumor progression in adenocarcinoma of the esophagogastric junction," *Medical Oncology*. Humana Press Inc., 32(6), pp. 1–7. doi: 10.1007/s12032-015-0618-7.
- Sung, C. O. *et al.* (2011) "Twist1 is up-regulated in gastric cancer-associated fibroblasts with poor clinical outcomes," *American Journal of Pathology*, 179(4), pp. 1827–1838. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.06.032.
- Sung, H. *et al.* (2021) "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries," *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. American Cancer Society, 71(3), pp. 209–249. doi: 10.3322/CAAC.21660.
- Syrjänen, S. (2004) "HPV infections and tonsillar carcinoma," *Journal of Clinical Pathology*. BMJ Publishing Group, pp. 449–455. doi: 10.1136/jcp.2003.008656.
- Taga, T. *et al.* (1989) "Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130," *Cell*, 58(3), pp. 573–581. doi: 10.1016/0092-8674(89)90438-8.
- Taga, T. (2002) "gp130, a Shared Signal Transducing Receptor Component for Hematopoietic and Neuropoietic Cytokines," *Journal of Neurochemistry*. Wiley-Blackwell, 67(1), pp. 1–10. doi: 10.1046/j.1471-4159.1996.67010001.x.
- Taga, T. and Kishimoto, T. (1997) "gp 130 AND THE INTERLEUKIN-6 FAMILY OF CYTOKINES ," *Annual Review of Immunology*. Annual Reviews, 15(1), pp. 797–819. doi: 10.1146/annurev.immunol.15.1.797.

- Taichman, L. B., Reilly, S. S. and LaPorta, R. F. (1983) "The role of keratinocyte differentiation in the expression of epitheliotropic viruses," *Journal of Investigative Dermatology*. Elsevier, 81(1 Suppl.), pp. S137–S140. doi: 10.1111/1523-1747.ep12540909.
- Takahashi, H. *et al.* (2017) "Cancer-associated fibroblasts promote an immunosuppressive microenvironment through the induction and accumulation of protumoral macrophages," *Oncotarget*. Impact Journals, LLC, 8(5), p. 8633. doi: 10.18632/oncotarget.14374.
- Tanaka, H. *et al.* (2017) "Preventive effect of human papillomavirus vaccination on the development of uterine cervical lesions in young Japanese women," *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. Blackwell Publishing, 43(10), pp. 1597–1601. doi: 10.1111/jog.13419.
- Tanaka, T. *et al.* (2009) "Frequent downregulation or loss of CD79a expression in plasma cell myelomas: Potential clue for diagnosis," *Pathology International*. John Wiley & Sons, Ltd, 59(11), pp. 804–808. doi: 10.1111/j.1440-1827.2009.02448.x.
- Tanaka, T., Narazaki, M. and Kishimoto, T. (2014) "IL-6 in inflammation, Immunity, And disease," *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 6(10). doi: 10.1101/cshperspect.a016295.
- Taylor, D. D. and Gercel-Taylor, C. (2008) "MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer," *Gynecologic Oncology*. Academic Press Inc., 110(1), pp. 13–21. doi: 10.1016/j.ygyno.2008.04.033.
- TD Kesis, DC Connolly, L Hedrick, K. C. (1996) "Expression of HPV16 E6 or E7 increases integration of foreign DNA.," *Oncogene*.
- van Tetering, G. *et al.* (2009) "Metalloprotease ADAM10 is required for Notch1 site 2 cleavage," *Journal of Biological Chemistry*, 284(45), pp. 31018–31027. doi: 10.1074/jbc.M109.006775.
- Thisse, B., Messal, M. El and Perrin-Schmitt, F. (1987) "The twist gene: Isolation of a *Drosophila* zygote gene necessary for the establishment of dorsoventral pattern," *Nucleic Acids Research*, 15(8), pp. 3439–3453. doi: 10.1093/nar/15.8.3439.
- Treitz, J. (2016) *Analysis of the canonical Wnt signaling pathway in cervical smears*. Universität des Saarlandes.
- Tumbar, T. *et al.* (2004) "Defining the Epithelial Stem Cell Niche in Skin," *Science*. American Association for the Advancement of Science, 303(5656), pp. 359–363. doi: 10.1126/science.1092436.
- de Villiers, E.-M. *et al.* (2004) "Classification of papillomaviruses," *Virology*. Academic Press, 324(1), pp. 17–27. doi: 10.1016/J.VIROL.2004.03.033.
- Vinokurova, S. *et al.* (2008) "Type-dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions," *Cancer Research*. American

- Association for Cancer Research, 68(1), pp. 307–313. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2754.
- Walboomers, J. M. M. *et al.* (1999) "Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide," *The Journal of Pathology*. John Wiley & Sons, Ltd, 189(1), pp. 12–19. doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(199909)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F.
- Walch-Rückheim, B. *et al.* (2015) "Stromal fibroblasts induce CCL20 through IL6/C/EBP $\beta$  to support the recruitment of Th17 cells during cervical cancer progression," *Cancer Research*. American Association for Cancer Research Inc., 75(24), pp. 5248–5259. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0732.
- Walch-Rückheim, B. *et al.* (2016) "STAT3/IRF1 pathway activation sensitizes cervical cancer cells to chemotherapeutic drugs," *Cancer Research*. American Association for Cancer Research Inc., 76(13), pp. 3872–3883. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1306.
- Walter, M. *et al.* (2009) "Interleukin 6 secreted from adipose stromal cells promotes migration and invasion of breast cancer cells," *Oncogene*. NIH Public Access, 28(30), pp. 2745–2755. doi: 10.1038/onc.2009.130.
- Wang, F. *et al.* (2011) "MiR-375 is down-regulated in squamous cervical cancer and inhibits cell migration and invasion via targeting transcription factor SP1," *American Journal of Pathology*. Elsevier, 179(5), pp. 2580–2588. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.07.037.
- Wang, H.-K. *et al.* (2009) "Robust production and passaging of infectious HPV in squamous epithelium of primary human keratinocytes.," *Genes & development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 23(2), pp. 181–94. doi: 10.1101/gad.1735109.
- Wang, J. W. and Roden, R. B. S. (2013) "L2, the minor capsid protein of papillomavirus," *Virology*. NIH Public Access, 445(1–2), pp. 175–186. doi: 10.1016/j.virol.2013.04.017.
- Wang, Q. *et al.* (2004) "Functional Analysis of the Human Papillomavirus Type 16 E1 E4 Protein Provides a Mechanism for In Vivo and In Vitro Keratin Filament Reorganization," *Journal of Virology*. American Society for Microbiology, 78(2), pp. 821–833. doi: 10.1128/jvi.78.2.821-833.2004.
- Wang, T. *et al.* (2004) "Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells," *Nature Medicine*. Nature Publishing Group, 10(1), pp. 48–54. doi: 10.1038/nm976.
- Wang, Y. *et al.* (2013) "MiR-375 regulates rat alveolar epithelial cell trans-differentiation by inhibiting Wnt/ $\beta$ -catenin pathway," *Nucleic Acids Research*, 41(6), pp. 3833–3844. doi: 10.1093/nar/gks1460.
- Wei, L. H. *et al.* (2003) "Interleukin-6 promotes cervical tumor growth by VEGF-

- dependent angiogenesis via a STAT3 pathway," *Oncogene*. Nature Publishing Group, 22(10), pp. 1517–1527. doi: 10.1038/sj.onc.1206226.
- Wei, S. C. *et al.* (2015) "Matrix stiffness drives epithelial-mesenchymal transition and tumour metastasis through a TWIST1-G3BP2 mechanotransduction pathway," *Nature Cell Biology*. Nature Publishing Group, 17(5), pp. 678–688. doi: 10.1038/ncb3157.
- Werness, B., Levine, A. and Howley, P. (1990) "Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53," *Science*, 248(4951), pp. 76–79. doi: 10.1126/science.2157286.
- Westra, W. H. (2012) "The Morphologic Profile of HPV-Related Head and Neck Squamous Carcinoma: Implications for Diagnosis, Prognosis, and Clinical Management," *Head and Neck Pathology*. Springer, pp. 48–54. doi: 10.1007/s12105-012-0371-6.
- WHO (2018) *GLOBOCAN*.
- Wigle, J., Coast, E. and Watson-Jones, D. (2013) "Human papillomavirus (HPV) vaccine implementation in low and middle-income countries (LMICs): Health system experiences and prospects," *Vaccine*. Elsevier, pp. 3811–3817. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.06.016.
- "Wissenschaftliche Begründung für die Empfehlung der HPV-Impfung für Jungen im Alter von 9 bis 14 Jahren" (2018) *Epidemiologisches Bulletin*, 26.
- Wong, E. *et al.* (2015) "The functional maturation of a disintegrin and metalloproteinase (ADAM) 9, 10, and 17 requires processing at a newly identified proprotein convertase (PC) cleavage site," *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc., 290(19), pp. 12135–12146. doi: 10.1074/jbc.M114.624072.
- Woods, N. *et al.* (2015) "Fendiline inhibits proliferation and invasion of pancreatic cancer cells by interfering with ADAM10 activation and  $\beta$ -catenin signaling," *Oncotarget*. Impact Journals LLC, 6(34), pp. 35931–35948. doi: 10.18632/oncotarget.5933.
- Wu, J. *et al.* (2015) "MiR-145, a microRNA targeting ADAM17, inhibits the invasion and migration of nasopharyngeal carcinoma cells," *Experimental Cell Research*. Academic Press Inc., 338(2), pp. 232–238. doi: 10.1016/j.yexcr.2015.08.006.
- Wu, V. *et al.* (2018) "ALDH1A1 positive cells are a unique component of the tonsillar crypt niche and are lost along with NGFR positive stem cells during tumorigenesis," *Pathology*. Elsevier B.V., 50(5), pp. 524–529. doi: 10.1016/j.pathol.2018.03.002.
- Xiao, L. J. *et al.* (2012) "ADAM17 targets MMP-2 and MMP-9 via EGFR-MEK-ERK pathway activation to promote prostate cancer cell invasion," *International Journal*

- of Oncology*. Spandidos Publications, 40(5), pp. 1714–1724. doi: 10.3892/ijo.2011.1320.
- Xu, Q. *et al.* (2005) “Targeting Stat3 blocks both HIF-1 and VEGF expression induced by multiple oncogenic growth signaling pathways,” *Oncogene*. Nature Publishing Group, 24(36), pp. 5552–5560. doi: 10.1038/sj.onc.1208719.
- Yang, X. *et al.* (2016) “FAP Promotes immunosuppression by cancer-associated fibroblasts in the tumor microenvironment via STAT3-CCL2 Signaling,” *Cancer Research*. American Association for Cancer Research Inc., 76(14), pp. 4124–4135. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-2973.
- Yeo, S. Y. *et al.* (2017) “Twist1 is highly expressed in cancer-associated fibroblasts of esophageal squamous cell carcinoma with a prognostic significance,” *Oncotarget*. Impact Journals LLC, 8(39), pp. 65265–65280. doi: 10.18632/oncotarget.17941.
- Yoshida, K. *et al.* (1996) “Targeted disruption of gp130, a common signal transducer for the interleukin 6 family of cytokines, leads to myocardial and hematological disorders,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 93(1), pp. 407–411. doi: 10.1073/pnas.93.1.407.
- Yu, H. *et al.* (2014) “Decreased circulating miR-375: A potential biomarker for patients with non-small-cell lung cancer,” *Gene*. Elsevier, 534(1), pp. 60–65. doi: 10.1016/j.gene.2013.10.024.
- Yu, H., Pardoll, D. and Jove, R. (2009) “STATs in cancer inflammation and immunity: A leading role for STAT3,” *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group, pp. 798–809. doi: 10.1038/nrc2734.
- Yuen, H. F. *et al.* (2007) “Upregulation of Twist in oesophageal squamous cell carcinoma is associated with neoplastic transformation and distant metastasis,” *Journal of Clinical Pathology*, 60(5), pp. 510–514. doi: 10.1136/jcp.2006.039099.
- Zakrzewski, W. *et al.* (2019) “Stem cells: past, present, and future,” *Stem Cell Research & Therapy* 2019 10:1. BioMed Central, 10(1), pp. 1–22. doi: 10.1186/S13287-019-1165-5.
- Zhang, Y. *et al.* (2011) “Ovarian cancer-associated fibroblasts contribute to epithelial ovarian carcinoma metastasis by promoting angiogenesis, lymphangiogenesis and tumor cell invasion,” *Cancer Letters*. Elsevier, 303(1), pp. 47–55. doi: 10.1016/j.canlet.2011.01.011.
- Zunke, F. and Rose-John, S. (2017) “The shedding protease ADAM17: Physiology and pathophysiology,” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. Elsevier B.V., pp. 2059–2070. doi: 10.1016/j.bbamcr.2017.07.001.

## Danksagung

Zuallererst möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Sigrun Smola für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die Betreuung im Rahmen dieser Dissertation bedanken. Insbesondere unsere produktiven Diskussionen waren mir eine große Hilfe bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Klaus Römer für die Übernahme der Erstkorrektur dieser Arbeit bedanken.

Vielen Dank zudem auch an Priv.-Doz. Dr. Maximilian Linxweiler sowie an Florian Bochen und Sandrina Körner des Forschungslabors der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde für die Bereitstellung des Tonsillengewebes.

Weiterhin möchte ich der Dermatopathologie, insbesondere Anne Kerber, für die freundliche Aufnahme in ihrem Labor während der Paraffineinbettung des Tonsillengewebes danken.

Ein großer Dank gilt allen Mitarbeitenden im Institut der Virologie, insbesondere der AG Smola. Vielen Dank an Dr. Stefan Lohse für seine Diskussionsbereitschaft bezüglich meiner Dissertation. An Barbara Best, ohne die der Laboralltag wesentlich chaotischer ausgesehen hätte. Vielen Dank an Anabel Zwick, Markus Vogelgesang, Luca Vella, Dr. Pascal Feld, Dr. Anna Marthaler, Michael Döring, Dr. Marta Podgórska, Dr. Jenny Menegatti und Birgit Glombitza. Ich möchte mich auch bei den ehemaligen Mitarbeitenden, insbesondere bei Dr. Jil Fischbach und Dr. Katrin Knerr-Rupp bedanken, die mir den Start in die Laborarbeit durch ihre Unterstützung wesentlich erleichtert haben. Innerhalb des Instituts für Virologie gilt mein Dank auch Priv.-Doz. Dr. Barbara Walch-Rückheim und Prof. Dr. Friedrich Grässer, die immer ein offenes Ohr hatten.

Ein besonderer Dank innerhalb des Instituts für Virologie gilt Katharina Bastuck, ohne die ich mir die Zeit der Doktorarbeit gar nicht hätte vorstellen können. Vielen Dank für all die schönen und vor allem lustigen Stunden im Labor, deine Hilfsbereitschaft im und außerhalb des Labors, die schöne gemeinsame Zeit und vor allem deine Freundschaft.

Vielen Dank an meinen Mann David, der mich während meiner Doktorarbeit immer wieder aufgebaut und unterstützt hat und vor allem für Ablenkung gesorgt

hat, wenn ich diese dringend gebraucht habe.

Der größte Dank gilt meiner Familie, meinem Bruder Dr. Patrick Treitz und insbesondere meinen Eltern Edmund und Marianne Treitz. Vielen Dank, dass ihr mich all die Jahre unterstützt, aufgebaut und ermutigt habt, meinen eigenen Weg zu gehen. Vielen Dank für eure Zeit, eure Unterstützung und vor allem eure Geduld.

## **Lebenslauf**

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

## Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen:

1. *Siglinde Wagner*: Die Paraffinschnitte der zervikalen Biopsien wurden von Siglinde Wagner, Institut für Pathologie der Universität des Saarlandes, angefertigt.
2. *Marta Podgórska*: Die HPV18-positiven NIKS wurden von Dr. Marta Podgórska, Institut für Virologie der Universität des Saarlandes, im Rahmen ihrer Dissertation hergestellt.
3. *Jil Fischbach*: Die in Abbildung 3 und Abbildung 16 dargestellten Färbungen für p63 wurden von Dr. Jil Fischbach durchgeführt.
4. *Barbara Best*: Die in Abbildung 16 dargestellte Färbung für Lgr6 wurde von Barbara Best durchgeführt.
5. *Katharina Metzger*: Katharina Metzger fertigte die immunhistochemischen Färbungen von gp80 im Zervixgewebe an (Abbildung 6).
6. *Markus Vogelgesang*: Markus Vogelgesang fertigte die immunhistochemischen Färbungen von ADAM17 im Zervixgewebe an (Abbildung 11).

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberaterinnen/Promotionsberater oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Außer den Angegebenen hat niemand von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder in ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Die Bedeutung der eidesstattlichen Erklärung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Erklärung sind mir bekannt.

---

*Ort, Datum*

---

*Unterschrift der Promovierenden*