

Aus dem Institut für Virologie,  
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar  
Institutsdirektorin: Univ.-Prof. Dr. med. Sigrun Smola

# **Myeloische Zellen in der HPV-getriebenen penilen Karzinogenese**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2025**

vorgelegt von

**Kristin Iris Burckhardt**

geboren am 12.02.1998 in Frankenthal (Pfalz)

Tag der Promotion:

28. April 2026

Dekan:

Univ.-Prof. Dr. med. dent. Matthias Hannig

Berichterstatter:

Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Stefan Lohse

Univ.-Prof. Dr. med. univ. et scient. med. Philipp Staber

# Inhaltsverzeichnis

<b>I.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>II.</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>III.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>1</b>	<b>Zusammenfassung / Abstract .....</b>	<b>1</b>
1.1	Zusammenfassung .....	1
1.2	Abstract .....	2
<b>2</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>3</b>
2.1	Das Peniskarzinom .....	3
2.2	Humane Papillomviren .....	9
2.3	Neutrophile Granulozyten .....	14
2.4	Myeloische Zellen im Tumormikromilieu .....	14
2.5	Konvergenz multipler onkogener Signalwege in HPV-positiven und HPV-negativen Tumoren .....	16
2.5.1	Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer .....	16
2.5.2	Epidermal Growth Factor Receptor .....	18
2.5.3	AKT und der PI3K/AKT-Signalweg .....	20
2.5.4	p38 MAPK und MAPK-Signalwege .....	22
2.5.5	ERK und der Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg .....	23
2.5.6	STAT3 und der JAK/STAT-Signalweg .....	24
2.6	Zielsetzung .....	26
<b>3</b>	<b>Material .....</b>	<b>27</b>
3.1	Genehmigung der Ethikkommission .....	27
3.2	Zelllinien .....	27
3.3	Medien und Lösungen zur Zellkultivierung .....	28
3.4	Primer für Mykoplasmen-PCR .....	29
3.5	Antikörper für Immunhistochemie und Immunfluoreszenz .....	30
3.6	Kits und gebrauchsfertige Produkte .....	31
3.7	Puffer und Lösungen .....	32
3.8	Chemikalien und Reagenzien .....	35
3.9	Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	37
3.10	Software .....	39
<b>4</b>	<b>Methodik .....</b>	<b>40</b>
4.1	Zellkultur .....	40
4.1.1	Kultivieren und Passagieren von Zellen .....	40
4.1.2	Zellzahlbestimmung .....	40
4.1.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	41
4.1.4	Mykoplasmen-PCR .....	41

4.2	Isolierung von Granulozyten aus Vollblut.....	42
4.3	Indirekte Immunfluoreszenz im 2D-Zellkulturmodell .....	44
4.3.1	Stimulation mit Epidermal Growth Factor .....	44
4.3.2	Stimulation mit Granulozyten .....	45
4.4	Organotypische 3D-Kulturen .....	45
4.4.1	Erstellung organotypischer 3D-Kulturen.....	45
4.4.2	Erstellung organotypischer 3D-Kulturen mit Granulozyten.....	46
4.5	Histologische Färbetechniken .....	48
4.5.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	48
4.5.2	Immunhistochemische Einzelfärbung mit DAB-Peroxidase.....	48
4.5.3	Immunhistochemische Doppelfärbung mit CD15 .....	49
4.5.4	Immunfluoreszenz .....	50
4.6	Statistik.....	50
<b>5</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>51</b>
5.1	Einfluss von EGF auf die Aktivierung EMMPRIN-assoziiierter Proteine in HPV-positiven PeCa-Zellen .....	51
5.2	Einfluss von Granulozyten auf die Aktivierung EMMPRIN-assoziiierter Proteine in HPV-positiven PeCa-Zellen .....	55
5.3	Einfluss von Granulozyten auf das Wachstumsverhalten von Tumorzellen in organotypischen 3D-Kulturen .....	59
5.4	Migrationsverhalten von Granulozyten.....	60
5.5	Aktivierung von AKT in organotypischen 3D-Kulturen mit den HPV-positiven PeCa-Zelllinien P2, L2 und L3.....	75
5.6	Aktivierung von ERK in organotypischen 3D-Kulturen mit den HPV-positiven PeCa-Zelllinien P2, L2 und L3.....	93
5.7	Aktivierung von p38 MAPK in organotypischen 3D-Kulturen mit den HPV-positiven PeCa-Zelllinien P2, L2 und L3 .....	107
5.8	Aktivierung von STAT3 in organotypischen 3D-Kulturen mit den HPV-positiven PeCa-Zelllinien P2, L2 und L3.....	123
<b>6</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>139</b>
6.1	Räumliche und zeitliche Auflösung der Immunzellmigration.....	139
6.2	Gegenseitige Aktivierung von Tumorzellen und Neutrophilen.....	142
6.3	Signalwegaktivierung bei HPV-positiven penilen Tumorzellen und anderen HPV-assoziierten Tumorentitäten.....	146
<b>7</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>150</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>151</b>
<b>9</b>	<b>Appendix.....</b>	<b>173</b>
<b>10</b>	<b>Publikation .....</b>	<b>175</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>176</b>
<b>12</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>177</b>

# I. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Weltweite Inzidenz des Peniskarzinoms.....	3
Abbildung 2: Systematik der humanen Papillomviren. ....	10
Abbildung 3: Aufbau des HPV16-Genoms. ....	11
Abbildung 4: Replikationszyklus der humanen Papillomviren im Zervixepithel.....	13
Abbildung 5: Die zelluläre Zusammensetzung des Tumormikromilieus. ....	15
Abbildung 6: Schematische Darstellung EMMPRIN-assoziiertes Proteine. ....	17
Abbildung 7: Schematische Darstellung EGFR-vermittelter Signalwege. ....	19
Abbildung 8: Der PI3K/AKT-Signalweg und seine bedeutendsten Effektoren. ....	21
Abbildung 9: Der JAK/STAT-Signalweg.....	25
Abbildung 10: Darstellung der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation zur Granulozytenisolierung. ..	43
Abbildung 11: Erstellung organotypischer 3D-Kulturen.....	47
Abbildung 12: Nachweis von pAKT, pSTAT3, pERK und pp38 nach EGF-Stimulation im 2D-Zellkulturmodell mit der Peniskarzinomzelllinie P2. ....	52
Abbildung 13: Nachweis von pAKT, pSTAT3, pERK und pp38 nach EGF-Stimulation im 2D-Zellkulturmodell mit der Peniskarzinomzelllinie L2. ....	54
Abbildung 14: Nachweis von pAKT, pSTAT3, pERK und pp38 nach Stimulation mit Granulozyten im 2D-Zellkulturmodell mit der Peniskarzinomzelllinie P2. ....	56
Abbildung 15: Nachweis von pAKT, pSTAT3, pERK und pp38 nach Stimulation mit Granulozyten im 2D-Zellkulturmodell mit der Peniskarzinomzelllinie L2.....	58
Abbildung 16: Hämatoxylin-Eosin-Färbung organotypischer 3D-Kulturen. ....	60
Abbildung 17: Nachweis von CD15 in organotypischen 3D-Kulturen. ....	63
Abbildung 18: Maximale Einwanderungstiefe von Granulozyten in 3D-Kulturen mit den Peniskarzinomzelllinien P2, L2 und L3.....	64
Abbildung 19: Absolute Anzahl und relativer Anteil immigrierter Granulozyten in 3D-Kulturen mit der Peniskarzinomzelllinie P2. ....	67
Abbildung 20: Absolute Anzahl und relativer Anteil immigrierter Granulozyten in 3D-Kulturen mit der Peniskarzinomzelllinie L2.....	69
Abbildung 21: Absolute Anzahl und relativer Anteil immigrierter Granulozyten in 3D-Kulturen mit der Peniskarzinomzelllinie L3.....	71
Abbildung 22: Absolute Anzahl und relativer Anteil immigrierter Granulozyten im Zelllinienvergleich. ....	74
Abbildung 23: Nachweis von pAKT (Thr308) und CD15 mittels Immunhistochemie.....	78
Abbildung 24: Nachweis von pAKT (Thr308) und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen ohne Granulozyten mittels Immunfluoreszenz.....	80
Abbildung 25: Nachweis von pAKT (Thr308) und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen mit Granulozyten für 4 Stunden mittels Immunfluoreszenz. ....	82
Abbildung 26: Nachweis von pAKT (Thr308) und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen mit Granulozyten für 6 Stunden mittels Immunfluoreszenz. ....	83
Abbildung 27: Nachweis von pAKT (Thr308) und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen mit Granulozyten für 8 Stunden mittels Immunfluoreszenz. ....	85
Abbildung 28: Nachweis von pAKT (Thr308) und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen mit Granulozyten für 24 Stunden mittels Immunfluoreszenz. ....	86
Abbildung 29: Nachweis von pAKT (Thr308) und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen mit der Peniskarzinomzelllinie P2 mittels Immunfluoreszenz.....	88
Abbildung 30: Nachweis von pAKT (Thr308) und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen mit der Peniskarzinomzelllinie L2 mittels Immunfluoreszenz.....	90
Abbildung 31: Nachweis von pAKT (Thr308) und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen mit der Peniskarzinomzelllinie L3 mittels Immunfluoreszenz.....	91
Abbildung 32: Nachweis von pERK in organotypischen 3D-Kulturen mittels Immunhistochemie. ...	94

Abbildung 33: Nachweis von pERK und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen ohne Granulozyten mittels Immunfluoreszenz.....	95
Abbildung 34: Nachweis von pERK und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen mit Granulozyten für 4 Stunden mittels Immunfluoreszenz.....	97
Abbildung 35: Nachweis von pERK und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen mit Granulozyten für 6 Stunden mittels Immunfluoreszenz.....	98
Abbildung 36: Nachweis von pERK und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen mit Granulozyten für 8 Stunden mittels Immunfluoreszenz.....	100
Abbildung 37: Nachweis von pERK und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen mit Granulozyten für 24 Stunden mittels Immunfluoreszenz.....	101
Abbildung 38: Nachweis von pERK und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen mit der Peniskarzinomzelllinie P2 mittels Immunfluoreszenz.....	102
Abbildung 39: Nachweis von pERK und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen mit der Peniskarzinomzelllinie L2 mittels Immunfluoreszenz.....	104
Abbildung 40: Nachweis von pERK und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen mit der Peniskarzinomzelllinie L3 mittels Immunfluoreszenz.....	105
Abbildung 41: Nachweis von Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) in organotypischen 3D-Kulturen ohne Granulozyten.....	107
Abbildung 42: Nachweis von Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) in organotypischen 3D-Kulturen mit Granulozyten.....	109
Abbildung 43: Nachweis von Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen ohne Granulozyten mittels Immunfluoreszenz.....	110
Abbildung 44: Nachweis von Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen mit Granulozyten für 4 Stunden mittels Immunfluoreszenz.....	112
Abbildung 45: Nachweis von Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen mit Granulozyten für 6 Stunden mittels Immunfluoreszenz.....	113
Abbildung 46: Nachweis von Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen mit Granulozyten für 8 Stunden mittels Immunfluoreszenz.....	115
Abbildung 47: Nachweis von Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen mit Granulozyten für 24 Stunden mittels Immunfluoreszenz.....	116
Abbildung 48: Nachweis von Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen mit der Peniskarzinomzelllinie P2 mittels Immunfluoreszenz.....	118
Abbildung 49: Nachweis von Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen mit der Peniskarzinomzelllinie L2 mittels Immunfluoreszenz.....	119
Abbildung 50: Nachweis von Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen mit der Peniskarzinomzelllinie L3 mittels Immunfluoreszenz.....	121
Abbildung 51: Nachweis von pSTAT3 (Tyr705) und CD15 mittels Immunhistochemie.....	125
Abbildung 52: Nachweis von pSTAT3 (Tyr705) und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen ohne Granulozyten mittels Immunfluoreszenz.....	127
Abbildung 53: Nachweis von pSTAT3 (Tyr705) und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen mit Granulozyten für 4 Stunden mittels Immunfluoreszenz.....	128
Abbildung 54: Nachweis von pSTAT3 (Tyr705) und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen mit Granulozyten für 6 Stunden mittels Immunfluoreszenz.....	129
Abbildung 55: Nachweis von pSTAT3 (Tyr705) und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen mit Granulozyten für 8 Stunden mittels Immunfluoreszenz.....	131
Abbildung 56: Nachweis von pSTAT3 (Tyr705) und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen mit Granulozyten für 24 Stunden mittels Immunfluoreszenz.....	132
Abbildung 57: Nachweis von pSTAT3 (Tyr705) und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen mit der Peniskarzinomzelllinie P2 mittels Immunfluoreszenz.....	134
Abbildung 58: Nachweis von pSTAT3 (Tyr705) und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen mit der Peniskarzinomzelllinie L2 mittels Immunfluoreszenz.....	135

Abbildung 59: Nachweis von pSTAT3 (Tyr705) und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen mit der Peniskarzinomzelllinie L3 mittels Immunfluoreszenz. .... 137

## II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	TNM-Klassifikation des Peniskarzinoms. ....	6
Tabelle 2:	Stadieneinteilung des Peniskarzinoms. ....	7
Tabelle 3:	Verwendete Zelllinien .....	27
Tabelle 4:	Medien und Lösungen zur Zellkultivierung .....	28
Tabelle 5:	Vollmedien zur Zellkultivierung .....	29
Tabelle 6:	Primer für Mykoplasmen-PCR in 5'→3'-Richtung .....	29
Tabelle 7:	Verwendete Primärantikörper für Immunhistochemie und Immunfluoreszenz .....	30
Tabelle 8:	Verwendete Sekundärantikörper für Immunfluoreszenz .....	31
Tabelle 9:	Verwendete Kits und gebrauchsfertige Produkte .....	31
Tabelle 10:	Verwendete Puffer und Lösungen .....	32
Tabelle 11:	Verwendete Chemikalien und Reagenzien .....	35
Tabelle 12:	Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	37
Tabelle 13:	Verwendete Software.....	39
Tabelle 14:	PCR-Ansatz zur Mykoplasmentestung.....	42
Tabelle 15:	PCR-Programm zur Mykoplasmen-Detektion.....	42
Tabelle 16:	Verwendete Substrate und Inkubationszeiten für Immunhistochemie .....	49
Tabelle 17:	Rohdaten der maximalen Einwanderungstiefe von Granulozyten in organotypische 3D-Kulturen mit PeCa P2.....	173
Tabelle 18:	Rohdaten der maximalen Einwanderungstiefe von Granulozyten in organotypische 3D-Kulturen mit PeCa L2.....	173
Tabelle 19:	Rohdaten der maximalen Einwanderungstiefe von Granulozyten in organotypische 3D-Kulturen mit PeCa L3.....	173
Tabelle 20:	Rohdaten der Granulozytenmigration in absoluten Zahlen .....	174
Tabelle 21:	Rohdaten der Granulozytenmigration in relativen Zahlen.....	174

### III. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
$\alpha$	Alpha
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer
$\mu$ M	Mikromolar
AKT	Proteinkinase B
AP	Alkalische Phosphatase
ASR	<i>age-standardized rate</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	Essigsäure
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CH <sub>3</sub> OH	Methanol
CIN	Zervikale intraepitheliale Neoplasie
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CTCs	<i>circulating tumor cells</i>
CXCL	Chemokin (C-X-C motif) Ligand
CXCR	Chemokin (C-X-C motif) Rezeptor
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dH <sub>2</sub> O	Destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTCs	<i>disseminated tumour cells</i>
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EMMPRIN	<i>extracellular matrix metalloproteinase inducer</i>
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
EVs	<i>extracellular vesicles</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>

FFPE	<i>formalin-fixed paraffin-embedded</i>
g	Gramm
G-CSF	<i>granulocyte colony-stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
Gro- $\alpha$	<i>growth-related oncogene-<math>\alpha</math></i>
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HPV	Humanes Papillomvirus
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule-1</i>
IF	Immunfluoreszenz
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
ILK	<i>integrin-linked kinase</i>
JAK	Januskinase
JNK	Jun N-terminale Kinase
KCl	Kaliumchlorid
KGM2	<i>Keratinocyte Growth Medium 2</i>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
LCR	<i>long control region</i>
LDL	<i>low-density lipoprotein</i>
LFA-1	<i>lymphocyte function-associated antigen-1</i>
LOX-1	<i>lectin-type oxidized low-density lipoprotein receptor-1</i>
Mac-1	<i>macrophage-1 antigen</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MAPKK	<i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MAPKKK	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase</i>
MDSCs	<i>myeloid-derived suppressor cells</i>
MEK	<i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid

MIF	<i>macrophage migration inhibitory factor</i>
mIgG <sub>1</sub>	Monoklonales Immunglobulin G der Subklasse 1
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mTORC2	<i>mechanistic target of rapamycin complex 2</i>
NaCl	Natriumchlorid
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NE	Neutrophile Elastase
NETs	<i>neutrophil extracellular traps</i>
ng	Nanogramm
NGAL	<i>neutrophil gelatinase-associated lipocalin</i>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ammoniumsulfat
NLR	<i>neutrophil-to-lymphocyte ratio</i>
nm	Nanometer
OLFM4	Olfactomedin 4
p38 MAPK	<i>p38 mitogen-activated protein kinase</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBST	<i>Phosphate Buffered Saline with Tween®20</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDPK1	Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase-1
PeCa	Peniskarzinom
PeIN	Penile intraepitheliale Neoplasie
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
Phospho-AKT (pAKT)	Phosphorylierte Proteinkinase B
Phospho-ERK (pERK)	<i>phosphorylated extracellular signal-regulated kinase</i>
Phospho-p38 MAPK (pp38 MAPK)	<i>phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase</i>
Phospho-STAT3 (pSTAT3)	<i>phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP2 oder PtdIns(4,5)P2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP3 oder PtdIns(3,4,5)P3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PMN	<i>polymorphonuclear neutrophils</i>

pRB	Retinoblastom-Protein
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
Raf	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
Ras	<i>rat sarcoma</i>
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
Ser	Serin
SIRP $\alpha$	<i>signal regulatory protein <math>\alpha</math></i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
STIKO	Ständige Impfkommission
TAN	Tumor-assoziierte Neutrophile
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TGF- $\alpha$	<i>transforming growth factor-<math>\alpha</math></i>
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor-<math>\beta</math></i>
Thr	Threonin
TMA	<i>tissue microarrays</i>
TME	Tumormikromilieu
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tyr	Tyrosin
U/ml	Units pro Milliliter
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VHF	Primäre humane Vorhautfibroblasten
VLP	<i>virus-like particles</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
YAP	<i>yes-associated protein</i>

# 1 Zusammenfassung / Abstract

## 1.1 Zusammenfassung

Das Peniskarzinom (PeCa) zählt zu den seltenen malignen Tumorerkrankungen und ist häufig mit Infektionen humaner Papillomviren (HPV) assoziiert. Obwohl das Tumormikromilieu (*tumor microenvironment*, TME) zunehmend Bedeutung in der onkologischen Forschung und Therapie gewinnt, sind die Wechselwirkungen zwischen Tumor-, Stroma- und Immunzellen sowie die kritischen Signalweghierarchien bislang nur unzureichend erforscht. Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Interaktionen zwischen HPV-positiven penilen Tumorzellen und Granulozyten zu untersuchen und relevante aktivierte Signalwege zu identifizieren.

Zu diesem Zweck wurden die HPV-positiven penilen Tumorzelllinien P2, L2 und L3 sowohl in 2D- als auch in 3D-Kulturmodellen mit Granulozyten kultiviert. Die organotypischen 3D-Kulturen ermöglichen einen Nachbau der 3D-Architektur des TME und damit die räumliche und zeitliche Darstellung der Immunzell-Immigration. Mittels immunhistochemischer und immunfluoreszenzbasierter Färbungen wurde die Aktivierung tumorprogressionsfördernder Signalwege, wie AKT, ERK, p38 MAPK und STAT3, untersucht.

Diese Forschungsarbeit liefert erste Anhaltspunkte für das Migrationsverhalten der Neutrophilen im penilen TME sowie die Aktivierung von Tumor- und Immunzellen. Neutrophile immigrierten insbesondere in organotypische 3D-Kulturen von HPV-positiven Tumorzellen mit ausgeprägter Expression viraler Onkoproteine. Deren gesteigerte Aktivität generiert eine Zytokinkonstellation, welche effektiv die Chemotaxis der Neutrophilen begünstigt. Darüber hinaus konnte die Aktivierung der Signalwege sowohl in Granulozyten als auch in benachbarten Tumorzellen nachgewiesen werden, wobei Aktivierungsmarker wie pERK und pp38 MAPK teils in Neutrophilen, teils in Tumorzellen phosphoryliert vorlagen.

Aus der Literatur ist die Bildung heterotypischer Aggregate aus Tumorzellen und Neutrophilen bekannt. Diese Interaktion von Tumor- und Immunzellen führt zu einer Reaktivierung ruhender Tumorzellen und schützt diese vor einer möglichen Immunüberwachung im TME und der Zirkulation. Aufgrund der vorliegenden Daten ist anzunehmen, dass der HPV-getriebenen penilen Karzinogenese vergleichbare Mechanismen zugrunde liegen. Diese Arbeit hat gezeigt, dass anspruchsvollere Zellkulturmodelle mit einer realistischeren 3D-Darstellung der TME-Architektur die Erarbeitung relevanter Mechanismen der PeCa-Pathogenese ermöglichen. Folgeversuche mit einer größeren Stichprobe sowie ein Vergleich mit Gewebeproben über Gewebemikroarrays mit klinisch-pathologischen Kontextdaten sind notwendig, um die Relevanz der identifizierten Marker zu überprüfen. Aufgrund der begrenzten Ressourcen zum PeCa ist ein Vergleich mit anderen HPV-assoziierten Tumorentitäten, wie dem Zervixkarzinom oder Kopf-Hals-Tumoren, sinnvoll. Die Interaktionen zwischen PeCa-Zellen und Immunzellen folgen einer komplexen räumlich-zeitlichen Dynamik, deren vollständige Aufklärung weiterführende systematische

Untersuchungen erfordert. Mit der Identifizierung vielversprechender Kandidaten legt die vorliegende Arbeit hierfür eine fundierte Grundlage und eröffnet neue Perspektiven für zukünftige translational orientierte Forschungsansätze.

## **1.2 Abstract**

Penile cancer (PeCa) is a rare genitourinary malignancy, frequently associated with human papillomavirus (HPV) infection. Despite growing interest in the tumor microenvironment (TME) as a critical factor in cancer research and therapy, the interplay between tumor, stromal, and immune cells, as well as the hierarchy of key signaling pathways, remains poorly understood. This study aimed to investigate the interactions between HPV-positive penile tumor cells and granulocytes with a focus on identifying relevant activated signaling pathways.

Therefore, the HPV-positive penile tumor cell lines P2, L2, and L3 were co-cultured with granulocytes in 2D and 3D culture models. Organotypic 3D cultures can replicate the three-dimensional architecture of the TME, thereby enabling spatial and temporal visualization of immune cell infiltration. Immunohistochemical and immunofluorescence staining were performed to analyze the activation of tumor-promoting signaling pathways, such as AKT, ERK, p38 MAPK, and STAT3.

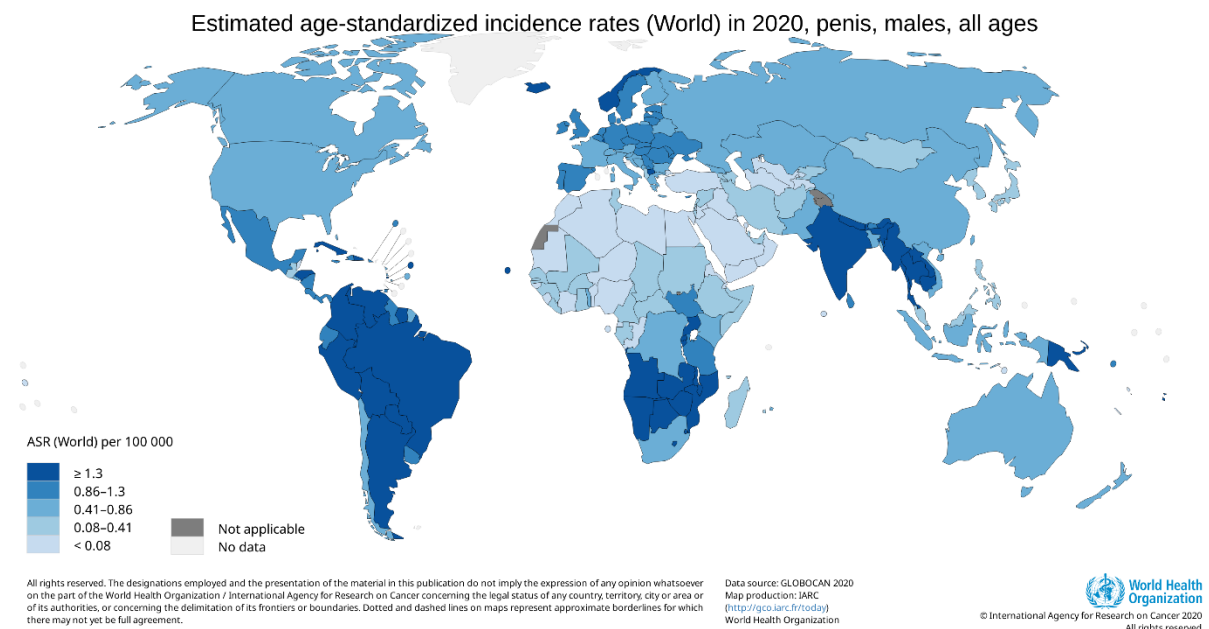
Our results provide initial evidence for neutrophil migration within the penile TME as well as the activation of tumor and immune cells. Neutrophils particularly migrated into organotypic 3D cultures of HPV-positive tumor cells expressing high levels of viral oncogenes. Increased activity of these viral oncogenes results in a cytokine milieu that effectively promotes neutrophil chemotaxis. Furthermore, activation of key signaling pathways was detected in granulocytes and adjacent tumor cells, with activation markers such as pERK and pp38 MAPK partly phosphorylated in both cell types.

Heterotypic aggregates of tumor cells and neutrophils have been described in the literature, reactivating dormant tumor cells and protecting them from immune surveillance within the TME and the circulation. Our data suggest that similar mechanisms may contribute to HPV-driven penile carcinogenesis. This study demonstrates that advanced 3D culture models, which more accurately recapitulate TME architecture, facilitate the elucidation of key mechanisms in PeCa pathogenesis. Follow-up studies with larger sample sizes, as well as comparisons with tissue specimens via tissue microarrays including clinicopathological data, are needed to validate the relevance of the identified markers. Due to the limited data available for PeCa, comparisons with other HPV-associated malignancies, such as cervical cancer or head and neck squamous cell carcinoma, could yield valuable insights. The interactions between PeCa cells and immune cells follow a complex spatiotemporal dynamic, whose full characterization requires further systematic investigation. By identifying promising signaling pathways, this study provides a solid foundation for future translational research and opens new avenues for targeted therapeutic strategies.

## 2 Einleitung

### 2.1 Das Peniskarzinom

Das Peniskarzinom (PeCa) zählt mit einer weltweit geschätzten altersstandardisierten Inzidenz von 0,84 Fällen pro 100.000 Einwohnern pro Jahr zu den seltenen malignen Tumorerkrankungen des Urogenitaltraktes (Montes Cardona & García-Perdomo, 2017). Allerdings zeigen sich erhebliche geographische Unterschiede (Abbildung 1). Während das Peniskarzinom in Europa und Nordamerika mit einer altersstandardisierten Neuerkrankungsrate von 0,3 bis 1,0 Fällen pro 100.000 Einwohnern in etwa 0,4 % bis 0,6 % aller Malignome ausmacht, repräsentiert es in Teilen Afrikas, Asiens und Südamerikas bis zu 10 % der malignen Neoplasien und stellt daher ein ernstzunehmendes Gesundheitsproblem in Entwicklungsländern dar (Bleeker et al., 2009). Hervorzuheben sind die sehr geringen Inzidenzraten in Kulturkreisen mit ritueller Zirkumzision im Kindesalter, beispielsweise bei jüdischen Männern in Israel (Montes Cardona & García-Perdomo, 2017). Die globalen Unterschiede in der Inzidenzrate des Peniskarzinoms lassen sich demnach auf vielfältige Faktoren zurückführen, darunter ethnischer Hintergrund, geographische Lage und individuelle kulturelle Praktiken (Misra et al., 2004). Die meisten Männer erkranken im Alter zwischen 55 und 74 Jahren, wobei die Inzidenz des Peniskarzinoms mit zunehmendem Alter ansteigt (Barnholtz-Sloan et al., 2007).



**Abbildung 1: Weltweite Inzidenz des Peniskarzinoms.** Die geschätzte altersstandardisierte Inzidenzrate (ASR = *age-standardized rate*, berechnet anhand der Standardpopulation) des Peniskarzinoms im Jahr 2020 wird für Länder weltweit abgebildet. Entnommen von <https://gco.iarc.fr/today>.

Das Peniskarzinom präsentiert sich in der Regel als sichtbare oder tastbare Läsion, die entweder de novo entstanden ist oder sich aus einer Präkanzerose beziehungsweise einem Carcinoma in situ, den sogenannten penilen intraepithelialen Neoplasien (PeIN), entwickelt hat (Barocas & Chang, 2010). Diese PeIN werden in drei Schweregrade eingeteilt, wobei PeIN Grad I eine milde Dysplasie, PeIN Grad II eine moderate Dysplasie und PeIN Grad III eine schwere Dysplasie darstellt (Crispen & Mydlo, 2010). Analog zum invasiven Peniskarzinom lassen sich PeIN auf Grundlage der Pathogenese in zwei Subtypen klassifizieren. Während undifferenzierte PeIN mit humanen Papillomviren (HPV) assoziiert sind, werden differenzierte PeIN nicht mit HPV in Verbindung gebracht (Spiess et al., 2016). Rubin et al. wiesen in 90 % der penilen Dysplasien HPV-DNA nach. Darunter wurden in 81,5 % der Fälle Hochrisiko-HPV-Typen, am häufigsten HPV16, identifiziert (Rubin et al., 2001). Bei HPV-assoziierten PeIN führt die Integration des viralen Genoms in das Wirtsgenom zu einer Überexpression viraler Onkoproteine, die eine maligne Transformation des Plattenepithels fördert (Spiess et al., 2016). Allerdings entwickeln sich lediglich 2 % der genitalen HPV16-Infektionen zu präkanzerösen PeIN (Kidd et al., 2017).

Der makroskopische Befund des Peniskarzinoms variiert von Erythem, Ulzeration und Induration bis hin zu einem warzigen, exophytischen Erscheinungsbild. Vor allem bei Patienten mit Phimose kann das Peniskarzinom mit Schmerzen, Blutungen oder purulentem bis fötide riechendem Ausfluss begleitet sein (Barocas & Chang, 2010). Obwohl es sich beim Peniskarzinom in vielen Fällen, insbesondere bei exophytem Wachstumverhalten, um eine Blickdiagnose handelt, ist eine histologische Diagnosesicherung des Primärtumors vor Therapieeinleitung erforderlich (Leitlinienprogramm Onkologie, 2020). Im Rahmen der körperlichen Untersuchung sollte neben der Inspektion eine Palpation erfolgen, bei der Tumorgröße und Lokalisation, Verschieblichkeit oder Fixierung sowie Infiltration des umliegenden Gewebes beurteilt werden (Sievert et al., 2018). Um die Tiefeninfiltration des Primärtumors, beispielsweise vor geplantem organerhaltenden Operationsverfahren, zuverlässiger einschätzen zu können, kann ergänzend eine Doppler-Sonographie oder Magnetresonanztomographie (MRT) mit artifizieller Erektion eingesetzt werden (De Vries et al., 2019; Hanchanale et al., 2016).

Histopathologisch handelt es sich beim Großteil der primären Peniskarzinome (annähernd 95 %) um Plattenepithelkarzinome, welche von der epithelialen Oberfläche der Glans penis, des Sulcus coronarius oder des inneren Blattes des Präputiums ausgehen. Andere epitheliale Tumoren des Penis, beispielsweise das Merkelzellkarzinom, Klarzellkarzinom und Talgdrüsenkarzinom, sowie nicht-epitheliale Tumoren, zum Beispiel Melanome und Sarkome, sind deutlich seltener (Bleeker et al., 2009; Leitlinienprogramm Onkologie, 2020).

Die *World Health Organization* (WHO) klassifiziert Plattenepithelkarzinome des Penis aufgrund verschiedener Pathogenesen in HPV-assoziierte und nicht-HPV-assoziierte Tumoren (Hakenberg et al., 2018). HPV-DNA, insbesondere der Hochrisikotypen HPV16 und HPV18, konnte bei 14 % bis 100 % der invasiven Peniskarzinome nachgewiesen werden (Backes et al., 2009; Flaherty et al., 2014; Olesen et al., 2019). Schwankungen in dieser Prozentzahl lassen sich durch Unterschiede in der Virusnachweismethode, geographischen Region und des untersuchten histologischen Subtyps erklären. Als Risikofaktoren für die Entstehung des nicht-HPV-assoziierten Peniskarzinoms gelten chronisch-entzündliche Erkrankungen der Glans penis oder des Präputiums (insbesondere Balanitis und Lichen sclerosus et atrophicus), Phimose, mangelhafte Genitalhygiene, Tabakkonsum und UVA-Phototherapie (Dillner et al., 2000; Misra et al., 2004). Außerdem finden sich beim HPV-negativen Peniskarzinom, verglichen mit HPV-positiven Tumoren, gehäuft somatische TP53-Mutationen, welche eine mögliche Erklärung für die HPV-unabhängige Karzinogenese liefern (Chahoud et al., 2021; Kashofer et al., 2017; Qiu et al., 2021). Stankiewicz et al. belegen zudem eine gesteigerte Phosphorylierung des EGFR beim HPV-negativen Peniskarzinom (Stankiewicz, Prowse, Ng, et al., 2011).

Plattenepithelkarzinome des Penis werden histopathologisch in die Subtypen basaloid, warzig, gemischt warzig-basaloid, gewöhnlich, verrukös und papillär eingeteilt. Der mit bis zu 75 % häufigste histologische Subtyp ist das gewöhnliche, nicht-HPV-assoziierte Plattenepithelkarzinom, welches sich durch ein aggressives Wachstumsverhalten und eine frühe Metastasierung auszeichnet. Weitere nicht-HPV-assoziierte, aber deutlich seltener vorkommende Subtypen sind das lediglich in Ausnahmefällen metastasierende und daher mit einer günstigen Prognose einhergehende verruköse Karzinom (2 % bis 3 %) sowie das sarkomatoide Peniskarzinom (1 % bis 4 %), welches aufgrund seines sehr aggressiven Wachstums die schlechteste Prognose aller Subtypen aufweist. Zur Gruppe der HPV-assoziierten Plattenepithelkarzinome zählen unter anderem das früh lymphogen metastasierende und hierdurch mit reduziertem tumorspezifischen Überleben einhergehende basaloide Karzinom (5 % bis 10 %) sowie das warzige Peniskarzinom (5 % bis 10 %), welches nahezu keine Metastasierungstendenz und infolgedessen eine günstige Prognose zeigt (Hakenberg et al., 2018). Somit erwies sich der histologische Subtyp im Gegensatz zum HPV-Status als prognostischer Faktor des Peniskarzinoms (Hölters et al., 2019).

Zur Stadieneinteilung (Tabelle 2) nach TNM-Klassifikation (Tabelle 1) muss neben der Ausbreitung des Primärtumors das Fehlen oder Vorhandensein von regionären Lymphknotenmetastasen, im Falle des Peniskarzinoms Metastasen in oberflächlichen und tiefen inguinalen und pelvinen Lymphknoten, sowie Fernmetastasen, retroperitoneale oder mediastinale Lymphknotenmetastasen, Lungen-, Leber- und Knochenherde, beurteilt werden (Leitlinienprogramm Onkologie, 2020). Hierzu erfolgen zunächst Inspektion und Palpation der bilateralen inguinalen Lymphknoten, wobei Anzahl, Größe und Verschieblichkeit tastbarer Lymphknoten dokumentiert werden (Sievert et al., 2018). Da klinisch unauffällige, nicht palpable inguinale Lymphknoten bereits in einem Viertel der Fälle Mikrometastasen aufweisen, ist in Abhängigkeit der Infiltrationstiefe des Primärtumors eine invasiv-operative Lymphknotendiagnostik mittels dynamischer Sentinel-Lymphknoten-Biopsie (DSNB) oder modifizierter inguinaler Lymphadenektomie (MIL) notwendig (Hakenberg et al., 2018). Palpable inguinale Lymphknoten werden durch eine radikale Lymphadenektomie histologisch gesichert (Protzel et al., 2009). Schnittbildverfahren und nuklearmedizinische Hybrid-Bildgebungsverfahren, beispielsweise die <sup>18</sup>F-Fluordesoxyglukose-Positronenemissionstomographie/Computertomographie (<sup>18</sup>F-FDG-PET/CT), eignen sich nicht zur Feststellung oder zum Ausschluss von Mikrometastasen, sondern spielen in der Diagnostik von Fernmetastasen, die beim Peniskarzinomen meist spät und somit in fortgeschrittenen Krankheitsstadien auftreten, eine zentrale Rolle (Leitlinienprogramm Onkologie, 2020; Sadeghi et al., 2012; S. Zhang et al., 2016).

**Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Peniskarzinoms.** Entnommen von Leitlinienprogramm Onkologie, 2020.

<b>Primärtumor</b>	
pTx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
pT0	Kein Anhalt für Primärtumor
pTis	Carcinoma in situ (penile intraepitheliale Neoplasie)
pTa	Nichtinvasives lokalisiertes Plattenepithelkarzinom
pT1	<p><b>Glans:</b> Tumor infiltriert Lamina propria</p> <p><b>Vorhaut:</b> Tumor infiltriert Dermis, Lamina propria oder Dartos'sche Faszie</p> <p><b>Schaft:</b> Tumor infiltriert das Bindegewebe zwischen Epidermis und Corpora unabhängig von der Lokalisation</p> <p><b>Alle:</b> Lokalisation mit/ohne lymphovaskuläre oder perineurale Infiltration und/oder schlecht differenziert/undifferenziert</p>
pT1a	Tumor ohne lymphovaskuläre oder perineurale Infiltration, nicht schlecht differenziert/undifferenziert/sarkomatoid
pT1b	Tumor mit lymphovaskulärer Infiltration und/oder perineuraler Invasion oder ist schlecht differenziert/undifferenziert/sarkomatoid

pT2	Tumor infiltriert Corpus spongiosum (entweder Glans oder ventraler Schaft) mit/ohne Invasion der Urethra
pT3	Tumor infiltriert Corpus cavernosum (eingeschlossen Tunica albuginea) mit/ohne Invasion der Urethra
pT4	Tumor infiltriert andere Nachbarstrukturen (z. B. Skrotum, Prostata, Schambein)
<b>Regionäre Lymphknoten</b>	
pNx	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
pN0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
pN1	Metastase(n) in einem oder zwei Leistenlymphknoten
pN2	Metastasen in mehr als zwei unilateralen inguinalen oder bilateralen Leistenlymphknoten
pN3	Metastase(n) in Beckenlymphknoten (uni- oder bilateral), oder extranodale Ausbreitung regionärer Lymphknotenmetastasen
<b>Fernmetastasen</b>	
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

**Tabelle 2: Stadieneinteilung des Peniskarzinoms.** Entnommen von Leitlinienprogramm Onkologie, 2020.

Stadium 0	Tis	N0	M0
	Ta	N0	M0
Stadium I	T1a	N0	M0
Stadium IIA	T1b, T2	N0	M0
Stadium IIB	T3	N0	M0
Stadium IIIA	T1, T2, T3	N1	M0
Stadium IIIB	T1, T2, T3	N2	M0
Stadium IV	T4	Jedes N	M0
	Jedes T	N3	M0
	Jedes T	Jedes N	M1

Hinsichtlich der Behandlung des Peniskarzinoms stehen abhängig vom vorliegenden Tumorstadium verschiedene Therapieverfahren zur Verfügung. Das Ziel der lokalen Therapie besteht in einer effektiven Tumorkontrolle bei gleichzeitig bestmöglichem Organerhalt und Gewährleistung der Patientenzufriedenheit, denn mit zunehmender Invasivität des operativen Verfahrens erhöht sich die psychosexuelle Beeinträchtigung des Patienten (Leitlinienprogramm Onkologie, 2020; Romero et al., 2005; Sedigh et al., 2015). Während bei Präkanzerosen und oberflächlichen, nicht-invasiven Tumoren der Glans eine lokale Exzision, komplette chirurgische Deepithelialisierung der Glans (*glans resurfacing*) sowie topische Therapien mit 5-Fluoruracil oder Imiquimod (*Off-Label-Use*) und Lasertherapie Anwendung finden, genügt im Falle isolierter Tumoren des Präputiums eine Zirkumzision (Alnajjar et al., 2012; Leitlinienprogramm Onkologie, 2020; Shabbir et al., 2011; D. H. Tang et al., 2018). Bei lokal fortgeschrittenen Primärtumoren werden in Abhängigkeit der Lokalisation und Tumorausdehnung eine Glansektomie, eine partielle oder totale (radikale) Penektomie, letztere mit Anlage einer perinealen Urethrostomie (Boutonniere), durchgeführt, bei denen anschließend eine plastische Rekonstruktion mittels Spalthautdeckung erfolgen kann (Leitlinienprogramm Onkologie, 2020; D. H. Tang et al., 2017). Die lokale Strahlentherapie stellt eine Alternative zur chirurgischen Resektion dar, zeigte jedoch im direkten Vergleich zur operativen Therapie umso schlechtere Ergebnisse, je ausgedehnter der Tumor war (Hasan et al., 2015; X. Hu et al., 2017). Patienten mit befallenen inguinalen Lymphknoten wird eine systemische Kombinationschemotherapie mit Paclitaxel, Cisplatin und 5-Fluoruracil beziehungsweise Ifosfamid empfohlen (Leitlinienprogramm Onkologie, 2020; Pagliaro et al., 2010; Pizzocaro et al., 2009; Protzel & Hakenberg, 2009). Im Falle einer Fernmetastasierung wird ein palliativer Ansatz verfolgt, der abhängig vom Allgemeinzustand des Patienten eine palliative Chemotherapie oder alternativ eine palliative Strahlentherapie zur Lebensverlängerung und Symptomkontrolle sowie *Best Supportive Care* einschließt (Leitlinienprogramm Onkologie, 2020).

Mehr als die Hälfte aller Rezidive des Peniskarzinoms tritt innerhalb der ersten zwei Jahre nach der Primärtherapie auf, weshalb die Nachsorge in diesem Zeitraum vierteljährliche klinische Untersuchungen umfasst, die bei Bedarf durch Ultraschalluntersuchungen der Leistenregion oder Schnittbildgebung ergänzt werden können. Ab dem zweiten Jahr erfolgen halbjährliche Kontrollen. Zusätzlich zur Bewertung der lokalen und regionalen Tumorkontrolle liegt der Schwerpunkt auf der Erfassung therapie- und tumorbedingter Nebenwirkungen sowie der Verbesserung der Lebensqualität der Patienten (Leitlinienprogramm Onkologie, 2020).

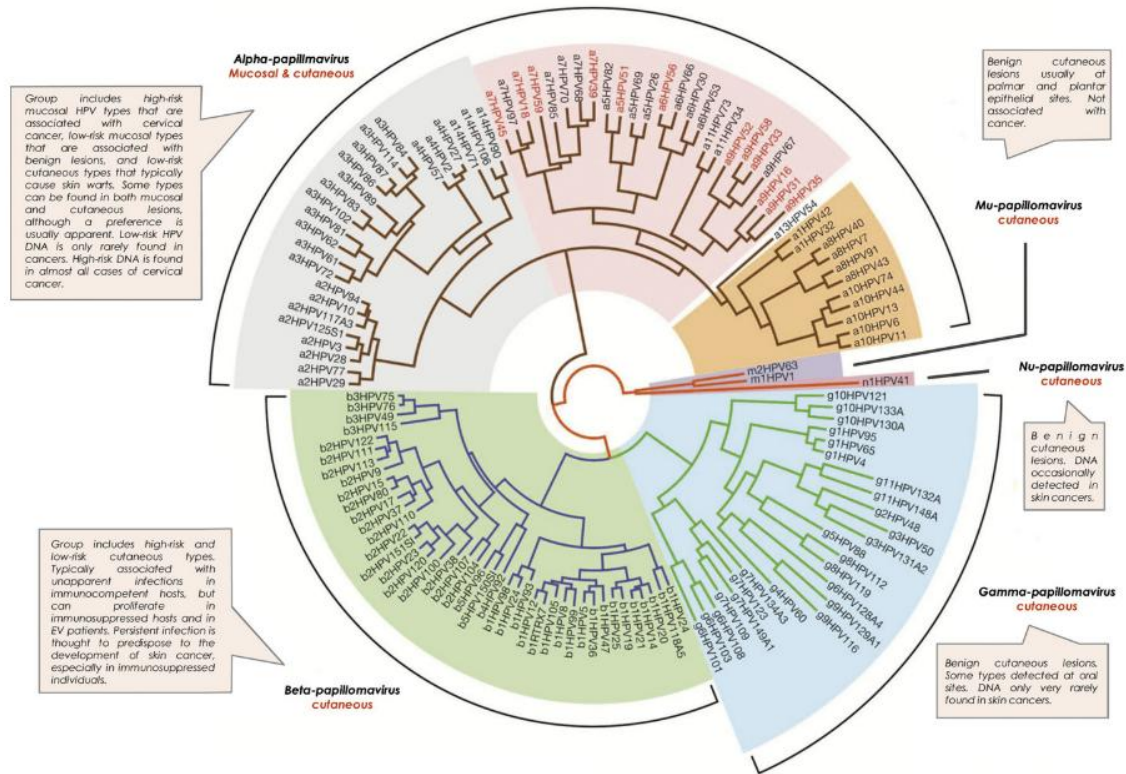
Während die 5-Jahres-Überlebensrate beim Peniskarzinom für organbegrenzte Erkrankungen bei 85 % und für lymphogen metastasierte Tumoren bei 59 % liegt, sind fünf Jahre nach Diagnosestellung lediglich 11 % der Patienten mit Fernmetastasierung noch am Leben (Leitlinienprogramm Onkologie, 2020). Angesichts der drastischen Prognoseverschlechterung bei lymphogener Metastasierung und Fernmetastasierung ist eine Diagnosestellung in frühen Krankheitsstadien von entscheidender

Bedeutung (Ficarra et al., 2010). Allerdings nehmen Patienten mit Peniskarzinom aufgrund von Schamgefühlen und der Furcht vor sozialen Stigmata gehäuft erst mehrere Monate nach Symptombeginn ärztliche Hilfe in Anspruch (Barocas & Chang, 2010).

## 2.2 Humane Papillomviren

Humane Papillomviren (HPV) sind ubiquitär vorkommende, unbehüllte DNA-Viren mit einem Durchmesser von circa 55 nm, die zur Familie der Papillomaviridae zählen (De Villiers et al., 2004; zur Hausen, 1996). Bisher wurden über 200 verschiedene HPV-Genotypen identifiziert (siehe Papillomavirus Episteme (PaVE) Datenbank, verfügbar unter <https://pave.niaid.nih.gov>). Anhand von DNA-Sequenzanalysen werden HPV in die fünf evolutionären Genera Alpha ( $\alpha$ ), Beta ( $\beta$ ), Gamma ( $\gamma$ ), Mu und Nu eingeteilt (Abbildung 2), die sich hinsichtlich des Epitheliotropismus und der assoziierten Krankheiten unterscheiden. Während HPV-Typen des Genus Alpha neben kutanem auch mukosales Epithel infizieren, befallen die restlichen Genera ausschließlich kutanes Gewebe (Doorbar et al., 2012). Des Weiteren werden HPV entsprechend ihres onkogenen Potenzials in Niedrig- und Hochrisikotypen unterteilt. Niedrigrisikotypen, insbesondere HPV6 und HPV11, verursachen benigne Läsionen und Genitalwarzen (zur Hausen, 1996). Im Gegensatz dazu können Infektionen mit Hochrisikotypen, vor allem HPV16 und HPV18, zu intraepithelialen Neoplasien und Karzinomen multipler anatomischer Regionen, darunter Kopf-Hals-Tumoren sowie Karzinome an Cervix, Vulva, Vagina, Penis und Anus, führen (Berman & Schiller, 2017). Neben HPV16 und HPV18 stuft die *World Health Organization* (WHO) die HPV-Typen 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 und 59 als Hochrisikotypen ein (Doorbar et al., 2012). Schätzungsweise sind HPV für etwa 5 % aller Krebserkrankungen des Menschen verantwortlich (Berman & Schiller, 2017).

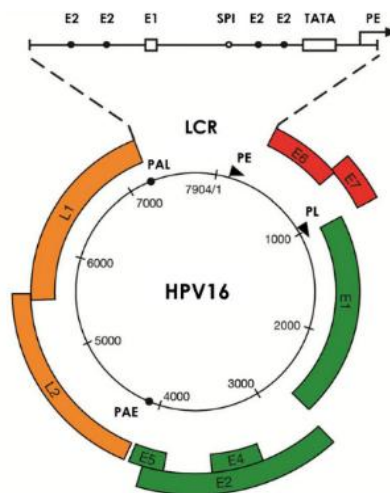
HPV-Infektionen zählen zu den häufigsten sexuell übertragbaren Infektionen weltweit (Sabeena et al., 2017). Mehr als die Hälfte aller sexuell aktiven Menschen infiziert sich im Laufe ihres Lebens mit HPV (Chesson et al., 2014). Obwohl HPV-Infektionen in der Regel asymptomatisch verlaufen und folgenlos ausheilen, kann eine persistierende Infektion mit Hochrisiko-HPV-Typen zu präkanzerösen Veränderungen und Karzinomen fortschreiten (Dunne & Park, 2013).



**Abbildung 2: Systematik der humanen Papillomviren.** Humane Papillomviren (HPV) werden anhand ihres Genoms in die fünf evolutionären Genera Alpha ( $\alpha$ ), Beta ( $\beta$ ), Gamma ( $\gamma$ ), Mu und Nu eingeteilt, die sich hinsichtlich des Epitheliotropismus und der assoziierten Krankheiten unterscheiden. HPV-Typen des Genus Alpha werden entsprechend ihres onkogenen Potenzials als kutane Niedrigrisikotypen (grau), mukosale Niedrigrisikotypen (orange) sowie mukosale Hochrisikotypen (rosa) klassifiziert. Hochrisikotypen in roter Schrift werden als sicher karzinogen eingestuft, während die übrigen Hochrisikotypen höchstwahrscheinlich eine Rolle in der Onkogenese spielen. Im Gegensatz dazu verursachen Niedrigrisikotypen benigne Läsionen und Hautwarzen. HPV-Typen der Genera Beta (grün), Gamma (blau), Mu (violett) sowie Nu (rot) zählen zu den kutanen HPV-Typen und werden mit Ausnahme vereinzelter Beta-HPV-Typen nicht mit Karzinomen in Verbindung gebracht. Der Stammbaum basiert auf dem Alignment der DNA-Sequenzen E1, E2, L1 und L2. Entnommen von Doorbar et al., 2012.

Bereits in den 1970er Jahren formulierte Harald zur Hausen die Hypothese der HPV-induzierten zervikalen Karzinogenese (zur Hausen, 1977), für welche er 2008 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet wurde. Basierend auf zur Hausens Erkenntnis wurden Impfstoffe zur Prävention von HPV-Infektionen und den damit assoziierten Karzinomen entwickelt, die auf virusähnlichen Partikeln (*virus-like particles*, VLP) beruhen. VLP bestehen aus dem gentechnisch in Hefezellen der *Saccharomyces cerevisiae* hergestellten Hauptkapsidprotein L1 und bilden leere, ikosaedrische Hüllen, die der Morphologie des jeweiligen HPV-Typs ähneln. Während sich der 2006 zugelassene quadrivalente Impfstoff Gardasil® gegen die Hochrisiko-HPV-Typen 16 und 18 sowie Niedrigrisiko-HPV-Typen 6 und 11 richtet, schützt der 2014 zugelassene nonavalente Impfstoff Gardasil®9 zusätzlich vor den Hochrisiko-HPV-Typen 31, 33, 45, 52 und 58 (Kash et al., 2015). Seit 2018 empfiehlt die Ständige Impfkommission (STIKO) die Impfung gegen HPV nicht nur für Mädchen, sondern ebenfalls für Jungen im Alter von 9 bis 14 Jahren (Robert Koch-Institut, 2018).

Das zirkuläre, doppelsträngige DNA-Genom der HPV (Abbildung 3) besteht aus circa 8000 Basenpaaren und gliedert sich in drei Regionen (zur Hausen, 1996). Die regulatorische Region (*long control region*, LCR) verfügt über Bindungsstellen für zelluläre Transkriptionsfaktoren sowie für die HPV-Proteine E1 und E2, welche die virale Replikation und Genexpression kontrollieren. Die *early region* kodiert die frühen viralen Onkoproteine E1, E2, E4, E5, E6 und E7, während die *late region* die Gene der viralen Kapsidproteine L1 und L2 beinhaltet (Doorbar et al., 2012). Die Strukturproteine L1 und L2, im Verhältnis von 30:1, verpacken das virale Genom in ein aus insgesamt 72 Pentameren bestehendes, ikosaedrisches Kapsid. Jedes Pentamer bildet sich aus fünf einzelnen L1-Proteinen, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Im Zentrum eines jeden Pentamers ist ein L2-Protein lokalisiert (Buck & Trus, 2012; Finnen et al., 2003). Abbildung 3 zeigt den Genomaufbau am Beispiel des Hochrisiko-HPV-Typs 16.



**Abbildung 3: Aufbau des HPV16-Genoms.** Das zirkuläre DNA-Genom des Hochrisiko-HPV-Typs 16 gliedert sich in drei Regionen: Die regulatorische Region (*long control region*, LCR) verfügt über Bindungsstellen für zelluläre Transkriptionsfaktoren und virale Proteine. Die *early region* kodiert die frühen viralen Onkoproteine E1, E2, E4, E5 (grün) sowie E6 und E7 (rot), deren Expression durch den *early promoter* (PE, ebenfalls als p97 bezeichnet) reguliert wird. Die *late region* beinhaltet die Gene der viralen Kapsidproteine L1 und L2 (orange), deren Expression durch den *late promoter* (PL, auch bekannt als p670) gesteuert wird. PAE und PAL kennzeichnen die Polyadenylierungsstellen innerhalb des viralen Genoms. Entnommen von Doorbar et al., 2012.

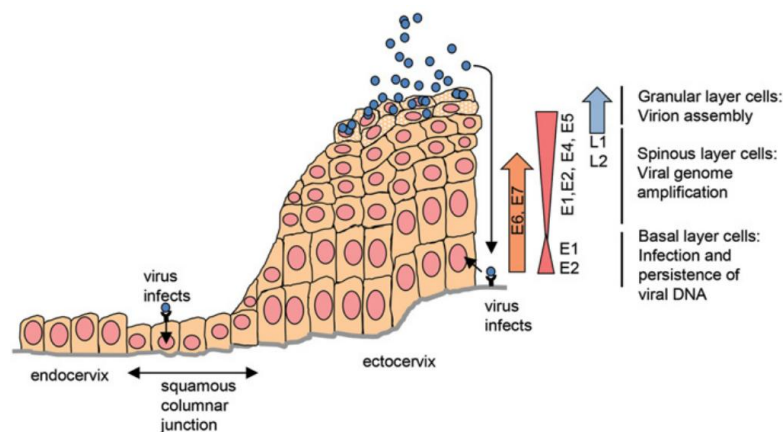
Da das HPV-Genom, mit Ausnahme einer DNA-Helikase, keine für die virale Replikation benötigten Enzyme kodiert, sind HPV auf die Transkriptionsmaschinerie ihrer Wirtszellen, der Keratinozyten, angewiesen. Hierbei ist der HPV-Replikationszyklus (Abbildung 4) eng mit der Differenzierung der Keratinozyten verknüpft (Graham, 2010; Moody & Laimins, 2010). Damit eine Infektion entsteht, benötigen HPV Zugang zu undifferenzierten, mitotisch aktiven Basalzellen des mehrschichtigen kutanen oder mukosalen Epithels durch Mikroläsionen (Doorbar, 2005; Pyeon et al., 2009). Die Bindung des Virus an Oberflächenproteine der Basalzelle, beispielsweise Heparansulfat (Giroglou et al., 2001), führt unter anderem durch Furinspaltung von L2 (Richards et al., 2006) zu strukturellen Veränderungen des Viruskapsids, wodurch die Internalisierung des Virus in die Wirtszelle mittels rezeptorvermittelter Endozytose ermöglicht wird (Doorbar et al., 2012). Nachdem das Virus durch das im reduzierenden Milieu des Zytoplasmas bedingte Aufbrechen der Kapsid-Disulfidbrücken entpackt wurde (M. Li et al., 1998), erfolgt der Transfer des Virusgenoms in den Zellkern sowie die Genomreplikation (Doorbar et al., 2012). Das Genom liegt dann in episomaler Form mit circa 10 bis 200 Kopien pro Zelle vor (Doorbar, 2005). In der Frühphase des viralen Replikationszyklus werden die HPV-Onkoproteine E1, eine DNA-Helikase, und E2 synthetisiert. E2 reguliert die Transkription des viralen Genoms durch Bindungsstellen in der LCR (Egawa et al., 2012). Darüber hinaus bilden E1 und E2 einen Komplex, der an den Replikationsursprung des Genoms bindet, die DNA entwindet und dadurch die Expression der übrigen frühen viralen Onkoproteine ermöglicht (Wilson et al., 2002).

Keratinozyten differenzieren im Rahmen ihrer Wanderung vom *Stratum basale* zum *Stratum corneum* von proliferationsfähigen zu ausgereiften, verhornten Zellen (Eckert, 1989). Die physiologische Differenzierung der Keratinozyten wird durch die HPV-Onkoproteine E6 und E7, deren Expression durch den *early promoter* (PE, ebenfalls bezeichnet als p97) reguliert wird, unterbunden (Doorbar et al., 2012). Die wichtigste Funktion des HPV-Proteins E6 ist die Inaktivierung des Tumorsuppressorgens p53, welches bei DNA-Schäden den Zellzyklus reversibel unterbricht, um zelleigene Reparaturmechanismen zu aktivieren oder im Bedarfsfall die Apoptose einzuleiten (Boulet et al., 2007; Levine, 1997). Hierfür bildet E6 zusammen mit dem E6-assoziierten Protein (E6AP), eine E3-Ubiquitin-Ligase, und p53 einen trimeren Komplex, wodurch p53 ubiquitiniert und proteolytisch abgebaut wird (Huibregtse et al., 1991; Martinez-Zapian et al., 2016). In nicht-infizierten Zellen formieren das Retinoblastom-Protein (pRb) und der Transkriptionsfaktor E2F einen Komplex, der als Transkriptionsrepressor fungiert. Die Bindung des HPV-Onkoproteins E7 an pRb verhindert die Interaktion von pRb mit E2F, wodurch E2F vermehrt freigesetzt wird und die Zelle in die S-Phase des Zellzyklus eintreten kann (Boulet et al., 2007). Zudem führt die Freisetzung von E2F zu einer gesteigerten Expression des Tumorsuppressorproteins p16<sup>INK4a</sup> (Spiess et al., 2016). Demzufolge kann eine HPV-Infektion nicht nur durch den direkten Nachweis von HPV-DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR), sondern ebenfalls durch den immunhistochemischen Nachweis einer p16<sup>INK4a</sup>-Überexpression diagnostiziert werden. Das Protein p16<sup>INK4a</sup> gilt hierbei als indirekter Marker für eine transkriptiv aktive Hochrisiko-HPV-Infektion (Cubilla et al., 2011; Olesen et

al., 2019; Sastre-Garau & Harlé, 2020). Zusammenfassend deregulieren die HPV-Onkoproteine E6 und E7 die Zellzykluskontrolle infizierter Wirtszellen, zwingen differenzierte Zellen zum Wiedereintritt in den Zellzyklus und gewährleisten dadurch eine anhaltende Proliferation der Keratinozyten und den Erhalt des Virusgenoms (Moody & Laimins, 2010).

Während Basalzellen zur Initiierung der Infektion und Expression der frühen viralen Gene dienen, werden in den suprabasal gelegenen Epithelschichten die späten Kapsidproteine L1 und L2, gesteuert durch den *late promoter* (PL, auch bekannt als p670), synthetisiert, die Viruspartikel zusammengebaut und die infektiösen Viren schließlich freigesetzt (Graham, 2017).

Bei HPV-assoziierten Karzinomen wurde das virale Genom meist in das Wirtszellgenom integriert, woraus eine gesteigerte Expression der Onkoproteine E6 und E7 resultiert (McBride & Warburton, 2017). Gründe hierfür liegen zum einen in der mangelnden Suppression dieser HPV-Proteine aufgrund der durch die Integration bedingten Unterbrechung des E2-Gens (Thierry & Yaniv, 1987) und zum anderen in der Methylierung der E2-Bindungsstellen in der LCR (Leung et al., 2015). Eine erhöhte E6/E7-Proteinexpression trägt angesichts der veränderten Zellzyklus-Regulation und daraus resultierender DNA-Schädigung sowie Genominstabilität zur Entstehung und Progression von Karzinomen bei (Hoppe-Seyley et al., 2018).



**Abbildung 4: Replikationszyklus der humanen Papillomviren im Zervixepithel.** Humane Papillomviren (HPV) infizieren die Basalzellen des zervikalen Epithels durch Bindung spezifischer Oberflächenrezeptoren. Die virale Replikation erfolgt im Nukleus und ist eng mit der Differenzierung der Keratinozyten verknüpft. Zunächst werden die frühen HPV-Proteine E1 und E2 synthetisiert. Im *Stratum spinosum* wird das virale Genom durch die zelluläre Transkriptionsmaschinerie des Keratinozyten amplifiziert. Die Expression der Onkoproteine E6 und E7 führt zur Deregulation des Zellzyklus und gewährleistet damit eine anhaltende Proliferation der Keratinozyten und den Erhalt des Virusgenoms. Im *Stratum granulosum* des Zervixepithels werden die späten Kapsidproteine L1 und L2 exprimiert, die Viruspartikel zusammengebaut und schließlich die infektiösen Viren freigesetzt. Entnommen von Graham, 2017.

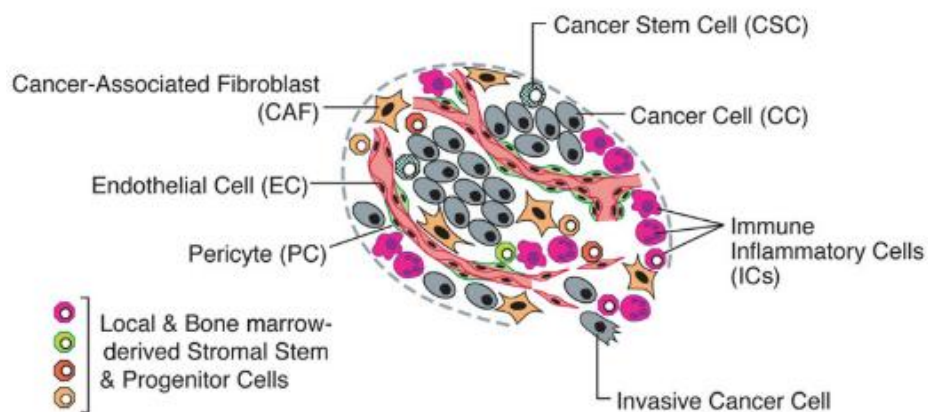
### 2.3 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten, ebenfalls als *Polymorphonuclear Neutrophils* (PMN) bezeichnet, sind Teil des angeborenen, unspezifischen Immunsystems und stellen bis zu 70 % aller Leukozyten des peripheren Blutes gesunder Erwachsener dar. Sie entwickeln sich im Rahmen der Granulopoese aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark. Die hämatopoetischen Stammzellen differenzieren zunächst über myeloische Vorläuferzellen zu Myeloblasten, aus welchen nicht nur neutrophile Granulozyten, sondern auch basophile und eosinophile Granulozyten hervorgehen können. Die Myeloblasten durchlaufen dann einen Entwicklungsprozess über Promyelozyten, Myelozyten und Metamyelozyten, welche anschließend zu stabkernigen und letztlich zu segmentkernigen neutrophilen Granulozyten heranreifen (Junger, 2008). Neben dem *Granulocyte Colony-Stimulating Factor* (G-CSF) und dem *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor* (GM-CSF) regulieren zudem die Interleukine IL-3, IL-17 und IL-23 die Granulopoese (Metcalf, 1988; Stark et al., 2005). Die neu gebildeten PMN werden im Knochenmark gespeichert und bei Bedarf rasch in die Blutbahn abgegeben, wo sie mehrere Stunden in den Gefäßen zirkulieren. Zahlreiche von Bakterien oder inflammatorischem Gewebe produzierte Chemokine steuern die Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten aus der Blutbahn in das entzündete Gewebe, die sogenannte Chemotaxis. Dort angekommen, erkennen PMN eingedrungene Mikroorganismen und bekämpfen diese durch Phagozytose, NETose sowie durch Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (*oxidative burst*), proteolytischer Enzyme und bakterizider Mediatoren (Junger, 2008). *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs) sind extrazelluläre, netzartige Strukturen aus DNA, zytotoxischen Proteinen und Proteasen wie neutrophile Elastase (NE) und Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9), die Pathogene binden und abtöten (Albregues et al., 2018).

### 2.4 Myeloische Zellen im Tumormikromilieu

Das Tumormikromilieu (*tumor microenvironment*, TME) (Abbildung 5) vermag durch Förderung der karzinombedingten Inflammation fortwährend angeborne Immunzellen, darunter Makrophagen und Neutrophile, zu rekrutieren und stellt daher ein schicksalsentscheidendes Kompartiment der Neoplasie dar. Innerhalb des TME werden myeloische Zellen zu tumorassoziierten Makrophagen, tumorassoziierten Neutrophilen (TANs) oder myeloiden Suppressorzellen (*myeloid-derived suppressor cells*, MDSCs) reprogrammiert (Flemming et al., 2018; Jaillon et al., 2020; Mohr et al., 2022; Veglia et al., 2018). Diese Zellen begünstigen die Tumorprogression in allen Stadien der Karzinogenese, beginnend bei der Initiierung über die Progression von Vorläuferläsionen zum invasiv wachsenden Karzinom bis hin zur Metastasierung (Coffelt et al., 2016; Jaillon et al., 2020; Mohr et al., 2022; Wellenstein et al., 2019).

Allerdings ist wichtig zu betonen, dass TANs basierend auf ihrer Funktion im Tumorgewebe in zwei Phänotypen, nämlich N1- und N2-TANs, eingeteilt werden (Fridlender et al., 2009). N1-TANs wirken proinflammatorisch und tumorhemmend. Durch Ausschüttung von Chemokinen und proinflammatorischen Zytokinen können N1-TANs zytotoxische T-Zellen in das Tumorstroma rekrutieren und aktivieren (Fridlender & Albelda, 2012). Allerdings polarisieren N1-TANs unter dem Einfluss des im Tumorstroma sezernierten Zytokins *Transforming Growth Factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) zum tumorfördernden N2-Phänotyp (Fridlender et al., 2009), welcher das Tumorwachstum unterstützt und die antitumorale Immunantwort unterdrückt (Fridlender & Albelda, 2012). N2-TANs fördern durch Freisetzung von Wachstumsfaktoren, wie *Epidermal Growth Factor* (EGF), direkt die Proliferation der Tumorzellen (Granot & Jablonska, 2015). Darüber hinaus verhindert die N2-TAN-vermittelte Sekretion der Matrix-Metalloproteinase MMP-9 die Apoptose der Tumorzellen und begünstigt die Angiogenese des Tumors. Durch Ausschüttung der Arginase 1 unterdrücken N2-TANs die Funktion der T-Zellen und wirken somit immunsuppressiv. Außerdem unterstützen N2-TANs die Invasion und Metastasierung des Tumors durch Sekretion der neutrophilen Elastase (Fridlender & Albelda, 2012).



**Abbildung 5: Die zelluläre Zusammensetzung des Tumormikromilieus.** Entnommen von Hanahan & Weinberg, 2011.

## 2.5 Konvergenz multipler onkogener Signalwege in HPV-positiven und HPV-negativen Tumoren

Im Rahmen der Karzinogenese HPV-positiver und HPV-negativer peniler Tumoren konvergieren multiple onkogene Signalwege, darunter der Notch-, p53-, TGF- $\beta$ -, Wnt- und Hippo-Signalweg, miteinander (Arya et al., 2015; Bley et al., 2022; Ribera-Cortada et al., 2022; L. Zhang et al., 2015; Zhou et al., 2018).

Aktuelle Forschungsergebnisse unserer Arbeitsgruppe belegen eine Überexpression des *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) (Bernhard et al., 2021) als auch des *Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer* (EMMPRIN) (Mohr et al., 2022) im Falle des Peniskarzinoms und stehen somit in Einklang mit publizierter Literatur (Börgermann et al., 2009; Di Lorenzo et al., 2013; Grass et al., 2023; Z. D. Han et al., 2010; Lavens et al., 2010). Sowohl der EGFR als auch EMMPRIN aktivieren verschiedene tumorfördernde Signalwege, darunter der PI3K/AKT-Signalweg, MAPK-Signalwege sowie der JAK/STAT-Signalweg (Asgari et al., 2023; Laurent-Puig et al., 2009; Nyati et al., 2006; Xin et al., 2016). Zudem deuten die Daten darauf hin, dass EGFR und EMMPRIN einen Komplex auf der Karzinomzelloberfläche bilden und direkt miteinander interagieren (Dai et al., 2013; Grass et al., 2013; X. Zhang et al., 2018). Grass et al. belegen eine Ansammlung aus EGFR und EMMPRIN bestehender Signalkomplexe in „lipid raft“-artigen (siehe 5.1) Domänen (Grass et al., 2013).

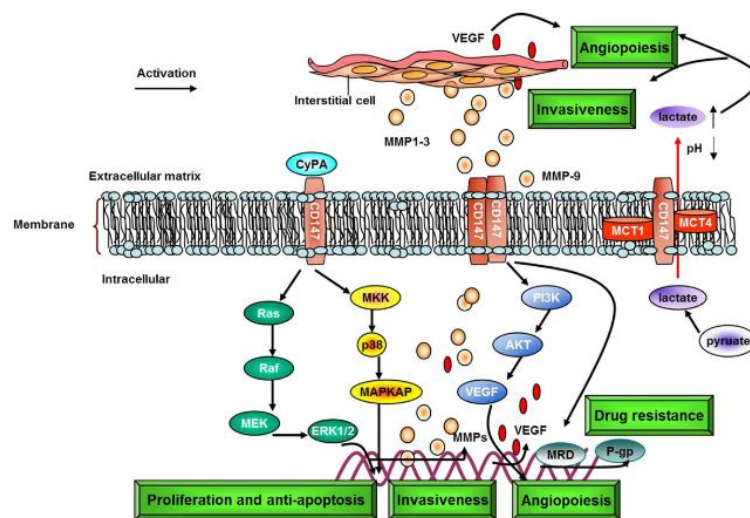
### 2.5.1 Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer

Der *Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer* (EMMPRIN) (Abbildung 6), auch *Cluster of Differentiation 147* (CD147) oder Basigin genannt, ist ein multifunktionales Glykoprotein der Immunglobulin-Superfamilie, welches sowohl auf der Oberfläche maligner als auch nicht-maligner Zellen, bei letzteren jedoch in geringerer Konzentration, exprimiert wird (H. Guo et al., 1998). EMMPRIN besteht aus einem extrazellulären Bereich mit zwei Immunglobulin-ähnlichen Domänen, einer Transmembrandomäne sowie einer zytoplasmatischen Domäne (Fossum et al., 1991).

Durch Vermittlung von Interaktionen zwischen Tumor- und Stromazellen sowie zwischen Tumorzellen untereinander trägt EMMPRIN zur Tumorprogression bei (Yan et al., 2005). EMMPRIN fördert Invasivität und Metastasierung des Karzinoms, indem er die Synthese von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) aus Tumor- und Stromazellen stimuliert (Grass & Toole, 2016). Aus gesteigerter Freisetzung von MMPs resultiert eine erhöhte EMMPRIN-Expression, sodass EMMPRIN seine eigene Expression im Tumorstroma induziert (Y. Tang et al., 2004). EMMPRIN dient zudem als Rezeptor für das S100A8/S100A9-Heterodimer Calprotectin auf Tumorzellen, Neutrophilen und Fibroblasten (Mohr et al., 2022). Des Weiteren reguliert EMMPRIN die Produktion des *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) über den PI3K/AKT-Signalweg, wodurch die Tumorangiogenese induziert wird (Y. Tang et al., 2006). Die EMMPRIN-vermittelte Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs sowie MAPK-abhängiger Signalwege wird für die Entwicklung der Zytostatikaresistenz vieler Karzinome verantwortlich gemacht. Infolgedessen kann EMMPRIN als Prognoseindikator von Tumorerkrankungen fungieren,

wobei dessen erhöhte Expression mit einer ungünstigen Prognose einhergeht (Xin et al., 2016). Beim Zervixkarzinom werden eine EMMPRIN-Überexpression sowie eine Koexpression von EMMPRIN und HPV16 E6 als Indikatoren für Malignität und eine schlechte Prognose angesehen (Zhao et al., 2017).

Han et al. belegen eine EMMPRIN-Expression in 94,12 % der Fälle des Peniskarzinoms (Z. D. Han et al., 2010). Unsere Arbeitsgruppe konnte ebenfalls eine Überexpression von EMMPRIN beim Peniskarzinom nachweisen, insbesondere im Tumorzentrum und bei HPV-positiven Tumoren (Mohr et al., 2022).



**Abbildung 6: Schematische Darstellung EMMPRIN-assoziierter Proteine.** Der *Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer* (EMMPRIN), auch *Cluster of Differentiation 147* (CD 147) genannt, trägt zur Tumorprogression bei, indem er durch Synthese von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) Invasivität und Metastasierung des Karzinoms fördert, durch Produktion des *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) die Tumorangiogenese über den PI3K/AKT-Signalweg induziert und durch Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs sowie MAPK-abhängiger Signalwege die Entwicklung der Zytostatikaresistenz begünstigt. Entnommen von Xin et al., 2016.

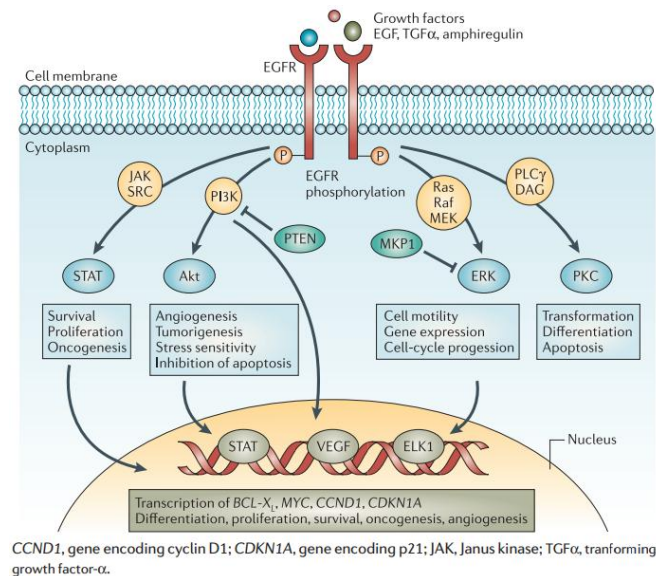
### 2.5.2 Epidermal Growth Factor Receptor

Der *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) (Abbildung 7), ebenfalls als ErbB1 oder HER1 bezeichnet, ist ein transmembranes Glykoprotein, welches gemeinsam mit ErbB2 (HER2), ErbB3 (HER3) und ErbB4 (HER4) zur ErbB-Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen zählt (Yarden, 2001; Yarden & Sliwkowski, 2001). Er besteht aus einer N-terminalen extrazellulären Ligandenbindungsdomäne, einer einzelnen  $\alpha$ -helikalen Transmembrandomäne, einer zytoplasmatischen Domäne mit Tyrosinkinaseaktivität sowie einer C-terminalen regulatorischen Domäne (Wells, 1999). Neben dem *Epidermal Growth Factor* (EGF) wurden der *Transforming Growth Factor- $\alpha$*  (TGF- $\alpha$ ), Amphiregulin,  $\beta$ -Cellulin, Heparin-bindendes EGF sowie Epiregulin als Liganden des EGFR identifiziert (Yarden & Sliwkowski, 2001). Bindet ein Ligand an die extrazelluläre Domäne des EGFR, kommt es zur Dimerisierung des Rezeptors. Die dadurch bedingte Autophosphorylierung des EGFR führt zur Aktivierung der intrazellulären Tyrosinkinase und schließlich zum Beginn der Signaltransduktion (Yarden & Schlessinger, 1987a, 1987b). Der EGFR beeinflusst ein breites Spektrum an Signalwegen, darunter der Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg, der PI3K/AKT-Signalweg sowie der JAK/STAT-Signalweg, woraus letztlich die Förderung von Proliferation, Wachstum, Differenzierung und Migration der Zellen bei gleichzeitiger Hemmung der Apoptose resultiert.

Eine Überexpression des EGFR findet sich nicht nur bei nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen, kolorektalen Karzinomen, Glioblastomen, Kopf-Hals-Tumoren sowie Karzinomen des Pankreas und der Mamma (Wee & Wang, 2017), sondern wurde ebenfalls in über 90 % der Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen des Peniskarzinoms nachgewiesen (Börgermann et al., 2009; Di Lorenzo et al., 2013; Lavens et al., 2010). Des Weiteren korrelieren Überexpression und Überaktivierung des EGFR mit einer schlechteren Prognose, Arzneimittelresistenz, Metastasierung und reduzierten Überlebensrate (Z. Wang, 2017).

In Hinblick auf HPV ist anzumerken, dass deren Onkoproteine E5, E6 und E7 den EGFR beeinflussen. E5 inhibiert einerseits den Abbau von internalisiertem EGFR in Lysosomen durch Hemmung der endosomalen Protonen-ATPase (Straight et al., 1995). Andererseits interagiert E5 mit der E3-Ubiquitin-Ligase c-Cbl, wodurch die Ubiquitinierung und der Abbau von EGFR verhindert werden (Zhang et al., 2005). Die EGFR-Liganden TGF- $\alpha$  und Amphiregulin hemmen den Hippo-Signalweg und aktivieren das *Yes-Associated Protein* (YAP). Aus der Aktivierung von YAP resultiert eine Hochregulierung des EGFR und seiner Liganden, sodass eine positive Rückkopplungsschleife entsteht (C. He et al., 2015). Die HPV-Onkoproteine E6 und E7 verhindern den Proteasom-abhängigen YAP-Abbau und erhalten somit hohe YAP-Proteinspiegel aufrecht (C. He et al., 2015; White et al., 2016). Infolgedessen fördern HPV das Recycling des EGFR zur Zelloberfläche sowie dessen Überexpression und ermöglichen so die Signalübertragung des Rezeptors.

Im Gegensatz dazu belegen Qiu et al. eine Herunterregulierung des EGFR bei HPV-positiven Zervixkarzinomen und Kopf-Hals-Tumoren verglichen mit HPV-negativen Tumoren (Qiu et al., 2021). Des Weiteren wiesen Stankiewicz et al. eine erhöhte Expression von phosphoryliertem EGFR beim HPV-negativen Peniskarzinom, im Vergleich zu HPV-positiven Tumoren, nach. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der EGFR eine bedeutendere Rolle in der nicht-HPV-assoziierten penilen Karzinogenese spielt (Stankiewicz, Prowse, Ng, et al., 2011).



**Abbildung 7: Schematische Darstellung EGFR-vermittelter Signalwege.** Die Bindung eines Liganden, beispielsweise *Epidermal Growth Factor* (EGF), *Transforming Growth Factor- $\alpha$*  (TGF- $\alpha$ ) oder Amphiregulin, an die extrazelluläre Domäne des EGFR bewirkt die Dimerisierung und Autophosphorylierung des Rezeptors. Die hieraus resultierende Aktivierung der intrazellulären Tyrosinkinase löst zahlreiche Signalkaskaden, darunter der Ras/Raf/MEK/ERK-, der PI3K/AKT- sowie der JAK/STAT-Signalweg, aus, die letztlich die Transkription bestimmter Zielgene beeinflussen und somit Differenzierung, Proliferation, Überleben sowie Onkogenese der Zellen regulieren. Entnommen von Nyati et al., 2006.

### 2.5.3 AKT und der PI3K/AKT-Signalweg

Der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)/AKT-Signalweg zählt zu den am häufigsten aktivierten Signalwegen in humanen Karzinomen. Er reguliert über multiple Effektoren zahlreiche Prozesse, einschließlich Zellproliferation, Apoptose, Metastasierung, Arzneimittelresistenz sowie Inflammation (Abbildung 8B), und spielt daher eine entscheidende Rolle in der Karzinogenese (Y. He et al., 2021). Darüber hinaus interagiert der PI3K/AKT-Signalweg mit dem Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg (McCubrey et al., 2007).

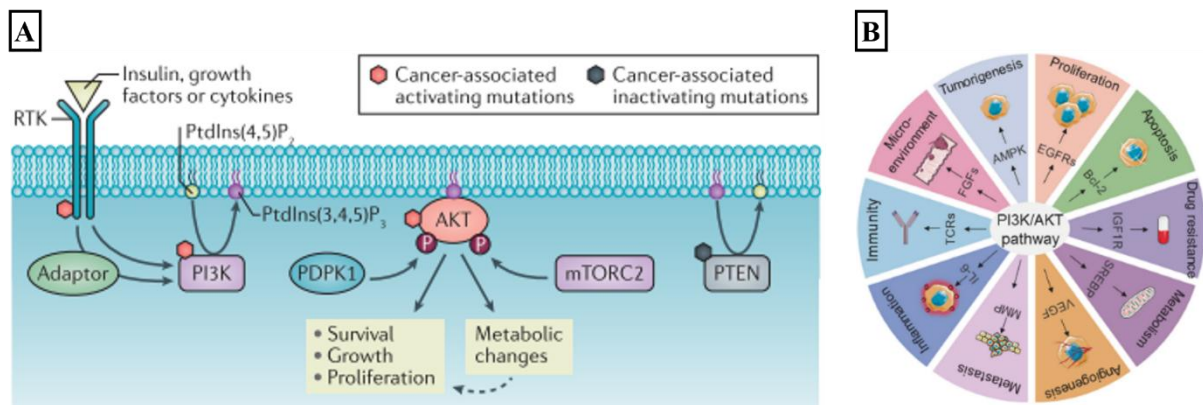
Die Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs (Abbildung 8A) erfolgt durch Rezeptor-Tyrosinkinasen, Zytokinrezeptoren, Integrine und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Bindet ein Ligand an einen solchen Rezeptor, kommt es zu dessen Aktivierung sowie zur Phosphorylierung von Tyrosinresten seiner zytosolischen Domäne. Die hierdurch geschaffenen Bindungsstellen rekrutieren PI3K zur Zellmembran. PI3K phosphoryliert daraufhin Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, abgekürzt als PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> oder PIP<sub>2</sub>, zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat, kurz PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> oder PIP<sub>3</sub>. Die Lipidphosphatase PTEN (*Phosphatase and Tensin Homolog*) kann diesen Prozess umkehren, indem sie PIP<sub>3</sub> zu PIP<sub>2</sub> dephosphoryliert. PIP<sub>3</sub> fungiert als klassischer *Second Messenger* und rekrutiert die Serin/Threonin-Kinase AKT, ebenfalls als Proteinkinase B bezeichnet, zur Zellmembran. AKT wird dann durch Phosphorylierung an Thr308 durch die Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase-1 (PDK1) sowie an Ser473 durch den *mechanistic Target of Rapamycin Complex 2* (mTORC2) vollständig aktiviert (Y. He et al., 2021; Hoxhaj & Manning, 2020).

Neben der Ligand-Rezeptor-Bindung kann der PI3K/AKT-Signalweg auch durch verschiedene genomische Veränderungen aktiviert werden. In vielen Karzinomen, einschließlich HPV-assoziierten Karzinomen, wurden aktivierende Mutationen im PIK3CA-Gen, welches für die katalytische Untereinheit p110 $\alpha$  von PI3K kodiert, nachgewiesen (Henken et al., 2011; Samuels et al., 2004). Während Andersson et al. PIK3CA-Genmutationen in 29 % der untersuchten PeCa-Proben belegen, zeigte eine wenige Jahre später, allerdings mit einer größeren Stichprobe durchgeführte Studie von Ferrándiz-Pulido et al. einen niedrigeren Anteil von lediglich 9 % (Andersson et al., 2008; Ferrándiz-Pulido et al., 2015). Nach Adimonye et al. korreliert der Anstieg der PIK3CA-Kopienzahl mit der Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs in PeIN, wohingegen dieser Zusammenhang beim Peniskarzinom nicht beobachtet werden konnte. Dies impliziert eine stärkere Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs in der frühen Karzinogenese des Peniskarzinoms (Adimonye, Stankiewicz, La-Touche, et al., 2018). Weitere genomische Veränderungen, die zur Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs führen können, umfassen Mutationen mit Funktionsverlust und Deletionen in PTEN, einem häufig mutierten Tumorsuppressorgen, sowie Amplifikation und Aktivierung spezifischer PI3K-aktivierender Rezeptor-Tyrosinkinasen. Außerdem können Amplifikation und Mutationen in Genen, die für eine der drei Isoformen von AKT kodieren, die Aktivierung dieses Signalwegs bewirken (Hoxhaj & Manning, 2020). Zahlreichen Publikationen zufolge sind Hauptakteure des PI3K/AKT-Signalwegs in

verschiedensten HPV-assoziierten Tumoren amplifiziert oder mutiert (Bertelsen et al., 2006; Chiosea et al., 2013; Lui et al., 2013).

Die Serin/Threonin-Kinase AKT ist ein zentraler Akteur des PI3K/AKT-Signalwegs. Im Säugetiergenom wurden die drei AKT-Gene AKT1, AKT2 und AKT3 identifiziert. AKT1 stellt die Hauptisoform dieser Proteinfamilie dar und ist maßgeblich an der Regulation der Apoptose beteiligt. Trotz struktureller Ähnlichkeiten unterscheiden sich die drei AKT-Isoformen in ihrer Funktion und ihrem Vorkommen. Während sich AKT1 ubiquitär nachweisen lässt, wird AKT2 hauptsächlich in insulinreaktiven Geweben wie Fettgewebe, Leber sowie Skelettmuskulatur und AKT3 vor allem im Gehirn exprimiert (H. Yu et al., 2015).

Aktuelle Forschungsergebnisse implizieren eine HPV-unabhängige Dysregulation des PI3K/AKT-Signalwegs beim Peniskarzinom (Chaux et al., 2014; Stankiewicz, Prowse, Ng, et al., 2011; Thomas et al., 2021). Chaux et al. sowie Thomas et al. wiesen eine höhere pAKT- beziehungsweise AKT-Expression bei high-grade Tumoren des Peniskarzinoms nach (Chaux et al., 2014; Thomas et al., 2021), während Azizi et al. die Hochregulierung des PI3K/AKT-Signalwegs und eine HPV-Koinfektion mit einer günstigen Prognose des Peniskarzinoms assoziierten (Azizi et al., 2019).



**Abbildung 8: Der PI3K/AKT-Signalweg und seine bedeutendsten Effektoren. [A] Schematische Darstellung des PI3K/AKT-Signalwegs.** Aus Bindung eines Liganden, beispielsweise Insulin, Wachstumsfaktoren oder Zytokine, an die Rezeptor-Tyrosinkinase resultiert deren Aktivierung sowie Phosphorylierung von Tyrosinresten ihrer zytosolischen Domäne, wodurch Bindungsstellen für verschiedene Moleküle geschaffen werden. Die hierdurch zur Zellmembran rekrutierte Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) phosphoryliert daraufhin Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, abgekürzt als PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> oder PIP<sub>2</sub>, zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat, kurz PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> oder PIP<sub>3</sub>. Das *Phosphatase and Tensin Homolog* (PTEN)-Protein, eine Lipidphosphatase, kann diesen Prozess umkehren, indem es PIP<sub>3</sub> zu PIP<sub>2</sub> dephosphoryliert. PIP<sub>3</sub> rekrutiert anschließend die Serin/Threonin-Kinase AKT zur Zellmembran, welche durch die Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase-1 (PDK1) sowie durch den *mechanistic Target of Rapamycin Complex 2* (mTORC2) phosphoryliert und damit vollständig aktiviert wird. Vollständig aktiviertes AKT reguliert durch zahlreiche Effektoren Proliferation, Wachstum und Überleben der Zellen. Modifiziert nach Hoxhaj & Manning, 2020. **[B] Die Rolle des PI3K/AKT-Signalwegs in der Karzinogenese.** Der PI3K/AKT-Signalweg reguliert eine Vielzahl zellulärer Prozesse durch multiple Effektoren. Entnommen von Y. He et al., 2021.

#### 2.5.4 p38 MAPK und MAPK-Signalwege

*Mitogen-activated Protein Kinases* (MAPKs) sind Serin/Threonin-Kinasen, die durch Phosphorylierung zytoplasmatischer und nukleärer Ziele an der Vermittlung extrazellulärer Stimuli mitwirken (Nebreda & Porras, 2000). Jede MAPK-Signalkaskade besteht aus drei nacheinander geschalteten Proteinkinasen: MAPK-Kinase-Kinasen (MAPKKK oder MAP3K) phosphorylieren und aktivieren zunächst MAPK-Kinasen (MAPKK oder MAP2K), die anschließend MAPK durch Phosphorylierung aktivieren. Mit dem ERK-, JNK- und p38 MAPK-Signalweg wurden drei bedeutende MAPK-Signalwege bei Säugetieren identifiziert (Martínez-Limón et al., 2020). Da die Zellkontext- und Zelltyp-spezifischen JAK- und p38 MAPK-Signalwege (Wagner & Nebreda, 2009) hauptsächlich durch Umwelt- und genotoxische Belastungen aktiviert werden, bezeichnet man sie auch als stressaktivierte Proteinkinasen.

Die vier p38 MAPK p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  und p38 $\delta$  werden von verschiedenen Genen kodiert und mittels doppelter Phosphorylierung an Thr und Tyr des Thr-Gly-Tyr-Motivs in der Aktivierungsschleife der Subdomäne VIII durch MKK3 und MKK6 aktiviert. Obwohl sich alle vier p38-Isoformen ubiquitär nachweisen lassen, wird p38 $\beta$  vor allem im Gehirn, p38 $\gamma$  in der Skelettmuskulatur und p38 $\delta$  in endokrinen Drüsen exprimiert (Cuenda & Rousseau, 2007).

Die p38 MAPK reguliert durch Interaktion mit multiplen Substraten eine Vielzahl zellulärer Prozesse, einschließlich der Stressreaktion sowie Proliferation, Differenzierung, Migration und Apoptose der Zellen (Martínez-Limón et al., 2020). Sie fördert das Überleben und die Migration von Tumorzellen sowie deren Resistenz gegenüber Stress und Chemotherapeutika (Wagner & Nebreda, 2009).

Im Rahmen einer immunhistochemischen Analyse von über 400 Gewebeproben humaner Kopf-Hals-Tumoren wurde eine Überexpression der Phospho-p38 MAPK in 79 % der Fälle nachgewiesen (Leelahavanichkul et al., 2014). Zudem belegen Junttila et al. die Entkopplung der p38 MAPK- und ERK-Signalwege in Kopf-Hals-Tumoren, wodurch die Tumorzellen von der wachstumsfördernden Aktivität beider Signalkaskaden profitieren (Junttila et al., 2007). Hinsichtlich des Peniskarzinoms konnte eine gesteigerte p38-Phosphorylierung in HPV-positiven Tumoren mit MAPK-assoziierter Integration im Vergleich zu HPV-positiven Tumoren mit anderer Integration und HPV-negativen Tumoren gezeigt werden (K. B. Huang et al., 2021). Satsuka et al. belegen, dass der p38 MAPK-Signalweg bei der Differenzierung HPV-positiver humaner Keratinozyten, im Gegensatz zu normalen Keratinozyten, aktiviert wird und implizieren daher eine zentrale Rolle dieses Signalwegs bei der differenzierungsspezifischen Genomamplifikation von HPV (Satsuka et al., 2015).

### 2.5.5 ERK und der Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg

Neben dem p38 MAPK- und JNK-Signalweg stellt der Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg (Ras = *rat sarcoma*, Raf = *rapidly accelerated fibrosarcoma*, MEK = *mitogen-activated protein kinase kinase*, ERK = *extracellular signal-regulated kinase*) einen weiteren MAPK-Signalweg bei Säugetieren dar (Martínez-Limón et al., 2020). Der Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg reguliert Proliferation, Differenzierung, Migration sowie Überleben der Zellen (Lavoie et al., 2020) und interagiert mit dem PI3K/AKT-Signalweg (McCubrey et al., 2007). ERK, das Schlüsselprotein des Ras/Raf/MEK/ERK-Signalwegs, verhindert durch Suppression proapoptotischer Faktoren sowie durch Stimulation antiapoptotischer Proteine die Zellapoptose (Lavoie et al., 2020).

Die Bindung eines Liganden an Rezeptor-Tyrosinkinasen, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren oder Zytokin-Rezeptoren führt zur Aktivierung von Ras-Proteinen, welche in der Zellmembran verankert sind (Lewis et al., 1998). Ras-Proteine sind kleine GTPasen, die bei Aktivierung von einer GDP-gebundenen, inaktiven Konformation zu einer GTP-gebundenen, aktiven Konformation wechseln (Rajalingam et al., 2007; Stites & Ravichandran, 2009). Diese Konformationsänderung initiiert eine für MAPK-charakteristische, dreistufige Phosphorylierungskaskade. Zunächst wird Raf an die Zellmembran rekrutiert und dort phosphoryliert. Hierdurch aktiviertes Raf, welches als MAP3K fungiert, phosphoryliert und aktiviert anschließend MEK1/2. MEK1/2 agieren als MAP2K, die ERK1 durch Phosphorylierung an Thr202 und Tyr204 beziehungsweise ERK2 durch Phosphorylierung an Thr183 und Tyr185 aktivieren. Aktivierte ERK1/2-Proteine phosphorylieren darauffolgend Serin/Threonin-Reste von mehr als fünfzig nachgeschalteten zytosolischen und nukleären Substraten (Lewis et al., 1998; Pearson et al., 2001; Yap et al., 2011).

Die Dysregulation des Ras/Raf/MEK/ERK-Signalwegs ist durch Förderung von Proliferation, Überleben, Invasion, Metastasierung sowie Angiogenese eng mit der Onkogenese humaner Karzinome assoziiert (Y. Guo et al., 2020). Laut Hoshino et al. liegt eine Aktivierung des Ras/Raf/MEK/ERK-Signalwegs in über 30 % der Karzinome vor (Hoshino et al., 1999). Forschungsergebnisse von Ferrándiz-Pulido et al. belegen eine gesteigerte Aktivierung von ERK in frühen Tumorstadien des Peniskarzinoms (Ferrándiz-Pulido et al., 2013). Bei Patienten mit HPV-negativen Kopf-Hals-Tumoren korreliert eine erhöhte pERK-Expression mit einem schlechteren Behandlungsergebnis der Radiochemotherapie (de Kort et al., 2023).

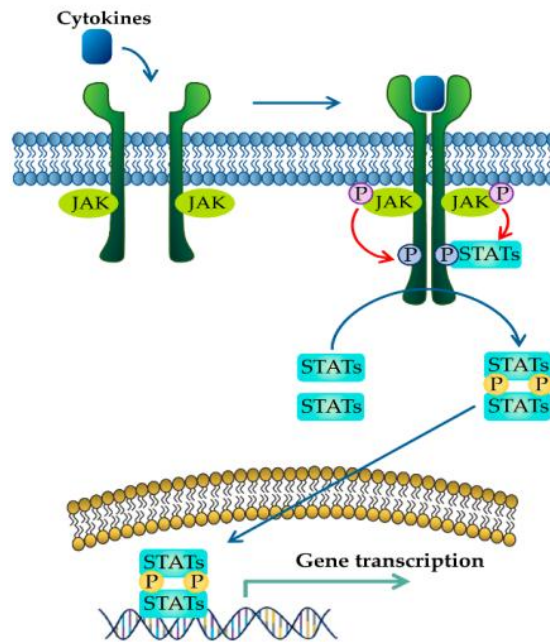
### 2.5.6 STAT3 und der JAK/STAT-Signalweg

Durch Übermittlung extrazellulärer Signale zum Zellkern ermöglicht der Januskinase/*Signal Transducer and Activator of Transcription*-Signalweg (JAK/STAT-Signalweg) (Abbildung 9) die Expression spezifischer Zielgene und reguliert dadurch zahlreiche zelluläre Prozesse, einschließlich Zellproliferation, Differenzierung, Apoptose sowie Angiogenese. Die Bindung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren an ihren Tyrosinkinase-assoziierten Membranrezeptor führt zur Dimerisierung des Rezeptors und nachfolgenden Phosphorylierung der Januskinasen (JAK). Die hierdurch aktivierten JAK phosphorylieren anschließend spezifische Tyrosinreste des Rezeptors, woraus dessen Interaktion mit *Signal Transducer and Activator of Transcription* (STAT)-Proteinen resultiert. Nach erfolgter Phosphorylierung der STAT-Proteine bilden diese Dimere, welche in den Zellkern translozieren und dort die Gentranskription aktivieren (Gutiérrez-Hoya & Soto-Cruz, 2020).

Die Familie der humanen STAT-Proteine besteht aus den sieben strukturell ähnlich aufgebauten Mitgliedern STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b sowie STAT6, die als ligandenabhängige Transkriptionsfaktoren fungieren (Darnell, 1997). Insbesondere STAT3 und STAT5 sind mit der Progression von Tumoren assoziiert, da sie die Expression von Genen fördern, die den Zellzyklus vorantreiben und die Apoptose unterdrücken (Morgan & Macdonald, 2020).

Lim et al. verknüpfen die HPV-assoziierte Karzinogenese mit einer Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs (Lim et al., 2024). HPV16-positive Zellen des Zervixkarzinoms wiesen, im direkten Vergleich zu HPV-negativen Zellen, eine gesteigerte Expression von STAT3 und pSTAT3 auf (Shukla et al., 2013). Im Gegensatz dazu konnten Gaykalova et al. eine höhere STAT3-Expression beim HPV-negativen Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs zeigen (Gaykalova et al., 2015). Dies deutet darauf hin, dass der Einfluss von HPV auf die STAT3-Aktivität je nach Gewebetyp variiert (Morgan & Macdonald, 2020).

Aktuelle Forschungsergebnisse identifizieren STAT3 als möglichen prognostischen Marker (de Barros et al., 2023) und vielversprechenden Ansatzpunkt neuer Therapien des Peniskarzinoms (Mo et al., 2021; Mo, Tong, Li, et al., 2020; Mo, Tong, Yin, et al., 2020; E. S. Yang et al., 2017).



**Abbildung 9: Der JAK/STAT-Signalweg.** Die Bindung von Zytokinen an ihren Tyrosinkinase-assoziierten Membranrezeptor bewirkt die Dimerisierung des Rezeptors sowie die Phosphorylierung der Januskinasen (JAK). Die hierdurch aktivierten JAK phosphorylieren anschließend spezifische Tyrosinreste des Rezeptors, die als Andockstellen für *Signal Transducer and Activator of Transcription* (STAT)-Proteine dienen. Nach erfolgter Phosphorylierung der STAT-Proteine bilden diese Dimere, welche in den Zellkern translozieren und dort die Gentranskription aktivieren. Entnommen von Moon et al., 2021.

## 2.6 Zielsetzung

Das Peniskarzinom ist eine seltene maligne Tumorerkrankung des Urogenitaltraktes, bei der die Interaktionen zwischen Tumor-, Stroma- und Immunzellen bislang nur unzureichend erforscht wurden.

Organotypische 3D-Kulturen wurden kürzlich beschrieben ein mehrschichtiges Epithel auszubilden, welches die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen in der dreidimensionalen Architektur eines Tumorgewebes modelliert. Im Vergleich zu 2D-Zellkulturmodellen ermöglichen sie somit eine präzisere und physiologisch relevantere Untersuchung der HPV-Onkoprotein-getriebenen malignen Transformation. Diese Eigenschaft macht sie besonders geeignet für Studien zur gezielten Manipulation von Granulozyten im Tumormikromilieu HPV-assoziiierter Tumorerkrankungen.

Das Ziel dieser explorativen Forschungsarbeit bestand darin,

- die Interaktionen zwischen HPV-positiven penilen Tumorzellen und Granulozyten in 2D- und 3D-Kulturmodellen zu analysieren,
- das Migrationsverhalten der Granulozyten in organotypische 3D-Kulturen zu untersuchen sowie
- vielversprechende Aktivierungsmarker und zugrunde liegende Signalweghierarchien des Peniskarzinoms zu identifizieren.

### 3 Material

#### 3.1 Genehmigung der Ethikkommission

Die Experimente mit menschlichem Blut und Gewebe wurden durch die Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes genehmigt (Zustimmungsnummern: 141/14, 251/15) und in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt.

#### 3.2 Zelllinien

Die verwendeten HPV16-positiven Peniskarzinomzelllinien Ki-PeCa-P2, Ki-PeCa-L2 und Ki-PeCa-L3 (Fenner et al., 2018), nachfolgend PeCa P2, PeCa L2 und PeCa L3 (Tabelle 3), wurden aus Biopsaten eines Primärtumors sowie inguinaler Lymphknotenmetastasen von Patienten mit metastasiertem Peniskarzinom etabliert (Naumann et al., 2012). Dabei ist hervorzuheben, dass die Primärtumorzelllinie PeCa P2 als auch die Lymphknotenmetastasenzelllinie L2 vom selben Patienten stammen. Bei PeCa L3 handelt es sich hingegen um eine Lymphknotenmetastasenzelllinie eines weiteren Patienten (Fenner et al., 2018). Während sich bei PeCa P2 und L2 das HPV-Genom in den offenen Leserahmen von p63 integrierte, zeichnet sich L3 durch episomales wie integriertes HPV-Genom aus. Die Expression der HPV-Onkoproteine E6 und E7 ist bei PeCa P2 und L3 wesentlich höher als bei L2 (Bernhard et al., 2021).

Zur Imitation des Tumormikromilieus fanden zudem primäre humane Vorhautfibroblasten (VHF) Verwendung (Tabelle 3).

**Tabelle 3: Verwendete Zelllinien**

Zelllinie	Charakteristika
PeCa P2	HPV16-positive Peniskarzinomzelllinie aus dem Primärtumor des Patienten 2
PeCa L2	HPV16-positive Peniskarzinomzelllinie aus einer Lymphknotenmetastase des Patienten 2
PeCa L3	HPV16-positive Peniskarzinomzelllinie aus einer Lymphknotenmetastase des Patienten 3
VHF	Primäre humane Vorhautfibroblasten von vier Donatoren

Die Peniskarzinomzelllinien wurden freundlicherweise von Herrn PD Dr. med. Carsten M. Naumann (Klinik für Urologie und Kinderurologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein am Campus Kiel) und Herrn Prof. Dr. rer. nat. Holger Kalthoff (Institut für Experimentelle Tumorforschung des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein am Campus Kiel) zur Verfügung gestellt.

Das Patientenmaterial zur Isolierung der primären humanen Vorhautfibroblasten ist auf eine Zusammenarbeit mit Herrn Dr. med. Martin Janssen (Klinik für Urologie und Kinderurologie des Universitätsklinikums des Saarlandes) zurückzuführen. Die Isolierung und Kultivierung der Zellen erfolgten in unserer Arbeitsgruppe.

### 3.3 Medien und Lösungen zur Zellkultivierung

Folgende Grundmedien, Lösungen und Zusätze wurden zur Zellkultivierung verwendet (Tabelle 4). Die Grundmedien wurden vor ihrem Gebrauch durch Lösungen und Zusätze zu Vollmedien vervollständigt (Tabelle 5).

**Tabelle 4: Medien und Lösungen zur Zellkultivierung**

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller (Firma, Firmensitz)</b>
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) - high glucose (4,5 g/l) with L-glutamine and sodium bicarbonate	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Fetal Calf Serum (FCS), hitzeinaktiviert für 30 Minuten bei 56 °C	Gibco™ bei Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Keratinocyte Growth Medium 2 (KGM2)	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Penicillin/Streptomycin [10000 U/ml, 10 mg/ml]	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI-1640) with L-glutamine and sodium bicarbonate	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Sodium pyruvate [100 mM]	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
SupplementMix (C-34005)	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
SupplementMix (C-39016)	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
TrypLE™ Express	Gibco™ bei Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

**Tabelle 5: Vollmedien zur Zellkultivierung**

Komponenten zur Vervollständigung	Menge
<b>D10<sup>++</sup>- Medium</b>	
DMEM	500 ml
FCS	10 %
Penicillin/Streptomycin	1 %
Sodium pyruvate	1 mM
<b>R10<sup>++</sup>- Medium</b>	
RPMI-1640	500 ml
FCS	10 %
Penicillin/Streptomycin	1 %
Sodium pyruvate	1 mM
<b>Vollständiges KGM2-Medium</b>	
KGM2	500 ml
SupplementMix (C-34005)	ein Röhrchen
SupplementMix (C-39016)	ein Röhrchen
<b>Peniskarzinomzellmedium (PeCa-Medium)</b>	
R10 <sup>++</sup> - Medium	50 %
Vollständiges KGM2-Medium	50 %
<b>Einfriermedium</b>	
FCS	90 %
DMSO	10 %

### 3.4 Primer für Mykoplasmen-PCR

Tabelle 6 stellt die zur Mykoplasmen-PCR verwendeten Primer dar. Diese wurden mit dH<sub>2</sub>O auf 5 µM verdünnt.

**Tabelle 6: Primer für Mykoplasmen-PCR in 5'→3'-Richtung**

Forward Primer	Reverse Primer
CGC CTG AGT AGT ACG TTC GC	GCG GTG TGT ACA AGA CCC GA
CGC CTG AGT AGT ACG TAC GC	GCG GTG TGT ACA AAA CCC GA
TGC CTG GGT AGT ACA TTC GC	GCG GTG TGT ACA AAC CCC GA
TGC CTG AGT AGT ACA TTC GC	
CGC CTG AGT AGT ACA TTC GC	
CAC CTG AGT AGT ATG CTC GC	
CGC CTG GGT AGT ACA TTC GC	

### 3.5 Antikörper für Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

In dieser Promotionsarbeit wurde mit folgenden Primärantikörpern für Immunhistochemie und Immunfluoreszenz gearbeitet (Tabelle 7). Tabelle 8 listet die verwendeten Sekundärantikörper für Immunfluoreszenz auf. Bei den Sekundärantikörpern für Immunhistochemie handelt es sich um ImmPRESS® Kits (Tabelle 9).

**Tabelle 7: Verwendete Primärantikörper für Immunhistochemie und Immunfluoreszenz**

Antikörper	Spezies, Isotyp	Anwendung	Ver- dünnung	Hersteller (Firma, Firmensitz)
CD15	Maus, IgM	IHC Einzelfärbung (3D)	1:200	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
		IHC Doppelfärbung (3D)	1:500	
		IF Doppelfärbung (3D)	1:200	
EGFR	Maus, IgG	IF (2D)	1:200	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
mIgG <sub>1</sub>	Maus, IgG <sub>1</sub>	IF (2D)	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Phospho-AKT (Thr308)	Kaninchen, IgG	IHC Doppelfärbung (3D)	1:500	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
		IF Doppelfärbung (3D)	1:200	
		IF (2D)	1:200	
Phospho-ERK	Maus, IgG	IHC Einzelfärbung (3D)	1:500	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
		IF Doppelfärbung (3D)	1:400	
		IF (2D)	1:200	
Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)	Kaninchen, IgG	IF Einzelfärbung (3D)	1:200	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
		IF Doppelfärbung (3D)	1:200	
		IF (2D)	1:200	
Phospho-STAT3 (Tyr705) (D3A7)	Kaninchen, IgG	IHC Doppelfärbung (3D)	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
		IF Doppelfärbung (3D)	1:200	
		IF (2D)	1:200	

IHC = Immunhistochemie, IF = Immunfluoreszenz, 3D = Schnitte einer organotypischen 3D-Kultur, 2D = 2D-Zellkulturmodell.

**Tabelle 8: Verwendete Sekundärantikörper für Immunfluoreszenz**

<b>Antikörper</b>	<b>Spezies</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller (Firma, Firmensitz)</b>
Alexa Fluor™ 488 goat anti-mouse IgG (H+L) (A-11029)	Ziege	1:200	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Alexa Fluor™ 488 goat anti-mouse IgM (μ-chain) (A-21042)	Ziege	1:200	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Alexa Fluor™ 546 goat anti-mouse IgG (H+L) (A-11030)	Ziege	1:200	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Alexa Fluor™ 546 goat anti-rabbit IgG (H+L) (A-11035)	Ziege	1:200	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

### 3.6 Kits und gebrauchsfertige Produkte

Folgende Kits und gebrauchsfertigen Produkte wurden verwendet (Tabelle 9).

**Tabelle 9: Verwendete Kits und gebrauchsfertige Produkte**

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller (Firma, Firmensitz)</b>
ImmPACT® DAB Substrate Kit, Peroxidase (SK-4105)	Vector Laboratories, Burlingame, USA
ImmPRESS® - AP anti-mouse IgG (Alkaline Phosphatase)	Vector Laboratories, Burlingame, USA
ImmPRESS® - HRP anti-mouse IgG (Peroxidase)	Vector Laboratories, Burlingame, USA
ImmPRESS® - HRP anti-rabbit IgG (Peroxidase)	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Normal Horse Serum blocking solution, 2,5% (MP-7405)	Vector Laboratories, Burlingame, USA
QIAamp® DNA Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
VectaMount® Permanent Mounting Medium (H-5000)	Vector Laboratories, Burlingame, USA
VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium (H-1000)	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Vector® Red Substrate Kit, Alkaline Phosphatase (SK-5100)	Vector Laboratories, Burlingame, USA

### 3.7 Puffer und Lösungen

In dieser Promotionsarbeit wurde mit folgenden Puffern und Lösungen gearbeitet (Tabelle 10).

**Tabelle 10: Verwendete Puffer und Lösungen**

Komponenten	Menge
<b>0,25 % Trypanblau-Lösung zur Zellzahlbestimmung</b>	
Trypanblau	0,25 g
1x PBS	100 ml
Die entstandene Lösung wurde steril filtriert.	
<b>Puffer und Lösungen zur Mykoplasmentestung</b>	
<b>10x Puffer</b>	
Tris-HCl (pH 8,88)	37,5 ml
Ammoniumsulfat (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,32 g
Magnesiumchlorid MgCl <sub>2</sub>	0,203 g
Tween®20	0,5 ml
Anschließend wurde die Lösung steril filtriert und bei -20 °C gelagert.	
<b>dNTP-Mix</b>	
Nukleotide (10 µM)	10 µl
dH <sub>2</sub> O	60 µl
<b>Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer)</b>	
Tris	89 mM
Borsäure	89 mM
EDTA	2 mM
<b>2 % Agarose-Gel</b>	
Agarose	8 g
Tris-Acetat-EDTA-Puffer	400 ml
Ethidiumbromid	25 µl
<b>Blaumarker</b>	
Bromphenolblau	0,25 %
Glycerin	50 %
EDTA	50 mM

**Waschpuffer**

**10x Phosphate Buffered Saline (PBS)**

Natriumchlorid (NaCl)	80 g
Kaliumchlorid (KCl)	2 g
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	11,4 g
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	2 g

Das Gemenge wurde mit dH<sub>2</sub>O auf einen Liter aufgefüllt und der pH-Wert auf 7,2 eingestellt.

**1x Phosphate Buffered Saline (PBS)**

10x PBS	100 ml
dH <sub>2</sub> O	900 ml

**1x Phosphate Buffered Saline with Tween®20 (PBST)**

Tween®20	500 µl
1x PBS	1000 ml

**10x Tris Buffered Saline (TBS)**

Tris	24,2 g
Natriumchlorid (NaCl)	80 g

Das Gemenge wurde mit dH<sub>2</sub>O auf einen Liter aufgefüllt und der pH-Wert mit 1 M HCl auf 7,6 eingestellt.

**1x Tris Buffered Saline (TBS)**

10x TBS	100 ml
dH <sub>2</sub> O	900 ml

**Lösungen für Immunfluoreszenz von 96-Well-Zellkultur-Platten**

**0,2 % Triton in 1x PBS zur Permeabilisierung**

Triton® X-100	200 µl
1x PBS	100 ml

**3 % BSA in 1x PBS + 0,002 % Triton zur Blockierung**

Albumin (BSA) Fraction V (pH 7,0)	3 g
1x PBS	100 ml
Triton® X-100	2 µl

**0,5 % BSA in 1x PBS zur Verdünnung der Antikörper**

Albumin (BSA) Fraction V (pH 7,0)	0,5 g
1x PBS	100 ml

**Lösungen für Immunhistochemie und Immunfluoreszenz von 3D-Kulturen**

**1 % Eosin-Färbungslösung**

Eosin	0,5 g
1x PBS	500 ml
Essigsäure (C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> )	5 Tropfen

**Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer)**

Tris	1,29 g
EDTA	0,37 g

Das Gemenge wurde mit dH<sub>2</sub>O auf einen Liter aufgefüllt und der pH-Wert auf 9 eingestellt.

**3 % Wasserstoffperoxid zur Blockierung der endogenen Peroxidase**

30 % Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	10 %
1x TBS	90 %

**0,5 % BSA in 1x TBS zur Verdünnung der Antikörper**

Albumin (BSA) Fraction V (pH 7,0)	0,5 g
1x TBS	100 ml

<p><b>Peroxidase Substratlösung (SK-4105)</b>          bestehend aus einem Tropfen DAB-Chromogen und          1 ml ImmPACT® DAB Dilent</p>	
<p><b>Tris-HCl-Puffer (100 mM Tris-HCl)</b>          Tris          dH<sub>2</sub>O          Anschließend wurde der pH-Wert mit HCL auf 8,3 eingestellt.</p>	<p>1,21 g          100 ml</p>
<p><b>Alkaline Phosphatase Substratlösung (SK-5100)</b>          bestehend aus 5 ml Tris-HCl (pH 8,3) und jeweils zwei Tropfen der          Reagenzien 1, 2 und 3</p>	
<p><b>DAPI in Methanol zur Zellkernfärbung</b>          4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)          Methanol</p>	<p>1 µl          50 ml</p>

### 3.8 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 11 listet Chemikalien und Reagenzien auf, die in dieser Promotionsarbeit verwendet wurden.

**Tabelle 11: Verwendete Chemikalien und Reagenzien**

Produkt	Hersteller (Firma, Firmensitz)
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Agarose	Meridian Bioscience, Cincinnati, USA
Albumin (BSA) Fraction V (pH 7,0)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumsulfat ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Aqua ad iniectabilia	B. Braun Deutschland GmbH & Co. KG, Melsungen, Deutschland
Borsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) - high glucose (10x)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Epidermal Growth Factor (EGF)	Gibco™ bei Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Eosin G, Certistain®	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Material

Essigsäure (C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> )	AnalaR NORMAPUR® bei VWR International, Radnor, USA
Ethanol (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ethidiumbromid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin/Glycerol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Grüssing GmbH, Filsum, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Methanol (CH <sub>3</sub> OH)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	J.T. Baker® bei VWR International, Radnor, USA
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Nukleotide (10 µM)	PEQLAB bei VWR International, Radnor, USA
Pancoll human (Densitiy 1,0770 g/ml)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Salzsäure (HCl)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Trizma® base	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tris-Hydrochlorid (Tris-HCL)	MP Biomedicals™ bei Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Triton® X-100	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Trypanblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tween®20 pure	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Vector® Hematoxylin (H-3401)	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Wasserstoffperoxid 30 % (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Xylol (C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> )	Otto Fischer GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland

### 3.9 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Mit folgenden Geräten und Verbrauchsmaterialien wurde gearbeitet (Tabelle 12).

**Tabelle 12: Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien**

Produkt	Hersteller (Firma, Firmensitz)
6-Well-Zellkultur-Platte	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
24-Well-Zellkultur-Platte	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
96-Well-Zellkultur-Platte, µclear®	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
CELLSTAR™ Zellkulturflaschen	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
ChemiDoc™ XRS+	Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, USA
Chirurgische Einmal-Skalpelle	B. Braun GmbH & Co. KG, Melsungen, Deutschland
EASYseal™, Abdeckfolie, transparent (79 x 135 mm)	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Heracell™ 240i Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
IKAMAG® RET Magnetrührer	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Laborabzug	WALDNER Holding GmbH & Co. KG, Wangen, Deutschland
Leica DMI6000 B Forschungsmikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Leica DMI1 inverses Mikroskop für Zellkultur	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Leica RM2235 Manual Rotary Microtome for Routine Sectioning	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Megafuge® 1.0R	Heraeus Holding GmbH & Co. KG, Hanau, Deutschland
Megafuge® 16R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Mehrkanalpipette Discovery Comfort	HTL Lab Solutions, Warschau, Polen
Mikroskopische Deckgläser (24 x 60 mm)	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland
Mikrowelle R-941STW	Sharp Corporation, Sakai, Japan
Neubauer-Zählkammer	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland

## Material

OneTouch™ Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sorenson BioScience, Salt Lake City, USA
pH-Meter	WTW® bei Xylem, Rye Brook, USA
Pipetten	Gilson, Middleton, USA
Pipettierhilfe Pipetboy acu 2	INTEGRA Biosciences, Hudson, USA
PTC-200 Thermal Cycler	MJ Research, St. Bruno, Kanada
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
RL-Pen® Labormarker	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland
Schraubröhre (15 ml, 50 ml)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Schüttel-Misch-Gerät GFL-3005	GFL Technology bei LAUDA Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Serologische Pipetten	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Sicherheitswerkbank Thermo Scientific™ Maxisafe 2020	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
S-Monovette®, Citrat 3,2 %, 10 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
SuperFrost® Plus Objektträger	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland
Tissue-Tek Cryo Console	Miles Scientific, Newark, USA
Vector ImmEdge™ Pen, H-4000	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Vortex-Schüttler VV3	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Waage SI-2002	Denver Instrument GmbH, Göttingen, Deutschland
Wasserbad	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland

### 3.10 Software

Folgende Software wurde für diese Promotionsarbeit verwendet (Tabelle 13).

**Tabelle 13: Verwendete Software**

<b>Software</b>	<b>Hersteller (Firma, Firmensitz)</b>
GraphPad Prism 9.1.0	GraphPad Software, San Diego, USA
ImageJ	National Institutes of Health, Bethesda, USA
Leica Application Suite X	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Microsoft Office 365	Microsoft, Redmond, USA

## 4 Methodik

Die durchgeführten Experimente erfolgten anhand etablierter Versuchsprotokolle des Instituts für Virologie des Universitätsklinikums des Saarlandes.

### 4.1 Zellkultur

#### 4.1.1 Kultivieren und Passagieren von Zellen

Um bestmögliche Zellkulturbedingungen zu gewährleisten, wurden die Zelllinien in 175 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen in entsprechendem Vollmedium bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt im Brutschrank kultiviert. Während für die Peniskarzinomzelllinien P2, L2 und L3 PeCa-Medium verwendet wurde, kam für die primären humanen Vorhautfibroblasten (VHF) D10<sup>++</sup>-Medium zum Einsatz. Sobald die Zellen einen konfluenten Zellrasen bildeten, wurden sie in einem angemessenen Teilungsverhältnis passagiert. Dazu wurde zunächst das verbrauchte Medium samt toten Zellen und Stoffwechselprodukten unter der Sterilbank abgenommen. Anschließend wurde verbleibendes Medium durch zweimaliges Waschen mit jeweils 10 ml 1x *Phosphate Buffered Saline* (PBS) entfernt. Zur Deadhäsion der Zellen wurden 3 ml Trypsin in die Zellkulturflasche hinzugefügt und zum Erzielen einer optimalen Trypsinwirkung kurzzeitig bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Trypsin ist eine Endopeptidase, die Zell-Matrix-Verbindungen andaut und zum Ablösen der adhärenen Zellen von der Zellkulturflasche führt (Gstraunthaler & Lindl, 2021, S. 148). Nach mikroskopischer Überprüfung des vollständigen Ablösens und Separierens der Zellen wurden zum Stoppen der enzymatischen Trypsinwirkung 10 ml vorgewärmtes Medium in die Zellkulturflasche gegeben. Die Vitalität der Zellen kann durch längere Einwirkzeit des Trypsins irreversibel geschädigt werden (Gstraunthaler & Lindl, 2021, S. 148). Zur Trypsinentfernung wurden die gelösten Zellen für 5 Minuten bei 1400 rpm zentrifugiert und das entstandene Zellpellet in 5 ml frischem Medium resuspendiert. Ein Teil der Suspension wurde zur Stammhaltung in die Zellkulturflasche überführt, mit frischem Medium auf 25 ml aufgefüllt und bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Zudem erfolgten in regelmäßigen Abständen Mykoplasmentestungen (siehe 4.1.4), sodass lediglich negativ getestete Zellen für die Experimente verwendet wurden.

#### 4.1.2 Zellzahlbestimmung

Da für viele Experimente eine definierte Zelldichte ausgesät werden musste, wurde die Zellzahl der Suspension mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierzu wurde die Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit 0,25 % Trypanblau verdünnt. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff (Gstraunthaler & Lindl, 2021, S. 167), der von toten Zellen aufgrund der geschädigten Membran ins Zellinnere aufgenommen wird. Unter dem Mikroskop erscheinen dadurch tote Zellen tiefblau und vitale Zellen hell (Schmitz, 2020, S. 292-293). Anschließend wurden 10 µl der verdünnten Zellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer gefüllt, die vitalen Zellen der vier großen Eckquadrate ausgezählt und daraus das arithmetische Mittel berechnet. Die Zellzahl pro Milliliter ergibt sich aus folgender Formel:

$$\text{Zellzahl pro Milliliter} = \text{arithmetisches Mittel} * \text{Verdünnungsfaktor} 2 * \text{Kammerfaktor} 10^4.$$

#### 4.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur Langzeitlagerung wurden Zellen, die negativ auf Mykoplasmen getestet wurden (siehe 4.1.4), tiefgefroren. Dafür wurden adhärenente Zellen einer 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche mit Trypsin abgelöst (siehe 4.1.1) und das durch Zentrifugation entstandene Zellpellet in 2 ml Einfriermedium resuspendiert. Das Einfriermedium besteht aus *Fetal Calf Serum* (FCS) mit 10 % kryoprotektivem Dimethylsulfoxid (DMSO) (Gstraunthaler & Lindl, 2021, S. 174, 345). Danach wurde 1 ml der Zellsuspension in ein 2 ml Kryogefäß überführt. Das Kryogefäß wurde zunächst für 24 Stunden bei -80 °C gelagert und anschließend in einen -150 °C kalten Gefrierschrank transferiert.

Wurden Zellen aus dem gefrorenen Zellbestand benötigt, wurde ein Kryogefäß aus dem -150 °C kalten Gefrierschrank entnommen und bis zum vollständigen Auftauen der Zellsuspension in ein 37 °C warmes Wasserbad gestellt. Im Anschluss daran wurden die aufgetauten Zellen in ein 50 ml Reaktionsgefäß mit vorgewärmtem Medium überführt. Zur Entfernung des DMSO wurde die Zellsuspension für 5 Minuten bei 1600 rpm zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 12 ml vorgewärmtem Medium resuspendiert, in eine 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche transferiert und im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag wurde das Zellwachstum überprüft.

#### 4.1.4 Mykoplasmen-PCR

Mykoplasmen sind 0,2 bis 0,8 µm große, zellwandlose Prokaryoten, die bei Kontamination von Zellkulturen zur Beeinträchtigung des Zellwachstums, der Proliferation und Vitalität führen können (Gstraunthaler & Lindl, 2021, S. 32). Um dies zu verhindern, wurden die Zellkulturen routinemäßig auf einen Befall mit Mykoplasmen untersucht. Das verwendete Protokoll zur Durchführung der Mykoplasmen-PCR basiert auf Publikationen von Uphoff und Drexler (Uphoff & Drexler, 2013, 2014). Zunächst wurde 1 ml Überstand einer konfluenten Zellkulturflasche abgenommen und zwecks Entfernung vorhandener Zellbestandteile für 5 Minuten bei 1400 rpm zentrifugiert. Im Anschluss daran wurden 200 µl des entstandenen Überstands mithilfe des QIAamp® DNA Mini Kits der Firma QIAGEN zur Gewinnung von DNA verwendet. In einer Mykoplasmen-PCR mit spezifischen Primern (Tabelle 6) wurde die gewonnene DNA zusammen mit einer Negativ- und Positivkontrolle auf die Anwesenheit von Mykoplasmen-DNA untersucht. Während destilliertes Wasser als Negativkontrolle diente, wurde eine zuvor auf Mykoplasmen positiv getestete Probe als Positivkontrolle verwendet. Für jede DNA-Probe wurde folgender Ansatz vorbereitet:

**Tabelle 14: PCR-Ansatz zur Mykoplasmentestung**

Komponenten	Menge
10x Puffer	2,5 µl
dNTP-Mix	2 µl
Primer-Mix	10 µl
Taq-Polymerase	1 µl
dH <sub>2</sub> O	9,3 µl
zu testende DNA (beziehungsweise dH <sub>2</sub> O als Negativkontrolle)	2 µl

Die PCR wurde nach folgendem Protokoll (Tabelle 15) in einem PTC-200 Thermal Cycler der Firma MJ Research amplifiziert:

**Tabelle 15: PCR-Programm zur Mykoplasmen-Detektion**

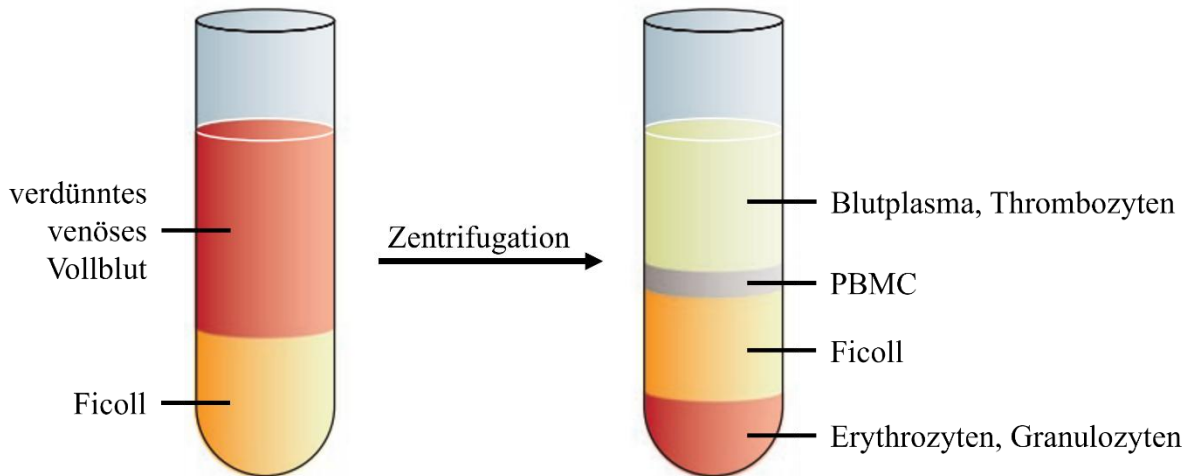
Funktion	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Prä-Denaturierung	94 °C	1 Minute	1
Denaturierung	94 °C	30 Sekunden	35
Annealing	62 °C	30 Sekunden	35
Polymerisierung	72 °C	30 Sekunden	35
Verlängerung	72 °C	3 Minuten	1
Kühlen	4 °C	∞	

Nach erfolgter Mykoplasmen-PCR wurde zwecks Visualisierung Blaumarker zum jeweiligen PCR-Produkt hinzugefügt. Danach wurden die Proben auf ein zweiprozentiges Agarose-Gel aufgetragen und bei 100 Volt gelelektrophoretisch aufgetrennt. Zum Schluss wurde das Gel mithilfe des ChemiDoc XRS+ der Firma Bio-Rad Laboratories bei UV-Licht auf Banden auf Höhe der Positivkontrolle überprüft.

#### 4.2 Isolierung von Granulozyten aus Vollblut

Um Granulozyten zu isolieren, wurde gesunden Spendern nach schriftlicher Einwilligung 60 ml venöses Vollblut mithilfe von Natriumcitrat-haltigen Blutentnahmeröhrchen (S-Monovette® der Firma Sarstedt) abgenommen. Natriumcitrat inhibiert durch Bindung der im Blutplasma enthaltenen Calciumionen die Blutgerinnung (Lüllmann et al., 2016, S. 224). Die gewonnene Blutmenge wurde in 20 ml Portionen aufgeteilt und im Verhältnis 1:1 mit 1x PBS verdünnt. Anschließend wurden 20 ml des verdünnten Blutes vorsichtig auf 12,5 ml Ficoll, ein synthetisches Polysaccharid-Polymer mit definierter Dichte (Luttmann et al., 2014, S. 56), aufgeschichtet. Die Reaktionsgefäße wurden danach für 20 Minuten bei 2000 rpm mit ausgeschalteter Bremse (Bremse 1, Beschleunigung 7) zentrifugiert. Bei diesem Verfahren wird sich das Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation zu Nutzen gemacht (Abbildung 10).

Das Blutplasma und die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) haben eine geringere Dichte als Ficoll und finden sich deshalb nach erfolgter Zentrifugation oberhalb der Ficollschicht wieder. Im Gegensatz dazu weisen Erythrozyten und Granulozyten eine höhere Dichte als Ficoll auf und setzen sich daher am Gefäßboden ab (Luttmann et al., 2014, S. 58-59). Nach Verwerfen des Blutplasmas und PBMC-Rings wurde die Ficollschicht durchstoßen und die sich darunter befindende Schicht aus Erythrozyten und Granulozyten in einem frischen 50 ml Reaktionsgefäß gesammelt. Die zusammengetragene Suspension wurde in 5 ml Portionen aufgeteilt und mit jeweils 45 ml 1x PBS aufgefüllt. Im Anschluss an eine fünfminütige Zentrifugation bei 1800 rpm mit ausgeschalteter Bremse wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet aufgelockert. Die Erythrozyten wurden mit 40 ml auf Eis vorgekühltem destilliertem Wasser behandelt. Der dadurch entstehende osmotische Druck führt zur Lyse der Erythrozyten. Die Reaktion wurde nach 30 Sekunden durch Zugabe von 5 ml sterilem 10x PBS gestoppt. Nach einem weiteren fünfminütigen Zentrifugationsschritt bei 1600 rpm (Bremse 9, Beschleunigung 9) wurde die Erythrozytenlyse ein zweites Mal durchgeführt, sodass sich im Zellpellet keine rot gefärbten Zellen mehr erkennen ließen. Zuletzt wurde das Zellpellet im erforderlichen Medium aufgenommen. Während Granulozyten zur Erstellung von organotypischen 3D-Kulturen in 1x PBS resuspendiert wurden, kam für Granulozyten der zweidimensionalen 96-Well-Immunfluoreszenzplatten R10<sup>+</sup>-Medium zum Einsatz.



**Abbildung 10: Darstellung der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation zur Granulozytenisolierung.** Zunächst wurde venöses Vollblut im Verhältnis 1:1 mit 1x PBS verdünnt und auf Ficoll aufgeschichtet. Durch Zentrifugation wurden die unterschiedlichen Blutbestandteile anhand ihrer Dichte aufgetrennt. Während sich Blutplasma, Thrombozyten und mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) oberhalb der Ficollschicht sammeln, lagern sich Erythrozyten und Granulozyten am Gefäßboden ab. Zur Isolierung der Granulozyten wurden die Erythrozyten lysiert. Modifiziert nach Schmitz & Desel, 2018, S. 33.

### 4.3 Indirekte Immunfluoreszenz im 2D-Zellkulturmodell

Zweidimensionale Zellkulturen gelten aufgrund ihrer einfachen Handhabung, Kosteneffizienz und guten Reproduzierbarkeit als etablierter Forschungsstandard (Gstraunthaler & Lindl, 2021, S. 312).

#### 4.3.1 Stimulation mit Epidermal Growth Factor

Am ersten Versuchstag erfolgte die Aussaat der Zellen in eine schwarze  $\mu$ Clear® 96-Well-Zellkulturplatte mit durchsichtigem Boden. Zur Erstellung einer Monokultur wurden  $2,5 \times 10^4$  Zellen der entsprechenden Peniskarzinomzelllinie in 100  $\mu$ l PeCa-Medium ausgesät. Eine Kokultur entstand aus  $1,25 \times 10^4$  Zellen einer Peniskarzinomzelllinie in 50  $\mu$ l PeCa-Medium und  $1,25 \times 10^4$  VHF in 50  $\mu$ l D10<sup>++</sup>-Medium. Nach vierundzwanzigstündiger Inkubation der Zellkulturplatte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt wurde das verbrauchte Medium abgenommen. Zur Zellstimulation wurden 50  $\mu$ l *Epidermal Growth Factor* (EGF) mit einer Endkonzentration von 10 ng/ml in PeCa-Medium auf die Zellen gegeben und für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Kontrollkulturen erhielten stattdessen dieselbe Menge 1x PBS in PeCa-Medium. Anschließend wurde das Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit jeweils 150  $\mu$ l 1x PBS gewaschen. Das Fixieren der Zellen erfolgte mit 100  $\mu$ l vorgekühltem Methanol für 10 Minuten bei -20 °C. Nach Abnahme des Methanols wurden die Zellen mit 100  $\mu$ l 0,2 % Triton-X in 1x PBS für 5 Minuten bei Raumtemperatur permeabilisiert. Die Lösung zur Permeabilisierung wurde ebenfalls entfernt. Daraufhin wurde die unspezifische Bindung der Antikörper durch Blocken mit 100  $\mu$ l 3 % Bovinem Serumalbumin (BSA) in 1x PBS mit 0,002 % Triton-X für 60 Minuten bei Raumtemperatur verhindert. Nach Abnahme der Blockierungslösung wurden 50  $\mu$ l des Primärantikörpers im Verhältnis 1:200, verdünnt in 0,5 % BSA in 1x PBS, auf die Zellen gegeben, die Zellkulturplatte mit einer EASYseal™ Abdeckfolie bedeckt und für 24 Stunden bei 4 °C unter sanfter Bewegung inkubiert.

Am Folgetag wurde der Primärantikörper abgenommen und die Zellen dreimal mit jeweils 100  $\mu$ l 1x *Phosphate Buffered Saline with Tween®20* (PBST) für jeweils 10 Minuten unter sanfter Bewegung gewaschen. Im Anschluss daran wurden 50  $\mu$ l des Alexa Fluor 546-markierten Sekundärantikörpers im Verhältnis 1:200, verdünnt in 0,5 % BSA in 1x PBS, auf die Zellen gegeben und für 60 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Danach schlossen sich drei Waschschrte mit 100  $\mu$ l 1x PBST (0,05 %) für jeweils 10 Minuten im Dunkeln an. Die Zellkerne wurden durch dreiminütige Inkubation mit 100  $\mu$ l 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) in Methanol (1:50000) gefärbt. Als interkalierende Substanz lagert sich DAPI in die DNA-Doppelhelix ein und färbt somit den Zellkern (Gstraunthaler & Lindl, 2021, S. 35). Nach zweimaligem Waschen mit Methanol für jeweils 5 Minuten wurden zum Entgegenwirken des Austrocknens 200  $\mu$ l 1x PBS auf die Zellen gegeben. Die Immunfluoreszenzfärbung wurde mithilfe des Leica DMI6000 B Forschungsmikroskops fotodokumentiert. Schließlich wurde das 1x PBS abgenommen und die Zellen zur Langzeitlagerung mit vierprozentigem Paraformaldehyd (PFA) fixiert.

### 4.3.2 Stimulation mit Granulozyten

Um Aussagen zum Einfluss von Granulozyten auf die Peniskarzinomzelllinien treffen zu können, wurden zweidimensionale Mono- und Kokulturen mit Granulozyten stimuliert.

Der erste Versuchstag entspricht der Darstellung unter 4.3.1 (Stimulation mit *Epidermal Growth Factor*). Am Folgetag wurden nach Abnahme des verbrauchten Mediums frisch isolierte Granulozyten (siehe 4.2) im Verhältnis 10:1 zu ausgesäten Zellen in 100 µl R10<sup>++</sup>-Medium auf die Zellen gegeben und für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt inkubiert. Die Kontrollkulturen wurden lediglich mit R10<sup>++</sup>-Medium behandelt. Nach zweimaligem Waschen mit 150 µl 1x PBS wurden die Zellen mit 100 µl vorgekühltem Methanol für 10 Minuten bei -20 °C fixiert. Die darauffolgenden Schritte sind den Ausführungen unter 4.3.1 zu entnehmen.

## 4.4 Organotypische 3D-Kulturen

Organotypische 3D-Kulturen wurden kürzlich beschrieben aufgrund der Ausbildung eines mehrschichtigen Epithels ein genaueres, der physiologischen Situation näheres Bild der HPV-Onkoprotein-getriebenen malignen Transformation zu liefern (Bernhard et al., 2021; Bley et al., 2022; Mohr et al., 2022). 3D-Kulturen bestehen aus Fibroblasten, die in eine extrazelluläre Matrix aus Kollagen eingebettet werden, sowie Keratinozyten oder Tumorzellen, die auf dieser Matrix an der Luft-Medium-Grenze ausgesät werden, um das Wachstum eines mehrschichtigen Epithels zu induzieren (Anacker & Moody, 2012; Asselineau & Prunieras, 1984). Dieses Zellkulturmodell generiert eine Umgebung, die interzelluläre regulatorische Netzwerke widerspiegelt und dadurch Studien zur Manipulation von Granulozyten im Tumormikromilieu in einem physiologischeren Kontext ermöglicht (Bernhard et al., 2021; Bley et al., 2022; Mohr et al., 2022).

### 4.4.1 Erstellung organotypischer 3D-Kulturen

Zur Beurteilung der Zell-Zell-Interaktionen zwischen penilen Tumorzellen und VHF wurden organotypische 3D-Kulturen generiert (Abbildung 11). Das verwendete Protokoll wurde von Dr. Katrin Knerr-Rupp im Rahmen ihrer Doktorarbeit am Institut für Virologie des Universitätsklinikums des Saarlandes etabliert (Knerr-Rupp, 2017). Zunächst wurde das Kollagen-Fibroblasten-Gel, die Grundlage der 3D-Kultur, erstellt. Um ein frühzeitiges Erstarren des Gels zu verhindern, wurden die nachfolgenden Schritte unter ständiger Bewegung auf Eis durchgeführt. Für die Fertigung einer 3D-Kultur wurden 800 µl Rattenschwanzkollagen vorsichtig mit 100 µl sterilem 10x *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) gemischt. Die entstandene orangefarbene Lösung wurde tröpfchenweise mit 2 M Natriumhydroxid (NaOH) neutralisiert, bis ein Farbumschlag von orange zu pink mittels pH-Indikator sichtbar wurde. Pro 3D-Kultur wurden 0,5 x 10<sup>6</sup> VHF, welche lediglich bis Passage sieben verwendet wurden, in 100 µl hitzeinaktiviertem FCS resuspendiert und zur neutralisierten Kollagenmischung hinzugefügt. Nach sanftem Mischen wurde die entstandene Kollagen-Fibroblasten-Suspension in eine 24-Well-Platte pipettiert und die Platte bis zum Aushärten des Gels im

Brutschrank inkubiert. Abschließend wurde das ausgehärtete Kollagen-Fibroblasten-Gel mit 1 ml D10<sup>++</sup>-Medium überschichtet und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Am Folgetag wurde das D10<sup>++</sup>-Medium entfernt und durch PeCa-Medium ersetzt. Pro 3D-Kultur wurden  $0,7 \times 10^6$  Tumorzellen der Peniskarzinomzelllinien P2, L2 oder L3 in 1 ml PeCa-Medium auf dem Kollagen-Fibroblasten-Gel ausgesät und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

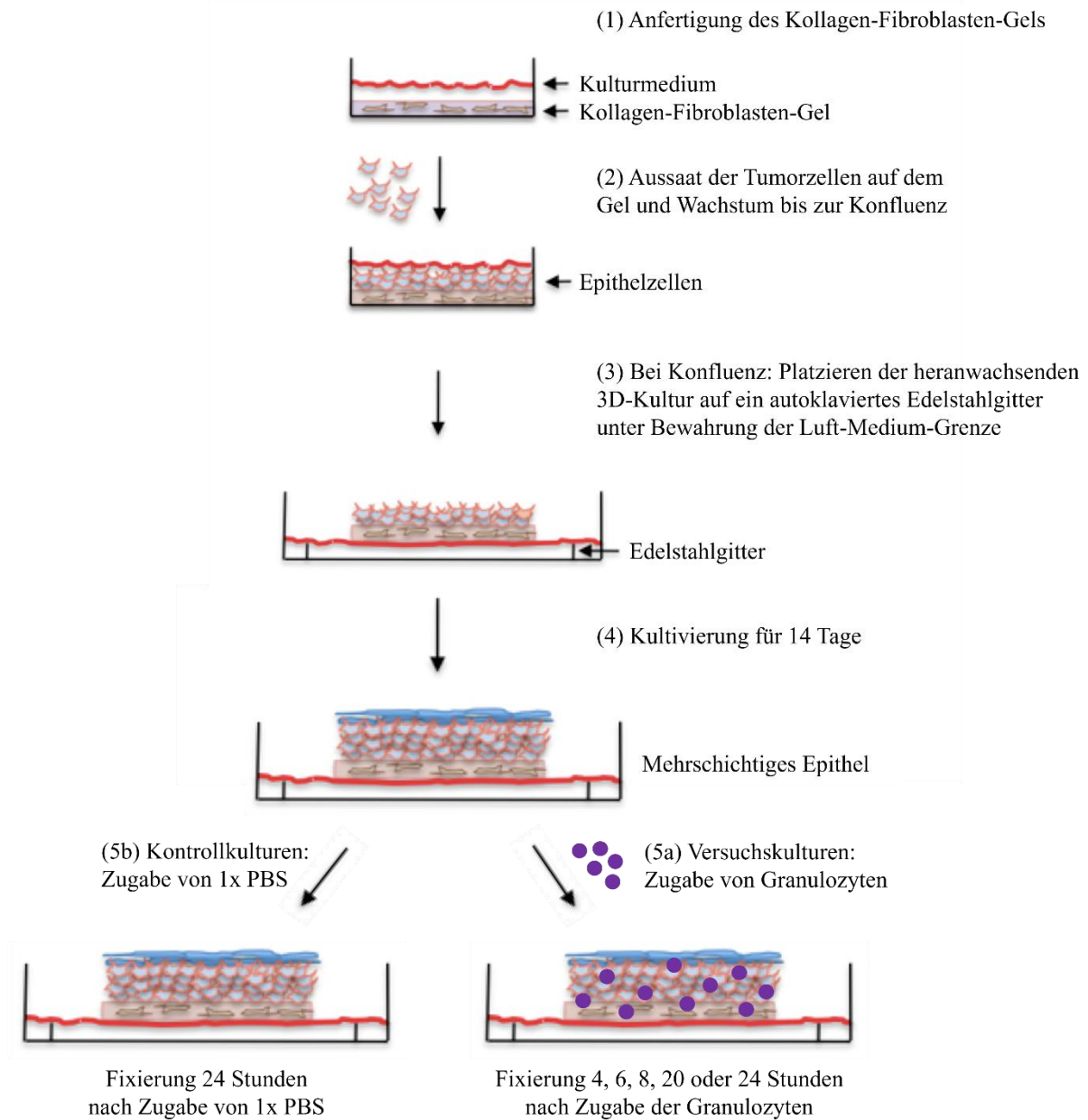
Am dritten Versuchstag wurde die heranwachsende 3D-Kultur vorsichtig mit einer sterilen Pinzette auf einem autoklavierten Edelstahlgitter in einem Well einer 6-Well-Platte platziert und mit PeCa-Medium unterschichtet. Der dadurch entstehende Luftreiz ermöglicht das Wachstum eines mehrschichtigen Epithels.

Für die Versuche dieser Promotionsarbeit wurden die 3D-Kulturen 14 Tage lang bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt im Brutschrank inkubiert. Währenddessen wurde das Medium alle zwei bis drei Tage unter Bewahrung der Luft-Medium-Grenze gewechselt.

Nach Erreichen der gewünschten Inkubationsdauer wurde die 3D-Kultur mit 4 % PFA fixiert. Dafür wurde zunächst das verbrauchte Medium entnommen. Anschließend wurde die 3D-Kultur mit PFA unterschichtet, nach zwei bis drei Stunden ebenfalls mit PFA überschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die PFA-fixierte 3D-Kultur mittels chirurgischem Skalpell halbiert und in Paraffin eingebettet. Um immunhistochemische und immunfluoreszenzbasierte Färbungen durchführen zu können, wurden 6 µm dicke *formalin-fixed paraffin-embedded* (FFPE)-Schnitte aus dem Paraffinblock mittels Mikrotom erstellt und auf einem Objektträger platziert.

#### **4.4.2 Erstellung organotypischer 3D-Kulturen mit Granulozyten**

Um das Granulozytenmigrationsverhalten als auch deren Einfluss auf das Tumormikromilieu zu analysieren, wurden organotypische 3D-Kulturen mit Granulozyten gefertigt (Abbildung 11). Zu diesem Zweck wurden, wie bereits unter 4.4.1 beschrieben, 3D-Kulturen angezüchtet und für 14 Tage auf dem Edelstahlgitter inkubiert. Schließlich wurden  $5 \times 10^6$  frisch isolierte Granulozyten (siehe 4.2), gelöst in 50 µl 1x PBS, von oben auf die Versuchskulturen gegeben und 4, 6, 8, 20 oder 24 Stunden nach Zugabe der Granulozyten fixiert. Die Kontrollkulturen wurden lediglich mit 50 µl 1x PBS behandelt und nach 24 Stunden fixiert.



**Abbildung 11: Erstellung organotypischer 3D-Kulturen.** Die Anfertigung des Kollagen-Fibroblasten-Gels erfolgte am ersten Versuchstag (1). Am Folgetag wurden Tumorzellen der Peniskarzinomzelllinien P2, L2 oder L3 auf dem Kollagen-Fibroblasten-Gel ausgesät (2). Anschließend wurde die heranwachsende 3D-Kultur auf ein autoklaviertes Edelstahlgitter platziert und unter Bewahrung der Luft-Medium-Grenze mit PeCa-Medium unterschichtet (3). Der dadurch entstehende Luftreiz ermöglicht das Wachstum eines mehrschichtigen Epithels. Nach vierzehntägiger Inkubation (4) wurden frisch isolierte Granulozyten von oben auf die Versuchskulturen gegeben und 4, 6, 8, 20 oder 24 Stunden nach Zugabe der Granulozyten fixiert (5a). Die Kontrollkulturen wurden lediglich mit 1x PBS behandelt und nach 24 Stunden fixiert (5b). Modifiziert nach Anacker & Moody, 2012.

## 4.5 Histologische Färbetechniken

### 4.5.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zur Beurteilung der Qualität der 3D-Kultur wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung durchgeführt. Dazu wurden 6 µm dicke FFPE-Schnitte der 3D-Kultur durch dreimalige Inkubation für jeweils 10 Minuten in verschiedenen Xylol-Küvetten deparaffiniert. Im Anschluss daran wurden die histologischen Schnitte in einer absteigenden Ethanolreihe mit 99%-, 90%-, 80%-, 70%- und 50%igem Ethanol für jeweils 2 Minuten rehydriert. Nach einem fünfminütigen Waschschrift in destilliertem Wasser wurden die deparaffinierten und rehydrierten Schnitte für 90 Sekunden in einer Hämatoxylin-Färbelösung inkubiert. Hämatoxylin färbt saure (basophile) Strukturen, beispielsweise den DNA-enhaltenden Zellkern, blau (Schmitz & Desel, 2018, S. 77). Damit sich die Färbung entwickeln konnte, wurden die Schnitte für 5 Minuten unter fließendem, warmem Leitungswasser gebläut. Anschließend wurden die Schnitte für 10 Minuten in einer Eosin-Färbelösung inkubiert. Im Gegensatz zu Hämatoxylin färbt Eosin basische (azidophile) Zellstrukturen, beispielsweise Proteine des Zytoplasmas, rot (Schmitz & Desel, 2018, S. 77). Danach wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe mit 50%-, 70%-, 80%-, 90%- und 99%igem Ethanol dehydriert. Nach dreiminütigem Eintauchen in Xylol wurden die Schnitte mit wenigen Tropfen VectaMount™ Mounting Medium und einem Deckglas eingedeckt. Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurde nach Trocknen des Eindeckmediums mithilfe des Leica DMI6000 B Forschungsmikroskops bei Hellfeldmikroskopie und zweihundertfacher Bildvergrößerung fotodokumentiert.

### 4.5.2 Immunhistochemische Einzelfärbung mit DAB-Peroxidase

Entsprechend dem Protokoll der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (siehe 4.5.1) wurden 6 µm dicke FFPE-Schnitte der 3D-Kultur deparaffiniert und rehydriert. Zur Antigendemaskierung wurden die Schnitte in Tris-EDTA-Puffer in der Mikrowelle einmal aufgeköcht und anschließend minütlich über einen Zeitraum von 15 Minuten wiederholt bis zur Blasenbildung erhitzt. Nach Abkühlen der Proben wurden endogene Peroxidasen durch zehnminütige Inkubation mit dreiprozentigem Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in 1x *Tris Buffered Saline* (TBS) im Dunkeln blockiert. Darauf schloss sich ein fünfminütiger Waschschrift in 1x TBS an. Eine unspezifische Bindung der Antikörper wurde durch eine zwanzigminütige Inkubation mit 2,5-prozentigem *Normal Horse Serum* in einer Feuchtkammer verhindert. Nach Entfernung des *Normal Horse Serums* wurde der spezifische Primärantikörper in der jeweiligen Verdünnung (Tabelle 7, Tabelle 16), gelöst in 0,5 % BSA in 1x TBS, auf die Schnitte gegeben und für 24 Stunden bei 4 °C in einer Feuchtkammer inkubiert. Um überschüssigen Primärantikörper zu entfernen, wurden die Schnitte am darauffolgenden Tag für 5 Minuten in 1x TBS gewaschen. Dann wurde der Meerrettich-Peroxidase-gekoppelte (HRP = *horseradish peroxidase*) Sekundärantikörper auf die Schnitte gegeben und für 30 Minuten in einer Feuchtkammer inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in 1x TBS für jeweils 5 Minuten wurde die ImmPACT® DAB-Peroxidase-Substratlösung (SK-4105) der Firma Vector Laboratories auf die Schnitte gegeben und für eine individuelle Zeitdauer (Tabelle 16) inkubiert. Die Meerrettich-Peroxidase katalysiert die Oxidation von 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) durch

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, die in einem dunkelbraunen, unlöslichen Präzipitat resultiert (Schmitz & Desel, 2018, S. 77). Sobald die gewünschte Farbintensität erreicht wurde, erfolgte ein kurzer Waschschrift in Leitungswasser. Daraufhin schloss sich eine vierzigsekündige Hämatoxylin-Gegenfärbung an. Zur Farbentwicklung wurden die Schnitte für 5 Minuten unter fließendem, warmem Leitungswasser gebläut. Schließlich wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe mit 50%-, 70%-, 80%-, 90%- und 99%igem Ethanol dehydriert, für 3 Minuten in Xylol getaucht und mit wenigen Tropfen VectaMount™ Mounting Medium eingedeckt. Die immunhistochemischen Färbungen wurden nach Trocknen des Eindeckmediums mithilfe des Leica DMI6000 B Forschungsmikroskops bei Hellfeldmikroskopie und zweihundertfacher Bildvergrößerung fotodokumentiert.

#### 4.5.3 Immunhistochemische Doppelfärbung mit CD15

Sollen zwei unterschiedliche Proteine parallel nachgewiesen werden, besteht die Möglichkeit der Durchführung einer immunhistochemischen Doppelfärbung. Die ersten Schritte entsprechen dem Protokoll der immunhistochemischen Einzelfärbung (siehe 4.5.2). An die Inkubation der ImmPACT® DAB-Substratlösung schloss sich ein fünfminütiger Waschschrift in 1x TBS an. Nach erneuter zwanzigminütiger Blockierung mit 2,5-prozentigem *Normal Horse Serum* wurde der CD15-spezifische Primärantikörper im Verhältnis 1:500, gelöst in 0,5 % BSA in 1x TBS, auf die Schnitte gegeben und für 24 Stunden bei 4 °C in einer Feuchtkammer inkubiert. Am Folgetag wurden die Schnitte für 5 Minuten in 1x TBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte eine dreißigminütige Inkubation des Alkalische-Phosphatase-gekoppelten Sekundärantikörpers in einer Feuchtkammer. Nach zweimaligem Waschen in 1x TBS für jeweils 5 Minuten wurde die Vector® Red-Alkaline-Phosphatase-Substratlösung (SK-5100) der Firma Vector Laboratories auf die Schnitte gegeben und bis zur Entwicklung einer magentafarbenen Farbreaktion inkubiert. Die darauffolgenden Schritte sind der Beschreibung unter 4.5.2 zu entnehmen.

**Tabelle 16: Verwendete Substrate und Inkubationszeiten für Immunhistochemie**

Antigen	Verdünnung	Substrat	Inkubationszeit
CD15 (Einzelfärbung)	1:200	DAB-Peroxidase	30 Sekunden
CD15 (Doppelfärbung)	1:500	Alkalische Phosphatase	5 Minuten
Phospho-AKT (Thr308)	1:500	DAB-Peroxidase	2 Minuten
Phospho-STAT3 (Tyr705)	1:1000	DAB-Peroxidase	90 Sekunden

DAB = 3,3'-Diaminobenzidin.

#### 4.5.4 Immunfluoreszenz

Die indirekte Immunfluoreszenz erlaubt die Expressionsanalyse und Lokalisierung von Proteinen mittels Fluoreszenzmikroskopie. Entsprechend der Darstellung unter 4.5.1 wurden deparaffinierte und rehydrierte 3D-Kultur-Schnitte zur Antigendemaskierung für 15 Minuten in Tris-EDTA-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht. Die abgekühlten Schnitte wurden anschließend für 5 Minuten in 1x TBS gewaschen. Nach zwanzigminütiger Inkubation mit 2,5-prozentigem *Normal Horse Serum* wurde der spezifische Primärantikörper in der jeweiligen Verdünnung (Tabelle 7), gelöst in 0,5 % BSA in 1x TBS, auf die Schnitte gegeben und für 24 Stunden bei 4 °C in einer Feuchtkammer inkubiert. Am zweiten Versuchstag wurden die Schnitte zunächst für 5 Minuten in 1x TBS gewaschen. Anschließend erfolgte die einstündige Inkubation des Alexa Fluor 546-markierten Sekundärantikörpers im Verhältnis 1:200, gelöst in 0,5 % BSA in 1x TBS, in einer Feuchtkammer im Dunkeln. Um ein Ausbleichen der Immunfluoreszenz zu vermeiden, wurden die nachfolgenden Schritte ebenfalls im Dunkeln durchgeführt. Es schlossen sich zwei fünfminütige Waschschrte in 1x TBS an, bevor die Schnitte für 2 Minuten mit DAPI in Methanol (1:50000) gefärbt wurden. Nach zweimaligem Spülen mit Methanol wurden die Schnitte nach kurzem Trocknen mit VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium und einem Deckglas eingedeckt. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mithilfe des Leica DMI6000 B Forschungsmikroskops bei zweihundertfacher Bildvergrößerung fotodokumentiert.

Analog zur Immunhistochemie besteht bei der Immunfluoreszenz ebenfalls die Möglichkeit der Durchführung einer Doppelfärbung. Dabei liegt das Augenmerk auf der Auswahl zweier Primärantikörper, die anhand unterschiedlicher Spezies (Maus, Kaninchen) oder Isotypen (IgG, IgM) differenziert werden können. Zudem wird der zweite Primärantikörper mit einem Alexa Fluor 488-anstelle eines Alexa Fluor 546-markierten Sekundärantikörpers detektiert. Das Versuchsprotokoll ändert sich lediglich dahingehend, dass sowohl beide Primär- als auch Sekundärantikörper, gelöst in 0,5 % BSA in 1x TBS, an entsprechender Stelle gleichzeitig auf die Schnitte gegeben wurden.

#### 4.6 Statistik

Zur graphischen Darstellung und statistischen Analyse der Ergebnisse wurde das Programm GraphPad Prism 9.1.0 der Firma GraphPad Software verwendet. Die Signifikanzen wurden mittels two-way ANOVA für Mehrfachvergleiche mit Korrektur nach Turkey berechnet. Für alle durchgeführten Tests wurde das Signifikanzniveau  $\alpha = 0,05$  zugrunde gelegt, sodass Ergebnisse mit  $p \leq 0,05$  als statistisch signifikant angesehen wurden. Signifikante Ergebnisse wurden in den jeweiligen Abbildungen durch Sternchen gekennzeichnet (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ ).

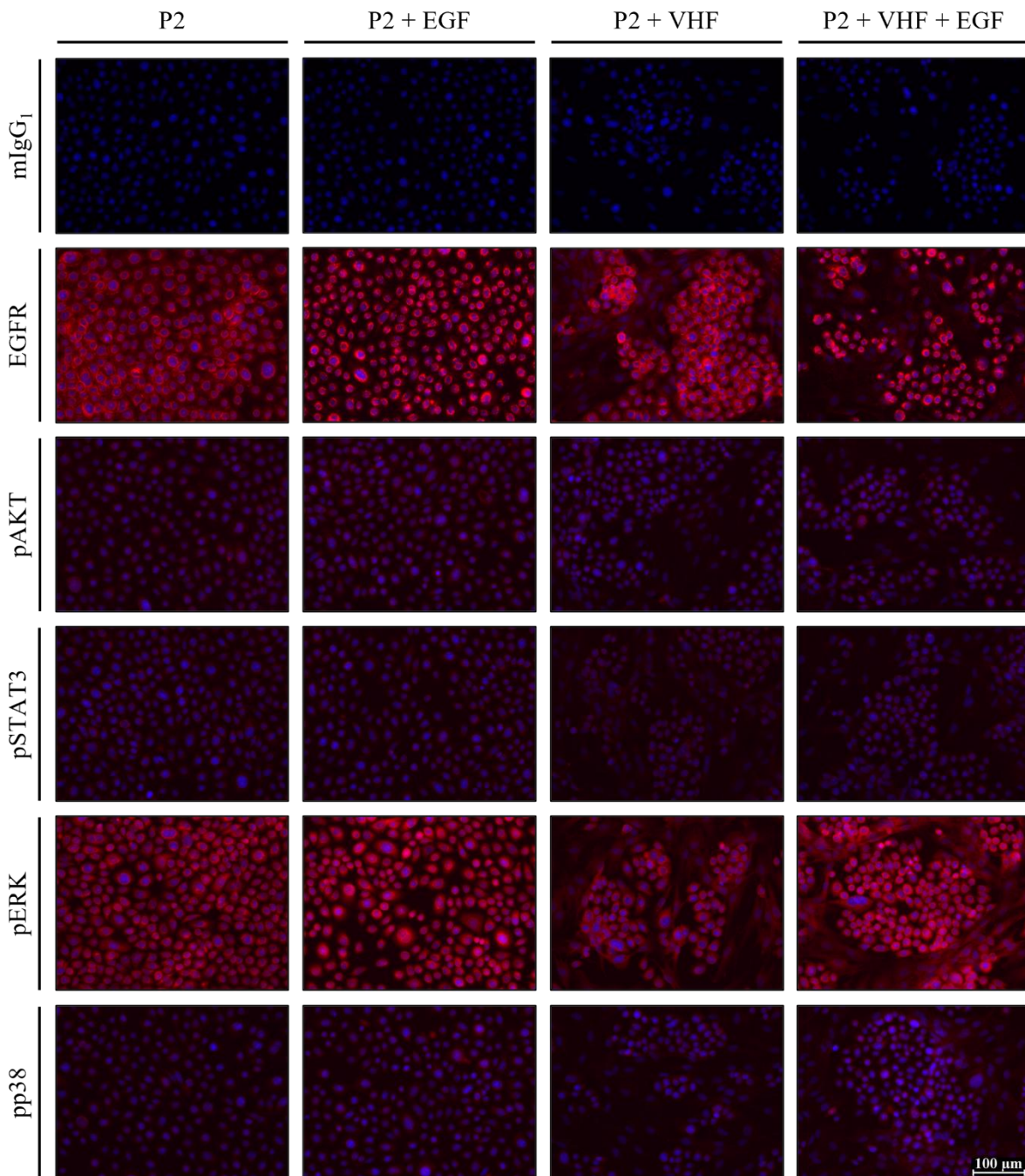
## 5 Ergebnisse

### 5.1 Einfluss von EGF auf die Aktivierung EMMPRIN-assoziiierter Proteine in HPV-positiven PeCa-Zellen

Bisherige Forschungsergebnisse zeigten eine Überexpression des EGFR in über 90 % der Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen des Peniskarzinoms (Börgermann et al., 2009; Di Lorenzo et al., 2013; Lavens et al., 2010) sowie dessen Interaktion mit dem multifunktionalen Glykoprotein EMMPRIN (Grass et al., 2013; Suzuki & Ishikawa, 2014). Der Einfluss von EGF, ein mit hoher Affinität an EGFR bindender Ligand (Jones et al., 1999), auf die Aktivierung EMMPRIN-assoziiierter Proteine wurde im 2D-Zellkulturmodell mit den HPV-positiven Peniskarzinomzelllinien P2 (Abbildung 12) und L2 (Abbildung 13), jeweils als Monokultur und in Kokultur mit VHF, mittels indirekter Immunfluoreszenz untersucht.

In Kontrollkulturen, Mono- und Kokulturen ohne EGF-Stimulation, zeigt PeCa P2 (Abbildung 12) für pERK eine zur Positivkontrolle EGFR vergleichbar starke Signalintensität. Im Gegensatz dazu weisen Tumorzellen der Primärtumorzelllinie P2 lediglich ein basales Aktivierungslevel für AKT, STAT3 und p38 MAPK auf. Alle gefärbten Proteine sind bei P2 zytoplasmatisch lokalisiert. In Kokulturen lassen sich die Tumorzellen von P2 morphologisch eindeutig von VHF abgrenzen. Zudem ist bei P2, im direkten Vergleich zu den VHF, die Überexpression von EGFR und pERK deutlich erkennbar. Die stattfindende Interaktion zwischen Tumorzellen und VHF führt bei PeCa P2 zu keiner gesteigerten Aktivierung EMMPRIN-assoziiierter Proteine.

Mono- und Kokulturen mit EGF-Stimulation (Versuchskulturen) zeigen bei P2 für alle untersuchten Proteine Fluoreszenzsignale ähnlich starker Intensität und gleicher Lokalisation wie die der Kontrollkulturen. Somit resultiert bei PeCa P2 aus zusätzlicher Stimulation mit EGF keine verstärkte Aktivierung EMMPRIN-assoziiierter Proteine, da das EGF im Medium anscheinend bereits zur maximalen Aktivierung führt. Werden Tumorzellen der Zelllinie P2 nach EGF-Stimulation mit EGFR gefärbt, lässt sich keine gleichmäßige Verteilung des EGFR mehr erkennen, sondern dessen punktuelle Anordnung beobachten. Dies ließe sich mit dem Modell der *lipid rafts* erklären. *Lipid rafts* sind organisierte Mikrodomänen der Zellmembran, die hohe Konzentrationen an Cholesterol und Sphingolipiden enthalten und durch Bildung von Signalplattformen intrazelluläre Signalwege regulieren (Simons & Ikonen, 1997). Zahlreichen Publikationen zufolge ist der EGFR in derartigen *lipid rafts* organisiert (Ringerike et al., 2002; Roepstorff et al., 2002; M. G. Waugh et al., 1999). Während der EGFR unter basalen Bedingungen als Monomer vorliegt, bewirkt die Bindung von EGF dessen Dimerisierung. Die dadurch bedingte Autophosphorylierung des EGFR führt zur Aktivierung der intrazellulären Tyrosinkinase und schließlich zum Beginn der Signaltransduktion (Yarden & Schlessinger, 1987a, 1987b).

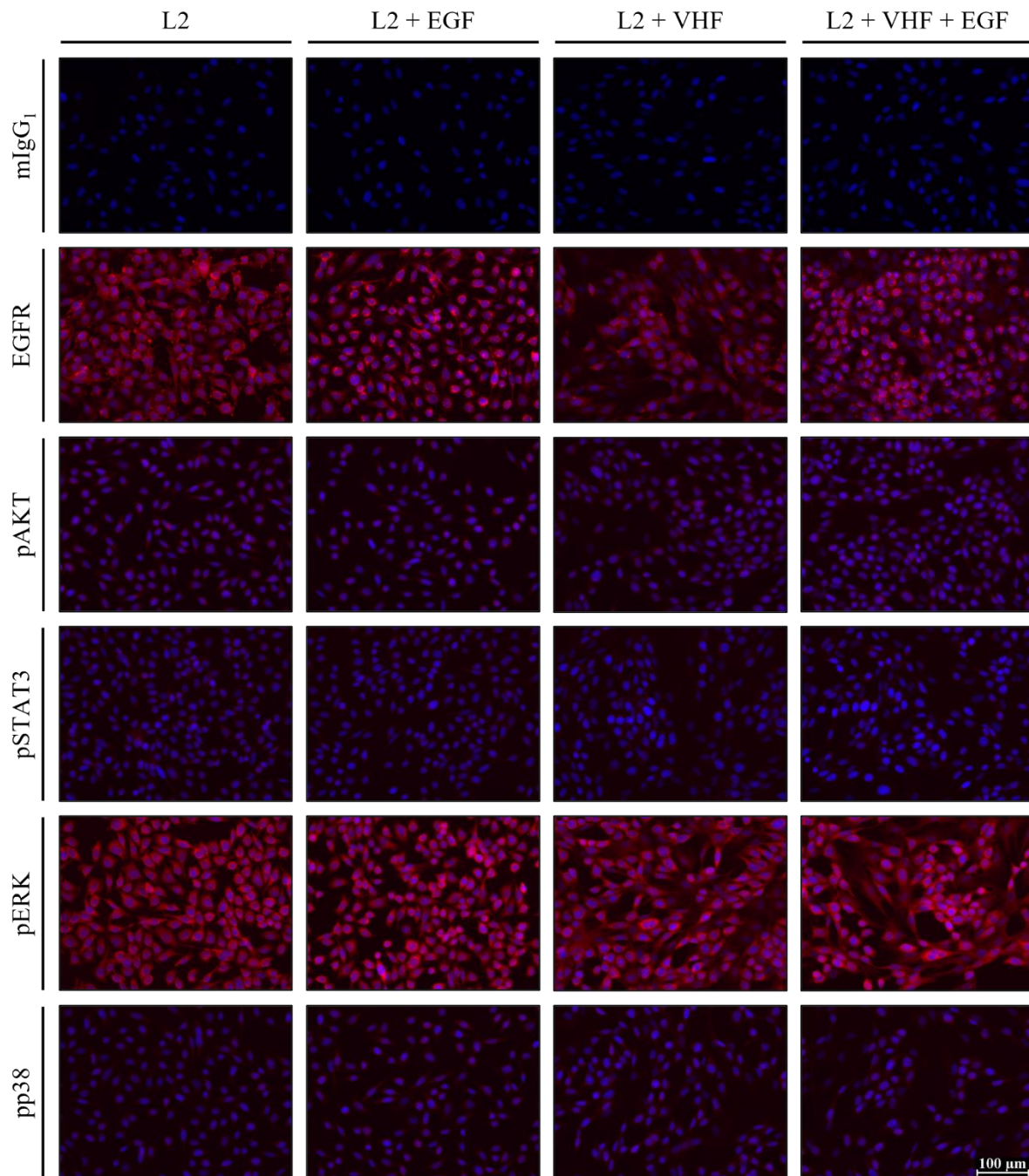


**Abbildung 12: Nachweis von pAKT, pSTAT3, pERK und pp38 nach EGF-Stimulation im 2D-Zellkulturmodell mit der Peniskarzinomzelllinie P2.** Zellen der Primärkarzinomzelllinie P2 wurden entweder als Monokultur oder zusammen mit VHF als Kokultur in eine schwarze  $\mu$ Clear® 96-Well-Zellkultur-Platte ausgesät. Am Folgetag wurden die Versuchskulturen mit EGF (Endkonzentration: 10 ng/ml) für 15 Minuten bei 37 °C stimuliert. Die Kontrollkulturen wurden lediglich mit 1x PBS behandelt. Nach vierundzwanzigstündiger Inkubation der Primärantikörper erfolgte deren Detektion mittels Alexa Fluor 546-markierten Sekundärantikörpern. Die Zellkerne wurden mit DAPI (1:50000) gefärbt. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mithilfe des Leica DMI6000 B Forschungsmikroskops (zweihundertfache Bildvergrößerung) fotodokumentiert. Overlays aus Immunfluoreszenz und nukleärer DAPI-Färbung werden abgebildet. Während mIgG<sub>1</sub> die Negativkontrolle darstellt, dient EGFR als Positivkontrolle. Repräsentative Bilder aus drei unabhängigen Versuchen (n = 3), die jeweils in Triplikaten durchgeführt wurden, werden gezeigt. DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, EGF = *epidermal growth factor*, EGFR = *epidermal growth factor receptor*, mIgG<sub>1</sub> = monoklonales Immunglobulin G der Subklasse 1, pAKT = phosphorylierte Proteinkinase B, pERK = *phosphorylated extracellular signal-regulated kinase*, pp38 = *phosphorylated*

*p38 mitogen-activated protein kinase*, pSTAT3 = *phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3*, VHF = Vorhautfibroblasten.

Tumorzellen der Peniskarzinomzelllinie L2 (Abbildung 13) zeigen, vergleichend zu PeCa P2, sowohl in Kontroll- als auch in Versuchskulturen für EGFR (Positivkontrolle) und pERK die stärksten Signalintensitäten, während AKT, STAT3 und p38 MAPK lediglich basal aktiviert sind. Die untersuchten Proteine sind bei PeCa L2 zytoplasmatisch und membrangebunden nachweisbar. Tumorzellen der Zelllinie L2 sind morphologisch spindelartiger als jene von P2 und lassen sich dadurch bei Kokultivierung mit VHF schlechter von diesen unterscheiden. Dennoch ist bei PeCa L2, im direkten Vergleich zu den VHF, die Überexpression von EGFR und pERK sichtbar. In Versuchskulturen lässt sich bei L2, ähnlich zu PeCa P2, bezüglich der Färbung des EGFR nach Stimulation mit EGF das Phänomen der *lipid rafts* beobachten. Weder die stattfindende Interaktion zwischen Tumorzellen und VHF noch die zusätzliche Stimulation mit EGF führt bei PeCa L2 zur gesteigerten Aktivierung EMMPRIN-assoziiierter Proteine.

Unter diesen Versuchsbedingungen konnte durch EGF-Stimulation keine verstärkte Aktivierung von AKT, STAT3, ERK und p38 MAPK in Zellen der HPV-positiven Peniskarzinomzelllinien P2 und L2 hervorgerufen werden, da das EGF im Medium anscheinend bereits zur maximalen Aktivierung führt. Nichtsdestotrotz zeigt sich im 2D-Zellkulturmodell eine Überexpression des EGFR sowie eine deutliche Aktivierung von ERK bei PeCa P2 und L2 sowohl in Monokulturen als auch in Kokulturen mit VHF.



**Abbildung 13: Nachweis von pAKT, pSTAT3, pERK und pp38 nach EGF-Stimulation im 2D-Zellkulturmodell mit der Peniskarzinomzelllinie L2.** Zellen der Peniskarzinomzelllinie L2 wurden entweder als Monokultur oder in Kokultur mit VHF in eine schwarze µClear® 96-Well-Zellkultur-Platte ausgesät. Am darauffolgenden Tag erfolgte die fünfzehnminütige Stimulation der Versuchskulturen mit EGF (Endkonzentration: 10 ng/ml) bei 37 °C. Die Kontrollkulturen wurden lediglich mit 1x PBS behandelt. Nach vierundzwanzigstündiger Inkubation der Primäntikörper erfolgte deren Detektion mittels Alexa Fluor 546-markierten Sekundäntikörpern. Die Zellkerne wurden mit DAPI (1:50000) gefärbt. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mithilfe des Leica DMI6000 B Forschungsmikroskops bei zweihundertfacher Vergrößerung fotodokumentiert. Abgebildet werden Overlays aus Immunfluoreszenz und nukleärer DAPI-Färbung. mIgG<sub>1</sub> dient als Negativkontrolle, während EGFR die Positivkontrolle darstellt. Gezeigt werden repräsentative Bilder aus drei unabhängigen Versuchen (n = 3), die jeweils in Triplikaten durchgeführt wurden. DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, EGF = *epidermal growth factor*, EGFR = *epidermal growth factor receptor*, mIgG<sub>1</sub> = monoklonales Immunglobulin G der Subklasse 1, pAKT = phosphorylierte Proteinkinase B, pERK = *phosphorylated extracellular signal-regulated kinase*, pp38 = *phosphorylated*

*p38 mitogen-activated protein kinase*, pSTAT3 = *phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3*, VHF = Vorhautfibroblasten.

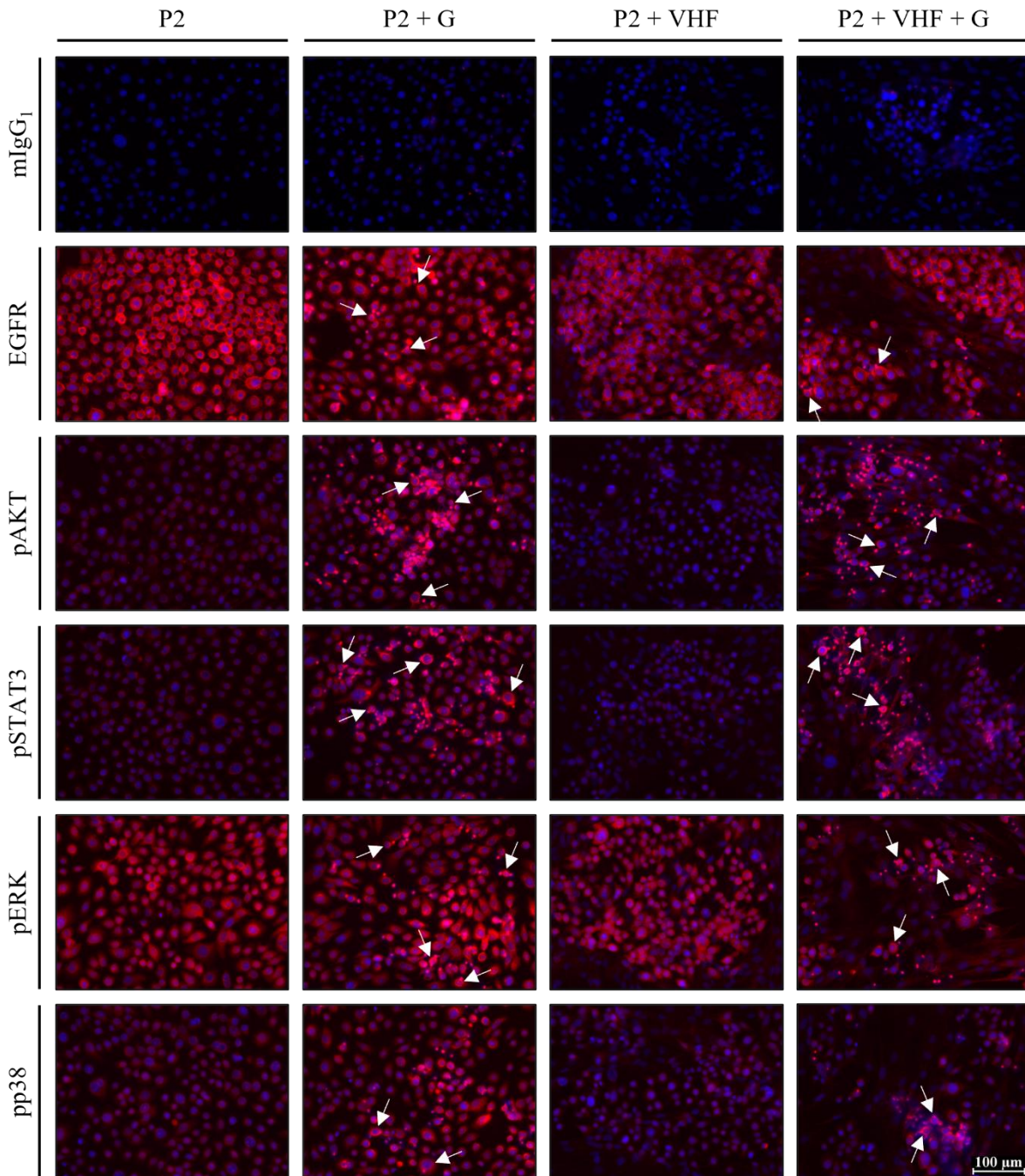
## **5.2 Einfluss von Granulozyten auf die Aktivierung EMMPRIN-assoziiierter Proteine in HPV-positiven PeCa-Zellen**

Vordaten der Arbeitsgruppe belegen sowohl die Immigration von Granulozyten (Bernhard et al., 2021) als auch die Überexpression von EMMPRIN im Falle des Peniskarzinoms, insbesondere in dessen Tumorzentrum und bei HPV-positiven Tumoren (Mohr et al., 2022). Einzeln betrachtet haben beide Faktoren ein starkes Potential die Karzinogenese voranzutreiben (Bonecchi et al., 2022; Jaillon et al., 2020; Yan et al., 2005), welches sich gegenseitig verstärken könnte. Aus diesem Grund erscheint es sinnvoll deren Einfluss aufeinander zu analysieren. Hierfür wurden Zellen der Peniskarzinomzelllinien P2 (Abbildung 14) und L2 (Abbildung 15), jeweils als Monokulturen oder zusammen mit VHF als Kokulturen, nicht nur mit, sondern auch ohne Granulozyten im 2D-Zellkulturmodell mittels indirekter Immunfluoreszenz auf die Aktivierung EMMPRIN-assoziiierter Proteine untersucht.

In Mono- und Kokulturen ohne Zugabe von Granulozyten (Kontrollkulturen) zeigen Tumorzellen der Peniskarzinomzelllinie P2 (Abbildung 14) für EGFR (Positivkontrolle) und pERK das stärkste Fluoreszenzsignal, während sie lediglich ein basales Aktivierungslevel für AKT, STAT3 und p38 MAPK aufweisen. Die Lokalisation der gefärbten Proteine beschränkt sich bei PeCa P2 auf das Zytoplasma. In Kokulturen lassen sich die Tumorzellen von P2 morphologisch eindeutig identifizieren und zeigen, im direkten Vergleich zu den VHF, eine Überexpression von EGFR und pERK. Erneut führt die stattfindende Interaktion zwischen Tumorzellen und VHF zu keiner gesteigerten Aktivierung EMMPRIN-assoziiierter Proteine bei PeCa P2. Somit ähneln die Kontrollkulturen dieses Versuchs denen von Abbildung 12.

Aus Zugabe von Granulozyten zu Mono- und Kokulturen mit der Primärtumorzelllinie P2 (Versuchskulturen) resultiert, im direkten Vergleich zu den Kontrollkulturen, die Anhebung der Signalintensität für EGFR und pERK als auch die erstmals deutliche Aktivierung von AKT, STAT3 und p38 MAPK bei PeCa P2, sofern sich Granulozyten im direkten Umfeld der penilen Tumorzellen befinden. Die untersuchten Proteine sind bei P2 wiederholt zytoplasmatisch lokalisiert. In Versuchskulturen mit PeCa P2 zeigen Granulozyten einen deutlichen EGFR-Nachweis. Da Granulozyten im Allgemeinen keinen EGFR exprimieren, ist der Nachweis von EGFR bei Granulozyten am ehesten auf einen von penilen Tumorzellen ausgehenden Proteintransfer über *small extracellular vesicles* (sEVs) als Ausdruck interzellulärer Kommunikation zurückzuführen. Ein ähnlicher über EVs vermittelter Proteintransfer wurde bereits bei anderen Immunzellen, beispielsweise Makrophagen, beobachtet (Buzas, 2023; Rubenich et al., 2021; Théry et al., 2009). Des Weiteren sind bei Granulozyten intensive Fluoreszenzsignale für pAKT, pSTAT3, pERK und pp38 MAPK detektierbar, sodass unter diesen Kulturbedingungen AKT-, STAT3-, ERK- und p38 MAPK-abhängige Signalwege in

Granulozyten aktiv zu sein scheinen. Im Gegensatz dazu sind AKT, STAT3, ERK und p38 MAPK bei VHF lediglich basal aktiviert.



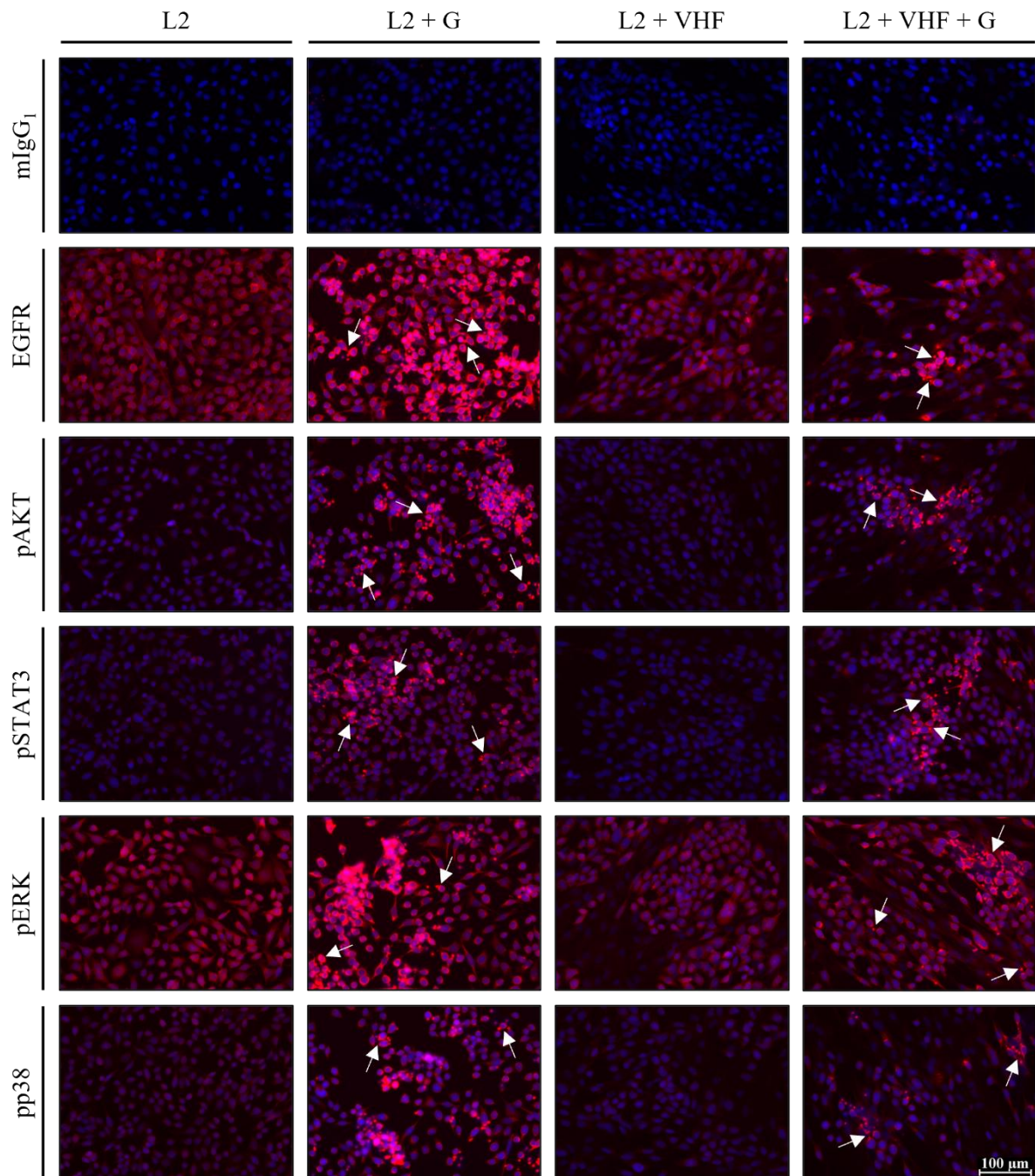
**Abbildung 14: Nachweis von pAKT, pSTAT3, pERK und pp38 nach Stimulation mit Granulozyten im 2D-Zellkulturmodell mit der Peniskarzinomzelllinie P2.** Zellen der Primärkarzinomzelllinie P2 wurden entweder als Monokultur oder zusammen mit VHF als Kokultur in eine schwarze  $\mu$ Clear® 96-Well-Zellkultur-Platte ausgesät. Am Folgetag wurden frisch isolierte Granulozyten im Verhältnis 10:1 zu ausgesäten Zellen in R10<sup>++</sup>-Medium auf die Zellen der Versuchskulturen gegeben und für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Kontrollkulturen wurden lediglich mit R10<sup>++</sup>-Medium behandelt. Nach vierundzwanzigstündiger Inkubation der Primärantikörper erfolgte deren Detektion mittels Alexa Fluor 546-markierten Sekundärantikörpern. Die Zellkerne wurden mit DAPI (1:50000) gefärbt. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mithilfe des Leica DMI6000 B Forschungsmikroskops (zweihundertfache Bildvergrößerung) fotodokumentiert. Overlays aus Immunfluoreszenz und nukleärer DAPI-Färbung werden abgebildet. Während mIgG<sub>1</sub> die

Negativkontrolle darstellt, dient EGFR als Positivkontrolle. Repräsentative Bilder aus drei unabhängigen Versuchen (n = 3), die jeweils in Triplikaten und insgesamt mit drei unterschiedlichen Granulozytendonatoren durchgeführt wurden, werden gezeigt. DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, EGFR = *epidermal growth factor receptor*, G = Granulozyten, mIgG<sub>1</sub> = monoklonales Immunglobulin G der Subklasse 1, pAKT = phosphorylierte Proteinkinase B, pERK = *phosphorylated extracellular signal-regulated kinase*, pp38 = *phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase*, pSTAT3 = *phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3*, VHF = Vorhautfibroblasten.

In Kontrollkulturen mit PeCa L2 (Abbildung 15) zeigen Tumorzellen dieser Zelllinie für pERK eine zur Positivkontrolle EGFR vergleichbar starke Signalintensität. Die Proteine AKT, STAT3 und p38 MAPK sind bei L2 lediglich basal aktiviert. Im Falle von PeCa L2 sind, im Vergleich zu P2, alle untersuchten Proteine sowohl zytoplasmatisch als auch membrangebunden lokalisiert. Bei VHF zeigt sich lediglich eine Hintergrundfärbung für EGFR, pAKT, pSTAT3, pERK und pp38 MAPK. Aus direkter Interaktion zwischen Tumorzellen und VHF resultiert bei PeCa L2 keine gesteigerte Aktivierung EMMPRIN-assoziiierter Proteine. Demnach ähneln die Kontrollkulturen dieses Versuchs denen von Abbildung 13.

Die Zugabe von Granulozyten zu Mono- und Kokulturen mit der Peniskarzinomzelllinie L2 bewirkt, im direkten Vergleich zu den Kontrollkulturen, die Verstärkung des Fluoreszenzsignals für EGFR und pERK als auch eine erstmals deutliche Aktivierung von AKT, STAT3 und p38 MAPK bei PeCa L2, sofern sich Granulozyten in direkter Nachbarschaft der penilen Tumorzellen aufhalten. Erneut sind die gefärbten Proteine bei L2 zytoplasmatisch und membrangebunden nachweisbar. Vergleichend zu Kulturen mit PeCa P2 zeigen Granulozyten in Versuchskulturen mit L2 einen EGFR-Nachweis sowie starke Signalintensitäten für pAKT, pSTAT3, pERK und pp38 MAPK. Folglich scheinen die Proteine AKT, STAT3, ERK und p38 MAPK unter diesen Kulturbedingungen in Granulozyten phosphoryliert und damit aktiviert vorzuliegen. Im Gegensatz dazu ist bei VHF lediglich eine Hintergrundfärbung für pAKT, pSTAT3, pERK und pp38 MAPK detektierbar.

Im 2D-Zellkulturmodell führt der direkte Kontakt zu Granulozyten zur gesteigerten Aktivierung von AKT, STAT3, ERK und p38 MAPK in Tumorzellen der HPV-positiven PeCa-Zelllinien P2 und L2. Zudem sind sowohl in Kulturen mit PeCa P2 als auch in Kulturen mit PeCa L2 pAKT, pSTAT3, pERK und pp38 MAPK in Granulozyten nachweisbar, sodass unter diesen Kulturbedingungen AKT-, STAT3-, ERK- und p38 MAPK-abhängige Signalwege in Granulozyten aktiv zu sein scheinen. Die bisherigen Ergebnisse implizieren eine gegenseitige Aktivierung von Tumorzellen und Granulozyten in der Kultur mit und ohne VHF.



**Abbildung 15: Nachweis von pAKT, pSTAT3, pERK und pp38 nach Stimulation mit Granulozyten im 2D-Zellkulturmodell mit der Peniskarzinomzelllinie L2.** Zellen der Peniskarzinomzelllinie L2 wurden entweder als Monokultur oder in Kokultur mit VHF in eine schwarze  $\mu$ Clear® 96-Well-Zellkultur-Platte ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurden frisch isolierte Granulozyten im Verhältnis 10:1 zu ausgesäten Zellen in R10<sup>++</sup>-Medium auf die Zellen der Versuchskulturen gegeben und für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Kontrollkulturen wurden lediglich mit R10<sup>++</sup>-Medium behandelt. Nach vierundzwanzigstündiger Inkubation der Primärantikörper erfolgte deren Detektion mittels Alexa Fluor 546-markierten Sekundärantikörpern. Die Zellkerne wurden mit DAPI (1:50000) gefärbt. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mithilfe des Leica DMI6000 B Forschungsmikroskops bei zweihundertfacher Vergrößerung fotodokumentiert. Abgebildet werden Overlays aus Immunfluoreszenz und nukleärer DAPI-Färbung. mIgG<sub>1</sub> dient als Negativkontrolle, während EGFR die Positivkontrolle darstellt. Gezeigt werden repräsentative Bilder aus drei unabhängigen Versuchen (n = 3), die jeweils in Triplikaten und insgesamt mit drei unterschiedlichen Granulozytendonatoren durchgeführt wurden. DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, EGFR = *epidermal growth factor receptor*, G = Granulozyten, mIgG<sub>1</sub> = monoklonales Immunglobulin

G der Subklasse 1, pAKT = phosphorylierte Proteinkinase B, pERK = *phosphorylated extracellular signal-regulated kinase*, pp38 = *phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase*, pSTAT3 = *phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3*, VHF = Vorhautfibroblasten.

### **5.3 Einfluss von Granulozyten auf das Wachstumsverhalten von Tumorzellen in organotypischen 3D-Kulturen**

Neutrophile Granulozyten sind eine heterogene Population von Immunzellen mit einer nennenswerten kontext- beziehungsweise gewebespezifischen Plastizität bezüglich Phänotyp und Funktion, die über eine Vielzahl an Modi das Wachstum von Tumoren modulieren können (Bonecchi et al., 2022; Jaillon et al., 2020; Silvestre-Roig et al., 2019). Um den Einfluss von Granulozyten auf das Wachstumsverhalten der PeCa-Linien P2, L2 und L3 beurteilen zu können, wurden FFPE-Schnitte organotypischer 3D-Kulturen sowohl mit als auch ohne Granulozyten mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt (Abbildung 16).

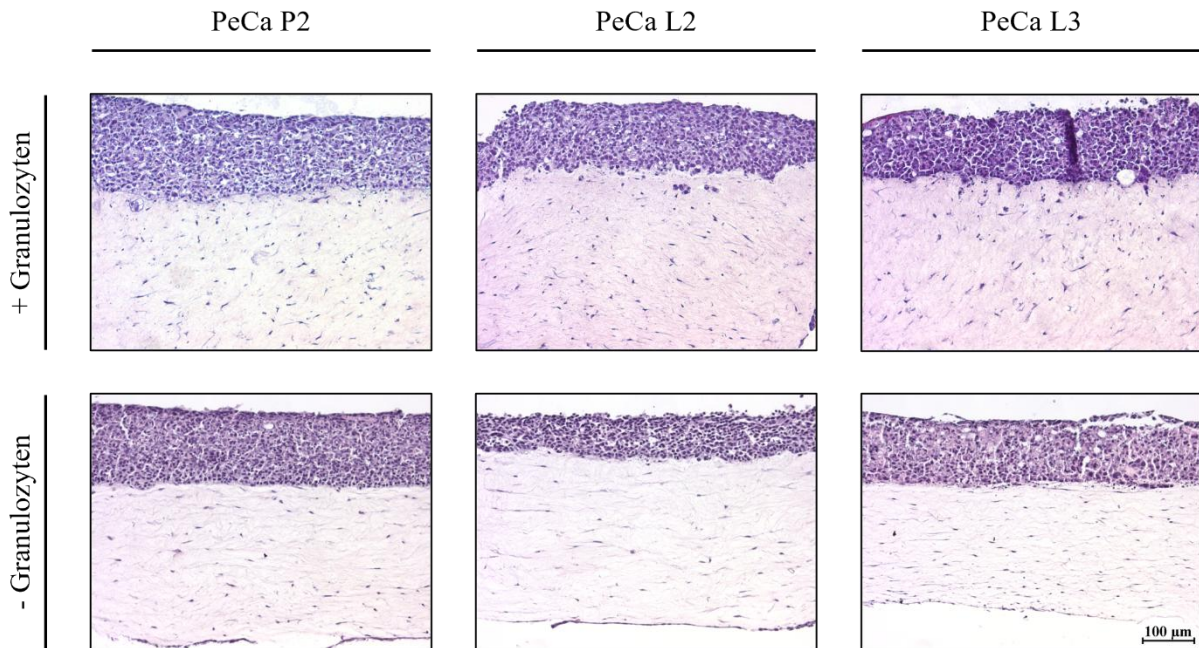
Die Peniskarzinomzelllinien P2, L2 und L3 weisen in Kulturen ohne Granulozyten eine horizontal verlaufende, mehr kontinuierliche Basalmembran zwischen Epithel- und Kollagen-Fibroblasten-Schicht auf und zeigen somit kein ausgeprägtes invasives Wachstumsverhalten.

Werden Granulozyten auf heranwachsende 3D-Kulturen gegeben und diese nach zwanzig Stunden fixiert, führt dies bei allen drei PeCa-Zelllinien zu einer eher unregelmäßig verlaufenden und interruptierten Basalmembran. In allen drei Fällen, am prominentesten bei L2, durchbrechen Tumorzellen die Basalmembran und invadieren die darunterliegende Kollagen-Fibroblasten-Schicht.

Darüber hinaus ändern VHF in Kulturen mit Granulozyten ihre Orientierung im Kollagen hin zu einer eher diffusen, vertikalen Ausrichtung, während sie in Kulturen ohne Granulozyten eher horizontal angeordnet sind.

Trotz der geringen Inkubationszeit wird im Ansatz sichtbar, dass Granulozyten das invasive Wachstum der drei Peniskarzinomzelllinien P2, L2 und L3 fördern. Eine längere Inkubationszeit der Granulozyten oder Verwendung konditionierter Medien könnte diesen Effekt vermutlich verstärken.

Zur besseren Visualisierung der Invasivität würde sich zudem die Durchführung einer Laminin-5-spezifischen Färbung eignen. Laminin-5, ein Hauptbestandteil der Basalmembran, verbindet Keratinozyten auf Ebene der Hemidesmosomen mit dem Mesenchym. Durchbrechen Tumorzellen die Basalmembran, würde sich eine irreguläre Färbung von Laminin-5 nachweisen lassen (Zinn et al., 2006).



**Abbildung 16: Hämatoxylin-Eosin-Färbung organotypischer 3D-Kulturen.** Organotypische 3D-Kulturen mit den Peniskarzinomzelllinien P2, L2 und L3 wurden für 14 Tage kultiviert. Bei den Kulturen mit Granulozyten wurden 20 Stunden vor Fixierung je  $5 \times 10^6$  frisch isolierte Granulozyten von oben auf die Kulturen gegeben. 6 µm dicke FFPE-Schnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Die Fotodokumentation erfolgte mittels Leica DMI6000 B Forschungsmikroskop bei zweihundertfacher Vergrößerung. Repräsentative Bilder aus drei Färbungen einer Kultur werden gezeigt.

#### 5.4 Migrationsverhalten von Granulozyten

Hohe Level der HPV-Onkoproteine E6 und E7 führen über eine gesteigerte Expression von p63 zu einer erhöhten CXCL8-Freisetzung (Bernhard et al., 2021), wodurch verstärkt Neutrophile rekrutiert werden (Barker et al., 1991; Yoshiro, 2008). Da die HPV-Onkoproteine E6 und E7 bei PeCa P2 und L3, im Vergleich zu L2, gesteigert aktiv sind (Bernhard et al., 2021), liegt die Vermutung nahe, dass Granulozyten in 3D-Kulturen mit diesen beiden PeCa-Zelllinien verstärkt einwandern. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Granulozyten von oben auf organotypische 3D-Kulturen mit den Peniskarzinomzelllinien P2, L2 und L3 gegeben und nach unterschiedlicher Inkubationsdauer fixiert. Anschließend erfolgte zur Analyse des Einwanderungsverhaltens der Granulozyten eine CD15-spezifische immunhistochemische Färbung (Abbildung 17). Die maximale Einwanderungstiefe der immigrierten Granulozyten wurde ausgehend von der apikalen Epithelschichtgrenze pro Inkubationszeit in drei unabhängigen Bildausschnitten pro Kultur mittels ImageJ gemessen und daraus Mittelwerte sowie Standardabweichungen berechnet. Darüber hinaus wurde die maximale Einwanderungstiefe zwischen den einzelnen PeCa-Zelllinien und verschiedenen Zeitpunkten graphisch dargestellt und auf signifikante Unterschiede untersucht (Abbildung 18).

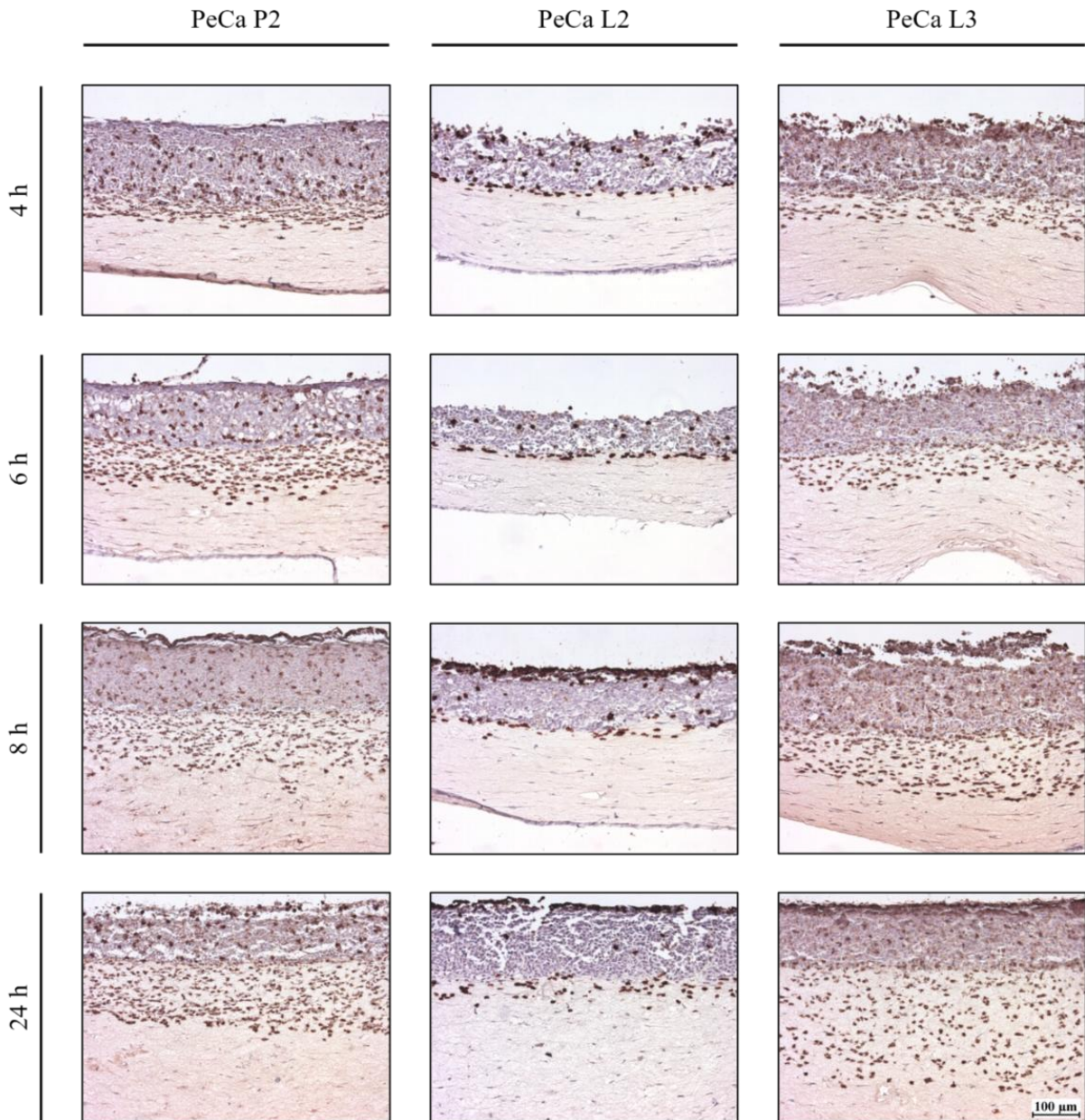
Bereits nach vier Stunden sind im Falle der Zelllinie P2 zahlreiche Granulozyten bis zu einer mittleren maximalen Tiefe von  $207,34 \mu\text{m} (\pm 1,90 \mu\text{m})$  in die 3D-Kultur eingewandert. Während sich sechs Stunden nach Zugabe noch einige Granulozyten im mittleren bis unteren Epitheldrittel der Kultur mit PeCa P2 befinden, hat sich der Großteil der immigrierten Granulozyten mit einer mittleren maximalen Einwanderungstiefe von  $283,74 \mu\text{m} (\pm 15,57 \mu\text{m})$  direkt unterhalb der Basalmembran angesiedelt. Mit zunehmender Inkubationszeit wandern die Granulozyten bei P2 in die obere und mittlere Kollagen-Fibroblasten-Schicht ein. Vergleicht man nun die achtstündige mit der vierundzwanzigstündigen Inkubation, wird deutlich, dass sich in Kulturen mit PeCa P2 weniger die mittlere maximale Immigrationstiefe ( $305,28 \mu\text{m} \pm 15,06 \mu\text{m}$  bei acht Stunden im Vergleich zu  $319,42 \mu\text{m} \pm 20,10 \mu\text{m}$  bei vierundzwanzig Stunden), sondern vielmehr die Anzahl der tief eingewanderten Granulozyten erhöht. Die maximale Einwanderungstiefe immigrierter Granulozyten unterscheidet sich bei PeCa P2 nach vierstündiger Inkubationszeit vergleichend zu sechs Stunden ( $p = 0,0005$ ), acht Stunden ( $p < 0,0001$ ) und vierundzwanzig Stunden ( $p < 0,0001$ ) signifikant voneinander (Abbildung 18, A & E).

In 3D-Kulturen mit der PeCa-Linie L2 zeigt sich ein, im Vergleich zu PeCa P2 und L3, abweichendes Migrationsverhalten der Granulozyten. Sowohl die Anzahl als auch die Tiefe der eingewanderten Granulozyten sind bei PeCa L2 geringer. Nach vierstündiger Inkubation befindet sich mehr als die Hälfte der eingewanderten Granulozyten im oberen bis mittleren Epithel der Kultur mit L2. Die restlichen Granulozyten reihen sich mit einer mittleren maximalen Einwanderungstiefe von  $125,13 \mu\text{m} (\pm 6,74 \mu\text{m})$  direkt unterhalb der Basalmembran auf. Die mittlere maximale Einwanderungstiefe erhöht sich sechs Stunden nach Immigration der Granulozyten lediglich minimal auf  $135,19 \mu\text{m} (\pm 10,63 \mu\text{m})$ . Erst nach achtstündiger Inkubation zeigt sich bei L2 mit einer mittleren maximalen Immigrationstiefe von  $161,91 \mu\text{m} (\pm 6,24 \mu\text{m})$  eine deutliche Wanderungstendenz der Granulozyten in tiefere Anteile der Kollagen-Fibroblasten-Schicht, sodass sich nach vierundzwanzigstündiger Inkubation nahezu alle Granulozyten aus dem Epithel in der oberen Kollagen-Fibroblasten-Schicht angesiedelt haben. Im Falle der PeCa-Zelllinie L2 erreichen Granulozyten nach vierundzwanzig Stunden eine mittlere maximale Einwanderungstiefe von  $224,01 \mu\text{m} (\pm 11,17 \mu\text{m})$ . Die two-way ANOVA der maximalen Einwanderungstiefe immigrierter Granulozyten zwischen jeweils zwei Inkubationszeiten zeigt bei PeCa L2, mit Ausnahme des Vergleichs nach vier- und sechsstündiger Inkubationszeit ( $p = 0,6822$ ), signifikante Unterschiede (Abbildung 18, B & E).

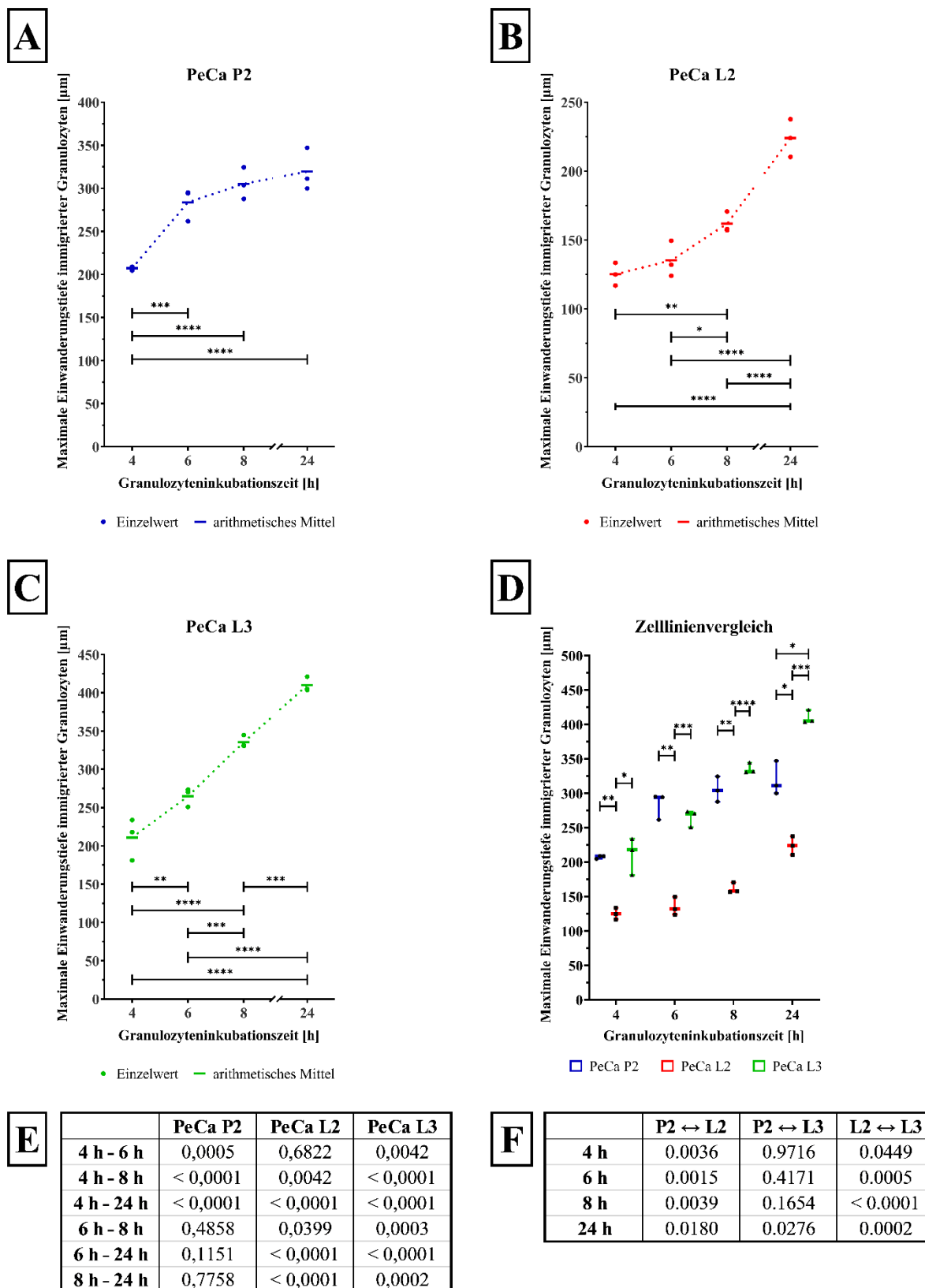
Findet nun PeCa L3 Beachtung, zeichnet sich hier ein zu P2 vergleichbares Granulozytenverhalten ab. Lässt man Granulozyten in 3D-Kulturen mit PeCa L3 immigrieren, wandern diese innerhalb weniger Stunden vielzählig und tief (mittlere maximale Einwanderungstiefe nach vier Stunden:  $210,96 \mu\text{m} \pm 22,11 \mu\text{m}$ ) ein. Der Großteil der immigrierten Granulozyten befindet sich im Falle der Zelllinie L3 bereits nach sechsstündiger Inkubation mit einer mittleren maximalen Einwanderungstiefe von  $264,88 \mu\text{m} (\pm 9,98 \mu\text{m})$  im oberen Drittel der Kollagen-Fibroblasten-Schicht. Nichtsdestotrotz hat sich eine nicht zu vernachlässigende Anzahl an Granulozyten in tiefen Schichten des Epithels angesiedelt.

Nach acht Stunden sind die Granulozyten bei PeCa L3 mit einer mittleren maximalen Tiefe von  $335,62 \mu\text{m} (\pm 6,46 \mu\text{m})$  bis in das mittlere Drittel der Kollagen-Fibroblasten-Schicht eingewandert. Mit zunehmender Inkubationszeit erreichen die Granulozyten tiefere Anteile der Kollagen-Fibroblasten-Schicht, sodass nach vierundzwanzigstündiger Inkubation mit einer mittleren maximalen Immigrationstiefe von  $409,97 \mu\text{m} (\pm 7,91 \mu\text{m})$  beinahe die vollständige Kollagen-Fibroblasten-Schicht der 3D-Kultur mit L3 von Granulozyten durchwandert ist. Wird die maximale Einwanderungstiefe immigrierter Granulozyten jeweils zwischen zwei verschiedenen Inkubationszeiten beurteilt, sind diese bei PeCa L3 in allen Fällen signifikant unterschiedlich (Abbildung 18, C & E).

Vergleicht man nun die drei PeCa-Zelllinien miteinander, wird deutlich, dass Granulozyten bei PeCa P2 und L3 zahlreicher und in kürzerer Zeit über eine größere Distanz (mittlere maximale Immigrationstiefe nach vierundzwanzig Stunden:  $319,42 \mu\text{m} \pm 20,10 \mu\text{m}$  bei P2 gegenüber  $409,97 \mu\text{m} \pm 7,91 \mu\text{m}$  bei L3) einwandern. Im Gegensatz dazu benötigt eine reduzierte Granulozytenanzahl bei PeCa L2 eine längere Inkubationszeit, um weniger tief (mittlere maximale Einwanderungstiefe bei L2 nach vierundzwanzig Stunden:  $224,01 \mu\text{m} \pm 11,17 \mu\text{m}$ ) in die Kollagen-Fibroblasten-Schicht zu migrieren. Während sich bei P2 und L3 der Großteil der Granulozyten bereits sechs Stunden nach Zugabe in der oberen bis mittleren Kollagen-Fibroblasten-Schicht befindet, erreichen sie bei L2 erst nach vierundzwanzigstündiger Inkubation tiefe Anteile der oberen Kollagen-Fibroblasten-Schicht. Wird die maximale Einwanderungstiefe immigrierter Granulozyten statistisch zwischen jeweils zwei Zelllinien nach gleicher Migrationszeit ausgewertet, sind die Ergebnisse im Vergleich zwischen P2 und L2 beziehungsweise zwischen L2 und L3 in allen Fällen signifikant (Abbildung 18, D & F). Dagegen zeigen sich im Vergleich zwischen P2 und L3 lediglich nach vierundzwanzig Stunden ( $p = 0,0276$ ) signifikante Unterschiede (Abbildung 18, D & F).



**Abbildung 17: Nachweis von CD15 in organotypischen 3D-Kulturen.** Organotypische 3D-Kulturen mit den Peniskarzinomzelllinien P2, L2 und L3 wurden für 14 Tage kultiviert. Im Anschluss wurden je  $5 \times 10^6$  frisch isolierte Granulozyten von oben auf die 3D-Kulturen gegeben. Die Fixierung der 3D-Kulturen erfolgte 4, 6, 8 oder 24 Stunden nach Zugabe der Granulozyten. Zur Analyse des Migrationsverhaltens der Granulozyten wurde eine immunhistochemische Färbung mit einem CD15-spezifischen Primärantikörper durchgeführt. Der Primärantikörper wurde mithilfe eines Peroxidasegekoppelten Sekundärantikörpers detektiert. Durch Zugabe der DAB-Peroxidase-Substratlösung entstand die Braunfärbung. Die Zellkerne wurden mit Hämatoxylin blau gefärbt. Die Fotodokumentation erfolgte mittels Leica DMI6000 B Forschungsmikroskop bei zweihundertfacher Vergrößerung. Abgebildet werden repräsentative Bilder aus drei Färbungen einer Kultur. CD = cluster of differentiation, DAB = 3,3'-Diaminobenzidin.



**Abbildung 18: Maximale Einwanderungstiefe von Granulozyten in 3D-Kulturen mit den Peniskarzinomzelllinien P2, L2 und L3.** In der CD15-spezifischen Immunhistochemie (Abbildung 17) wurde die maximale Einwanderungstiefe von Granulozyten ausgehend von der apikalen Epithelschichtgrenze pro Inkubationszeit in drei unabhängigen Bildausschnitten pro Kultur mittels ImageJ gemessen. Die Ergebnisse wurden graphisch als *replicates with connected means* für jede Zelllinie, PeCa P2 in [A], PeCa L2 in [B] und PeCa L3 in [C], dargestellt. Während die gemessenen

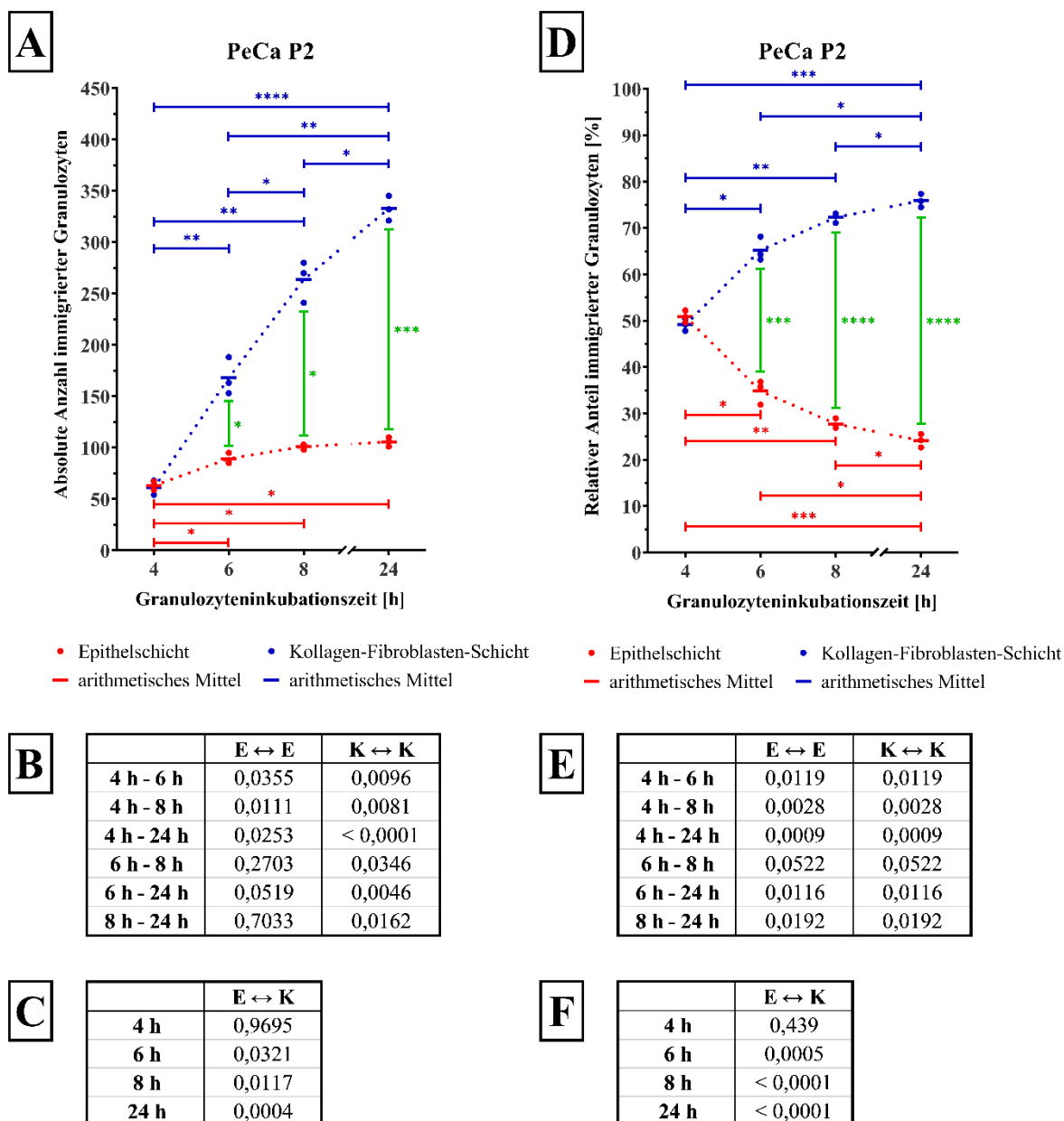
Einzelwerte als Punkte abgebildet werden, symbolisiert der Balken deren arithmetisches Mittel. Zudem wurden die Ergebnisse im Zelllinienvergleich für die Zelllinien PeCa P2 (blau), PeCa L2 (rot) und PeCa L3 (grün) graphisch als *interleaved box and whiskers* in [D] dargestellt. Neben Boxplots werden die gemessenen Einzelwerte abgebildet. Die Signifikanzen wurden mittels two-way ANOVA für Mehrfachvergleiche mit Korrektur nach Turkey berechnet. Tabelle [E] zeigt p-Werte bei Vergleich der maximalen Einwanderungstiefe immigrierter Granulozyten in 3D-Kulturen mit der Zelllinie PeCa P2, PeCa L2 beziehungsweise PeCa L3 zwischen zwei verschiedenen Zeitpunkten. P-Werte resultierend aus dem Vergleich der maximalen Einwanderungstiefe immigrierter Granulozyten zwischen zwei verschiedenen Zelllinien nach gleicher Migrationszeit werden in Tabelle [F] aufgelistet. Signifikante Ergebnisse wurden durch Sternchen gekennzeichnet (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ ).

Des Weiteren wurden die eingewanderten Granulozyten ausgezählt, um mit einem Vergleich der Anzahl pro Schicht über die Zeit ein Maß für die Immigration der Granulozyten zu erhalten und deren Quantität zwischen den 3D-Kulturen mit den individuellen PeCa-Zelllinien und verschiedenen Zeitpunkten mathematisch miteinander vergleichen zu können. Dabei wurde die Anzahl eingewanderter Granulozyten innerhalb der Epithelschicht und Kollagen-Fibroblasten-Schicht jeweils zwischen den verschiedenen Inkubationszeiten sowie im Vergleich der beiden Schichten zueinander nach gleicher Migrationszeit auf signifikante Unterschiede untersucht.

In absoluten Zahlen steigt im Falle von 3D-Kulturen mit der PeCa-Zelllinie P2 (Abbildung 19, A) mit zunehmender Zeit die Zahl der immigrierten Granulozyten sowohl im Epithel als auch der Kollagen-Fibroblasten-Schicht an. Während sich bei P2 nach vier Stunden annähernd gleich viele Granulozyten in der Epithel- sowie Kollagen-Fibroblasten-Schicht befinden, nimmt die Granulozytenzahl in der Kollagen-Fibroblasten-Schicht mit weiterer Inkubationszeit stark zu. Im Gegensatz dazu erreicht die Kurve des Epithels vierundzwanzig Stunden nach Applikation der Granulozyten nahezu ein Plateau. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass PeCa P2 eine hohe Menge an CXCL8 produziert, das chemotaktisch auf Granulozyten wirkt (Barker et al., 1991; Yoshiro, 2008), sodass diese vorübergehend in der Epithelschicht gehalten werden. Denkbar wäre ebenfalls die Einstellung eines Gleichgewichts durch eine weiterhin über die Zeit stattfindende Immigration zugegebener Granulozyten in die Epithelschicht der 3D-Kultur bei gleichzeitig konstanter Wanderung immigrierter Granulozyten durch das Epithel in die Kollagen-Fibroblasten-Schicht. Die Granulozytenzahl der Epithelschicht unterscheidet sich bei PeCa P2 nach vierstündiger Inkubationszeit vergleichend zu sechs Stunden ( $p = 0,0355$ ), acht Stunden ( $p = 0,0111$ ) und vierundzwanzig Stunden ( $p = 0,0253$ ) signifikant voneinander (Abbildung 19, B). Im Falle der Primärtumorzelllinie P2 gibt es einen sukzessiven Anstieg der Granulozytenmigration in die Kollagen-Fibroblasten-Schicht über die Zeit mit einem signifikanten Unterschied zwischen allen Zeitpunkten (Abbildung 19, B). Vergleicht man nun die Granulozytenzahl in 3D-Kulturen mit P2 zwischen Epithel- und Kollagen-Fibroblasten-Schicht nach jeweils gleicher Migrationszeit, zeigen sich bereits ab sechsständiger Inkubation signifikante Differenzen (Abbildung 19, C). Hervorzuheben ist der hoch signifikante Unterschied vierundzwanzig Stunden nach Applikation der Granulozyten zwischen den beiden Schichten (Abbildung 19, C:  $p = 0,0004$ ).

Werden nun die relativen Zahlen betrachtet (Abbildung 19, D), nimmt der Anteil eingewanderter Granulozyten mit zunehmender Inkubationszeit im Epithel der 3D-Kulturen mit P2 ab, während er sich in der Kollagen-Fibroblasten-Schicht erhöht. Dabei ist bereits nach vier Stunden nahezu die Hälfte der immigrierten Granulozyten in die Kollagen-Fibroblasten-Schicht vorgedrungen. Der Granulozytenanteil in der Kollagen-Fibroblasten-Schicht steigert sich vierundzwanzig Stunden nach Applikation der Granulozyten auf circa 75 %. Die two-way ANOVA zwischen jeweils zwei Inkubationszeiten innerhalb der Epithel- oder Kollagen-Fibroblasten-Schicht zeigt bei PeCa P2, mit Ausnahme des Vergleichs nach sechs- und achtstündiger Inkubationszeit, signifikante Unterschiede (Abbildung 19, E). Erwähnenswert ist an dieser Stelle der Vergleich zwischen vier und vierundzwanzig Stunden nach Granulozytenapplikation mit  $p = 0,0009$  (Abbildung 19, E). Werden die Verhältnisse zwischen Epithel- und Kollagen-Fibroblasten-Schicht nach jeweils gleicher Migrationszeit ausgewertet, sind diese bei P2 ab sechsstündiger Inkubationszeit hoch signifikant (Abbildung 19, F).

Die Granulozyten wandern im Falle von 3D-Kulturen mit PeCa P2 sukzessive in Abhängigkeit von der Zeit durch das Epithel in die Kollagen-Fibroblasten-Schicht ein. Offensichtlich besteht ein Chemokingradient in Richtung des Mediums, entlang dessen die Granulozyten durch die Kultur wandern. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zeigten, dass P2 große Mengen an CXCL8, einem Lockstoff für Granulozyten (Barker et al., 1991; Yoshiro, 2008), sezerniert. Somit weist die Epithelschicht der 3D-Kultur eine hohe Konzentration von CXCL8 auf, wodurch eine Anreicherung von Granulozyten im Epithel begünstigt wird. Entscheidend für das Migrationsverhalten und damit die Lokalisation von Granulozyten ist die Stärke und der Vektor der Chemokingradienten. Verläuft der Chemokingradient durch einen zusätzlichen Beitrag der VHF nach unten in Richtung Medium, wandern die Granulozyten durch das Epithel in die Kollagen-Fibroblasten-Schicht ein. Im Falle eines aufwärts gerichteten Chemokingradienten verbleiben die Granulozyten im Epithel. Dies würde erklären, warum es den Anschein hat, dass die Granulozyten zwischen beiden Schichten pausieren. Vermutlich werden hier die Chemokingradienten verrechnet und entschieden, welchem Gradienten die Granulozyten folgen.

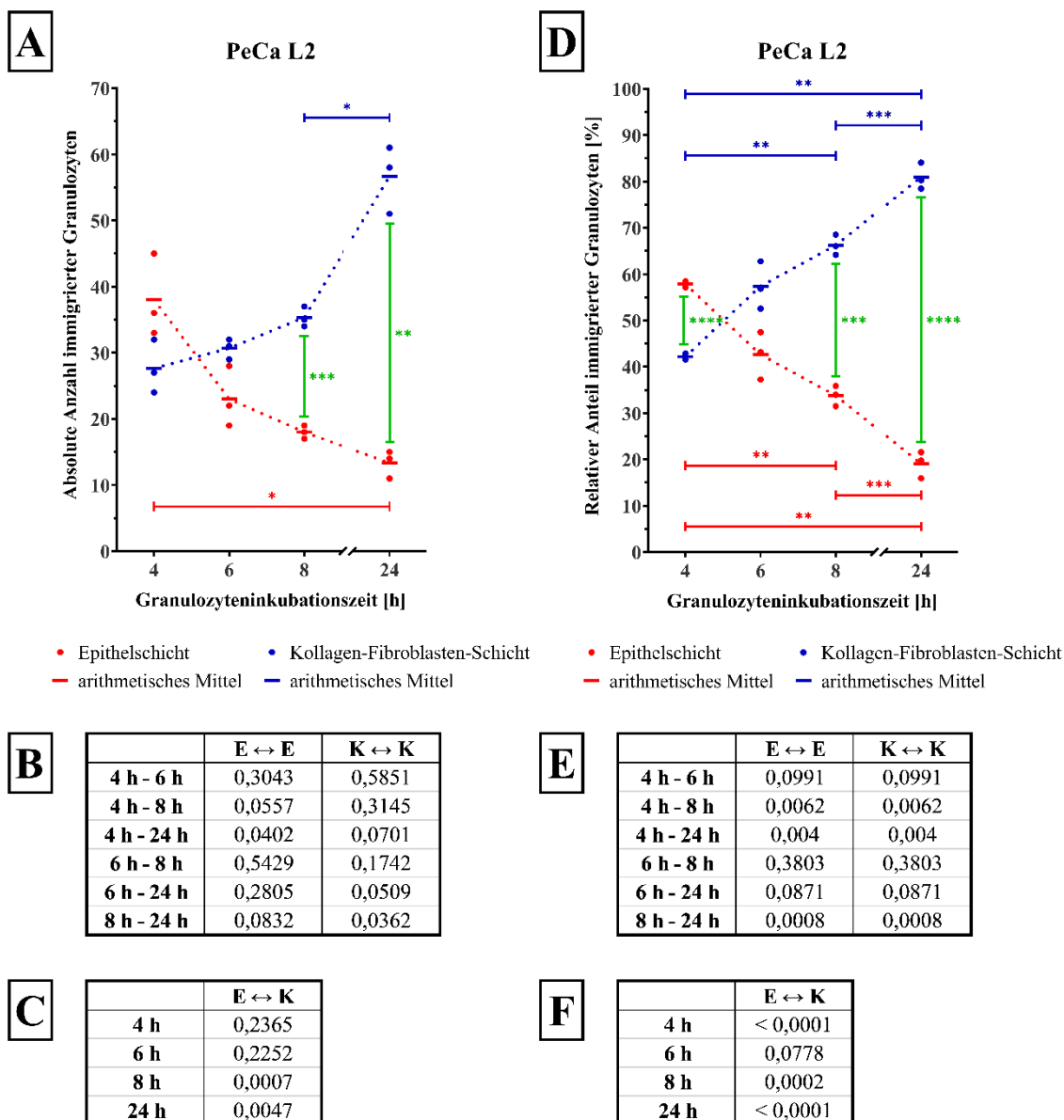


**Abbildung 19: Absolute Anzahl und relativer Anteil immigrierter Granulozyten in 3D-Kulturen mit der Peniskarzinomzelllinie P2.** In der mittels CD15-Antikörper durchgeführten Immunhistochemie (Abbildung 17) wurde die Anzahl eingewanderter Granulozyten pro Inkubationszeit in drei unabhängigen Bildausschnitten pro Kultur erhoben. Hierbei wurde differenziert, ob sich die Granulozyten im Epithel (rot) oder der Kollagen-Fibroblasten-Schicht (blau) befinden. Die Ergebnisse wurden graphisch als *replicates with connected means* sowohl in absoluten [A] als auch in relativen Zahlen [D] dargestellt. Zur Berechnung der relativen Zahlen wurde die gezählte Anzahl immigrierter Granulozyten in der Epithel- beziehungsweise Kollagen-Fibroblasten-Schicht ins Verhältnis zur Gesamtzahl eingewanderter Granulozyten gesetzt. Die gezählten Einzelwerte beziehungsweise berechneten Relationen werden als Punkte abgebildet, während der Balken deren arithmetisches Mittel symbolisiert. Die Signifikanzen wurden mittels two-way ANOVA für Mehrfachvergleiche mit Korrektur nach Turkey berechnet. Tabelle [B] listet p-Werte bei Vergleich der absoluten Anzahl immigrierter Granulozyten innerhalb der Epithelschicht (E) oder Kollagen-Fibroblasten-Schicht (K) zwischen zwei verschiedenen Zeitpunkten auf. Gleiches ist für relative Zahlen in [E] zu sehen. P-Werte bei Vergleich der absoluten Anzahl beziehungsweise des relativen Anteils eingewanderter Granulozyten zwischen Epithelschicht (E) und Kollagen-Fibroblasten-Schicht (K) nach gleicher Migrationszeit werden in [C] beziehungsweise [F] gezeigt. Signifikante Ergebnisse wurden durch Sternchen gekennzeichnet (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ ).

In 3D-Kulturen mit der PeCa-Zelllinie L2 sinkt mit zunehmender Inkubationszeit sowohl die absolute Anzahl (Abbildung 20, A) als auch der relative Anteil (Abbildung 20, D) eingewanderter Granulozyten im Epithel bei gleichzeitiger Zunahme in der Kollagen-Fibroblasten-Schicht. Vier Stunden nach Applikation der Granulozyten überwiegt bei L2 die absolute Zahl der Granulozyten im Epithel verglichen zur Kollagen-Fibroblasten-Schicht. Das Verhältnis kehrt sich jedoch bereits nach sechs Stunden zugunsten der Kollagen-Fibroblasten-Schicht um und zeigt mit fortschreitender Inkubationszeit eine signifikant progrediente Differenz (Abbildung 20, C:  $p = 0,0007$  nach acht Stunden,  $p = 0,0047$  nach vierundzwanzig Stunden). Die Granulozytenzahl ist im Epithel der 3D-Kulturen mit PeCa L2 zwischen vier- und vierundzwanzigstündiger Inkubationszeit ( $p = 0,0402$ ) und in der Kollagen-Fibroblasten-Schicht zwischen acht- und vierundzwanzigstündiger Inkubationszeit ( $p = 0,0362$ ) signifikant unterschiedlich (Abbildung 20, B).

Während bei L2 nach vier Stunden noch nahezu 60 % der Granulozyten in der Epithelschicht lokalisiert sind, sinkt dieser Anteil nach sechs Stunden auf knapp über 40 % und vermindert sich mit weiterer Inkubationszeit zunehmend (Abbildung 20, D). Umgekehrt verhält sich der Granulozytenanteil in der Kollagen-Fibroblasten-Schicht. Werden die Granulozyten für vierundzwanzig Stunden inkubiert, befinden sich lediglich etwa 20 % der Granulozyten im Epithel und knapp 80 % in der Kollagen-Fibroblasten-Schicht der 3D-Kultur mit L2. Der Granulozytenanteil ist bei PeCa L2 innerhalb der Epithel- beziehungsweise Kollagen-Fibroblasten-Schicht zwischen vier- und vierundzwanzigstündiger Inkubationszeit (Abbildung 20, E:  $p = 0,004$ ) als auch im Vergleich der Zellschichten miteinander vierundzwanzig Stunden nach Applikation der Granulozyten (Abbildung 20, F:  $p < 0,0001$ ) signifikant verschieden. Hervorzuheben ist der im Falle der PeCa-Zelllinie L2, im Gegensatz zu P2 und L3, hoch signifikante Unterschied (Abbildung 20, F:  $p < 0,0001$ ) des Granulozytenanteils nach vierstündiger Inkubationszeit zwischen den beiden Zellschichten.

Erneut wandern die Granulozyten sukzessive in Abhängigkeit von der Zeit durch das Epithel in die Kollagen-Fibroblasten-Schicht ein, sodass bei PeCa L2 von einem abwärts in Richtung Medium gerichteten Chemokingradienten ausgegangen werden kann. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe belegen, dass L2 nur wenig CXCL8 sezerniert. Dadurch reichern sich die Granulozyten nicht im Epithel an, sondern wandern mit zunehmender Inkubationszeit in die Kollagen-Fibroblasten-Schicht ein. Insgesamt wandern Granulozyten in 3D-Kulturen mit L2, im Vergleich zu 3D-Kulturen mit P2 und L3, nur rudimentär ein.

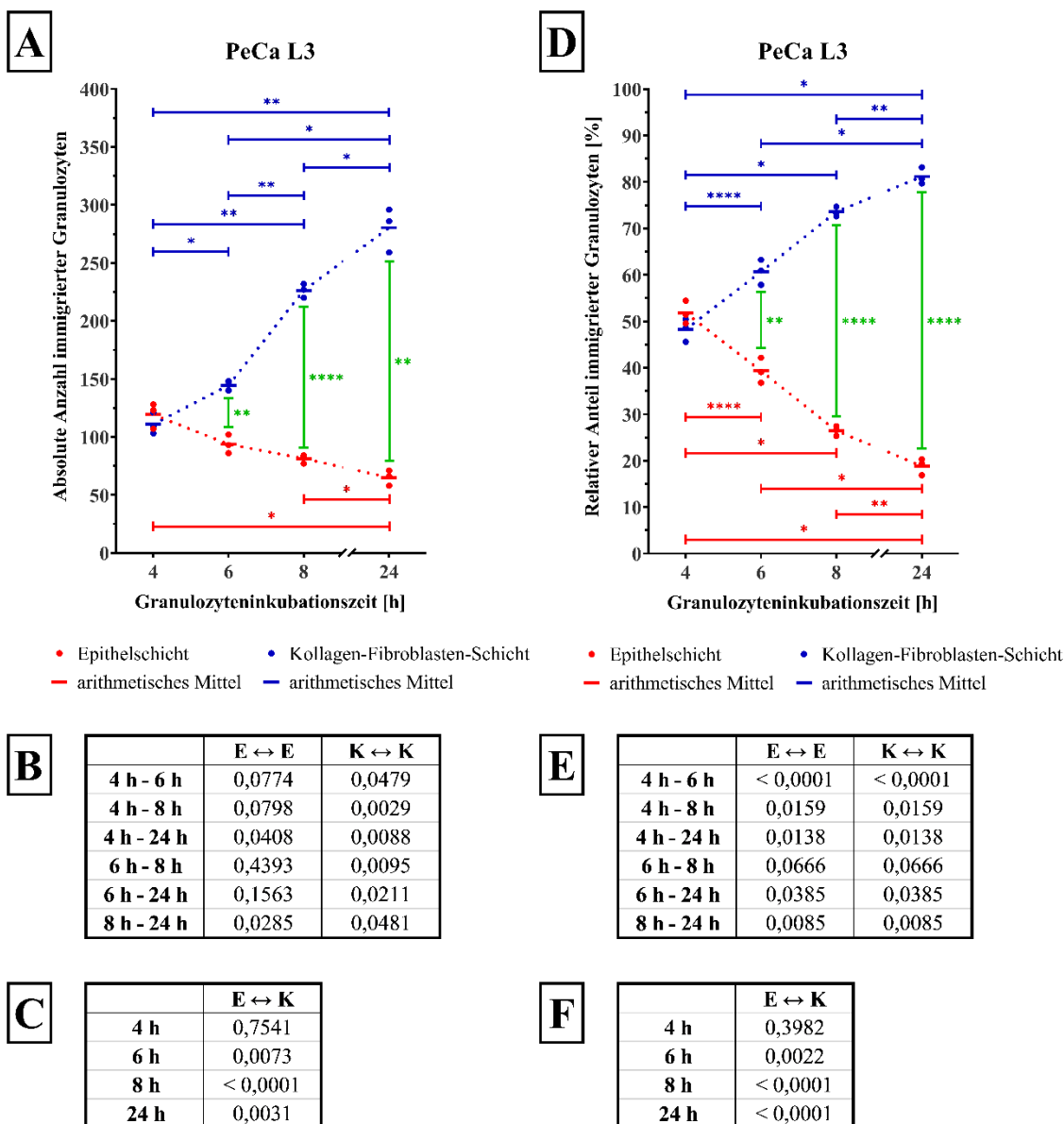


**Abbildung 20: Absolute Anzahl und relativer Anteil immigrierter Granulozyten in 3D-Kulturen mit der Peniskarzinomzelllinie L2.** In der CD15-spezifischen Immunhistochemie (Abbildung 17) wurde die Anzahl eingewanderter Granulozyten pro Inkubationszeit in drei unabhängigen Bildausschnitten pro Kultur bestimmt. Dabei wurde unterschieden, ob sich die Granulozyten im Epithel (rot) oder der Kollagen-Fibroblasten-Schicht (blau) befinden. Die Ergebnisse wurden graphisch als *replicates with connected means* sowohl in absoluten [A] als auch in relativen Zahlen [D] dargestellt. Zur Berechnung der relativen Zahlen wurde die gezählte Anzahl immigrierter Granulozyten in der Epithel- beziehungsweise Kollagen-Fibroblasten-Schicht in Relation zur Gesamtzahl eingewanderter Granulozyten gesetzt. Während die gezählten Einzelwerte beziehungsweise berechneten Relationen als Punkte abgebildet werden, symbolisiert der Balken deren arithmetisches Mittel. Die Signifikanzen wurden mittels two-way ANOVA für Mehrfachvergleiche mit Korrektur nach Turkey berechnet. Tabelle [B] zeigt p-Werte bei Vergleich der absoluten Anzahl immigrierter Granulozyten innerhalb der Epithelschicht (E) oder Kollagen-Fibroblasten-Schicht (K) zwischen zwei verschiedenen Zeitpunkten. Gleiches ist für relative Zahlen in [E] zu sehen. P-Werte bei Vergleich der absoluten Anzahl beziehungsweise des relativen Anteils eingewanderter Granulozyten zwischen Epithelschicht (E) und Kollagen-Fibroblasten-Schicht (K) nach gleicher Migrationszeit sind in [C] beziehungsweise [F] aufgelistet. Signifikante Ergebnisse wurden durch Sternchen gekennzeichnet (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ ).

In 3D-Kulturen mit der PeCa-Zelllinie L3 reduziert sich mit fortschreitender Inkubationszeit sowohl die absolute Anzahl (Abbildung 21, A) als auch der relative Anteil (Abbildung 21, D) immigrierter Granulozyten im Epithel bei gleichzeitig stetigem Anstieg in der Kollagen-Fibroblasten-Schicht. Zudem sind bei PeCa L3 vier Stunden nach Granulozytenapplikation im arithmetischen Mittel mehr Granulozyten im Epithel als in der Kollagen-Fibroblasten-Schicht vorhanden. Diese Granulozytenverteilung kehrt sich bei L3 in der sechsstündig inkubierten Kultur um und steigert sich dann bei weiterer Inkubationszeit signifikant zugunsten der Kollagen-Fibroblasten-Schicht (Abbildung 21, C:  $p = 0,0073$  nach sechs Stunden,  $p < 0,0001$  nach acht Stunden,  $p = 0,0031$  nach vierundzwanzig Stunden). Außerdem zeigt die Granulozytenzahl der Epithelschicht in 3D-Kulturen mit L3 im Vergleich zwischen vier und vierundzwanzig Stunden nach Applikation der Granulozyten einen signifikanten Unterschied (Abbildung 21, B:  $p = 0,0408$ ). Wird die Anzahl eingewanderter Granulozyten in der Kollagen-Fibroblasten-Schicht jeweils zwischen zwei verschiedenen Inkubationszeiten beurteilt, sind diese bei PeCa L3 in allen Fällen signifikant unterschiedlich (Abbildung 21, B). Erwähnenswert ist dabei der Vergleich zwischen vier- und vierundzwanzigstündiger Inkubationszeit mit  $p = 0,0088$  (Abbildung 21, B).

Während die relative Granulozytenverteilung in 3D-Kulturen mit der Zelllinie L3 (Abbildung 21, D), vergleichend zu P2, nach vier Stunden mit leicht über 50 % zugunsten der Epithelschicht ausfällt, ähnelt sie nach vierundzwanzig Stunden mit etwas unter 20 % Granulozytenanteil im Epithel hingegen der von L2. Der Vergleich zweier Inkubationszeiten innerhalb einer Zellschicht liefert im Falle der PeCa-Zelllinie L3, mit Ausnahme des Vergleichs zwischen sechs und acht Stunden nach Granulozytenapplikation ( $p = 0,0666$ ), signifikante Unterschiede (Abbildung 21, E). Des Weiteren sind bei L3 die Verhältnisse nach sechs Stunden ( $p = 0,0022$ ), nach acht Stunden ( $p < 0,0001$ ) und nach vierundzwanzig Stunden ( $p < 0,0001$ ) zwischen den beiden Zellschichten signifikant (Abbildung 21, F).

Vergleichend zu P2 und L2 wandern die Granulozyten in 3D-Kulturen mit PeCa L3 sukzessive in Abhängigkeit von der Zeit durch das Epithel in die Kollagen-Fibroblasten-Schicht ein. Aus diesem Grund ist ein Chemokingradient in Richtung des Mediums naheliegend, entlang dessen die Granulozyten durch die Kultur wandern. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zeigten, dass PeCa L3, ähnlich zu P2, große Mengen an CXCL8, einem Lockstoff für Granulozyten (Barker et al., 1991; Yoshiro, 2008), sezerniert. Durch eine hohe Konzentration von CXCL8 in der Epithelschicht der 3D-Kultur mit L3 wird eine Anreicherung von Granulozyten im Epithel begünstigt. Entscheidend für das Migrationsverhalten und damit die Lokalisation von Granulozyten ist die Stärke und der Vektor der Chemokingradienten. Im Falle eines abwärts in Richtung Medium gerichteten Chemokingradienten wandern die Granulozyten durch das Epithel in die Kollagen-Fibroblasten-Schicht ein. Verläuft der Chemokingradient nach oben, verbleiben die Granulozyten im Epithel. Allem Anschein nach verweilen die Granulozyten zwischen den beiden Schichten, bis durch Verrechnung der Chemokingradienten die Entscheidung getroffen wird, welchem Gradienten die Granulozyten folgen.



**Abbildung 21: Absolute Anzahl und relativer Anteil immigrierter Granulozyten in 3D-Kulturen mit der Peniskarzinomzelllinie L3.** In der mittels CD15-Antikörper durchgeführten Immunhistochemie (Abbildung 17) wurde die Anzahl eingewandelter Granulozyten pro Inkubationszeit in drei unabhängigen Bildausschnitten pro Kultur erhoben. Hierbei wurde differenziert, ob sich die Granulozyten im Epithel (rot) oder der Kollagen-Fibroblasten-Schicht (blau) befinden. Die Ergebnisse wurden graphisch als *replicates with connected means* sowohl in absoluten [A] als auch in relativen Zahlen [D] dargestellt. Zur Berechnung der relativen Zahlen wurde die gezählte Anzahl immigrierter Granulozyten in der Epithel- beziehungsweise Kollagen-Fibroblasten-Schicht ins Verhältnis zur Gesamtzahl eingewandelter Granulozyten gesetzt. Die gezählten Einzelwerte beziehungsweise berechneten Relationen werden als Punkte abgebildet, während der Balken deren arithmetisches Mittel symbolisiert. Die Signifikanzen wurden mittels two-way ANOVA für Mehrfachvergleiche mit Korrektur nach Turkey berechnet. Tabelle [B] listet p-Werte bei Vergleich der absoluten Anzahl immigrierter Granulozyten innerhalb der Epithelschicht (E) oder Kollagen-Fibroblasten-Schicht (K) zwischen zwei verschiedenen Zeitpunkten auf. Gleiches ist für relative Zahlen in [E] zu sehen. P-Werte bei Vergleich der absoluten Anzahl beziehungsweise des relativen Anteils eingewandelter Granulozyten zwischen Epithelschicht (E) und Kollagen-Fibroblasten-Schicht (K) nach gleicher Migrationszeit werden in [C] beziehungsweise [F] gezeigt. Signifikante Ergebnisse wurden durch Sternchen gekennzeichnet (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ ).

Im Folgenden wurden die Ergebnisse zwischen den einzelnen PeCa-Zelllinien bezüglich der Immigration von Granulozyten in das Epithel (Abbildung 22, A & E) als auch in die Kollagen-Fibroblasten-Schicht (Abbildung 22, C & G) verglichen.

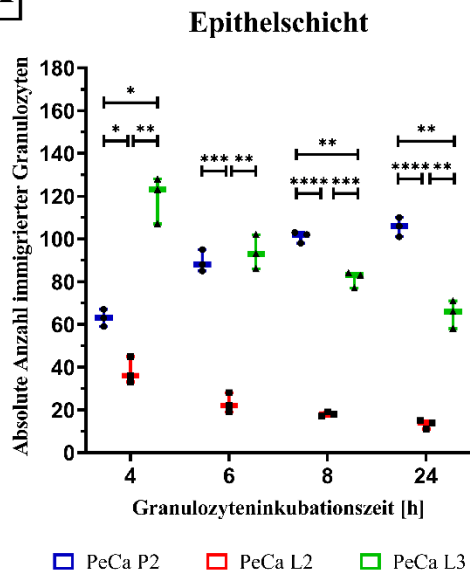
Die absolute Anzahl ins Epithel immigrierter Granulozyten in 3D-Kulturen mit der PeCa-Zelllinie P2 steigt mit zunehmender Inkubationszeit an (Abbildung 22, A). Im Gegensatz dazu nimmt sie in Kulturen mit den Zelllinien L2 und L3 im zeitlichen Verlauf ab. Hinsichtlich der absoluten Anzahl eingewanderter Granulozyten zeigen sich erhebliche Unterschiede: Während sich nach vier Stunden im Epithel der Kultur mit L3 am meisten Granulozyten befinden, sind es bei L2 am wenigsten. Diese Rangfolge verändert sich acht Stunden nach Granulozytenapplikation durch Anstieg der Granulozytenzahl bei P2 und gleichzeitigem Abfall bei L3 zugunsten der Primärtumorzelllinie. Des Weiteren wandern bei L3, im Vergleich zu L2, trotz graphisch ähnlicher Einwanderungskinetik deutlich mehr Granulozyten in die Epithelschicht ein. Wertet man nun das Granulozytenmigrationsverhalten im Epithel statistisch zwischen jeweils zwei Zelllinien nach jeweils gleicher Migrationszeit aus, ergeben sich im Vergleich zwischen P2 und L2 beziehungsweise L2 und L3 in allen Fällen signifikante Unterschiede (Abbildung 22, B). Dieses Ergebnis lässt sich ebenfalls auf den Vergleich zwischen P2 und L3, mit Ausnahme sechs Stunden nach Applikation der Granulozyten (Abbildung 22, B:  $p = 0,7323$ ), übertragen. Konzentriert man sich auf die Kollagen-Fibroblasten-Schicht, erhöht sich die Anzahl eingewanderter Granulozyten mit zunehmender Inkubationszeit bei allen drei Zelllinien (Abbildung 22, C). Die Granulozytenzunahme ist bei P2 und L3 deutlich stärker ausgeprägt als bei L2. Vergleichend zur Epithelschicht sind nach vier Stunden in 3D-Kulturen mit der PeCa-Zelllinie L3 die meisten und im Falle der Zelllinie L2 die wenigsten Granulozyten lokalisiert. Allerdings kommt es in der Kollagen-Fibroblasten-Schicht bereits nach sechsständiger Granulozyteninkubation zur Änderung der Rangfolge, die dann P2 anführt. Wird das Granulozytenmigrationsverhalten in der Kollagen-Fibroblasten-Schicht statistisch zwischen jeweils zwei Zelllinien nach jeweils gleicher Migrationszeit ausgewertet, sind die Ergebnisse im Vergleich zwischen P2 und L2 beziehungsweise L2 und L3 in allen Fällen hoch signifikant (Abbildung 22, D). Im Gegensatz dazu zeigen sich im Vergleich zwischen P2 und L3 lediglich nach vier Stunden ( $p = 0,0048$ ) und nach vierundzwanzig Stunden ( $p = 0,0461$ ) signifikante Unterschiede (Abbildung 22, D).

Während bei allen drei Zelllinien der Anteil eingewanderter Granulozyten im Epithel mit zunehmender Inkubationszeit abnimmt (Abbildung 22, E), steigt er parallel in der Kollagen-Fibroblasten-Schicht an (Abbildung 22, G). Signifikante Differenzen des Granulozytenanteils sind zwischen P2 und L2 nach vier Stunden ( $p = 0,0079$ ), zwischen L2 und L3 nach acht Stunden ( $p = 0,0305$ ) und zwischen P2 und L3 nach vierundzwanzig Stunden ( $p = 0,0373$ ) nachweisbar (Abbildung 22, F & H).

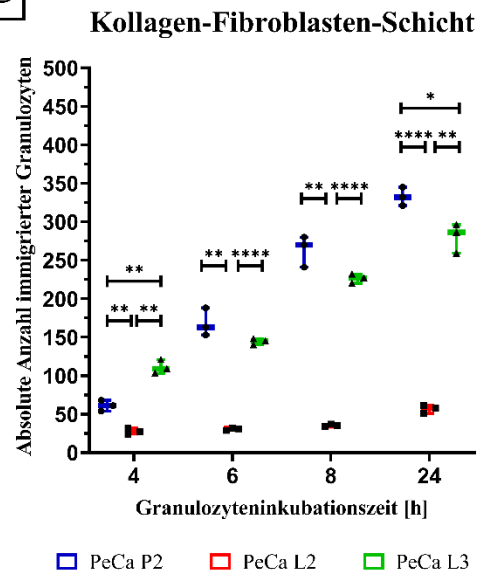
Diese Ergebnisse belegen signifikante Unterschiede bezüglich der Immigration der Granulozyten sowohl zwischen den verwendeten PeCa-Zelllinien, den Zeitpunkten als auch den 3D-Kultur-Schichten. Aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe geht hervor, dass insbesondere die beiden PeCa-Zelllinien P2 und

L3, mit hoher Aktivität viraler Onkoproteine und Expression von p63, deutlich mehr CXCL8 exprimierten als die Zelllinie L2. Weitere Pilotversuche zeigten ebenfalls eine erhöhte Expression an CXCL1, CXCL5, G-CSF und GM-CSF, alle vier wirken chemotaktisch auf Granulozyten, in 3D-Kulturen mit den Zelllinien P2 und L3 im Vergleich zu L2 (Bernhard, 2019). Damit liegt im Falle der PeCa-Zelllinien P2 und L3 ein Zytokinmilieu vor, welches besonders stark die Immigration von Granulozyten fördern sollte. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen dies.

**A**



**C**



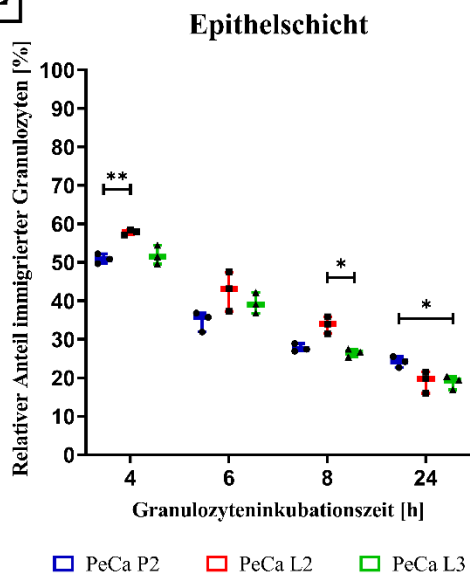
**B**

	P2 ↔ L2	P2 ↔ L3	L2 ↔ L3
4 h	0,0147	0,013	0,0025
6 h	0,0002	0,7323	0,0015
8 h	< 0,0001	0,0059	0,0007
24 h	< 0,0001	0,0033	0,0054

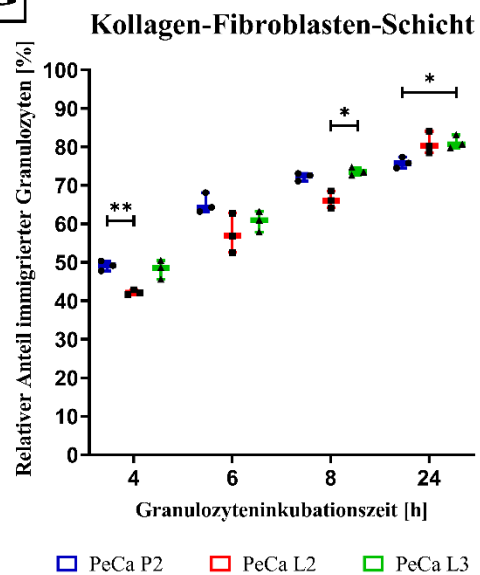
**D**

	P2 ↔ L2	P2 ↔ L3	L2 ↔ L3
4 h	0,0095	0,0048	0,0023
6 h	0,0099	0,2557	< 0,0001
8 h	0,0044	0,1389	< 0,0001
24 h	< 0,0001	0,0461	0,0025

**E**



**G**



**F**

	P2 ↔ L2	P2 ↔ L3	L2 ↔ L3
4 h	0,0079	0,8474	0,0811
6 h	0,1913	0,2076	0,6335
8 h	0,0503	0,3693	0,0305
24 h	0,1407	0,0373	0,992

**H**

	P2 ↔ L2	P2 ↔ L3	L2 ↔ L3
4 h	0,0079	0,8474	0,0811
6 h	0,1913	0,2076	0,6335
8 h	0,0503	0,3693	0,0305
24 h	0,1407	0,0373	0,992

**Abbildung 22: Absolute Anzahl und relativer Anteil immigrierter Granulozyten im Zelllinienvergleich.** In der CD15-spezifischen Immunhistochemie (Abbildung 17) wurde die Anzahl eingewanderter Granulozyten pro Inkubationszeit in drei unabhängigen Bildausschnitten pro Kultur für

die Zelllinien PeCa P2 (blau), PeCa L2 (rot) und PeCa L3 (grün) bestimmt. Dabei wurde unterschieden, ob sich die Granulozyten im Epithel [A & E] oder der Kollagen-Fibroblasten-Schicht [C & G] befinden. Die Ergebnisse wurden graphisch als *interleaved box and whiskers* sowohl in absoluten [A & C] als auch in relativen [E & G] Zahlen dargestellt. Zur Berechnung der relativen Zahlen wurde die gezählte Anzahl immigrierter Granulozyten in der Epithel- beziehungsweise Kollagen-Fibroblasten-Schicht in Relation zur Gesamtzahl eingewanderter Granulozyten gesetzt. Neben Boxplots werden die gezählten Einzelwerte beziehungsweise berechneten Relationen abgebildet. Die Signifikanzen wurden mittels two-way ANOVA für Mehrfachvergleiche mit Korrektur nach Turkey berechnet. P-Werte resultierend aus dem Vergleich der absoluten Anzahl immigrierter Granulozyten nach gleicher Inkubationszeit zwischen zwei verschiedenen Zelllinien werden für die Epithelschicht in [B] beziehungsweise für die Kollagen-Fibroblasten-Schicht in [D] gezeigt. Während in [F] p-Werte bei Vergleich des relativen Anteils immigrierter Granulozyten nach gleicher Inkubationszeit zwischen zwei verschiedenen Zelllinien für die Epithelschicht aufgelistet sind, ist Gleiches für die Kollagen-Fibroblasten-Schicht in [H] zu sehen. Signifikante Ergebnisse wurden durch Sternchen gekennzeichnet (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ ).

### 5.5 Aktivierung von AKT in organotypischen 3D-Kulturen mit den HPV-positiven PeCa-Zelllinien P2, L2 und L3

AKT reguliert als zentrales Signalprotein des sowohl durch EGFR als auch durch EMMPRIN aktivierten PI3K/AKT-Signalwegs Proliferation, Differenzierung, Migration und Überleben der Zellen und fördert durch gesteigerte VEGF-Expression die Tumorangiogenese (Stankiewicz, Prowse, Ng, et al., 2011; Y. Tang et al., 2006).

Nachdem im 2D-Zellkulturmodell eine Aktivierung der Tumorzellen durch direkten Kontakt zu Granulozyten nachgewiesen werden konnte, stellte sich die Frage, ob sich diese Beobachtung ebenfalls im 3D-Zellkulturmodell zeigt. Zunächst wurde analysiert, ob sich pAKT in organotypischen 3D-Kulturen mit den HPV-positiven PeCa-Zelllinien P2, L2 und L3 nachweisen lässt und welchen Einfluss Granulozyten auf diese Aktivierung haben. Hierzu wurden FFPE-Schnitte organotypischer 3D-Kulturen mit Granulozyten gegenüber Kulturen ohne Granulozyten immunhistochemisch auf die Expression von pAKT und CD15 untersucht (Abbildung 23).

In der granulozytenlosen Kultur (Kontrollkultur) mit der Peniskarzinomzelllinie P2 ist eine schwache, am ehesten zytoplasmatisch lokalisierte, pAKT-spezifische Braunfärbung im gesamten Epithel feststellbar. Bei genauerer Betrachtung zeigen zudem vereinzelte, diffus in der Epithelschicht lokalisierte Tumorzellen eine nukleäre Aktivierung von AKT. Bei P2 ist in Versuchskulturen (3D-Kulturen mit Granulozyten), die vier oder sechs Stunden nach Granulozytenzugabe fixiert wurden, eine nukleäre pAKT-Expression in Tumorzellen der obersten Epithelreihe sowie gehäuft in Granulozyten umgebenden Tumorzellen des unteren Epitheldrittels detektierbar. Da die Granulozyten von oben auf die Kulturen gegeben wurden und nun nach kurzer Inkubationszeit vermehrt pAKT im oberen Epitheldrittel nachgewiesen werden konnte, deutet dies auf einen positiven Einfluss der Granulozyten auf die Aktivierung von AKT hin. Nichtsdestotrotz darf nicht außer Acht gelassen werden, dass sich diese Beobachtung ebenfalls durch ein technisches Artefakt begründen ließe: In den oberen Epithelschichten befinden sich mit höherer Wahrscheinlichkeit tote Zellen, welche den Antikörper

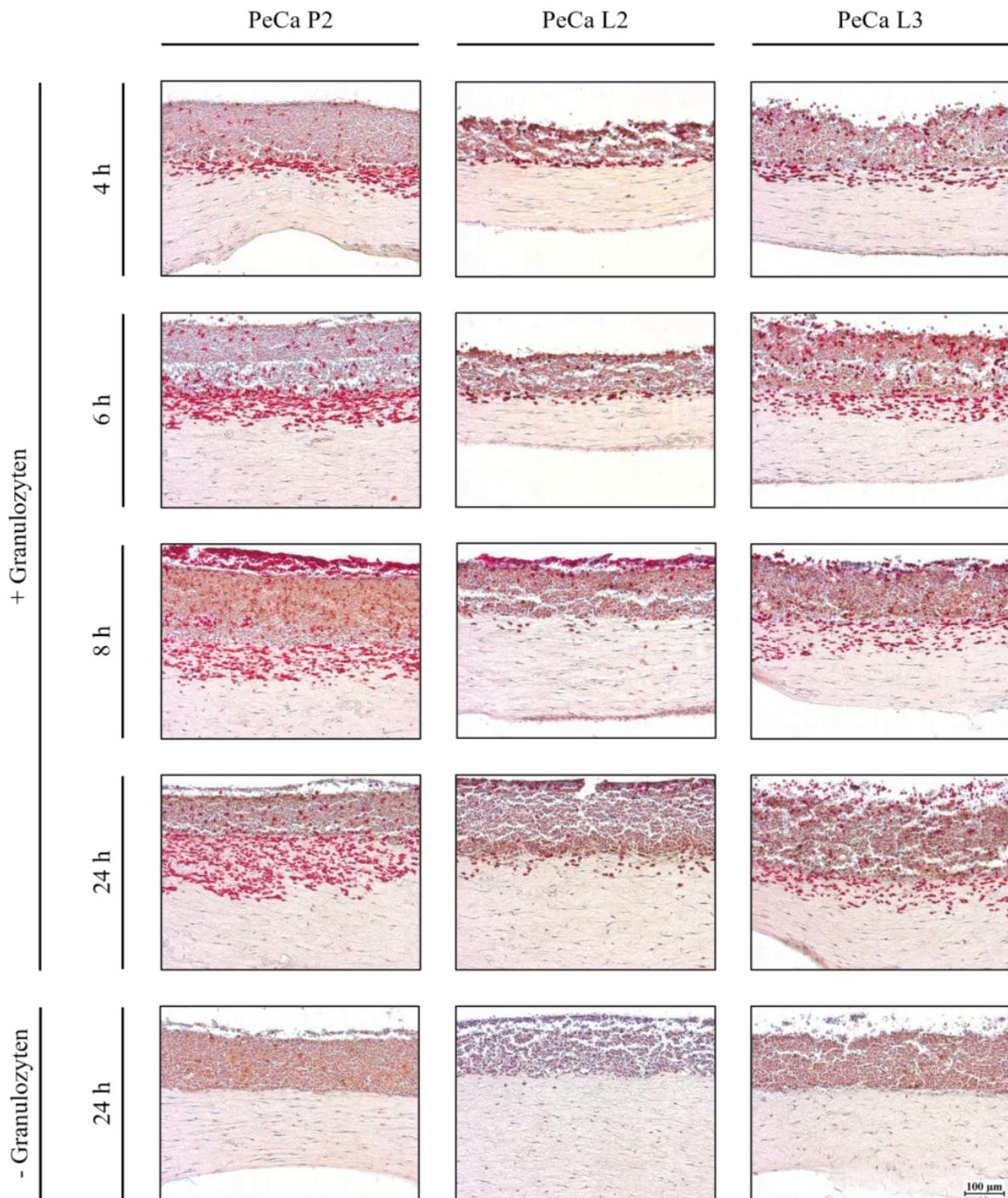
unspezifisch aufnehmen, wodurch der gesteigerte pAKT-Nachweis im oberen Epitheldrittel ebenfalls erklärt werden könnte. Die Anzahl bräunlich gefärbter und somit pAKT-positiver Tumorzellnuklei erhöht sich in der Kultur mit P2, die acht Stunden nach Zugabe der Granulozyten fixiert wurde, im Vergleich zu kürzeren Inkubationszeiten sichtlich. Hierbei ist auffällig, dass die bräunlich gefärbten, in allen Epithelschichten lokalisierten Tumorzellen beinahe perlschnurartig angeordnet sind und diagonal von apikal nach basal verlaufen. Damit ähneln sie dem von apikal nach basal gerichteten Einwanderungsverhalten der Granulozyten. Bei P2 zeigt die Versuchskultur nach vierundzwanzigstündiger Granulozyteninkubation wiederholt eine nukleäre AKT-Aktivierung einzelner Tumorzellen im gesamten Epithel hauptsächlich in unmittelbarer Nachbarschaft zu Granulozyten. Im Falle von 3D-Kulturen mit PeCa P2 ist die Mehrheit der immigrierten Granulozyten, unabhängig der Inkubationszeit und Immigrationstiefe, sowohl magentafarben als auch bräunlich gefärbt und exprimiert demzufolge neben CD15 auch pAKT.

Bei PeCa L2 ist in der Kultur ohne Granulozyten keine Phosphorylierung von AKT im Epithel erkennbar. Dagegen zeigt sich in Versuchskulturen nach vier- und sechsständiger Inkubation ein nukleärer pAKT-Nachweis in zahlreichen Tumorzellen der Zelllinie L2, die vorrangig in der oberen Epithelhälfte lokalisiert sind. Acht Stunden nach Immigration der Granulozyten sind bei PeCa L2 einzelne Tumorzellnuklei in verschiedenen Epithelschichten, hauptsächlich im mittleren Epitheldrittel, bräunlich gefärbt und AKT somit phosphoryliert. Die nukleäre AKT-Aktivierung beschränkt sich in der Versuchskultur mit L2, die vierundzwanzig Stunden nach Granulozytenzugabe fixiert wurde, auf Zellkerne des unteren Epitheldrittels. Dementsprechend ist pAKT im Falle von PeCa L2 immer in den Epithelschichten nachweisbar, in denen sich laut CD15-Färbung der Großteil der Granulozyten aufhält und deckt sich folglich mit dem Einwanderungsverhalten der Granulozyten. In 3D-Kulturen mit der Zelllinie L2 zeigen nahezu alle Granulozyten über die Zeit eine rotbraune Färbung, sodass AKT in Granulozyten aktiviert vorliegt.

Die Kontrollkultur mit der Peniskarzinomzelllinie L3 zeigt, vergleichend zu PeCa P2, eine dezente zytoplasmatisch lokalisierte pAKT-spezifische Braunfärbung im gesamten Epithel sowie eine nukleäre Aktivierung von AKT in einzelnen diffus lokalisierten Tumorzellen. Lässt man Granulozyten in die Kultur immigrieren, ist pAKT sowohl nach vier Stunden als auch nach sechs Stunden in zahlreichen, sich vor allem im direkten Umfeld von Granulozyten befindenden Tumorzellen der Zelllinie L3 nachweisbar. Mit zunehmender Inkubationszeit der Granulozyten verschiebt sich die AKT-Aktivierung vom oberen ins untere Epitheldrittel der 3D-Kulturen mit PeCa L3 und spiegelt demnach das von apikal nach basal gerichtete Migrationsverhalten der Granulozyten wider. Bei L3 ist der Großteil der immigrierten Granulozyten, unabhängig der Inkubationszeit und Immigrationstiefe, magentafarben und bräunlich gefärbt, sodass Granulozyten neben CD15 auch pAKT exprimieren.

Im Zelllinienvergleich ist anzumerken, dass PeCa P2 und L3 in Kontrollkulturen eine vergleichbar intensive, pAKT-spezifische Braunfärbung des Epithels zeigen, während bei L2 keine pAKT-

Expression in der Epithelschicht nachweisbar ist. In Versuchskulturen mit geringer Inkubationszeit der Granulozyten ist die stärkste Aktivierung von AKT zunächst bei L2, gefolgt von L3 und P2, detektierbar. Diese Rangfolge kehrt sich spätestens nach acht Stunden zugunsten von P2 um und wird nach vierundzwanzig Stunden von L3 angeführt. Die nukleäre Braunfärbung für pAKT ist bei allen drei PeCa-Zelllinien, abhängig von der Inkubationsdauer der Granulozyten, hauptsächlich im oberen oder unteren Epitheldrittel lokalisiert. Somit lassen die Beobachtungen dieses Versuches in Zusammenschau mit den Ergebnissen der CD15-Färbung (Abbildung 17) den Rückschluss zu, dass die pAKT-Färbung in den Tumorzellen der drei verschiedenen PeCa-Zelllinien dem Einwanderungsverhalten der Granulozyten zu folgen scheint. Des Weiteren erscheinen Granulozyten über die Zeit bei allen drei PeCa-Zelllinien, jedoch vor allem bei L2, in einem Mischfarbton aus magentafarben und braun. Dies deutet auf eine Expression von pAKT und CD15 bei Granulozyten hin. Infolgedessen scheinen unter diesen Kulturbedingungen und unabhängig der verwendeten PeCa-Zelllinie AKT-involvierende Signalwege in Granulozyten aktiv zu sein. VHF sind bei PeCa P2, L2 und L3 sowohl in Kulturen mit als auch ohne Granulozyten sowie über alle Zeitpunkte hinweg schwach bräunlich gefärbt, sodass von einer basalen AKT-Aktivierung ausgegangen werden kann.

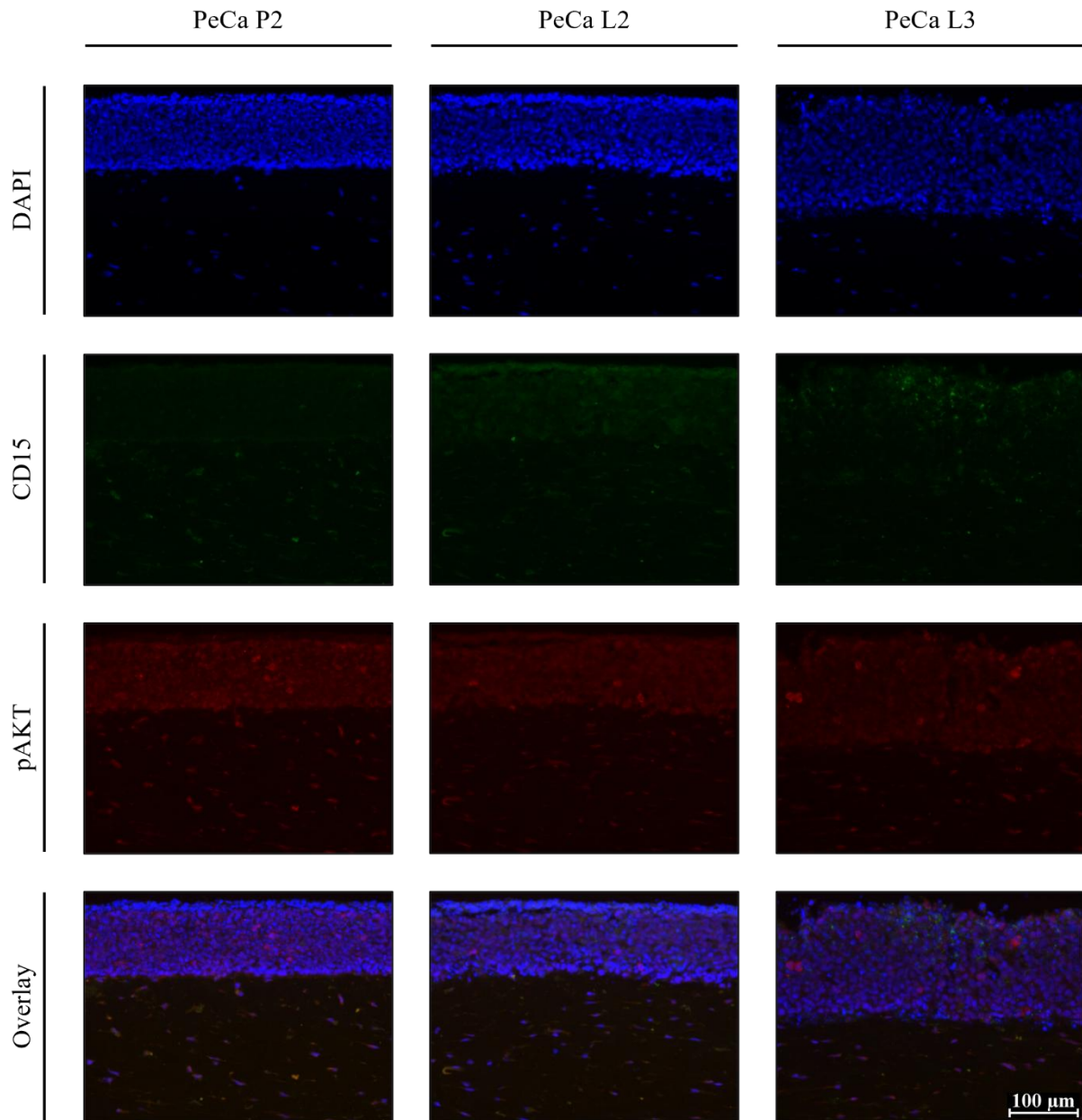


**Abbildung 23: Nachweis von pAKT (Thr308) und CD15 mittels Immunhistochemie.** Organotypische 3D-Kulturen mit den Peniskarzinomzelllinien P2, L2 und L3 wurden für 14 Tage kultiviert. Anschließend wurden je  $5 \times 10^6$  frisch isolierte Granulozyten von oben auf die Versuchskulturen gegeben und 4, 6, 8 oder 24 Stunden nach Granulozytenzugabe fixiert. Die Kontrollkulturen wurden lediglich mit 1x PBS behandelt und nach 24 Stunden fixiert. Um den Einfluss der Granulozyten auf die Aktivierung von AKT beurteilen zu können, wurde eine immunhistochemische Doppelfärbung durchgeführt. Die Detektion des pAKT-spezifischen Primärantikörpers erfolgte durch Verwendung eines Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers. Durch Zugabe der DAB-Peroxidase-Substratlösung entstand die Braunfärbung. Der CD15-spezifische Primärantikörper wurde mithilfe eines Alkalische-Phosphatase-gekoppelten Sekundärantikörpers detektiert. Das Hinzufügen der Red-Alkaline-Phosphatase-Substratlösung führte zur magentafarbenen Farbreaktion. Die Zellkerne wurden mit Hämatoxylin blau gefärbt. Die Fotodokumentation erfolgte mittels Leica DMI6000 B

Forschungsmikroskop bei zweihundertfacher Vergrößerung. Repräsentative Bilder aus drei Färbungen einer Kultur werden gezeigt. CD = *cluster of differentiation*, DAB = 3,3'-Diaminobenzidin, pAKT = phosphorylierte Proteinkinase B.

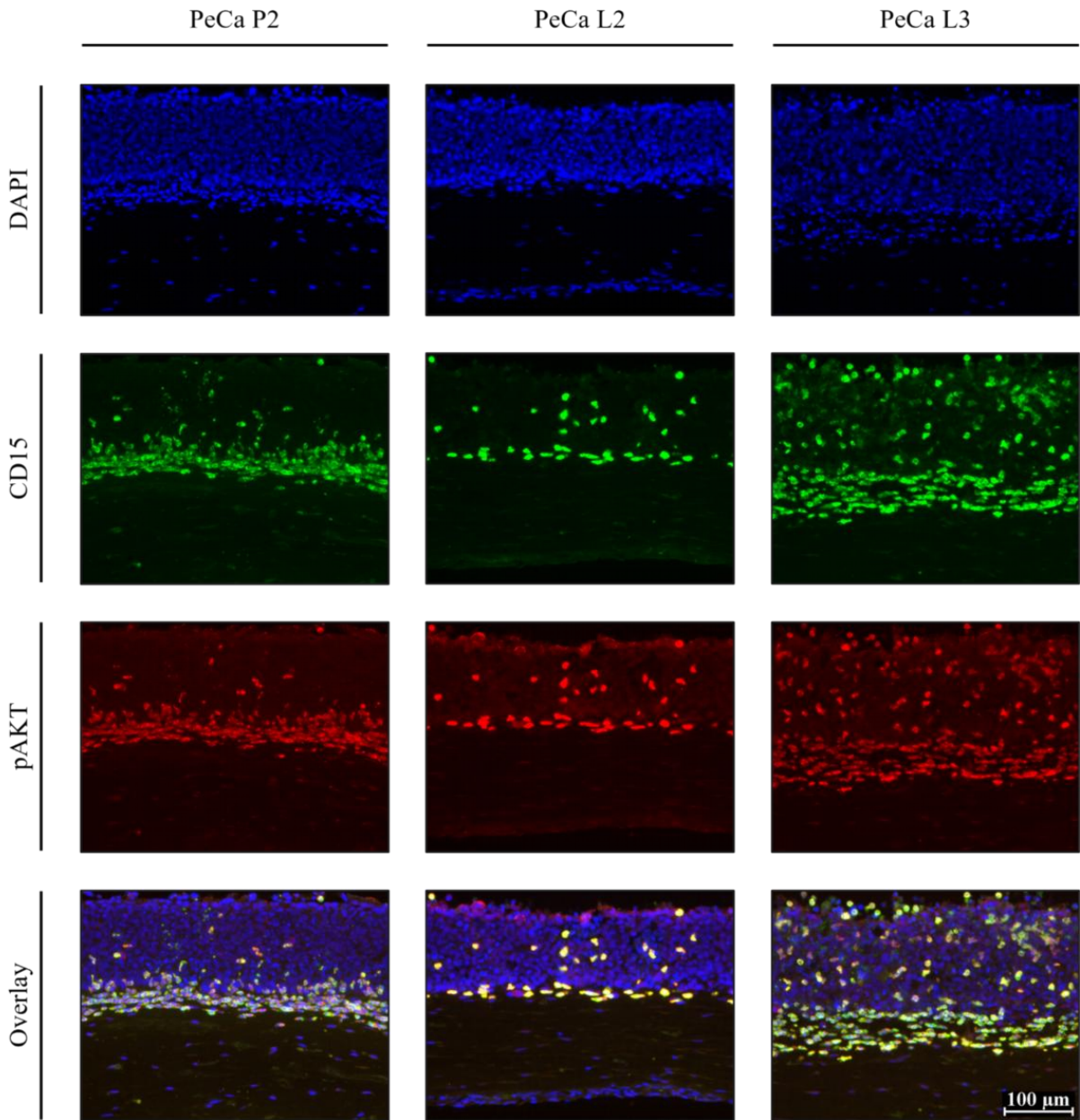
Da die rotbraunen Farbtöne der Immunhistochemie (Abbildung 23) nur bedingt voneinander unterschieden werden können, wurde im Anschluss eine Immunfluoreszenzfärbung, die sich besser zur Visualisierung von Doppelfärbungen eignet, mit pAKT und CD15 durchgeführt (Abbildungen 24 bis 31).

Wird der Fokus zunächst auf die granulozytenlosen Kontrollkulturen (Abbildung 24) gerichtet, zeigt sich bei PeCa P2, L2 und L3 ein basales Aktivierungslevel für AKT im gesamten Epithel. Sporadisch ist eine nukleäre Signalzunahme der rotfarbenen, pAKT-spezifischen Immunfluoreszenz erkennbar, die bei PeCa P2 und L3 diffus im Epithel verteilt ist und sich bei L2 in der unteren Epithelhälfte befindet. Diese Beobachtung lässt sich am ehesten durch tote Zellen erklären, die den Antikörper unspezifisch aufnehmen und so zu einem vermeintlichen pAKT-Nachweis führen. Erwartungsgemäß ist in 3D-Kulturen ohne Granulozyten keine Expression des Granulozytenmarkers CD15 detektierbar. Bei VHF fällt das rotfarbene Fluoreszenzsignal für pAKT, unabhängig der verwendeten PeCa-Zelllinie, schwach aus.



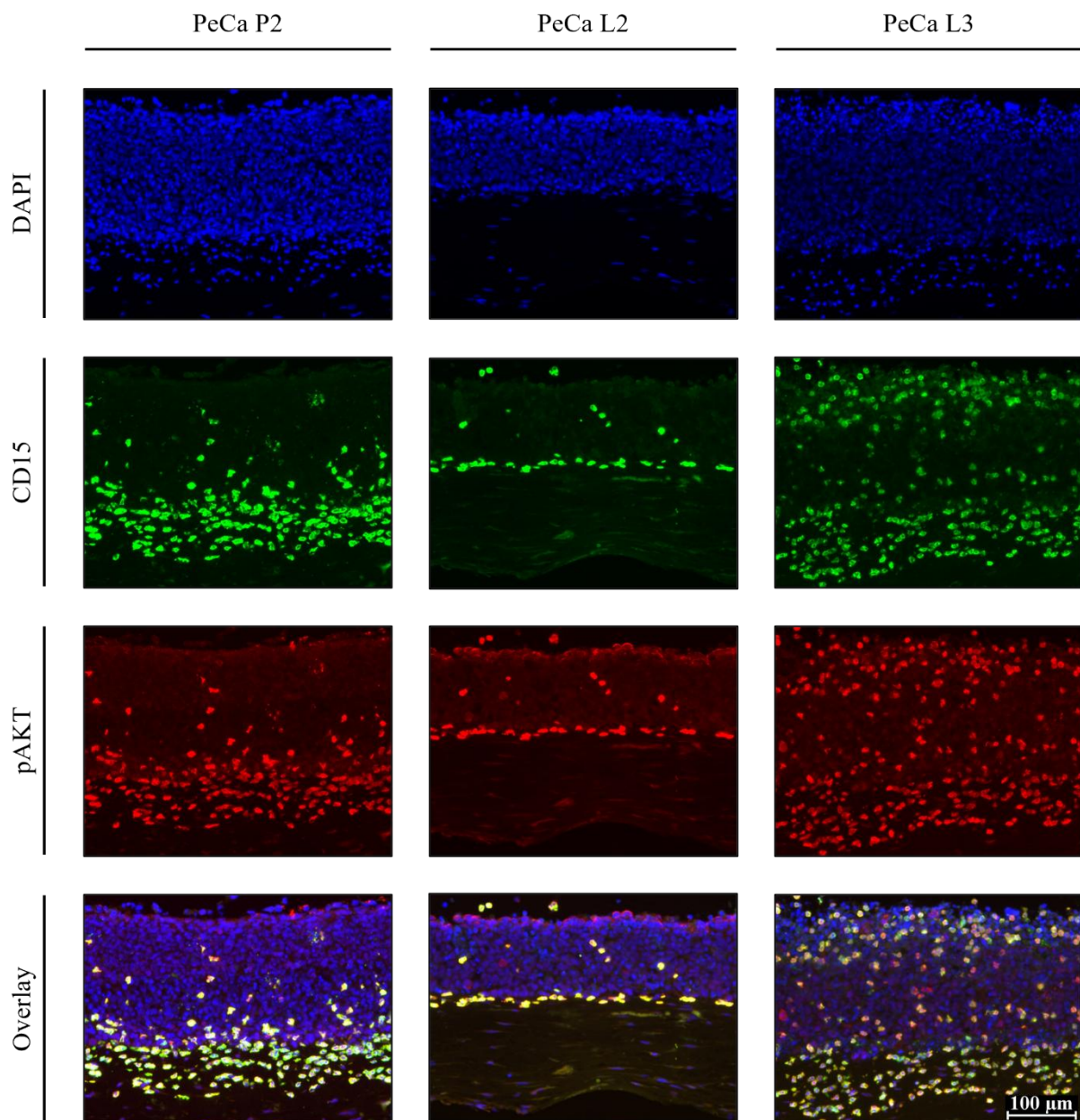
**Abbildung 24: Nachweis von pAKT (Thr308) und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen ohne Granulozyten mittels Immunfluoreszenz.** Organotypische 3D-Kulturen mit den Peniskarzinomzelllinien P2, L2 und L3 wurden für 14 Tage kultiviert. Die hier abgebildeten Kontrollkulturen wurden mit 1x PBS behandelt und nach 24 Stunden fixiert. Die Detektion des pAKT-spezifischen Primärantikörpers erfolgte mittels Alexa Fluor 546-markiertem Sekundärantikörper. Der CD15-spezifische Primärantikörper wurde mithilfe eines Alexa Fluor 488-markierten Sekundärantikörpers detektiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI (1:50000) gefärbt. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mithilfe des Leica DMI6000 B Forschungsmikroskops (zweihundertfache Bildvergrößerung) fotodokumentiert. Abgebildet werden Immunfluoreszenz, CD15-Färbung und nukleäre DAPI-Färbung sowie deren Overlay. Repräsentative Bilder aus drei Färbungen einer Kultur werden gezeigt. CD = *cluster of differentiation*, DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, pAKT = phosphorylierte Proteinkinase B.

In organotypischen 3D-Kulturen, die vier Stunden nach Zugabe der Granulozyten fixiert wurden (Abbildung 25), ist bei allen drei PeCa-Zelllinien, jedoch am stärksten bei PeCa L2, ein dezentes, rotfarbenes, pAKT-spezifisches Fluoreszenzsignal in der gesamten Epithelschicht sichtbar. Durch Expression des Markers CD15 lassen sich Granulozyten eindeutig identifizieren. Während bei PeCa L2 alle immigrierten Granulozyten neben CD15 auch pAKT exprimieren, demzufolge doppelt positiv sind und durch Überlagerung der grünen CD15- und rotfarbenen pAKT-Fluoreszenz eine gelbe Färbung zeigen, trifft dies in 3D-Kulturen mit P2 und L3 lediglich auf die Mehrheit, aber nicht auf alle Granulozyten zu. Demzufolge scheinen, unabhängig der verwendeten PeCa-Zelllinie, AKT-abhängige Signalwege in Granulozyten aktiv zu sein. Bei genauerer Betrachtung liegt in der Epithelschicht aller drei PeCa-Zelllinien, insbesondere bei L3, keine vollständige Deckungsgleichheit der beiden Immunfluoreszenzfärbungen vor, sodass sich mehrfach ein an Granulozyten grenzendes, rotfarbenes, pAKT-spezifisches Signal erkennen lässt. Infolgedessen zeigt sich in penilen Tumorzellen, die sich in der Nähe der Granulozyten befinden, unabhängig der verwendeten PeCa-Zelllinie, allerdings vor allem bei L3, ein gesteigerter pAKT-Nachweis. VHF weisen bei allen drei PeCa-Zelllinien nicht nur in Kulturen mit Granulozyten, sondern auch in Kulturen ohne Granulozyten lediglich ein basales Aktivierungslevel für AKT auf.



**Abbildung 25: Nachweis von pAKT (Thr308) und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen mit Granulozyten für 4 Stunden mittels Immunfluoreszenz.** Organotypische 3D-Kulturen mit den Peniskarzinomzelllinien P2, L2 und L3 wurden für 14 Tage kultiviert. Im Anschluss wurden je  $5 \times 10^6$  frisch isolierte Granulozyten von oben auf die Versuchskulturen gegeben und 4 Stunden nach Granulozytenzugabe fixiert. Der Einfluss der Granulozyten auf die Phosphorylierung von AKT (Thr308) wurde mittels Immunfluoreszenz-Doppelfärbung analysiert. Die Detektion des pAKT-spezifischen Primärantikörpers erfolgte mithilfe eines Alexa Fluor 546-markierten Sekundärantikörpers. Der CD15-spezifische Primärantikörper wurde mittels Alexa Fluor 488-markiertem Sekundärantikörper detektiert. Zur Darstellung der Zellkerne wurde DAPI (1:50000) verwendet. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mithilfe des Leica DMI6000 B Forschungsmikroskops (zweihundertfache Bildvergrößerung) fotodokumentiert. Gezeigt werden Immunfluoreszenz, CD15-Färbung und nukleäre DAPI-Färbung sowie deren Overlay. Repräsentative Bilder aus drei Färbungen einer Kultur werden abgebildet. CD = *cluster of differentiation*, DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, pAKT = phosphorylierte Proteinkinase B.

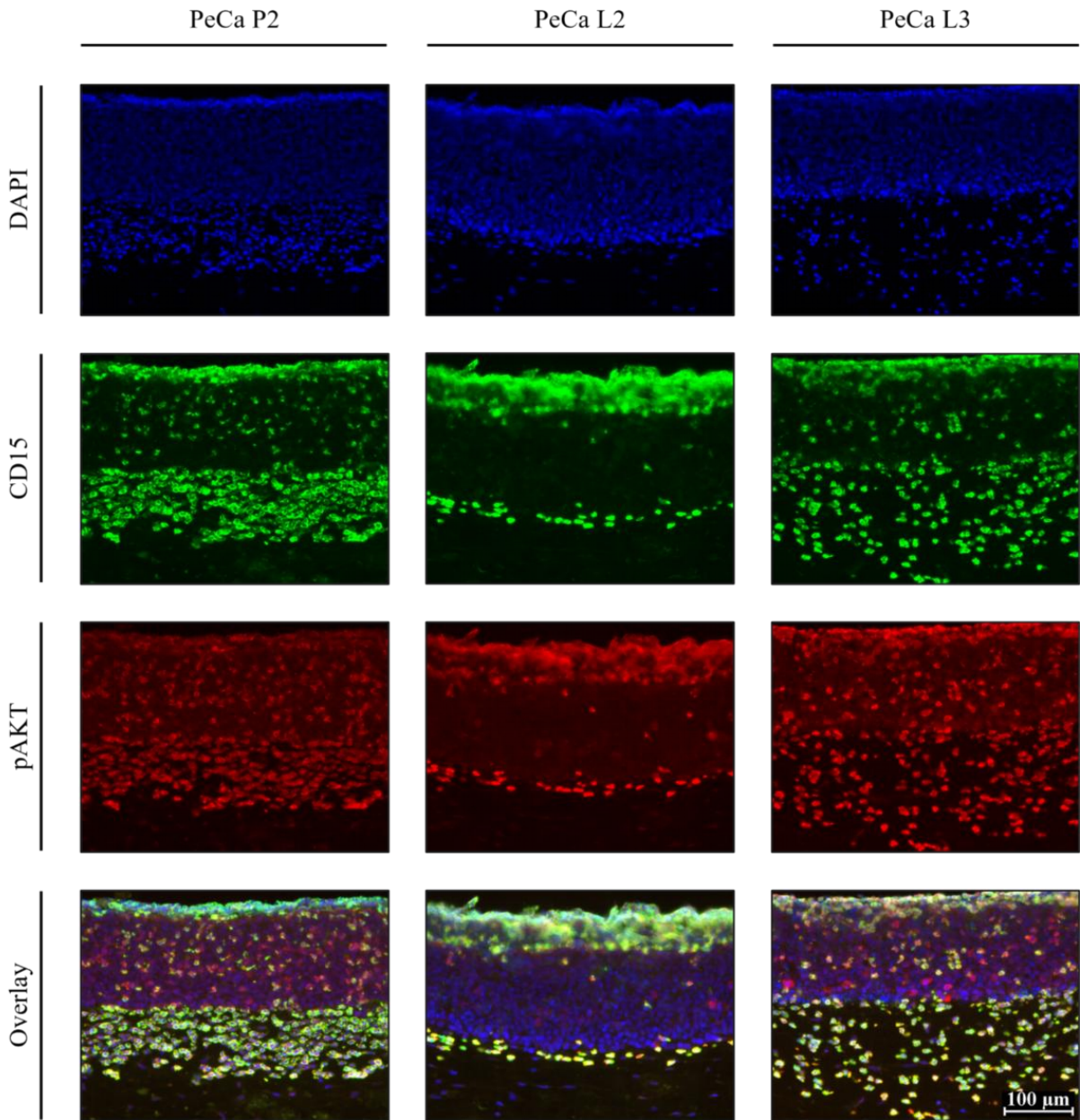
Sechs Stunden nach Immigration der Granulozyten (Abbildung 26) zeigen Kulturen mit PeCa P2, L2 und L3 erneut ein basales Aktivierungslevel für AKT im gesamten Epithel mit einem gesteigerten, rotfarbenen, pAKT-spezifischen Fluoreszenzsignal im oberen Epitheldrittel bei PeCa L2. Während bei P2 und L3 lediglich der Großteil der Granulozyten sowohl CD15 als auch pAKT exprimiert, sind bei L2 ausnahmslos alle eingewanderten Granulozyten doppelt positiv. Vergleichend zu 3D-Kulturen nach vierstündiger Inkubation sind die CD15- und pAKT-Färbungen im Epithel aller drei PeCa-Zelllinien, jedoch vor allem bei L3, nicht vollkommen kongruent. Demnach liegt hier AKT in Granulozyten umgebenden Tumorzellen phosphoryliert und somit aktiviert vor.



**Abbildung 26: Nachweis von pAKT (Thr308) und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen mit Granulozyten für 6 Stunden mittels Immunfluoreszenz.** Organotypische 3D-Kulturen mit den Peniskarzinomzelllinien P2, L2 und L3 wurden für 14 Tage kultiviert. Anschließend wurden je  $5 \times 10^6$  frisch isolierte Granulozyten von oben auf die Versuchskulturen gegeben und 6 Stunden nach Granulozytenzugabe fixiert. Um den Einfluss der Granulozyten auf die Aktivierung von AKT (Thr308)

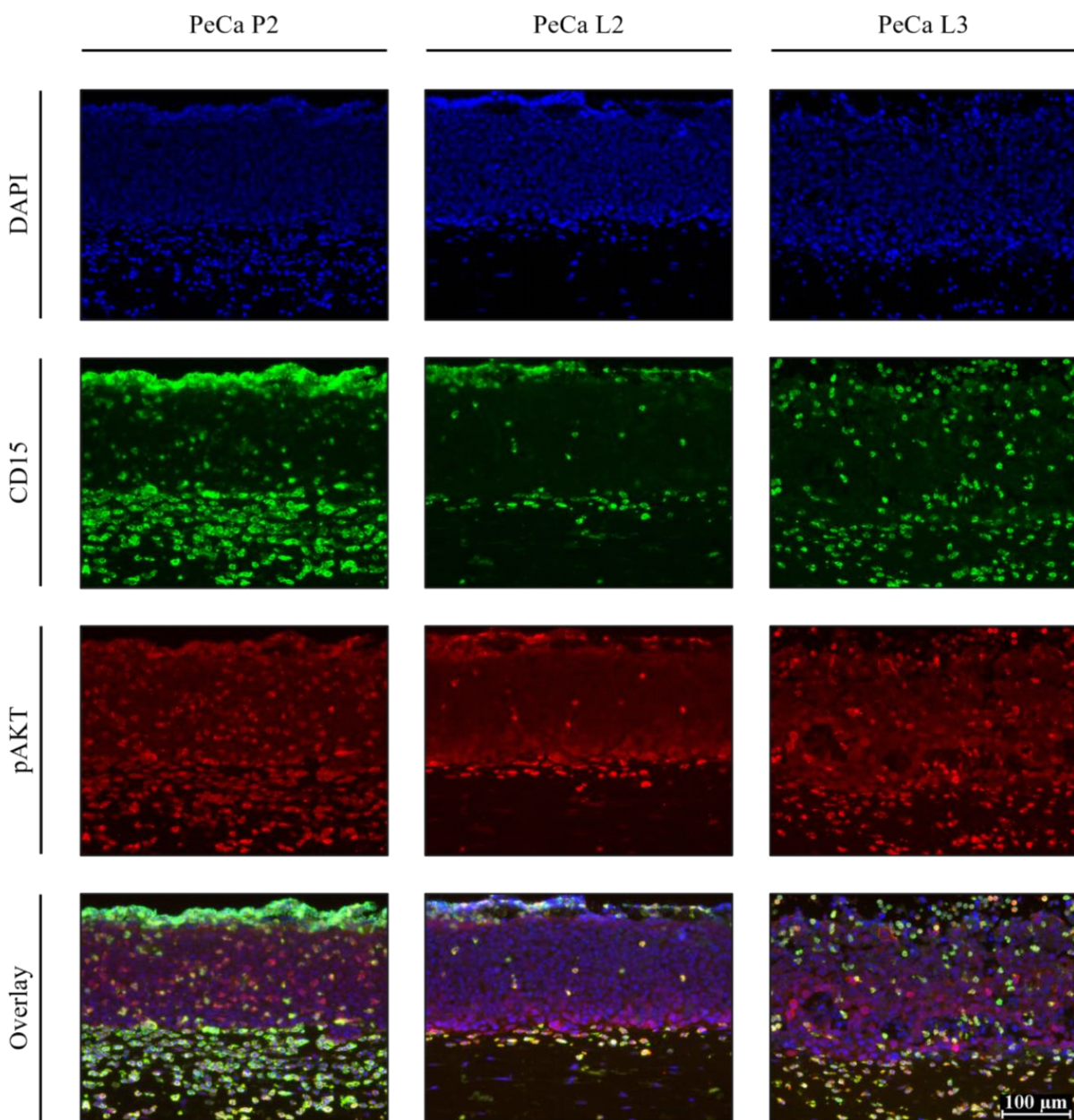
beurteilen zu können, wurde eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung durchgeführt. Die Detektion des pAKT-spezifischen Primärantikörpers erfolgte mittels Alexa Fluor 546-markiertem Sekundärantikörper. Der CD15-spezifische Primärantikörper wurde mithilfe eines Alexa Fluor 488-markierten Sekundärantikörpers detektiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI (1:50000) gefärbt. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mithilfe des Leica DMI6000 B Forschungsmikroskops (zweihundertfache Bildvergrößerung) fotodokumentiert. Abgebildet werden Immunfluoreszenz, CD15-Färbung und nukleäre DAPI-Färbung sowie deren Overlay. Repräsentative Bilder aus drei Färbungen einer Kultur werden gezeigt. CD = *cluster of differentiation*, DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, pAKT = phosphorylierte Proteinkinase B.

Lässt man Granulozyten in 3D-Kulturen immigrieren, ist nach acht Stunden (Abbildung 27) bei allen drei PeCa-Zelllinien, jedoch am stärksten bei PeCa P2, gefolgt von L3 und schließlich L2, eine im gesamten Epithel lokalisierte AKT-Aktivierung erkennbar. Vergleichend zu den Abbildungen 25 und 26 liegt AKT bei L2 in allen eingewanderten Granulozyten in seiner aktivierten Form vor, während diese Beobachtung in den Kulturen mit P2 und L3 lediglich auf die Mehrzahl der Granulozyten zutrifft. Wiederholt sind die beiden Immunfluoreszenzfärbungen im Epithel der drei PeCa-Zelllinien nicht komplett deckungsgleich. Dadurch kann, insbesondere bei PeCa L3 und nun auch eindrücklich bei P2, in zu Granulozyten benachbarten Tumorzellen verstärkt pAKT als rotfarbene Fluoreszenz nachgewiesen werden.



**Abbildung 27: Nachweis von pAKT (Thr308) und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen mit Granulozyten für 8 Stunden mittels Immunfluoreszenz.** Organotypische 3D-Kulturen mit den Peniskarzinomzelllinien P2, L2 und L3 wurden für 14 Tage kultiviert. Im Anschluss wurden je  $5 \times 10^6$  frisch isolierte Granulozyten von oben auf die Versuchskulturen gegeben und 8 Stunden nach Granulozytenzugabe fixiert. Eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung wurde durchgeführt, um den Einfluss der Granulozyten auf die Aktivierung von AKT (Thr308) zu untersuchen. Die Detektion des pAKT-spezifischen Primärantikörpers erfolgte mittels Alexa Fluor 546-markiertem Sekundärantikörper. Der CD15-spezifische Primärantikörper wurde mithilfe eines Alexa Fluor 488-markierten Sekundärantikörpers detektiert. Zur Visualisierung der Zellkerne wurde DAPI (1:50000) verwendet. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mithilfe des Leica DMI6000 B Forschungsmikroskops (zweihundertfache Bildvergrößerung) fotodokumentiert. Dargestellt werden Immunfluoreszenz, CD15-Färbung und nukleäre DAPI-Färbung sowie deren Overlay. Repräsentative Bilder aus drei Färbungen einer Kultur werden abgebildet. CD = *cluster of differentiation*, DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, pAKT = phosphorylierte Proteinkinase B.

Nach vierundzwanzigstündiger Granulozyteninkubation (Abbildung 28) zeigen die 3D-Kulturen mit den Peniskarzinomzelllinien P2, L2 und L3 ein diffus im gesamten Epithel vorkommendes, rotfarbenes Fluoreszenzsignal für pAKT. Hervorzuheben ist dabei die gesteigerte, sich in Granulozytennähe befindende Signalintensität im unteren Epitheldrittel bei PeCa L2. Während bei L2 alle immigrierten Granulozyten sowohl CD15 als auch pAKT exprimieren, ist bei PeCa P2 und L3 lediglich der Großteil der Granulozyten doppelt positiv. Somit ist in Granulozyten, unabhängig der verwendeten PeCa-Zelllinie, AKT phosphoryliert und damit aktiviert. Erneut liegt im Epithel der drei PeCa-Zelllinien keine vollständige Deckungsgleichheit der CD15- und pAKT-Färbungen vor, sodass nicht nur bei PeCa L3 und P2, sondern neuerdings auch deutlich bei L2 in penilen Tumorzellen, die in der Umgebung von Granulozyten angesiedelt sind, pAKT verstärkt nachweisbar ist.

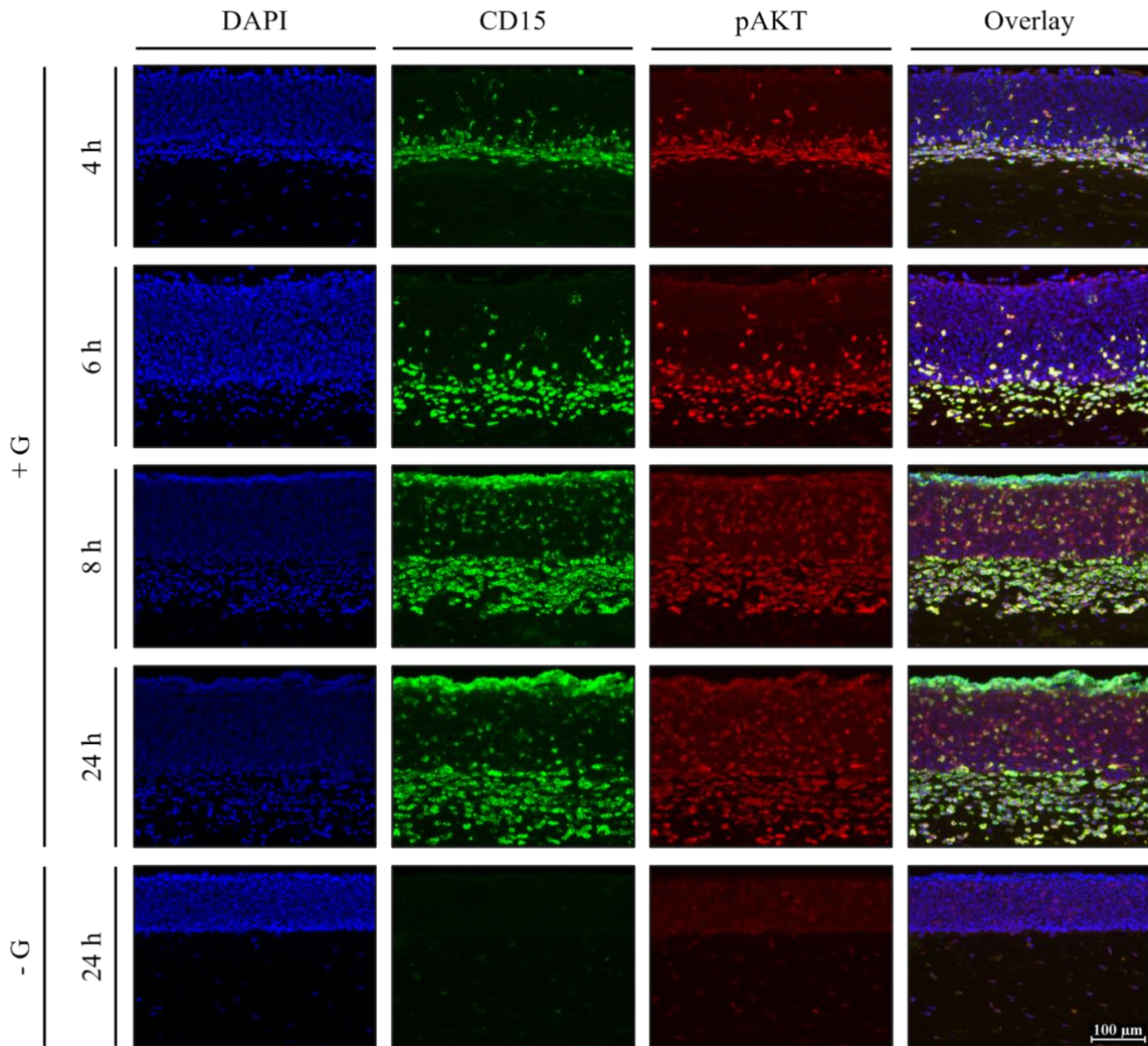


**Abbildung 28: Nachweis von pAKT (Thr308) und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen mit Granulozyten für 24 Stunden mittels Immunfluoreszenz. Organotypische 3D-Kulturen mit den**

Peniskarzinomzelllinien P2, L2 und L3 wurden für 14 Tage kultiviert. Anschließend wurden je  $5 \times 10^6$  frisch isolierte Granulozyten von oben auf die Versuchskulturen gegeben und 24 Stunden nach Granulozytenzugabe fixiert. Um den Einfluss der Granulozyten auf die Aktivierung von AKT (Thr308) beurteilen zu können, wurde eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung durchgeführt. Die Detektion des pAKT-spezifischen Primärantikörpers erfolgte mittels Alexa Fluor 546-markiertem Sekundärantikörper. Der CD15-spezifische Primärantikörper wurde mithilfe eines Alexa Fluor 488-markierten Sekundärantikörpers detektiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI (1:50000) gefärbt. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mithilfe des Leica DMI6000 B Forschungsmikroskops (zweihundertfache Bildvergrößerung) fotodokumentiert. Abgebildet werden Immunfluoreszenz, CD15-Färbung und nukleäre DAPI-Färbung sowie deren Overlay. Repräsentative Bilder aus drei Färbungen einer Kultur werden gezeigt. CD = *cluster of differentiation*, DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, pAKT = phosphorylierte Proteinkinase B.

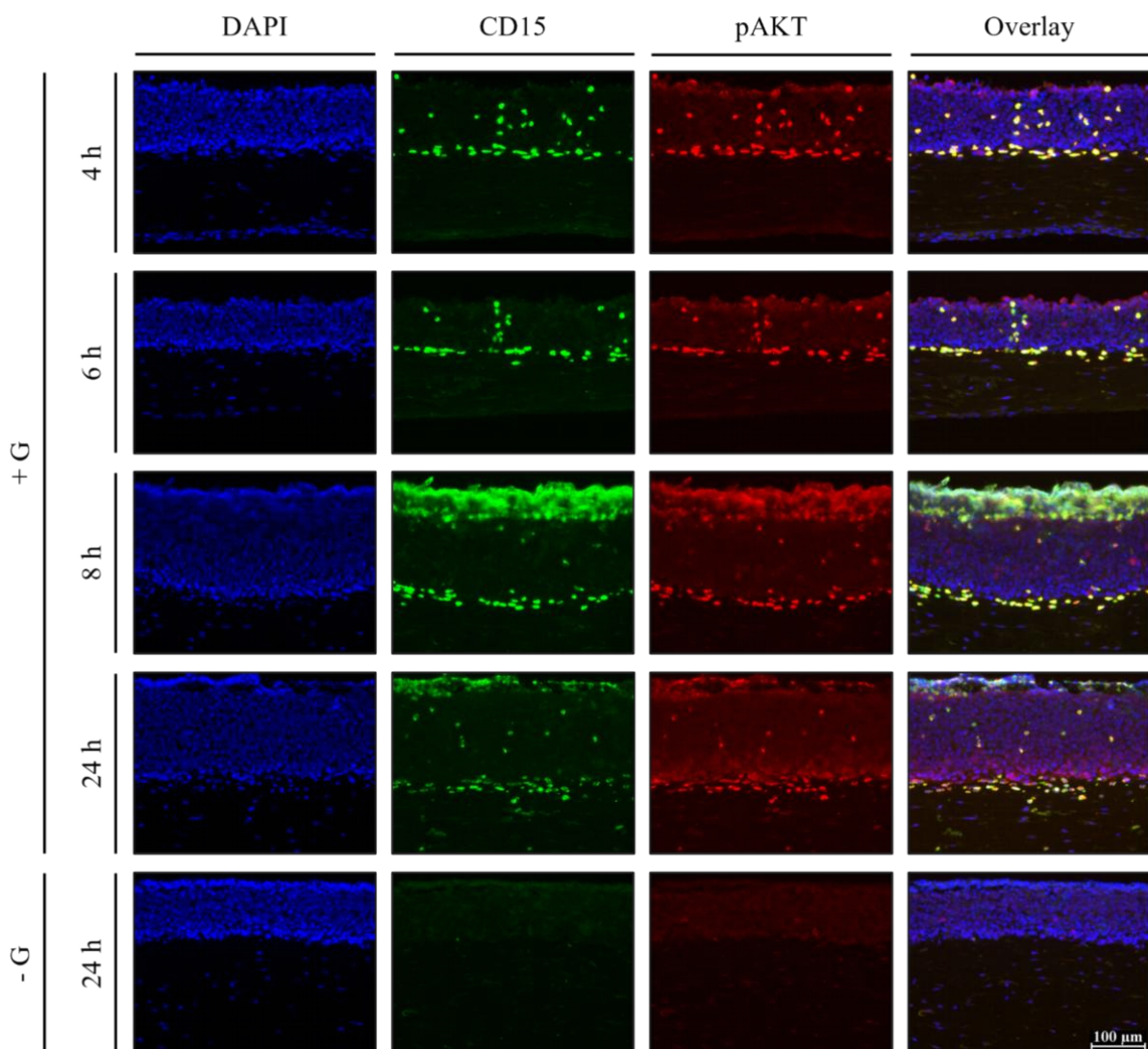
Neben Abbildungen zum Vergleich der drei PeCa-Zelllinien zu einem Zeitpunkt (Abbildungen 24 bis 28) wurden ebenfalls Abbildungen für jede Zelllinie pro Zeitpunkt (Abbildungen 29 bis 31) der pAKT- und CD15-spezifischen Immunfluoreszenz gefertigt.

Im Falle der Primärtumorzelllinie P2 (Abbildung 29) unterscheiden sich 3D-Kulturen mit und ohne Granulozyten hinsichtlich des Nachweises von pAKT deutlich: Während sich in der granulozytenlosen Kontrollkultur mit P2 lediglich ein basales Aktivierungslevel für AKT zeigt, ist in Kulturen mit Granulozyten, unabhängig der Inkubationszeit, ein im gesamten Epithel vorkommendes, rotfarbenes, pAKT-spezifisches Fluoreszenzsignal mit vor allem ab acht Stunden nach Immigration der Granulozyten auftretender nukleärer Signalzunahme einzelner peniler Tumorzellen feststellbar. Der Großteil der in 3D-Kulturen mit PeCa P2 eingewanderten Granulozyten exprimiert über die Zeit sowohl CD15 als auch pAKT, sodass unter diesen Kulturbedingungen AKT-abhängige Signalwege in Granulozyten aktiviert zu sein scheinen. Insbesondere bei achtstündiger und vierundzwanzigstündiger Inkubation sind substantiell mehr Granulozyten in die Kulturen eingewandert und pAKT anhand fehlender Kongruenz der beiden Immunfluoreszenzfärbungen im Epithel gesteigert in zu Granulozyten benachbarten Tumorzellen nachweisbar. Folglich führt die Anwesenheit von Granulozyten zu einer verstärkten Phosphorylierung und damit Aktivierung von AKT bei PeCa P2.



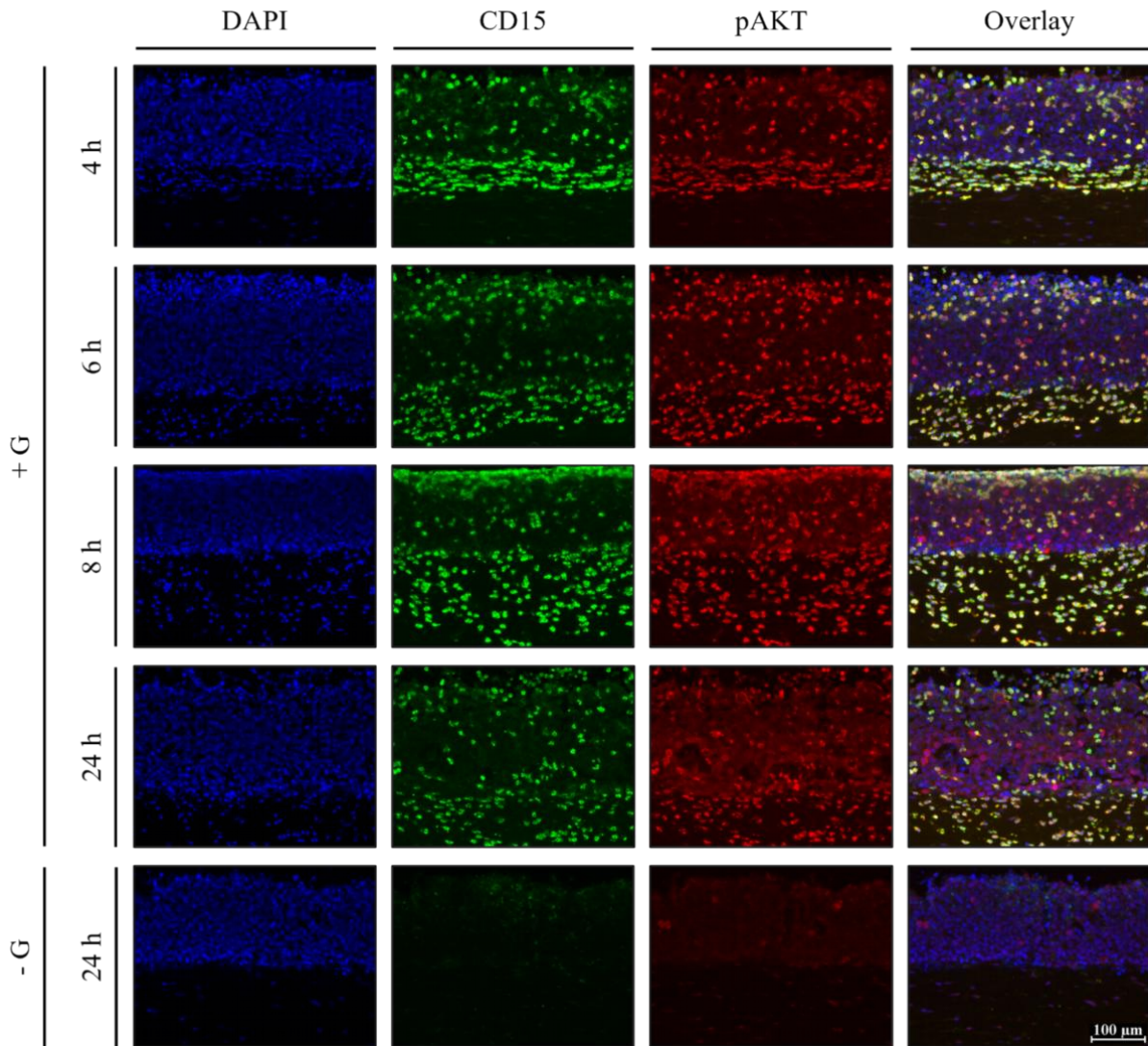
**Abbildung 29: Nachweis von pAKT (Thr308) und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen mit der Peniskarzinomzelllinie P2 mittels Immunfluoreszenz.** Organotypische 3D-Kulturen mit der Peniskarzinomzelllinie P2 wurden für 14 Tage kultiviert. Im Anschluss wurden je  $5 \times 10^6$  frisch isolierte Granulozyten von oben auf die Versuchskulturen gegeben und 4, 6, 8 oder 24 Stunden nach Granulozytenzugabe fixiert. Die Kontrollkulturen wurden lediglich mit 1x PBS behandelt und nach 24 Stunden fixiert. Der Einfluss der Granulozyten auf die Phosphorylierung von AKT (Thr308) wurde mittels Immunfluoreszenz-Doppelfärbung untersucht. Die Detektion des pAKT-spezifischen Primärantikörpers erfolgte mithilfe eines Alexa Fluor 546-markierten Sekundärantikörpers. Der CD15-spezifische Primärantikörper wurde mittels Alexa Fluor 488-markiertem Sekundärantikörper detektiert. Zur Darstellung der Zellkerne wurde DAPI (1:50000) verwendet. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mithilfe des Leica DMI6000 B Forschungsmikroskops (zweihundertfache Bildvergrößerung) fotodokumentiert. Gezeigt werden Immunfluoreszenz, CD15-Färbung und nukleäre DAPI-Färbung sowie deren Overlay. Repräsentative Bilder aus drei Färbungen einer Kultur werden abgebildet. CD = cluster of differentiation, DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, G = Granulozyten, pAKT = phosphorylierte Proteinkinase B.

Die granulozytenlose 3D-Kultur mit der Peniskarzinomzelllinie L2 (Abbildung 30) zeigt lediglich ein basales Aktivierungslevel für AKT im gesamten Epithel. Lässt man Granulozyten in die Kulturen mit L2 einwandern, ist über die Zeit ein rotfarbenes, pAKT-spezifisches Fluoreszenzsignal in der gesamten Epithelschicht mit nukleärer Signalzunahme einzelner peniler Tumorzellen, die vier und sechs Stunden nach Immigration der Granulozyten vor allem im oberen Epitheldrittel und nach vierundzwanzig Stunden im unteren Epitheldrittel lokalisiert sind, sichtbar. Dementsprechend gleicht die Lokalisation des gesteigerten pAKT-Nachweises bei PeCa L2 dem von apikal nach basal gerichteten Einwanderungsverhalten der Granulozyten. Im Falle der Zelllinie L2 exprimieren ausnahmslos alle Granulozyten, unabhängig der Inkubationszeit und Immigrationstiefe, neben CD15 auch pAKT und sind damit doppelt positiv. Die beiden Immunfluoreszenzfärbungen sind im Epithel der Kulturen mit L2 nicht komplett deckungsgleich, sodass AKT, insbesondere nach vierundzwanzigständiger Inkubation, in den Tumorzellen, die sich in der Nähe der Granulozyten befinden, phosphoryliert und damit aktiviert vorliegt. Somit scheinen Granulozyten auf ihrem Weg durchs Epithel AKT-abhängige Signalwege in Tumorzellen von PeCa L2 zu aktivieren.



**Abbildung 30: Nachweis von pAKT (Thr308) und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen mit der Peniskarzinomzelllinie L2 mittels Immunfluoreszenz.** Organotypische 3D-Kulturen mit der Peniskarzinomzelllinie L2 wurden für 14 Tage kultiviert. Anschließend wurden je  $5 \times 10^6$  frisch isolierte Granulozyten von oben auf die Versuchskulturen gegeben und 4, 6, 8 oder 24 Stunden nach Granulozytenzugabe fixiert. Die Kontrollkulturen wurden lediglich mit 1x PBS behandelt und nach 24 Stunden fixiert. Um den Einfluss der Granulozyten auf die Aktivierung von AKT (Thr308) beurteilen zu können, wurde eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung durchgeführt. Die Detektion des pAKT-spezifischen Primärantikörpers erfolgte mittels Alexa Fluor 546-markiertem Sekundärantikörper. Der CD15-spezifische Primärantikörper wurde mithilfe eines Alexa Fluor 488-markierten Sekundärantikörpers detektiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI (1:50000) gefärbt. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mithilfe des Leica DMI6000 B Forschungsmikroskops (zweihundertfache Bildvergrößerung) fotodokumentiert. Abgebildet werden Immunfluoreszenz, CD15-Färbung und nukleäre DAPI-Färbung sowie deren Overlay. Repräsentative Bilder aus drei Färbungen einer Kultur werden gezeigt. CD = *cluster of differentiation*, DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, G = Granulozyten, pAKT = phosphorylierte Proteinkinase B.

Im Folgenden wird die Aktivierung von AKT in 3D-Kulturen mit der PeCa-Zelllinie L3 in Abhängigkeit der eingewanderten Granulozyten nach Zeit verglichen (Abbildung 31). Während sich in der Kultur ohne Granulozyten lediglich ein basales Aktivierungslevel für AKT zeigt, resultiert bei L3 aus Zugabe von Granulozyten, unabhängig der Inkubationszeit, ein im gesamten Epithel detektierbares, rotfarbenes, pAKT-spezifisches Fluoreszenzsignal mit nukleärer Signalzunahme einzelner peniler Tumorzellen. Vergleichend zu PeCa P2 ist bei L3 über die Zeit die Mehrheit der immigrierten Granulozyten doppelt positiv gefärbt. Demnach liegt AKT in Granulozyten der 3D-Kulturen mit PeCa L3 in seiner aktivierten Form vor. Erneut sind die CD15- und pAKT-Färbungen im Epithel nicht vollständig kongruent, sodass im Falle von L3 ab vierstündiger Inkubation in Granulozyten umgebenden Tumorzellen AKT verstärkt aktiviert ist. Mit zunehmender Inkubationszeit erhöht sich die Anzahl pAKT-positiver Tumorzellen der Zelllinie L3 entsprechend der sich steigenden Menge eingewanderter Granulozyten.



**Abbildung 31: Nachweis von pAKT (Thr308) und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen mit der Peniskarzinomzelllinie L3 mittels Immunfluoreszenz.** Organotypische 3D-Kulturen mit der Peniskarzinomzelllinie L3 wurden für 14 Tage kultiviert. Im Anschluss wurden je  $5 \times 10^6$  frisch isolierte Granulozyten von oben auf die Versuchskulturen gegeben und 4, 6, 8 oder 24 Stunden nach Granulozytenzugabe fixiert. Die Kontrollkulturen wurden lediglich mit 1x PBS behandelt und nach 24 Stunden fixiert. Eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung wurde durchgeführt, um den Einfluss der Granulozyten auf die Aktivierung von AKT (Thr308) zu untersuchen. Die Detektion des pAKT-spezifischen Primärantikörpers erfolgte mittels Alexa Fluor 546-markiertem Sekundärantikörper. Der CD15-spezifische Primärantikörper wurde mithilfe eines Alexa Fluor 488-markierten Sekundärantikörpers detektiert. Zur Visualisierung der Zellkerne wurde DAPI (1:50000) verwendet. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mithilfe des Leica DMI6000 B Forschungsmikroskops (zweihundertfache Bildvergrößerung) fotodokumentiert. Dargestellt werden Immunfluoreszenz, CD15-Färbung und nukleäre DAPI-Färbung sowie deren Overlay. Repräsentative Bilder aus drei Färbungen einer Kultur werden abgebildet. CD = *cluster of differentiation*, DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, G = Granulozyten, pAKT = phosphorylierte Proteinkinase B.

Im direkten Vergleich zur Immunhistochemie (Abbildung 23) ermöglicht die Immunfluoreszenz (Abbildungen 24 bis 31) eine genauere Zuordnung der pAKT-Färbung zu den Granulozyten und erleichtert somit den Nachweis pAKT-positiver peniler Tumorzellen in deren direkter Nachbarschaft. Während AKT bei PeCa L3 bereits ab vierstündiger Inkubation verstärkt in Granulozyten umgebenden Tumorzellen phosphoryliert und damit aktiviert vorliegt, ist dies bei P2 erst ab acht Stunden und bei L2 vierundzwanzig Stunden nach Immigration der Granulozyten der Fall. Die Anzahl pAKT-positiver Tumorzellen steigt in 3D-Kulturen mit PeCa P2, L2 und L3 mit zunehmender Inkubationszeit der Granulozyten an. VHF exprimieren, unabhängig der verwendeten PeCa-Zelllinie sowie in Kulturen mit als auch ohne Granulozyten und über alle Zeitpunkte hinweg, schwach pAKT.

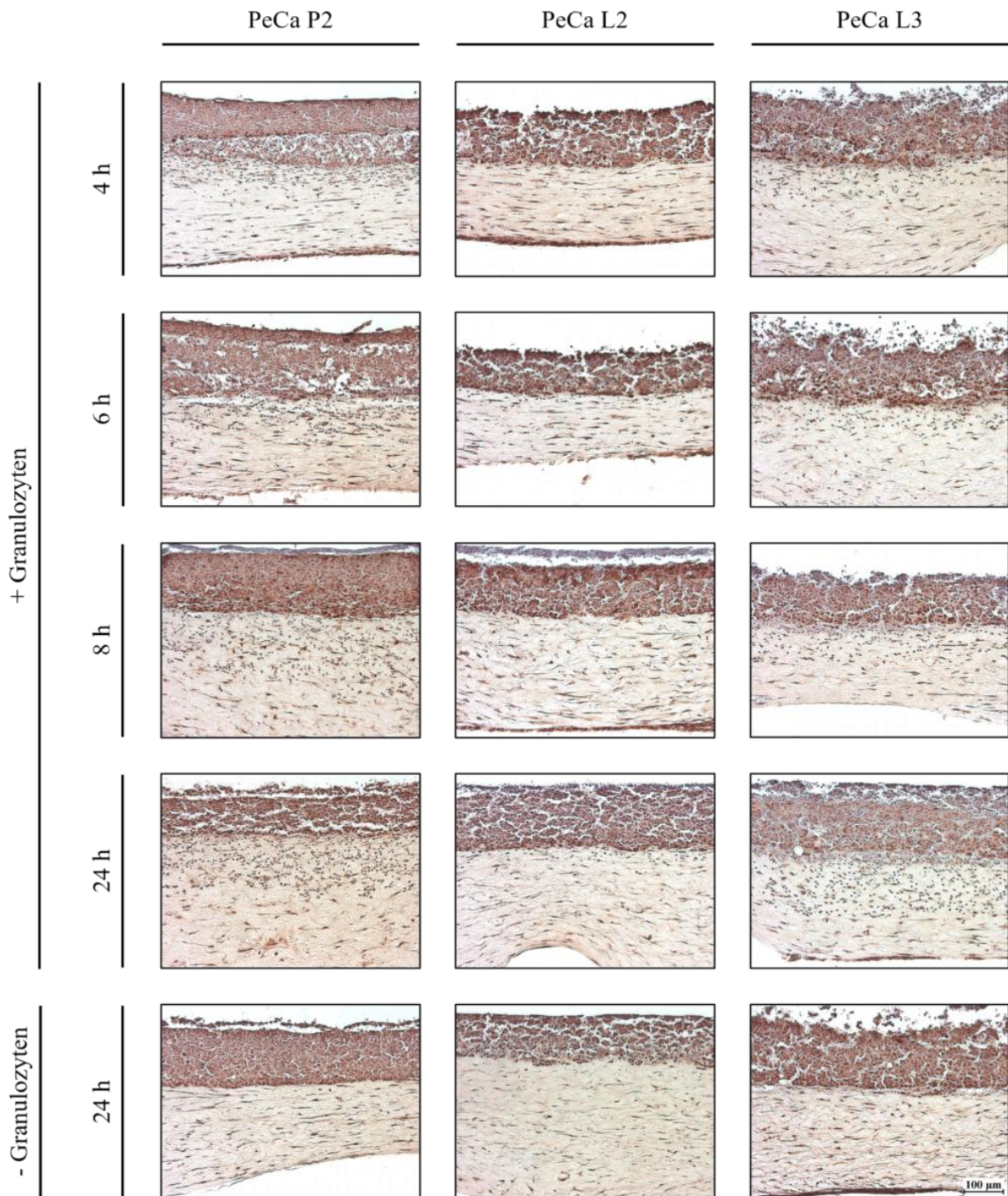
Zusammenfassend sprechen die Daten der 2D- und 3D-Färbungen für eine sehr starke Aktivierung von AKT in Granulozyten, unabhängig der verwendeten PeCa-Zelllinie, Inkubationszeit und Immigrationstiefe. Des Weiteren scheint der direkte Kontakt zu Granulozyten AKT-abhängige Signalwege in penilen Tumorzellen der HPV-positiven PeCa-Zelllinien P2, L2 und L3 zu aktivieren.

## **5.6 Aktivierung von ERK in organotypischen 3D-Kulturen mit den HPV-positiven PeCa-Zelllinien P2, L2 und L3**

Der ebenfalls durch EGFR aktivierte Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg reguliert wichtige physiologische Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Entwicklung und Apoptose der Zellen, interagiert mit dem PI3K/AKT-Signalweg und ist mit der Onkogenese humaner Tumoren assoziiert (McCubrey et al., 2007). Dessen Schlüsselprotein ERK verhindert durch Suppression proapoptotischer Faktoren sowie durch Stimulation antiapoptotischer Proteine die Zellapoptose (Lavoie et al., 2020).

Nachdem im 2D-Zellkulturmodell eine Überexpression von pERK in HPV-positiven Zellen der PeCa-Linien P2 (Abbildungen 12 und 14) und L2 (Abbildungen 13 und 15) nachgewiesen werden konnte, wurde die Aktivierung von ERK in 3D-Kulturen mit P2, L2 und L3 mittels Immunhistochemie analysiert (Abbildung 32).

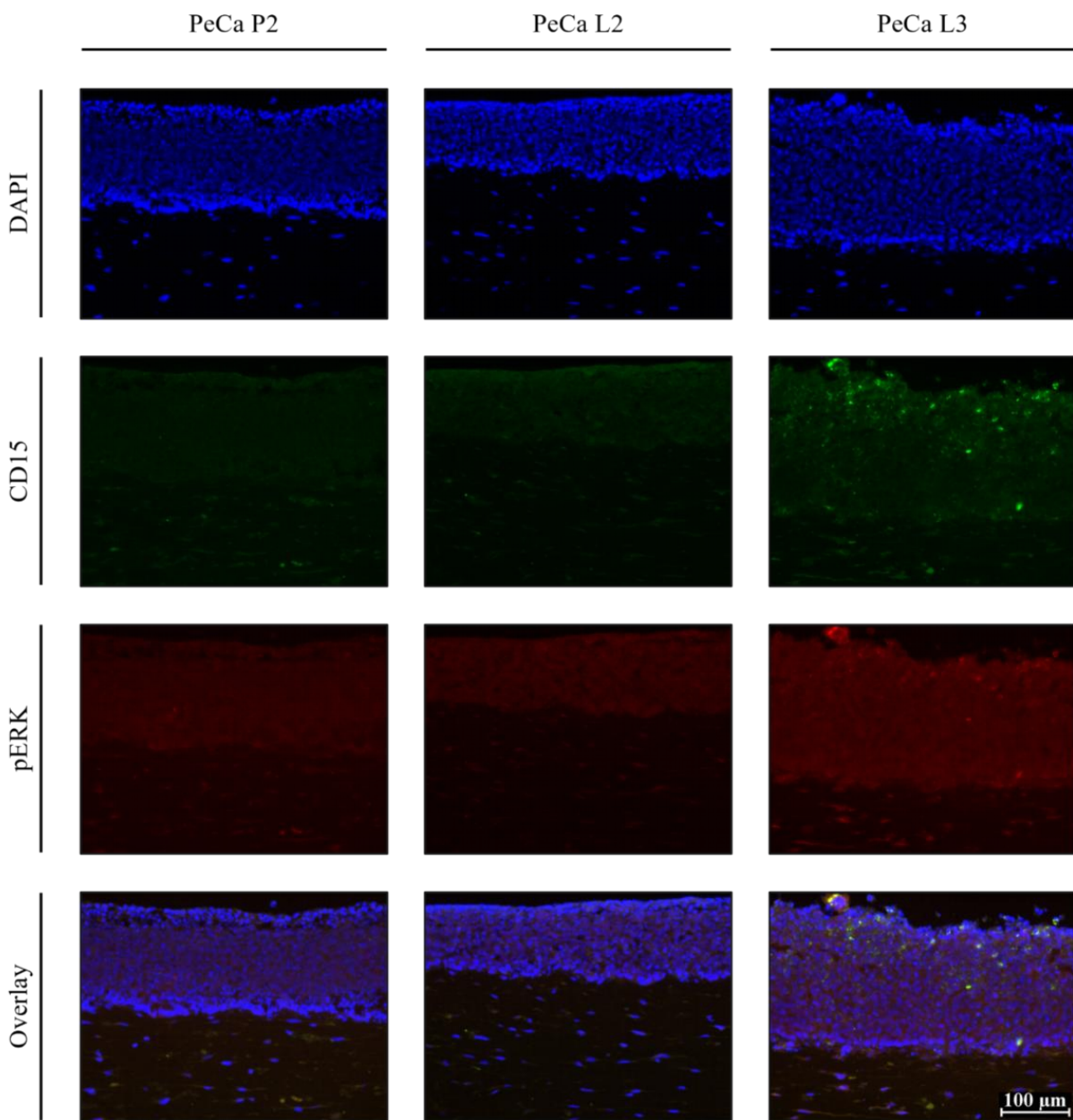
In 3D-Kulturen ohne Granulozyten zeigt sich, unabhängig der verwendeten PeCa-Zelllinie, eine sowohl nukleär als auch zytoplasmatisch lokalisierte, pERK-spezifische Braunfärbung im gesamten Epithel. Dieser pERK-Nachweis ist bei L2 am stärksten und bei P2 am schwächsten ausgeprägt. Lässt man Granulozyten in die Kulturen immigrieren, ist, unabhängig der Inkubationszeit, wiederholt bei allen drei PeCa-Zelllinien, erneut am stärksten bei L2, gefolgt von L3 und zuletzt P2, eine nukleäre und zytoplasmatische Aktivierung von ERK in der gesamten Epithelschicht feststellbar. Zudem zeigt sich bei PeCa L3 bereits ab vierstündiger Inkubation der Granulozyten eine erhöhte Farbintensität der nukleären Braunfärbung für pERK in der unteren Epithelhälfte. Hingegen ist bei P2 lediglich in der Kultur, die acht Stunden nach Zugabe der Granulozyten fixiert wurde, vermehrt pERK in Tumorzellnuklei des unteren Epitheldrittels nachweisbar. Während nukleäre ERK bei PeCa L2 ab vierstündiger Inkubation gesteigert in der oberen Epithelhälfte phosphoryliert und damit aktiviert vorliegt, verschiebt sich dies nach vierundzwanzig Stunden in Einklang mit dem von apikal nach basal gerichteten Einwanderungsverhalten der Granulozyten in die untere Epithelhälfte. Granulozyten exprimieren, unabhängig der verwendeten PeCa-Zelllinie, Inkubationszeit und Immigrationstiefe, pERK. VHF sind bei P2, L2 und L3, in Kulturen mit als auch ohne Granulozyten sowie unabhängig der Inkubationszeit, bräunlich gefärbt und ERK somit aktiviert.



**Abbildung 32: Nachweis von pERK in organotypischen 3D-Kulturen mittels Immunhistochemie.** Organotypische 3D-Kulturen mit den Peniskarzinomzelllinien P2, L2 und L3 wurden für 14 Tage kultiviert. Im Anschluss wurden je  $5 \times 10^6$  frisch isolierte Granulozyten von oben auf die Versuchskulturen gegeben und 4, 6, 8 oder 24 Stunden nach Granulozytenzugabe fixiert. Die Kontrollkulturen wurden lediglich mit 1x PBS behandelt und nach 24 Stunden fixiert. Zum Nachweis von pERK wurde eine immunhistochemische Färbung durchgeführt. Die Detektion des pERK-spezifischen Primärantikörpers erfolgte mithilfe eines Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers. Durch Zugabe der DAB-Peroxidase-Substratlösung entstand die Braunfärbung. Die Zellkerne wurden mit Hämatoxylin blau gefärbt. Die Fotodokumentation erfolgte mittels Leica DMI6000 B Forschungsmikroskop bei zweihundertfacher Vergrößerung. Abgebildet werden repräsentative Bilder aus drei Färbungen einer Kultur. DAB = 3,3'-Diaminobenzidin.

An die Immunhistochemie (Abbildung 32) schloss sich eine Immunfluoreszenzfärbung mit pERK und CD15 an (Abbildungen 33 bis 40), da diese sich besser zur Visualisierung von Doppelfärbungen eignet.

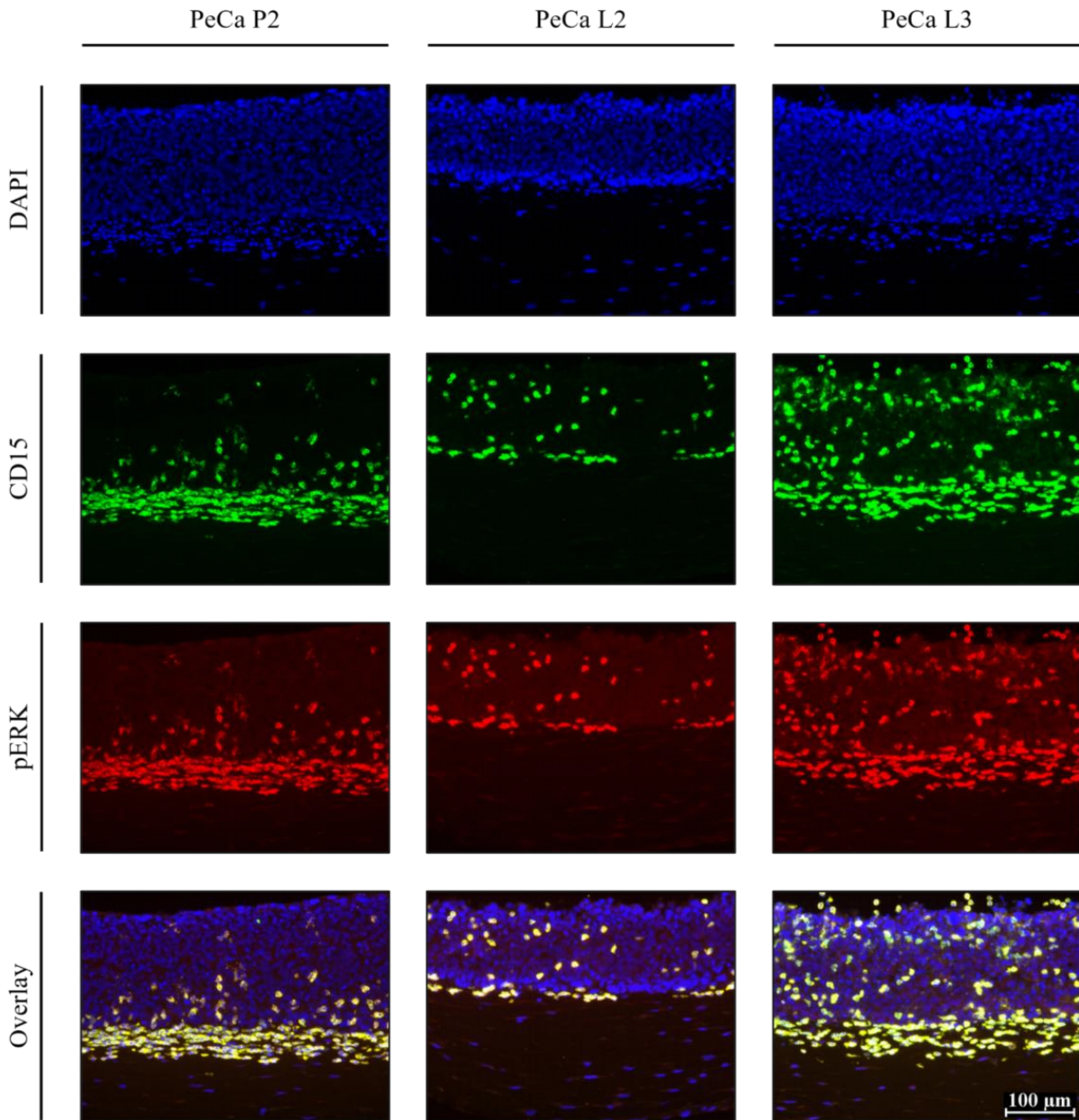
Widmet man sich anfangs den Kulturen ohne Granulozyten (Abbildung 33), zeigt sich im gesamten Epithel der drei PeCa-Zelllinien eine Hintergrundfärbung für pERK. Nennenswert ist die vermutlich auf Fluoreszenz toter Zellen beruhende Signalzunahme einzelner, diffus in der Epithelschicht lokalisierter Tumorzellen bei L3. Erwartungsgemäß ist in granulozytenlosen Kulturen keine Expression des Granulozytenmarkers CD15 detektierbar. VHF weisen, unabhängig der verwendeten PeCa-Zelllinie, lediglich ein basales Aktivierungslevel für ERK auf.



**Abbildung 33: Nachweis von pERK und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen ohne Granulozyten mittels Immunfluoreszenz.** Organotypische 3D-Kulturen mit den Peniskarzinomzelllinien P2, L2 und L3 wurden für 14 Tage kultiviert. Die hier abgebildeten Kontrollkulturen wurden mit 1x PBS behandelt und nach 24 Stunden fixiert. Die Detektion des pERK-

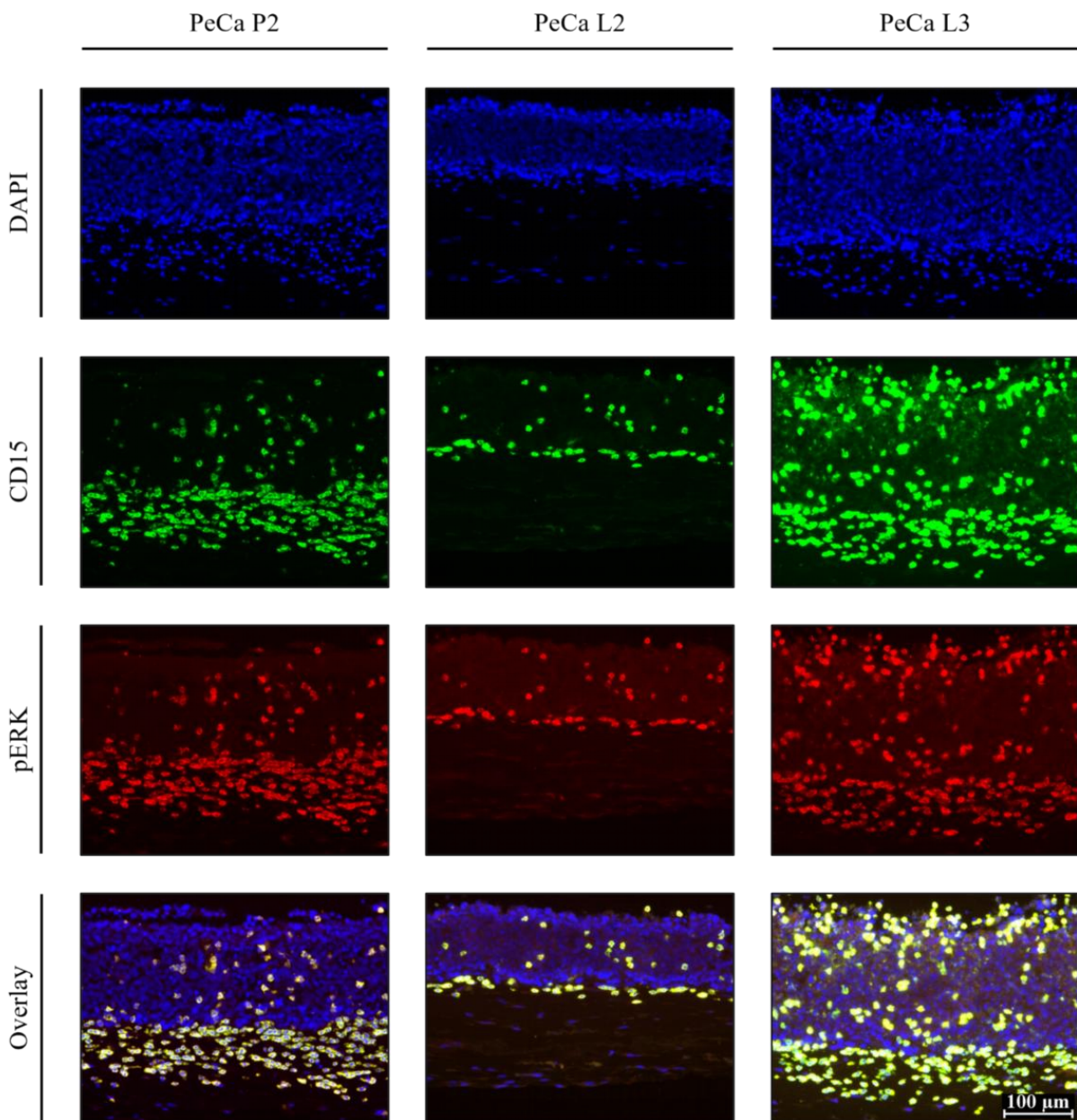
spezifischen Primärantikörpers erfolgte mittels Alexa Fluor 546-markiertem Sekundärantikörper. Der CD15-spezifische Primärantikörper wurde mithilfe eines Alexa Fluor 488-markierten Sekundärantikörpers detektiert. Zur Darstellung der Zellkerne wurde DAPI (1:50000) verwendet. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mithilfe des Leica DMI6000 B Forschungsmikroskops (zweihundertfache Bildvergrößerung) fotodokumentiert. Gezeigt werden Immunfluoreszenz, CD15-Färbung und nukleäre DAPI-Färbung sowie deren Overlay. Repräsentative Bilder aus drei Färbungen einer Kultur werden abgebildet. CD = *cluster of differentiation*, DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, pERK = *phosphorylated extracellular signal-regulated kinase*.

Nach vierstündiger Inkubation der Granulozyten (Abbildung 34) ist ERK in Kulturen mit PeCa P2, L2 und L3 im gesamten Epithel basal aktiviert. Die beiden Immunfluoreszenzfärbungen sind in der Epithelschicht der drei Peniskarzinomzelllinien vollständig deckungsgleich, sodass alle immigrierten Granulozyten, unabhängig der verwendeten PeCa-Zelllinie, neben CD15 auch pERK exprimieren, folglich doppelt positiv sind und durch Überlagerung der grünen CD15- und rotfarbenen pERK-Fluoreszenz eine gelbe Färbung zeigen. Demnach ist kein gesteigerter pERK-Nachweis in Granulozyten umgebenden Tumorzellen detektierbar. VHF zeigen bei P2, L2 und L3 nicht nur in 3D-Kulturen mit Granulozyten, sondern auch in Kulturen ohne Granulozyten lediglich eine geringe pERK-Expression.



**Abbildung 34: Nachweis von pERK und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen mit Granulozyten für 4 Stunden mittels Immunfluoreszenz.** Organotypische 3D-Kulturen mit den Peniskarzinomzelllinien P2, L2 und L3 wurden für 14 Tage kultiviert. Anschließend wurden je  $5 \times 10^6$  frisch isolierte Granulozyten von oben auf die Versuchskulturen gegeben und 4 Stunden nach Granulozytenzugabe fixiert. Um den Einfluss der Granulozyten auf die Aktivierung von ERK beurteilen zu können, wurde eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung durchgeführt. Die Detektion des pERK-spezifischen Primärantikörpers erfolgte mittels Alexa Fluor 546-markiertem Sekundärantikörper. Der CD15-spezifische Primärantikörper wurde mithilfe eines Alexa Fluor 488-markierten Sekundärantikörpers detektiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI (1:50000) gefärbt. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mithilfe des Leica DMI6000 B Forschungsmikroskops (zweihundertfache Bildvergrößerung) fotodokumentiert. Abgebildet werden Immunfluoreszenz, CD15-Färbung und nukleäre DAPI-Färbung sowie deren Overlay. Repräsentative Bilder aus drei Färbungen einer Kultur werden gezeigt. CD = *cluster of differentiation*, DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, pERK = *phosphorylated extracellular signal-regulated kinase*.

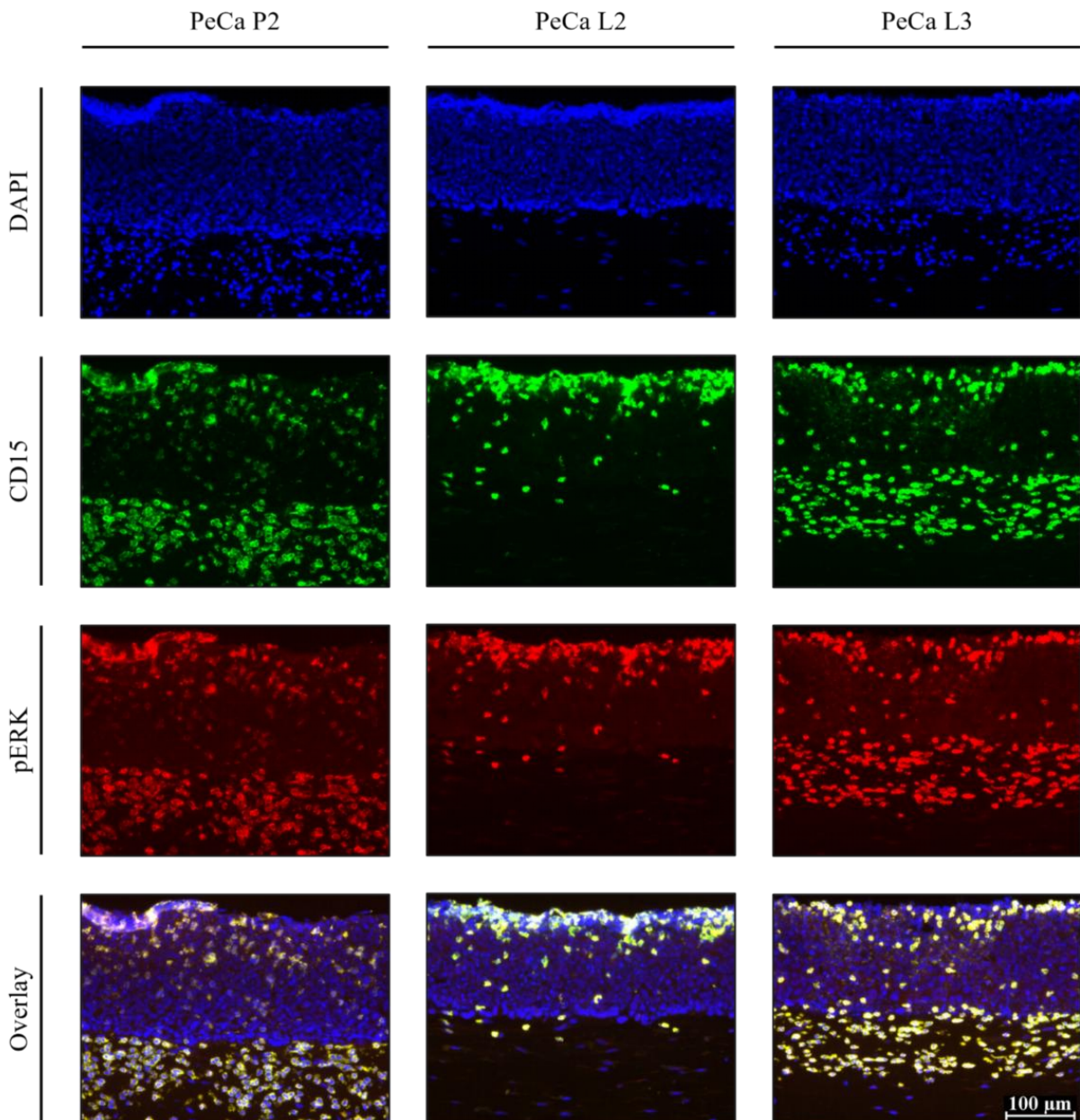
Lässt man Granulozyten in 3D-Kulturen immigrieren, ist nach sechs Stunden (Abbildung 35) eine niedrigschwellige Positivität für pERK im gesamten Epithel der drei PeCa-Zelllinien feststellbar. Da beide Immunfluoreszenzfärbungen in der Epithelschicht vollkommen kongruent sind, liegt in allen eingewanderten Granulozyten, unabhängig der verwendeten PeCa-Zelllinie, ERK phosphoryliert und damit aktiviert vor, während es auf der anderen Seite keinen nennenswerten pERK-Nachweis in Tumorzellen und VHF gibt.



**Abbildung 35: Nachweis von pERK und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen mit Granulozyten für 6 Stunden mittels Immunfluoreszenz.** Organotypische 3D-Kulturen mit den Peniskarzinomzelllinien P2, L2 und L3 wurden für 14 Tage kultiviert. Im Anschluss wurden je  $5 \times 10^6$  frisch isolierte Granulozyten von oben auf die Versuchskulturen gegeben und 6 Stunden nach Granulozytenzugabe fixiert. Der Einfluss der Granulozyten auf die Phosphorylierung von ERK wurde mittels Immunfluoreszenz-Doppelfärbung analysiert. Die Detektion des pERK-spezifischen Primärantikörpers erfolgte mithilfe eines Alexa Fluor 546-markierten Sekundärantikörpers. Der CD15-spezifische Primärantikörper wurde mittels Alexa Fluor 488-markiertem Sekundärantikörper detektiert.

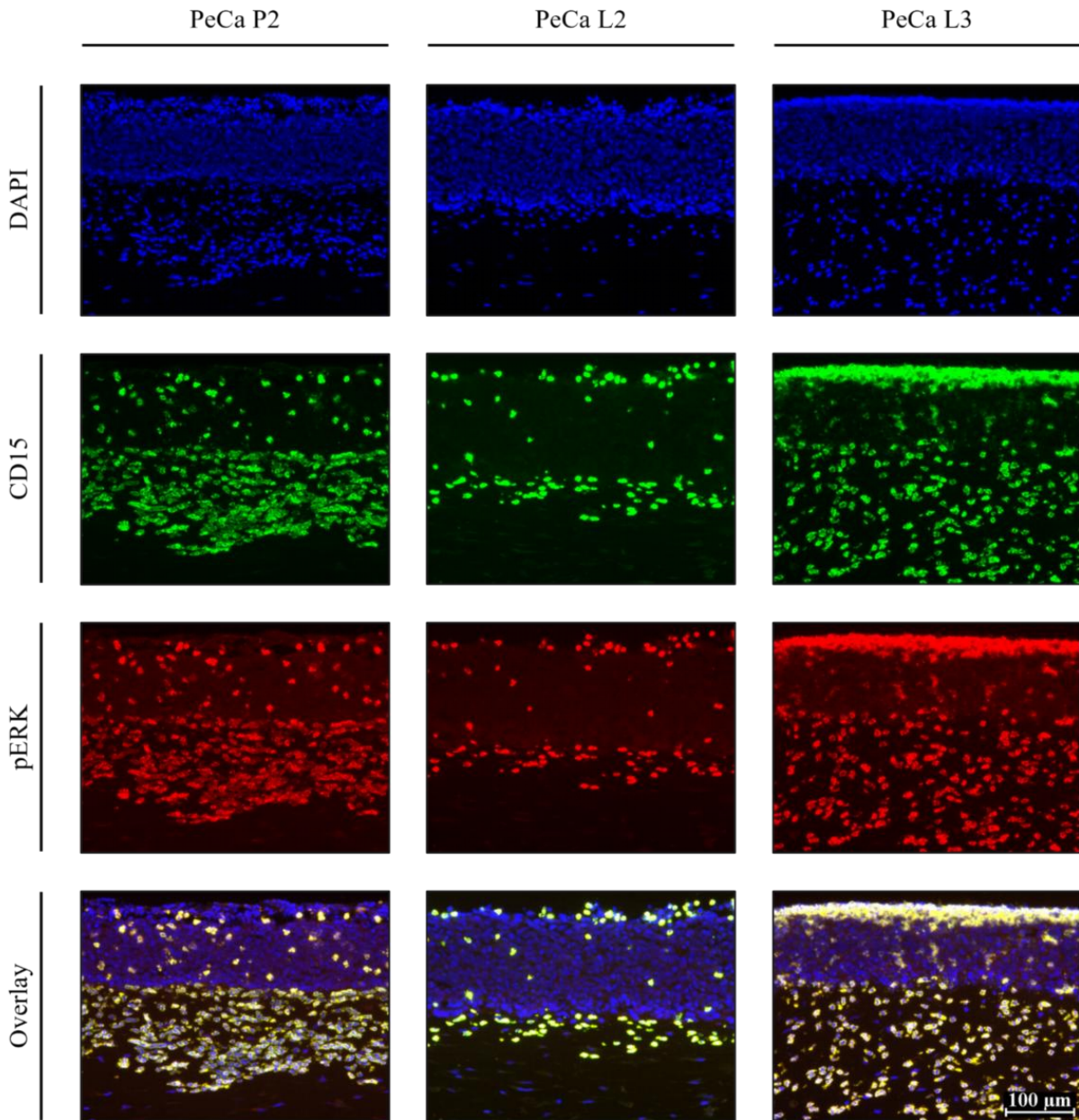
Zur Visualisierung der Zellkerne wurde DAPI (1:50000) verwendet. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mithilfe des Leica DMI6000 B Forschungsmikroskops (zweihundertfache Bildvergrößerung) fotodokumentiert. Dargestellt sind Immunfluoreszenz, CD15-Färbung und nukleäre DAPI-Färbung sowie deren Overlay. Repräsentative Bilder aus drei Färbungen einer Kultur werden abgebildet. CD = *cluster of differentiation*, DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, pERK = *phosphorylated extracellular signal-regulated kinase*.

Acht Stunden nach Immigration der Granulozyten (Abbildung 36) zeigt sich in 3D-Kulturen mit den Peniskarzinomzelllinien P2, L2 und L3 eine Hintergrundfärbung für pERK in der gesamten Epithelschicht. Vergleichend zu den Abbildungen 34 und 35 liegt im Epithel der drei PeCa-Zelllinien eine vollständige Deckungsgleichheit der CD15- und pERK-Färbungen vor, sodass alle eingewanderten Granulozyten, unabhängig der verwendeten PeCa-Zelllinie, neben CD15 auch pERK exprimieren. In Tumorzellen, die sich in der Nähe der Granulozyten befinden, ist ERK nicht verstärkt aktiviert.



**Abbildung 36: Nachweis von pERK und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen mit Granulozyten für 8 Stunden mittels Immunfluoreszenz.** Organotypische 3D-Kulturen mit den Peniskarzinomzelllinien P2, L2 und L3 wurden für 14 Tage kultiviert. Anschließend wurden je  $5 \times 10^6$  frisch isolierte Granulozyten von oben auf die Versuchskulturen gegeben und 8 Stunden nach Granulozytenzugabe fixiert. Um den Einfluss der Granulozyten auf die Aktivierung von ERK beurteilen zu können, wurde eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung durchgeführt. Die Detektion des pERK-spezifischen Primärantikörpers erfolgte mittels Alexa Fluor 546-markiertem Sekundärantikörper. Der CD15-spezifische Primärantikörper wurde mithilfe eines Alexa Fluor 488-markierten Sekundärantikörpers detektiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI (1:50000) gefärbt. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mithilfe des Leica DMI6000 B Forschungsmikroskops (zweihundertfache Bildvergrößerung) fotodokumentiert. Abgebildet werden Immunfluoreszenz, CD15-Färbung und nukleäre DAPI-Färbung sowie deren Overlay. Repräsentative Bilder aus drei Färbungen einer Kultur werden gezeigt. CD = *cluster of differentiation*, DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, pERK = *phosphorylated extracellular signal-regulated kinase*.

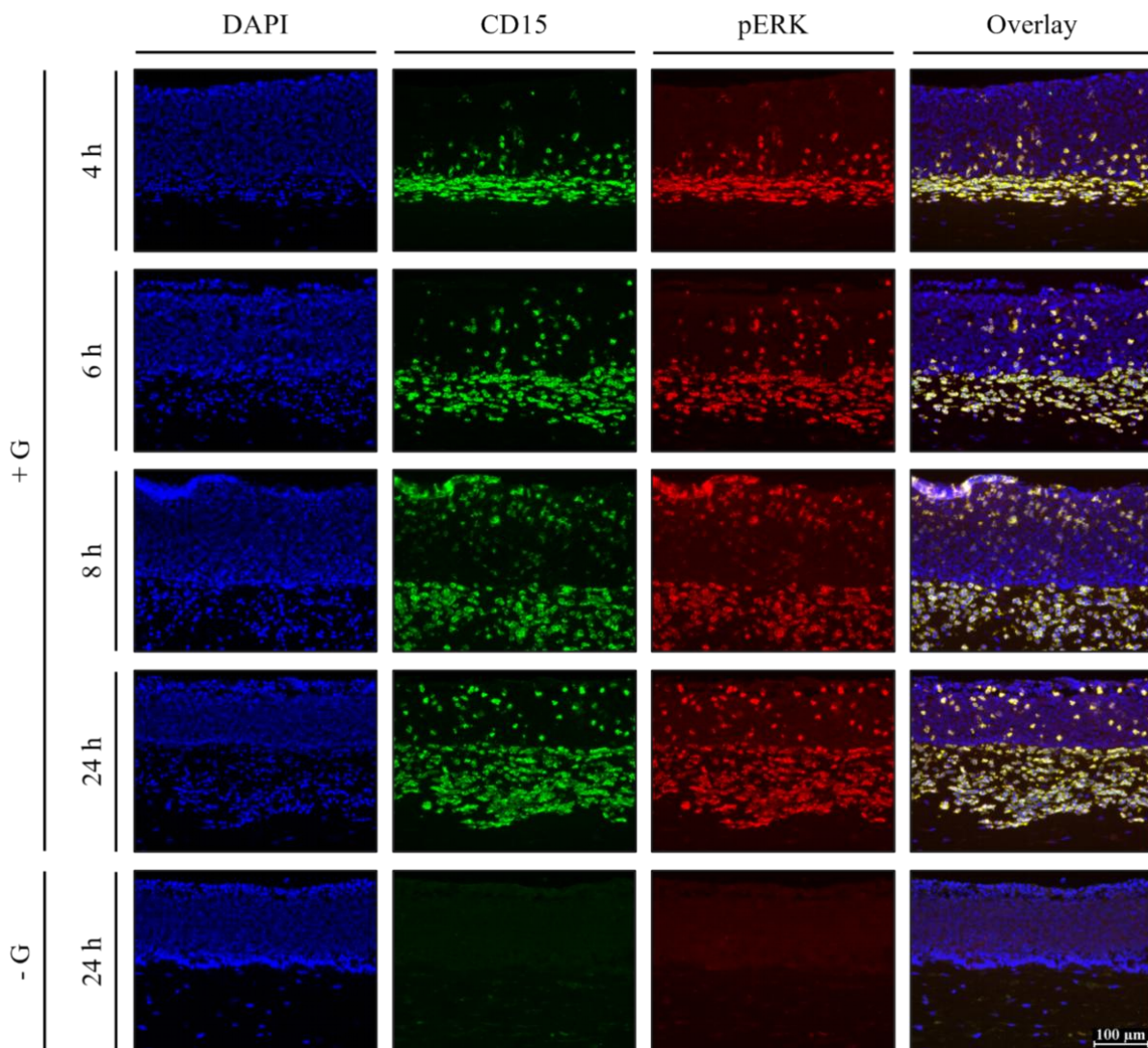
In organotypischen 3D-Kulturen, die vierundzwanzig Stunden nach Zugabe der Granulozyten fixiert wurden (Abbildung 37), weisen die drei PeCa-Zelllinien ein basales Aktivierungslevel für ERK im gesamten Epithel auf. Im Overlay wird deutlich, dass die grüne CD15-Färbung und die rotfarbene pERK-Färbung bei P2, L2 und L3 komplett deckungsgleich sind, sodass ERK in allen immigrierten Granulozyten phosphoryliert und damit aktiviert ist. Dementsprechend ist pERK in zu Granulozyten benachbarten Tumorzellen nicht gesteigert nachweisbar.



**Abbildung 37: Nachweis von pERK und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen mit Granulozyten für 24 Stunden mittels Immunfluoreszenz.** Organotypische 3D-Kulturen mit den Peniskarzinomzelllinien P2, L2 und L3 wurden für 14 Tage kultiviert. Im Anschluss wurden je  $5 \times 10^6$  frisch isolierte Granulozyten von oben auf die Versuchskulturen gegeben und 24 Stunden nach Granulozytenzugabe fixiert. Eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung wurde durchgeführt, um den Einfluss der Granulozyten auf die Aktivierung von ERK zu untersuchen. Die Detektion des pERK-spezifischen Primärantikörpers erfolgte mittels Alexa Fluor 546-markiertem Sekundärantikörper. Der CD15-spezifische Primärantikörper wurde mithilfe eines Alexa Fluor 488-markierten Sekundärantikörpers detektiert. Zur Darstellung der Zellkerne wurde DAPI (1:50000) verwendet. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mithilfe des Leica DMI6000 B Forschungsmikroskops (zweihundertfache Bildvergrößerung) fotodokumentiert. Gezeigt werden Immunfluoreszenz, CD15-Färbung und nukleäre DAPI-Färbung sowie deren Overlay. Repräsentative Bilder aus drei Färbungen einer Kultur werden abgebildet. CD = *cluster of differentiation*, DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, pERK = *phosphorylated extracellular signal-regulated kinase*.

Als Nächstes wird die Aktivierung von ERK in 3D-Kulturen mit den Peniskarzinomzelllinien P2, L2 und L3 in Abhängigkeit der immigrierten Granulozyten pro Zeitpunkt verglichen (Abbildungen 38 bis 40).

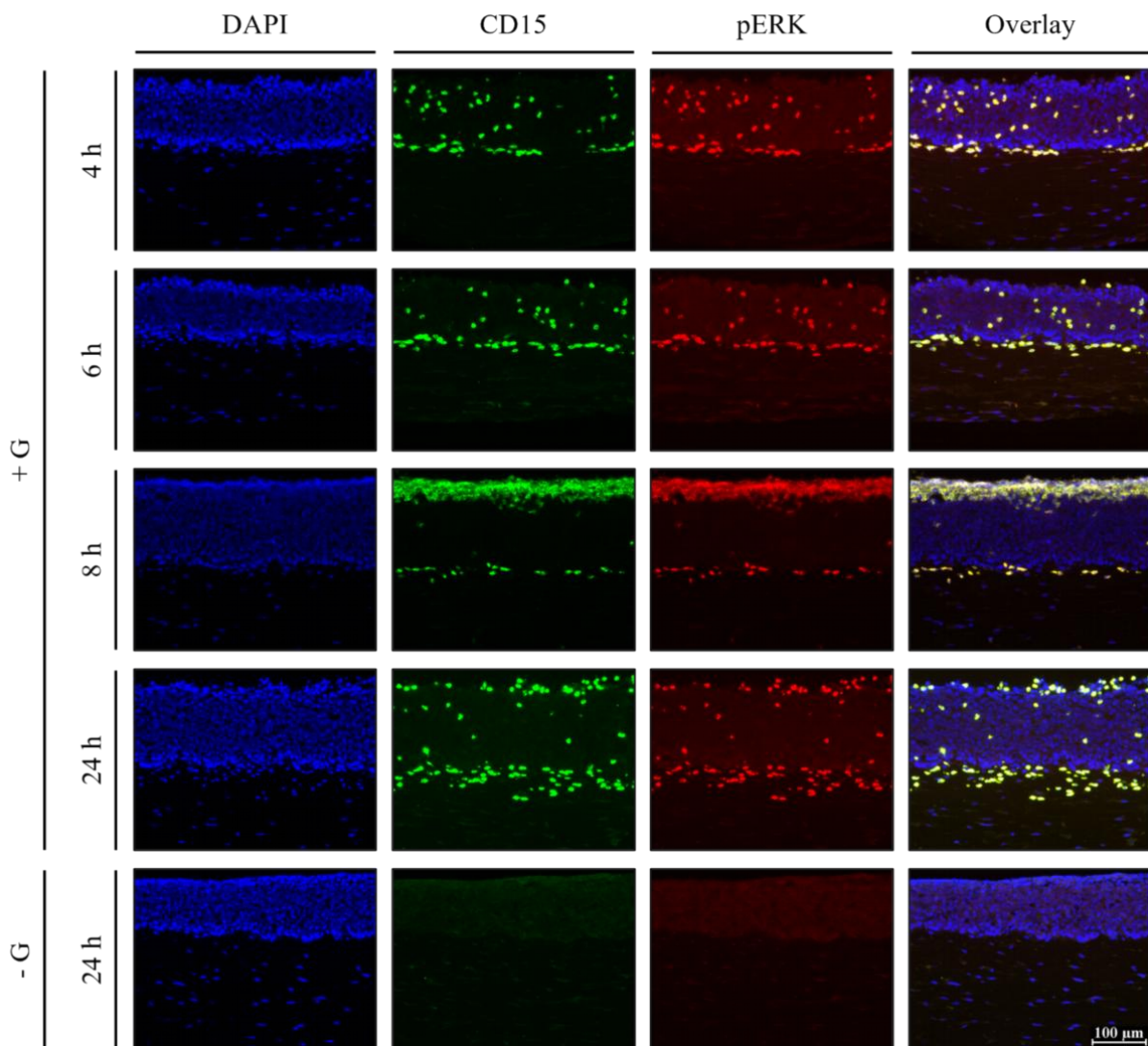
Findet zunächst PeCa P2 Beachtung (Abbildung 38), zeigt sich sowohl in Kulturen mit als auch der Kultur ohne Granulozyten eine Hintergrundfärbung für pERK in der gesamten Epithelschicht. Die beiden Immunfluoreszenzfärbungen sind im Epithel über die Zeit vollkommen kongruent, sodass bei P2 alle eingewanderten Granulozyten, unabhängig der Inkubationszeit und Immigrationstiefe, doppelt positiv sind. Zudem ist keine verstärkte pERK-Expression in Granulozyten umgebenden Tumorzellen dieser Zelllinie sichtbar.



**Abbildung 38: Nachweis von pERK und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen mit der Peniskarzinomzelllinie P2 mittels Immunfluoreszenz.** Organotypische 3D-Kulturen mit der Peniskarzinomzelllinie P2 wurden für 14 Tage kultiviert. Anschließend wurden je  $5 \times 10^6$  frisch isolierte Granulozyten von oben auf die Versuchskulturen gegeben und 4, 6, 8 oder 24 Stunden nach Granulozytenzugabe fixiert. Die Kontrollkulturen wurden lediglich mit 1x PBS behandelt und nach 24 Stunden fixiert. Um den Einfluss der Granulozyten auf die Aktivierung von ERK beurteilen zu können, wurde eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung durchgeführt. Die Detektion des pERK-spezifischen Primärantikörpers erfolgte mittels Alexa Fluor 546-markiertem Sekundärantikörper. Der

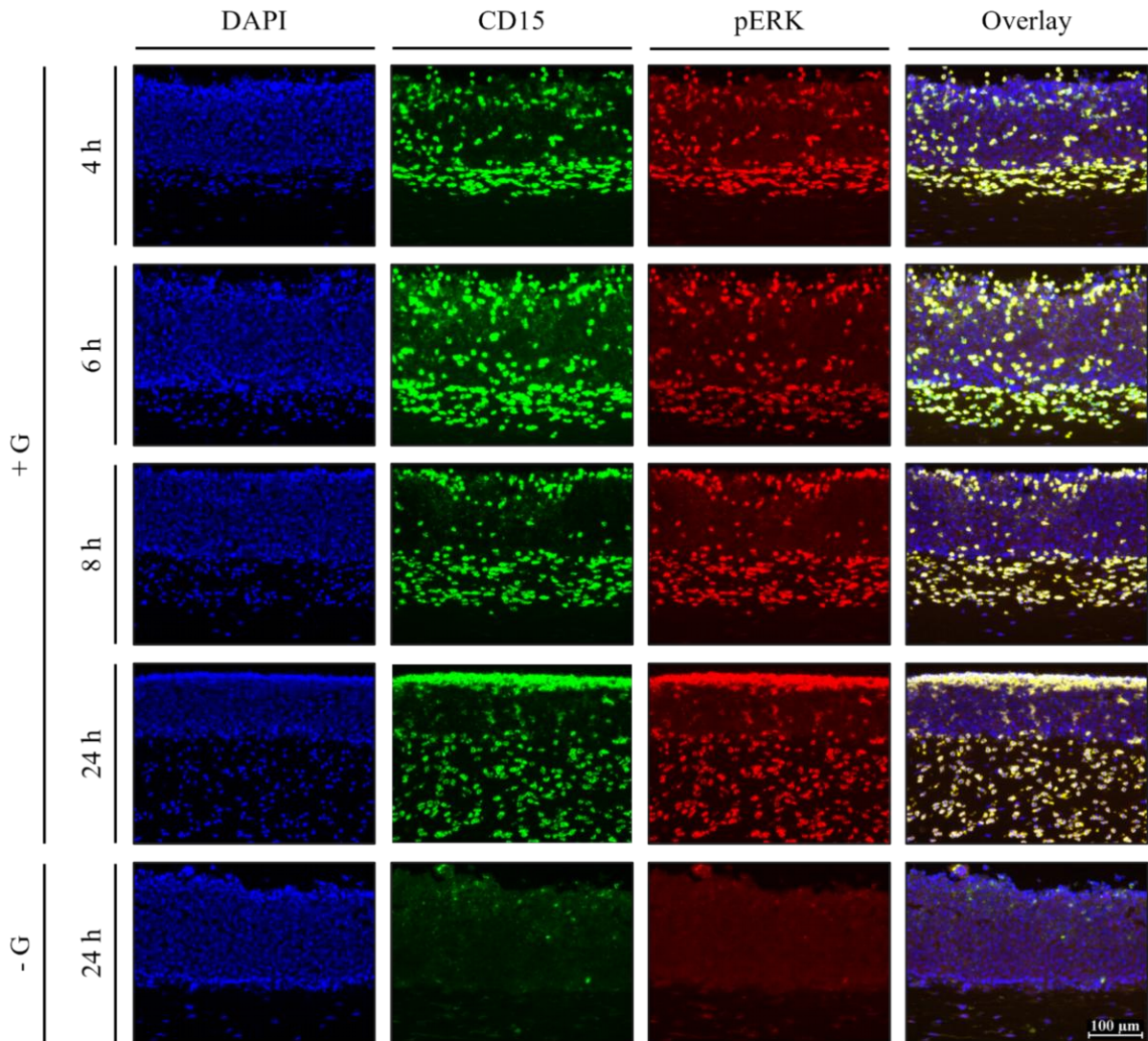
CD15-spezifische Primärantikörper wurde mithilfe eines Alexa Fluor 488-markierten Sekundärantikörpers detektiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI (1:50000) gefärbt. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mithilfe des Leica DMI6000 B Forschungsmikroskops (zweihundertfache Bildvergrößerung) fotodokumentiert. Abgebildet werden Immunfluoreszenz, CD15-Färbung und nukleäre DAPI-Färbung sowie deren Overlay. Repräsentative Bilder aus drei Färbungen einer Kultur werden gezeigt. CD = *cluster of differentiation*, DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, G = Granulozyten, pERK = *phosphorylated extracellular signal-regulated kinase*.

Im Falle der Peniskarzinomzelllinie L2 (Abbildung 39) ist in der granulozytenlosen Kultur sowie in Kulturen mit Granulozyten für pERK lediglich ein sehr schwaches, rotfarbenes Fluoreszenzsignal im gesamten Epithel detektierbar. Im Vergleich zur Kontrollkultur führt die Anwesenheit von Granulozyten, unabhängig der Inkubationszeit und Immigrationstiefe, zu keinem gesteigerten pERK-Nachweis in Tumorzellen dieser Zelllinie. Bei L2 liegt über die Zeit eine vollständige Deckungsgleichheit der CD15- und pERK-Färbungen im Epithel vor, sodass alle eingewanderten Granulozyten neben CD15 auch pERK exprimieren.



**Abbildung 39: Nachweis von pERK und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen mit der Peniskarzinomzelllinie L2 mittels Immunfluoreszenz.** Organotypische 3D-Kulturen mit der Peniskarzinomzelllinie L2 wurden für 14 Tage kultiviert. Im Anschluss wurden je  $5 \times 10^6$  frisch isolierte Granulozyten von oben auf die Versuchskulturen gegeben und 4, 6, 8 oder 24 Stunden nach Granulozytenzugabe fixiert. Die Kontrollkulturen wurden lediglich mit 1x PBS behandelt und nach 24 Stunden fixiert. Der Einfluss der Granulozyten auf die Phosphorylierung von ERK wurde mittels Immunfluoreszenz-Doppelfärbung analysiert. Die Detektion des pERK-spezifischen Primärantikörpers erfolgte mithilfe eines Alexa Fluor 546-markierten Sekundärantikörpers. Der CD15-spezifische Primärantikörper wurde mittels Alexa Fluor 488-markiertem Sekundärantikörper detektiert. Zur Visualisierung der Zellkerne wurde DAPI (1:50000) verwendet. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mithilfe des Leica DMI6000 B Forschungsmikroskops (zweihundertfache Bildvergrößerung) fotodokumentiert. Dargestellt werden Immunfluoreszenz, CD15-Färbung und nukleäre DAPI-Färbung sowie deren Overlay. Repräsentative Bilder aus drei Färbungen einer Kultur werden abgebildet. CD = *cluster of differentiation*, DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, G = Granulozyten, pERK = *phosphorylated extracellular signal-regulated kinase*.

Wird der Fokus schließlich auf PeCa L3 (Abbildung 40) gerichtet, weisen Tumorzellen dieser Zelllinie in 3D-Kulturen mit und ohne Granulozyten lediglich ein basales Aktivierungslevel für ERK im gesamten Epithel auf. Vergleichend zu P2 und L2 sind beide Immunfluoreszenzfärbungen über die Zeit in der Epithelschicht komplett deckungsgleich. Folglich liegt bei PeCa L3 in allen immigrierten Granulozyten, unabhängig der Inkubationszeit und Immigrationstiefe, ERK phosphoryliert und damit aktiviert vor. Auch über alle Zeitpunkte hinweg zeigt sich kein Signal für pERK in Granulozyten benachbarten Tumorzellen oder VHF.



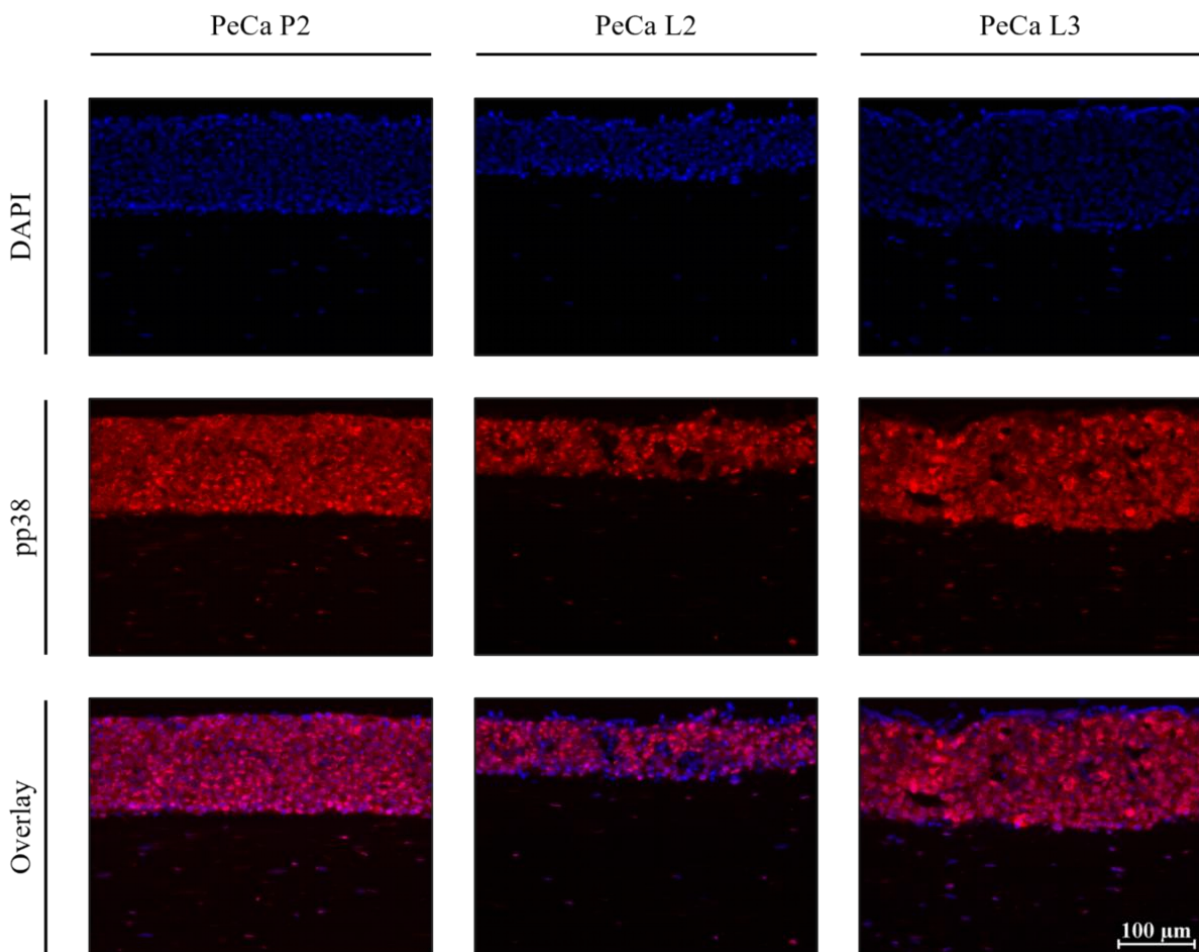
**Abbildung 40: Nachweis von pERK und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen mit der Peniskarzinomzelllinie L3 mittels Immunfluoreszenz.** Organotypische 3D-Kulturen mit der Peniskarzinomzelllinie L3 wurden für 14 Tage kultiviert. Anschließend wurden je  $5 \times 10^6$  frisch isolierte Granulozyten von oben auf die Versuchskulturen gegeben und 4, 6, 8 oder 24 Stunden nach Granulozytenzugabe fixiert. Die Kontrollkulturen wurden lediglich mit 1x PBS behandelt und nach 24 Stunden fixiert. Um den Einfluss der Granulozyten auf die Aktivierung von ERK beurteilen zu können, wurde eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung durchgeführt. Die Detektion des pERK-spezifischen Primärantikörpers erfolgte mittels Alexa Fluor 546-markiertem Sekundärantikörper. Der CD15-spezifische Primärantikörper wurde mithilfe eines Alexa Fluor 488-markierten Sekundärantikörpers detektiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI (1:50000) gefärbt. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mithilfe des Leica DMI6000 B Forschungsmikroskops (zweihundertfache Bildvergrößerung) fotodokumentiert. Abgebildet werden Immunfluoreszenz, CD15-Färbung und nukleäre DAPI-Färbung sowie deren Overlay. Repräsentative Bilder aus drei Färbungen einer Kultur werden gezeigt. CD = *cluster of differentiation*, DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, G = Granulozyten, pERK = *phosphorylated extracellular signal-regulated kinase*.

Im direkten Vergleich zur Immunhistochemie (Abbildung 32) erlaubt die Immunfluoreszenz (Abbildungen 33 bis 40) eine deutlichere Zuordnung der pERK-Färbung zu den Granulozyten bei gleichzeitig eher ungefärbt erscheinenden Tumorzellen und VHF. Während die Immunhistochemie pERK auch in Tumorzellen der drei Peniskarzinomzelllinien und VHF nachweist, ist der Nachweis in der Immunfluoreszenz vielmehr einer Hintergrundfärbung zuzuordnen. Folgeuntersuchungen mit Immunblot werden zeigen müssen, inwieweit ERK in den einzelnen beteiligten Zelltypen in seiner phosphorylierten Form vorliegt. Gegenwärtig sprechen die Daten für eine sehr starke Aktivierung von ERK in Granulozyten, unabhängig der verwendeten PeCa-Zelllinie, Inkubationszeit und Immigrationstiefe.

### 5.7 Aktivierung von p38 MAPK in organotypischen 3D-Kulturen mit den HPV-positiven PeCa-Zelllinien P2, L2 und L3

Die Regulation der Apoptose wird nicht nur durch den Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg, sondern ebenfalls maßgeblich durch den p38 MAPK-Signalweg beeinflusst (Martínez-Limón et al., 2020). Nach Analyse der ERK-Phosphorylierung wurde nun die Aktivierung von p38 MAPK mittels indirekter Immunfluoreszenz in organotypischen 3D-Kulturen mit den PeCa-Linien P2, L2 und L3 sowohl mit (Abbildung 42) als auch ohne Granulozyten (Abbildung 41) untersucht.

In granulozytenlosen Kulturen (Abbildung 41) ist bei allen drei Peniskarzinomzelllinien, jedoch am stärksten bei P2, gefolgt von L3 und schließlich L2, ein nukleärer und zytoplasmatischer Nachweis von pp38 MAPK im gesamten Epithel feststellbar. Während sich bei PeCa P2 eine Zunahme des nukleären, rotfarbenen, pp38 MAPK-spezifischen Fluoreszenzsignals in Tumorzellen der unteren Epithelhälfte und bei L2 der oberen Epithelhälfte zeigt, ist pp38 MAPK in diffus lokalisierten Tumorzellnuklei der Zelllinie L3 gesteigert nachweisbar. Bei VHF ist, unabhängig der verwendeten PeCa-Zelllinie, p38 MAPK phosphoryliert und damit aktiviert.

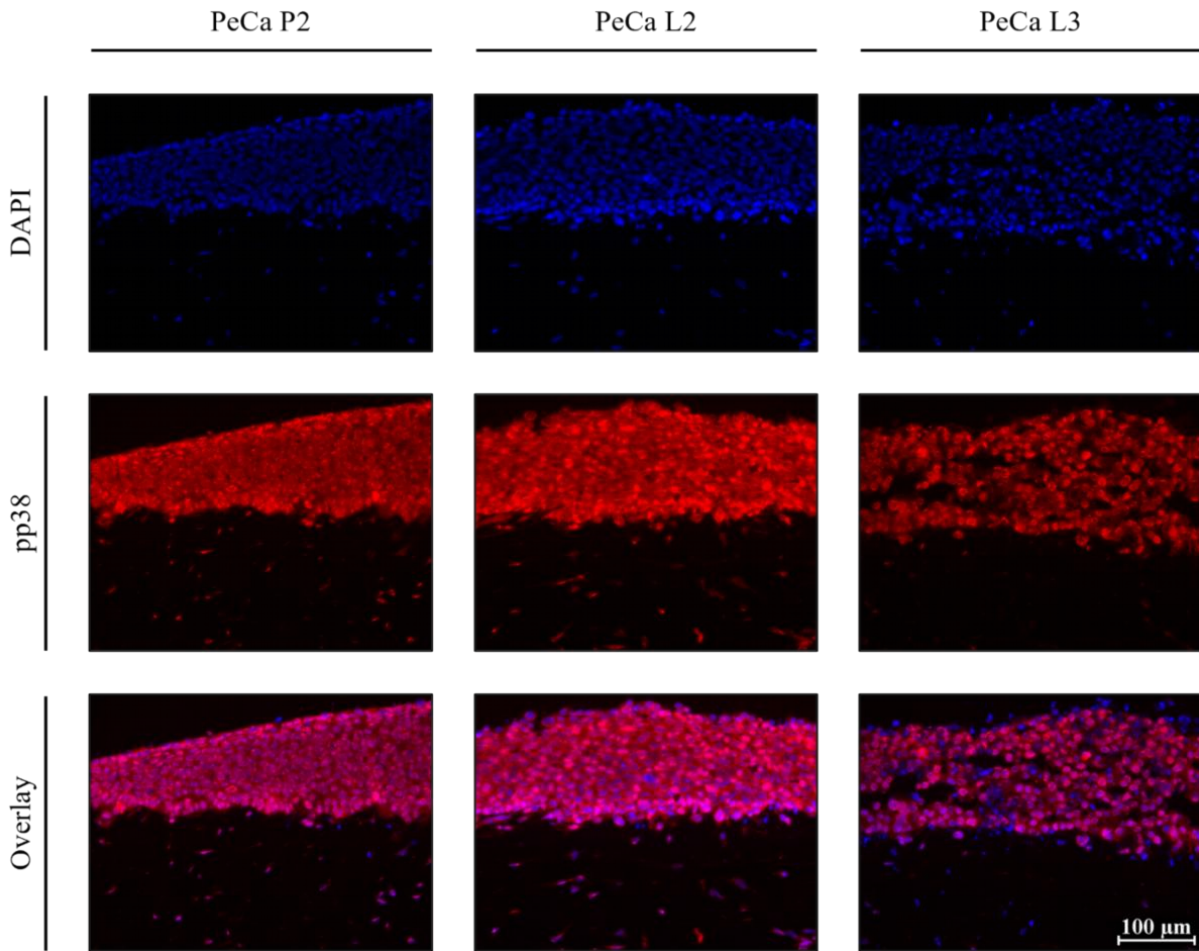


**Abbildung 41: Nachweis von Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) in organotypischen 3D-Kulturen ohne Granulozyten.** Organotypische 3D-Kulturen mit den Peniskarzinomzelllinien P2, L2 und L3 wurden für 14 Tage kultiviert. Zum Nachweis von pp38 MAPK wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Die Detektion des pp38-spezifischen Primärantikörpers

erfolgte mittels Alexa Fluor 546-markiertem Sekundärantikörper. Die Zellkerne wurden mit DAPI (1:50000) gefärbt. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mithilfe des Leica DMI6000 B Forschungsmikroskops (zweihundertfache Bildvergrößerung) fotodokumentiert. Abgebildet werden Immunfluoreszenz, nukleäre DAPI-Färbung sowie deren Overlay. Repräsentative Bilder aus drei Färbungen einer Kultur werden gezeigt. DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, pp38 = *phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase*.

Werden Granulozyten auf heranwachsende 3D-Kulturen gegeben und diese nach zwanzig Stunden fixiert (Abbildung 42), ist pp38 MAPK erneut sowohl nukleär als auch zytoplasmatisch in der gesamten Epithelschicht der drei PeCa-Zelllinien nachweisbar. Hervorzuheben ist dabei, dass nun die ausgeprägteste Aktivierung von p38 MAPK bei PeCa L2, gefolgt von P2 und L3, detektierbar ist und sich somit die Rangfolge der Zelllinien durch Anwesenheit von Granulozyten verändert. Entsprechend der granulozytenlosen Kultur ist bei PeCa P2 in der Kultur mit Granulozyten eine Zunahme der nukleären, rotfarbenen, pp38 MAPK-spezifischen Signalintensität im unteren Epitheldrittel sichtbar, während wiederholt vereinzelte, diffus im Epithel lokalisierte Tumorzellen der Zelllinie L3 eine verstärkte nukleäre pp38 MAPK-Expression zeigen. Tumorzellnuklei der Zelllinie L2 weisen in der 3D-Kultur mit Granulozyten, passend zum apikal nach basal gerichteten Einwanderungsverhalten der Granulozyten, eine intensivere rotfarbene Immunfluoreszenz für pp38 MAPK im unteren Epitheldrittel auf. VHF zeigen in Kulturen mit Granulozyten, unabhängig der verwendeten PeCa-Zelllinie, einen deutlichen pp38 MAPK-Nachweis.

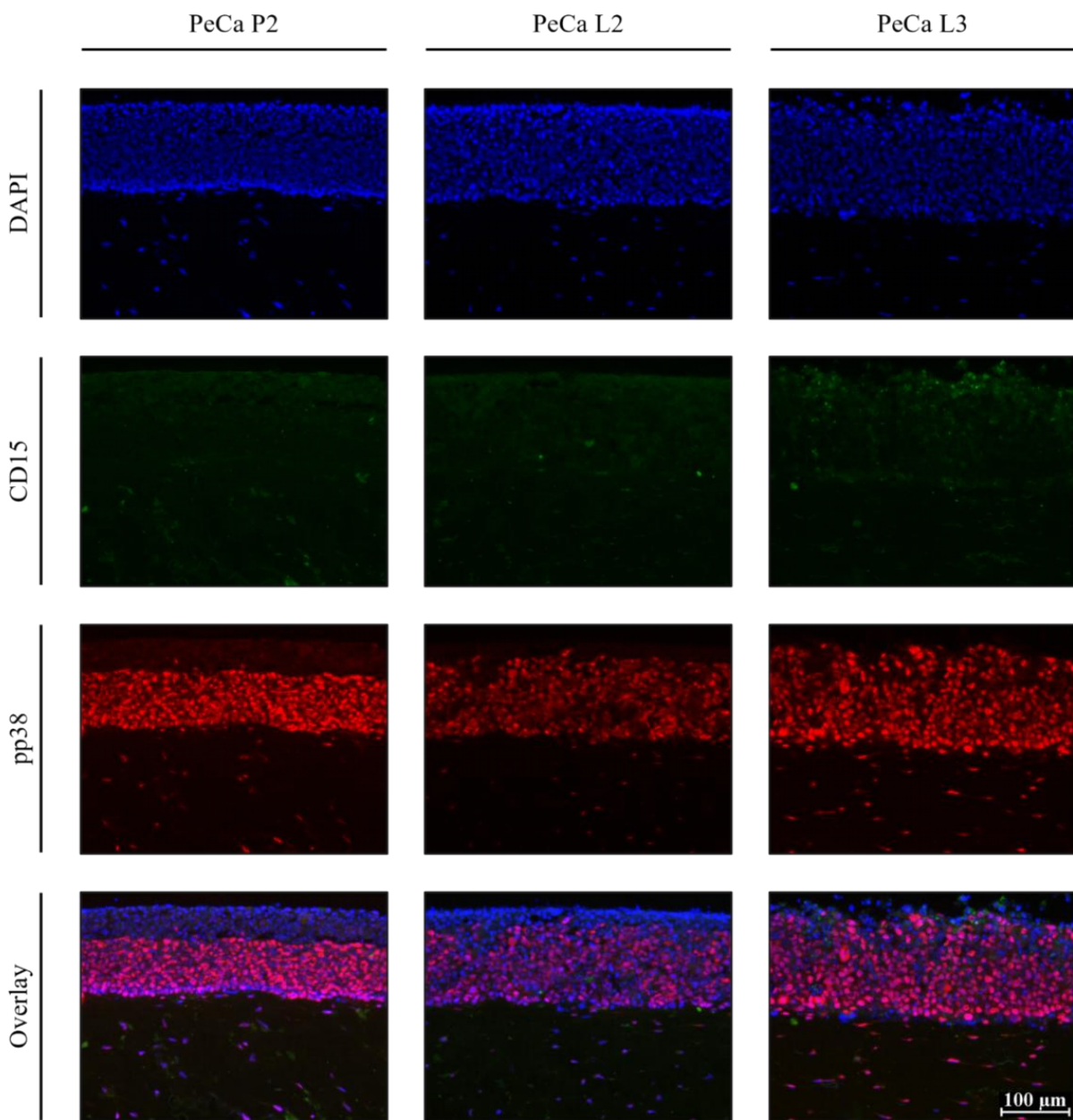
Stellt man die Beobachtungen der Abbildungen 41 und 42 gegenüber, ist anzumerken, dass p38 MAPK bei PeCa P2, L2 und L3 nicht nur in Kulturen mit Granulozyten, sondern auch in granulozytenlosen Kulturen phosphoryliert und damit aktiviert vorliegt. Während die Anwesenheit von Granulozyten bei L2 zu einem gesteigerten Fluoreszenzsignal für pp38 MAPK führt, wird die Intensität der pp38 MAPK-Expression bei P2 und L3 nicht bedeutend durch Granulozyten verstärkt. Des Weiteren unterscheidet sich bei PeCa L2 die Lokalisation der intensivsten nukleären Immunfluoreszenz für pp38 MAPK zwischen Kulturen mit und ohne Granulozyten. Bei VHF ist, unabhängig der verwendeten PeCa-Zelllinie sowie in Kulturen mit als auch ohne Granulozyten, pp38 MAPK nachweisbar.



**Abbildung 42: Nachweis von Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) in organotypischen 3D-Kulturen mit Granulozyten.** Organotypische 3D-Kulturen mit den Peniskarzinomzelllinien P2, L2 und L3 wurden für 14 Tage kultiviert. 20 Stunden vor Fixierung wurden je  $5 \times 10^6$  frisch isolierte Granulozyten von oben auf die Kulturen gegeben. Zum Nachweis von pp38 MAPK wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Der pp38-spezifische Primärantikörper wurde mittels Alexa Fluor 546-markiertem Sekundärantikörper detektiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI (1:50000) gefärbt. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mithilfe des Leica DMI6000 B Forschungsmikroskops (zweihundertfache Bildvergrößerung) fotodokumentiert. Abgebildet werden Immunfluoreszenz, nukleäre DAPI-Färbung sowie deren Overlay. Repräsentative Bilder aus drei Färbungen einer Kultur werden gezeigt. DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, pp38 = *phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase*.

Als Nächstes wurde eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung mit pp38 MAPK und CD15 durchgeführt (Abbildungen 43 bis 50).

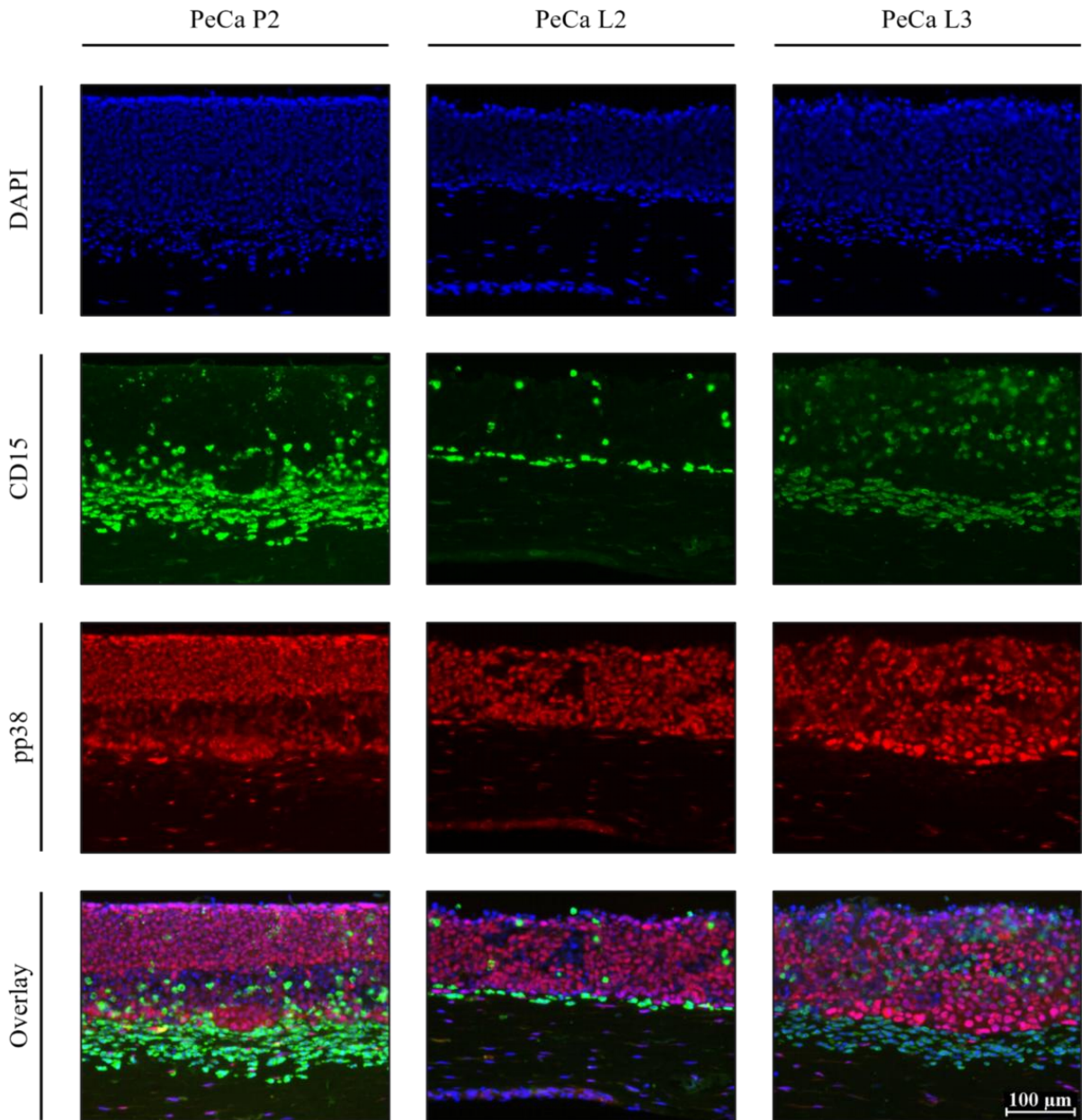
In 3D-Kulturen ohne Granulozyten (Abbildung 43) zeigen PeCa P2, L2 und L3 einen hauptsächlich nukleär, aber ebenfalls zytoplasmatisch lokalisierten pp38 MAPK-Nachweis im gesamten Epithel. Dabei gilt es zu betonen, dass bei P2 und L3 das rotfarbene, pp38 MAPK-spezifische Fluoreszenzsignal wesentlich stärker ausgeprägt ist als bei L2. Erwartungsgemäß ist in granulozytenlosen Kulturen keine Expression des Granulozytenmarkers CD15 detektierbar. Bei VHF liegt, unabhängig der verwendeten PeCa-Zelllinie, p38 MAPK phosphoryliert und damit aktiviert vor.



**Abbildung 43: Nachweis von Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen ohne Granulozyten mittels Immunfluoreszenz.** Organotypische 3D-Kulturen mit den Peniskarzinomzelllinien P2, L2 und L3 wurden für 14 Tage kultiviert. Die hier abgebildeten Kontrollkulturen wurden mit 1x PBS behandelt und nach 24 Stunden fixiert. Die Detektion

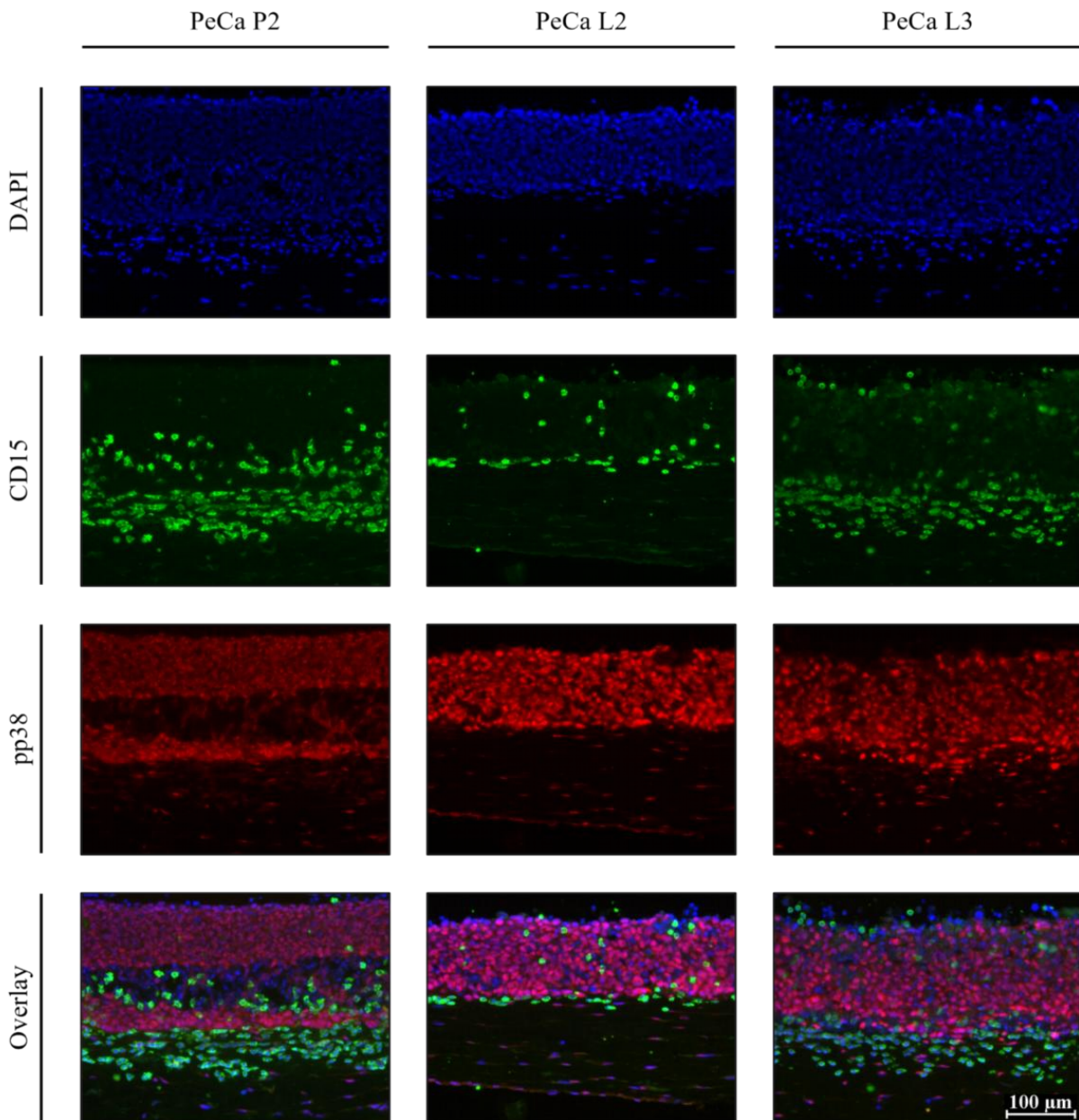
des pp38-spezifischen Primärantikörpers erfolgte mittels Alexa Fluor 546-markiertem Sekundärantikörper. Der CD15-spezifische Primärantikörper wurde mithilfe eines Alexa Fluor 488-markierten Sekundärantikörpers detektiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI (1:50000) gefärbt. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mithilfe des Leica DMI6000 B Forschungsmikroskops (zweihundertfache Bildvergrößerung) fotodokumentiert. Abgebildet werden Immunfluoreszenz, CD15-Färbung und nukleäre DAPI-Färbung sowie deren Overlay. Repräsentative Bilder aus drei Färbungen einer Kultur werden gezeigt. CD = *cluster of differentiation*, DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, pp38 = *phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase*.

Lässt man Granulozyten in 3D-Kulturen immigrieren, ist nach vier Stunden (Abbildung 44) eine augenscheinlich gleichwertige, vor allem nukleäre, aber auch zytoplasmatische Aktivierung von p38 MAPK im gesamten Epithel der drei PeCa-Zelllinien sichtbar. Insbesondere bei L3, allerdings ansatzweise auch bei P2, zeigt sich zudem eine Intensitätszunahme der rotfarbenen, nukleären, pp38 MAPK-spezifischen Immunfluoreszenz in zu Granulozyten benachbarten Tumorzellen des unteren Epitheldrittels. Während bei P2 vereinzelte Granulozyten neben CD15 auch pp38 MAPK exprimieren, ist im Falle der Zelllinien L2 und L3 bei Granulozyten lediglich ein CD15-Nachweis detektierbar. VHF weisen, unabhängig der verwendeten PeCa-Zelllinie sowie in Kulturen mit und ohne Granulozyten, ein rotfarbenes Fluoreszenzsignal für pp38 MAPK auf.



**Abbildung 44: Nachweis von Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen mit Granulozyten für 4 Stunden mittels Immunfluoreszenz.** Organotypische 3D-Kulturen mit den Peniskarzinomzelllinien P2, L2 und L3 wurden für 14 Tage kultiviert. Im Anschluss wurden je  $5 \times 10^6$  frisch isolierte Granulozyten von oben auf die Versuchskulturen gegeben und 4 Stunden nach Granulozytenzugabe fixiert. Der Einfluss der Granulozyten auf die Phosphorylierung von p38 MAPK wurde mittels Immunfluoreszenz-Doppelfärbung analysiert. Die Detektion des pp38-spezifischen Primärantikörpers erfolgte mithilfe eines Alexa Fluor 546-markierten Sekundärantikörpers. Der CD15-spezifische Primärantikörper wurde mittels Alexa Fluor 488-markiertem Sekundärantikörper detektiert. Zur Darstellung der Zellkerne wurde DAPI (1:50000) verwendet. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mithilfe des Leica DMI6000 B Forschungsmikroskops (zweihundertfache Bildvergrößerung) fotodokumentiert. Gezeigt werden Immunfluoreszenz, CD15-Färbung und nukleäre DAPI-Färbung sowie deren Overlay. Repräsentative Bilder aus drei Färbungen einer Kultur werden abgebildet. CD = *cluster of differentiation*, DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, pp38 = *phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase*.

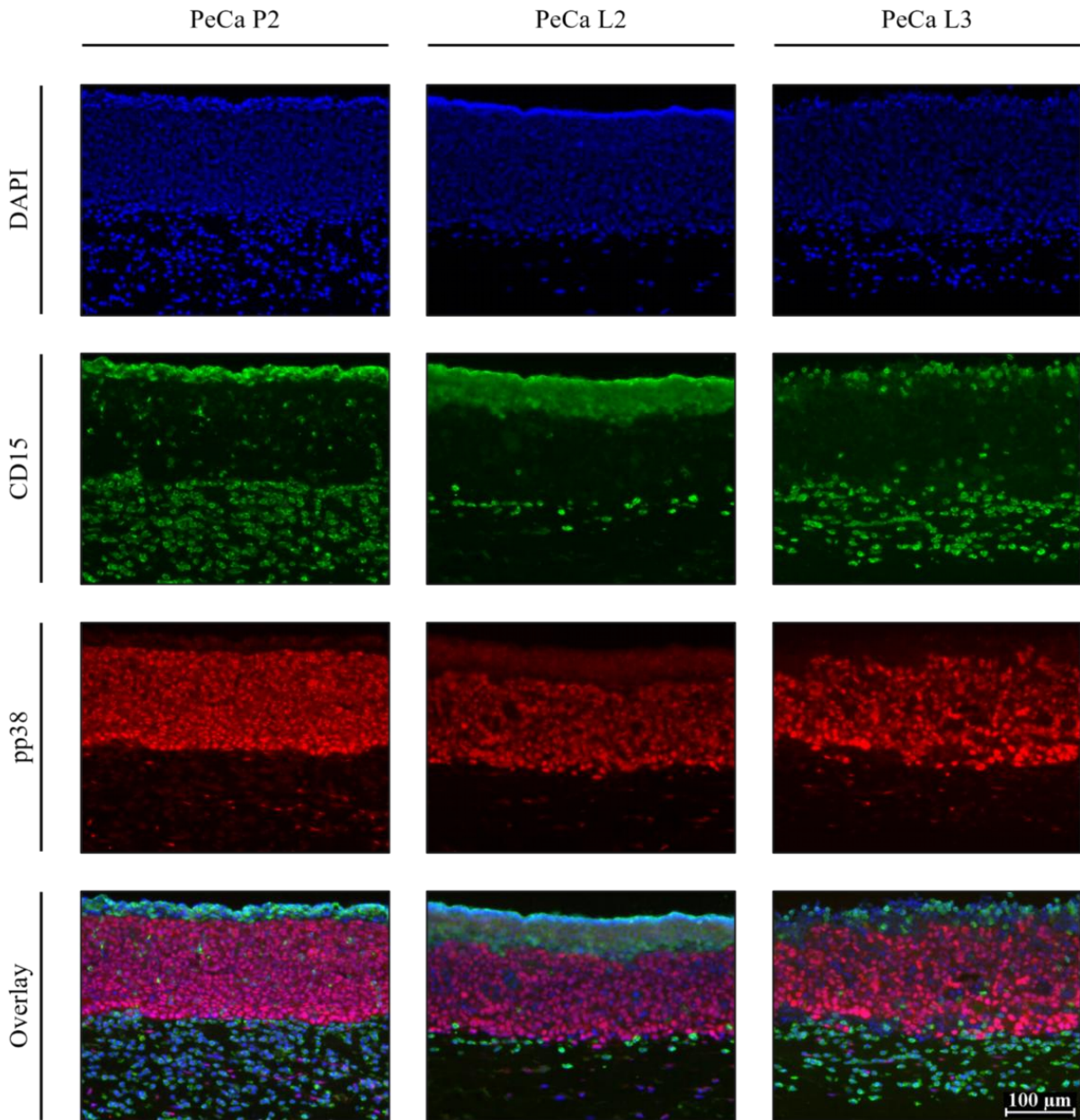
Nach sechsständiger Inkubation der Granulozyten (Abbildung 45) zeigt sich weiterhin bei allen drei Peniskarzinomzelllinien, jedoch nun am stärksten bei L2, gefolgt von L3 und zuletzt P2, eine nukleäre und zytoplasmatische pp38 MAPK-Expression in der gesamten Epithelschicht. Im Falle der Zelllinien P2 und insbesondere L3 ist darüber hinaus eine gesteigerte nukleäre Aktivierung von p38 MAPK in Granulozyten umgebenden Tumorzellen des unteren Epitheldrittels sichtbar. In 3D-Kulturen mit P2, L2 und L3 ist bei Granulozyten CD15, aber keine pp38 MAPK detektierbar.



**Abbildung 45: Nachweis von Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen mit Granulozyten für 6 Stunden mittels Immunfluoreszenz.** Organotypische 3D-Kulturen mit den Peniskarzinomzelllinien P2, L2 und L3 wurden für 14 Tage kultiviert. Anschließend wurden je  $5 \times 10^6$  frisch isolierte Granulozyten von oben auf die Versuchskulturen gegeben und 6 Stunden nach Granulozytenzugabe fixiert. Um den Einfluss der Granulozyten auf die Aktivierung von p38 MAPK beurteilen zu können, wurde eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung durchgeführt. Die Detektion des pp38-spezifischen Primärantikörpers erfolgte mittels Alexa Fluor 546-markiertem Sekundärantikörper. Der CD15-spezifische Primärantikörper wurde

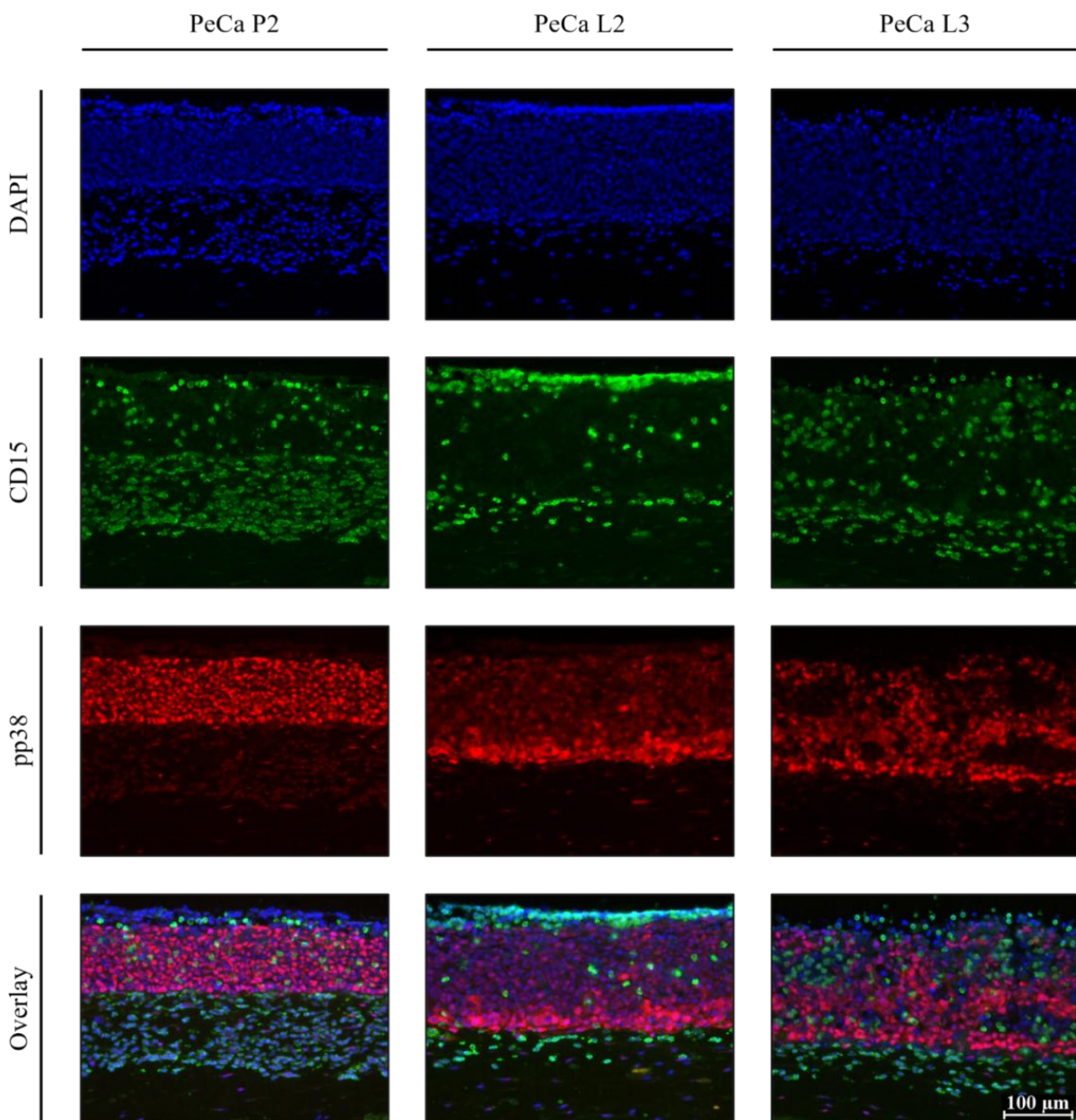
mithilfe eines Alexa Fluor 488-markierten Sekundärantikörpers detektiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI (1:50000) gefärbt. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mithilfe des Leica DMI6000 B Forschungsmikroskops (zweihundertfache Bildvergrößerung) fotodokumentiert. Abgebildet werden Immunfluoreszenz, CD15-Färbung und nukleäre DAPI-Färbung sowie deren Overlay. Repräsentative Bilder aus drei Färbungen einer Kultur werden gezeigt. CD = *cluster of differentiation*, DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, pp38 = *phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase*.

In organotypischen 3D-Kulturen, die acht Stunden nach Zugabe der Granulozyten fixiert wurden (Abbildung 46), ist erneut nukleär und zytoplasmatisch lokalisierte pp38 MAPK im gesamten Epithel der drei PeCa-Zelllinien, nun allerdings am stärksten bei P2, gefolgt von L3 und schließlich L2, nachweisbar. Hervorzuheben ist die nicht nur bei PeCa L3 und P2, sondern neuerdings im Ansatz auch bei L2 sichtbare Zunahme des nukleären, rotfarbenen, pp38 MAPK-spezifischen Fluoreszenzsignals in Tumorzellen des unteren Epitheldrittels, sofern sich Granulozyten in deren Nähe befinden. Während in Kulturen mit P2, L2 und L3 immigrierte Granulozyten lediglich CD15 exprimieren, liegt p38 MAPK bei VHF, unabhängig der verwendeten PeCa-Zelllinie, phosphoryliert und damit aktiviert vor. Um zu bestätigen, dass es sich hierbei tatsächlich um pp38 MAPK-positive VHF und nicht um invadierte Tumorzellen handelt, müsste man ebenfalls mit einem Fibroblastenmarker gegenfärben.



**Abbildung 46: Nachweis von Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen mit Granulozyten für 8 Stunden mittels Immunfluoreszenz.** Organotypische 3D-Kulturen mit den Peniskarzinomzelllinien P2, L2 und L3 wurden für 14 Tage kultiviert. Im Anschluss wurden je  $5 \times 10^6$  frisch isolierte Granulozyten von oben auf die Versuchskulturen gegeben und 8 Stunden nach Granulozytenzugabe fixiert. Eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung wurde durchgeführt, um den Einfluss der Granulozyten auf die Aktivierung von p38 MAPK zu untersuchen. Die Detektion des pp38-spezifischen Primärantikörpers erfolgte mittels Alexa Fluor 546-markiertem Sekundärantikörper. Der CD15-spezifische Primärantikörper wurde mithilfe eines Alexa Fluor 488-markierten Sekundärantikörpers detektiert. Zur Visualisierung der Zellkerne wurde DAPI (1:50000) verwendet. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mithilfe des Leica DMI6000 B Forschungsmikroskops (zweihundertfache Bildvergrößerung) fotodokumentiert. Dargestellt werden Immunfluoreszenz, CD15-Färbung und nukleäre DAPI-Färbung sowie deren Overlay. Repräsentative Bilder aus drei Färbungen einer Kultur werden abgebildet. CD = *cluster of differentiation*, DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, pp38 = *phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase*.

Vierundzwanzig Stunden nach Immigration der Granulozyten (Abbildung 47) ist bei P2 und L3 eine vor allem nukleäre, aber auch zytoplasmatische pp38 MAPK-Expression im gesamten Epithel detektierbar. Zudem ist bei PeCa L3 eine gesteigerte nukleäre p38 MAPK-Aktivierung in Tumorzellen der unteren Epithelhälfte, die sich in direkter Umgebung von Granulozyten aufhalten, erkennbar. Die 3D-Kultur mit L2 zeigt eine intensive, gleichermaßen nukleär und zytoplasmatisch lokalisierte, rotfarbene, pp38 MAPK-spezifische Immunfluoreszenz in zu Granulozyten benachbarten Tumorzellen des unteren Epitheldrittels, während in der restlichen Epithelschicht pp38 MAPK lediglich schwach nachweisbar ist. Granulozyten exprimieren, unabhängig der verwendeten PeCa-Zelllinie, ausschließlich CD15 und keine pp38 MAPK.

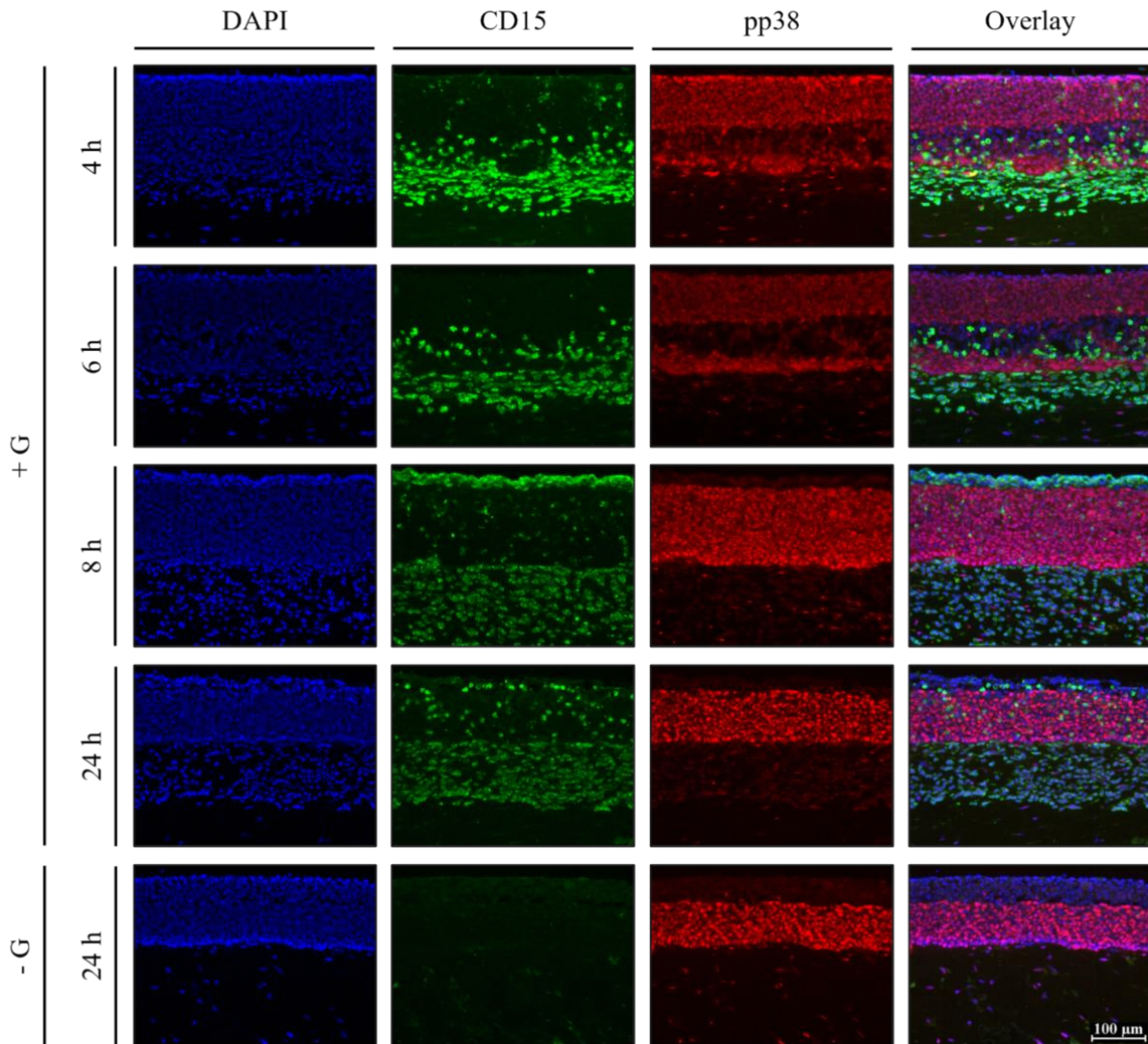


**Abbildung 47: Nachweis von Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen mit Granulozyten für 24 Stunden mittels Immunfluoreszenz.** Organotypische 3D-Kulturen mit den Peniskarzinomzelllinien P2, L2 und L3 wurden für 14 Tage

kultiviert. Anschließend wurden je  $5 \times 10^6$  frisch isolierte Granulozyten von oben auf die Versuchskulturen gegeben und 24 Stunden nach Granulozytenzugabe fixiert. Um den Einfluss der Granulozyten auf die Aktivierung von p38 MAPK beurteilen zu können, wurde eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung durchgeführt. Die Detektion des pp38-spezifischen Primärantikörpers erfolgte mittels Alexa Fluor 546-markiertem Sekundärantikörper. Der CD15-spezifische Primärantikörper wurde mithilfe eines Alexa Fluor 488-markierten Sekundärantikörpers detektiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI (1:50000) gefärbt. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mithilfe des Leica DMI6000 B Forschungsmikroskops (zweihundertfache Bildvergrößerung) fotodokumentiert. Abgebildet werden Immunfluoreszenz, CD15-Färbung und nukleäre DAPI-Färbung sowie deren Overlay. Repräsentative Bilder aus drei Färbungen einer Kultur werden gezeigt. CD = *cluster of differentiation*, DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, pp38 = *phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase*.

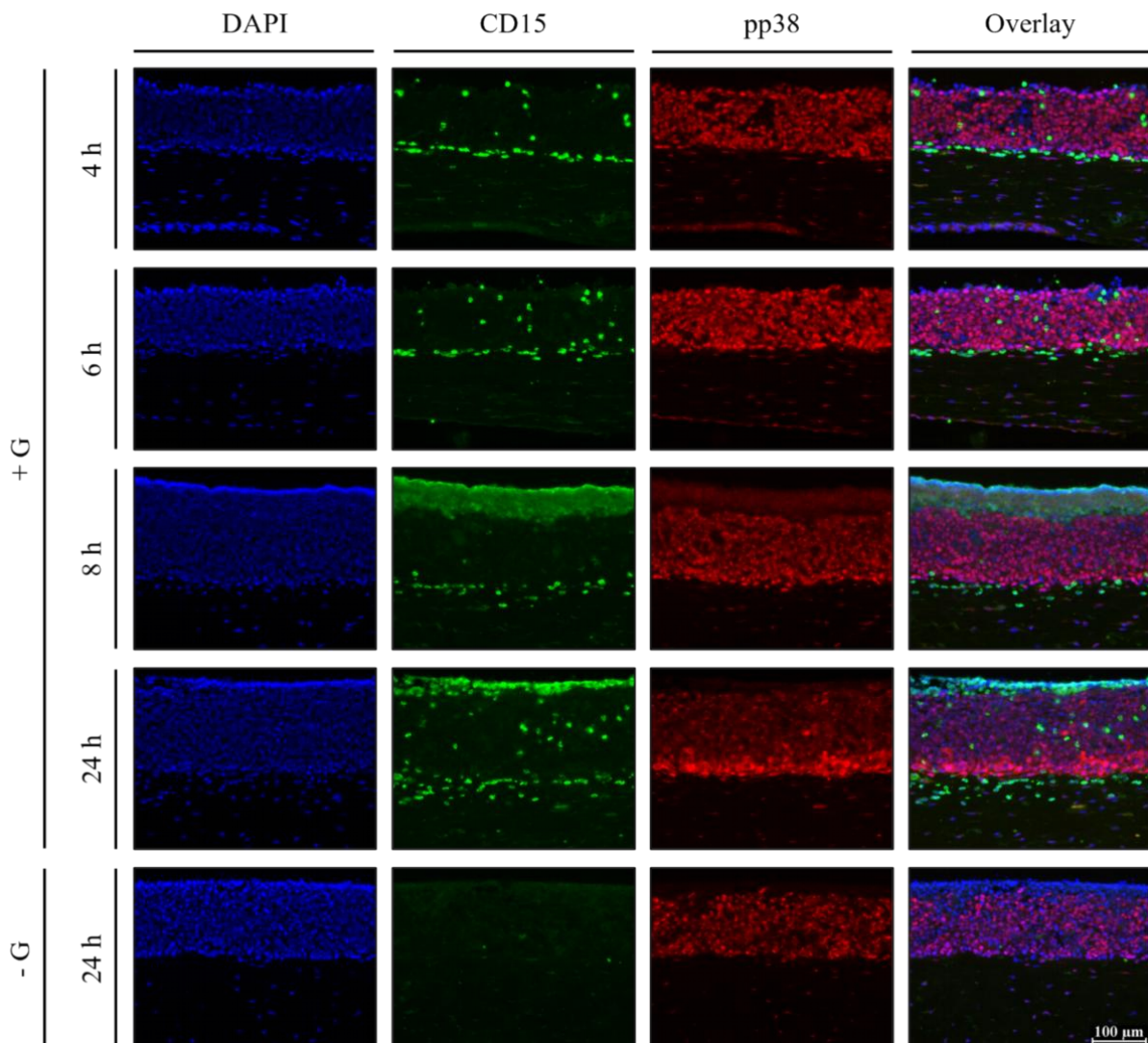
Neben Abbildungen zum Vergleich der drei PeCa-Zelllinien zu einem Zeitpunkt (Abbildungen 43 bis 47) wurden ebenfalls Abbildungen für jede Zelllinie pro Zeitpunkt (Abbildungen 48 bis 50) der pp38 MAPK- und CD15-spezifischen Immunfluoreszenz erstellt.

Im Falle der Primärtumorzelllinie P2 (Abbildung 48) zeigt sich sowohl in 3D-Kulturen mit Granulozyten, unabhängig der Inkubationszeit, als auch in der granulozytenlosen Kultur eine hauptsächlich nukleäre, allerdings ebenfalls zytoplasmatische Aktivierung von p38 MAPK im gesamten Epithel. Erwähnenswert ist dabei, dass vier, sechs und acht Stunden nach Immigration der Granulozyten ein leicht verstärkter nukleärer pp38 MAPK-Nachweis in Tumorzellen des unteren Epitheldrittels, die in der Nähe der Granulozyten lokalisiert sind, detektierbar ist. Alle in 3D-Kulturen mit PeCa P2 eingewanderten Granulozyten exprimieren über die Zeit CD15 und mit Ausnahme von ein bis zwei vereinzelt Granulozyten über die gesamte Kultur nach vierstündiger Inkubation keine pp38 MAPK. VHF weisen in Kulturen mit P2 ein im direkten Vergleich zu den Tumorzellen dezenteres, rotfarbendes Fluoreszenzsignal für pp38 MAPK auf.



**Abbildung 48: Nachweis von Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen mit der Peniskarzinomzelllinie P2 mittels Immunfluoreszenz.** Organotypische 3D-Kulturen mit der Peniskarzinomzelllinie P2 wurden für 14 Tage kultiviert. Im Anschluss wurden je  $5 \times 10^6$  frisch isolierte Granulozyten von oben auf die Versuchskulturen gegeben und 4, 6, 8 oder 24 Stunden nach Granulozytenzugabe fixiert. Die Kontrollkulturen wurden lediglich mit 1x PBS behandelt und nach 24 Stunden fixiert. Der Einfluss der Granulozyten auf die Phosphorylierung von p38 MAPK wurde mittels Immunfluoreszenz-Doppelfärbung analysiert. Die Detektion des pp38-spezifischen Primärantikörpers erfolgte mithilfe eines Alexa Fluor 546-markierten Sekundärantikörpers. Der CD15-spezifische Primärantikörper wurde mittels Alexa Fluor 488-markiertem Sekundärantikörper detektiert. Zur Darstellung der Zellkerne wurde DAPI (1:50000) verwendet. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mithilfe des Leica DMI6000 B Forschungsmikroskops (zweihundertfache Bildvergrößerung) fotodokumentiert. Gezeigt werden Immunfluoreszenz, CD15-Färbung und nukleäre DAPI-Färbung sowie deren Overlay. Repräsentative Bilder aus drei Färbungen einer Kultur werden abgebildet. CD = *cluster of differentiation*, DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, G = Granulozyten, pp38 = *phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase*.

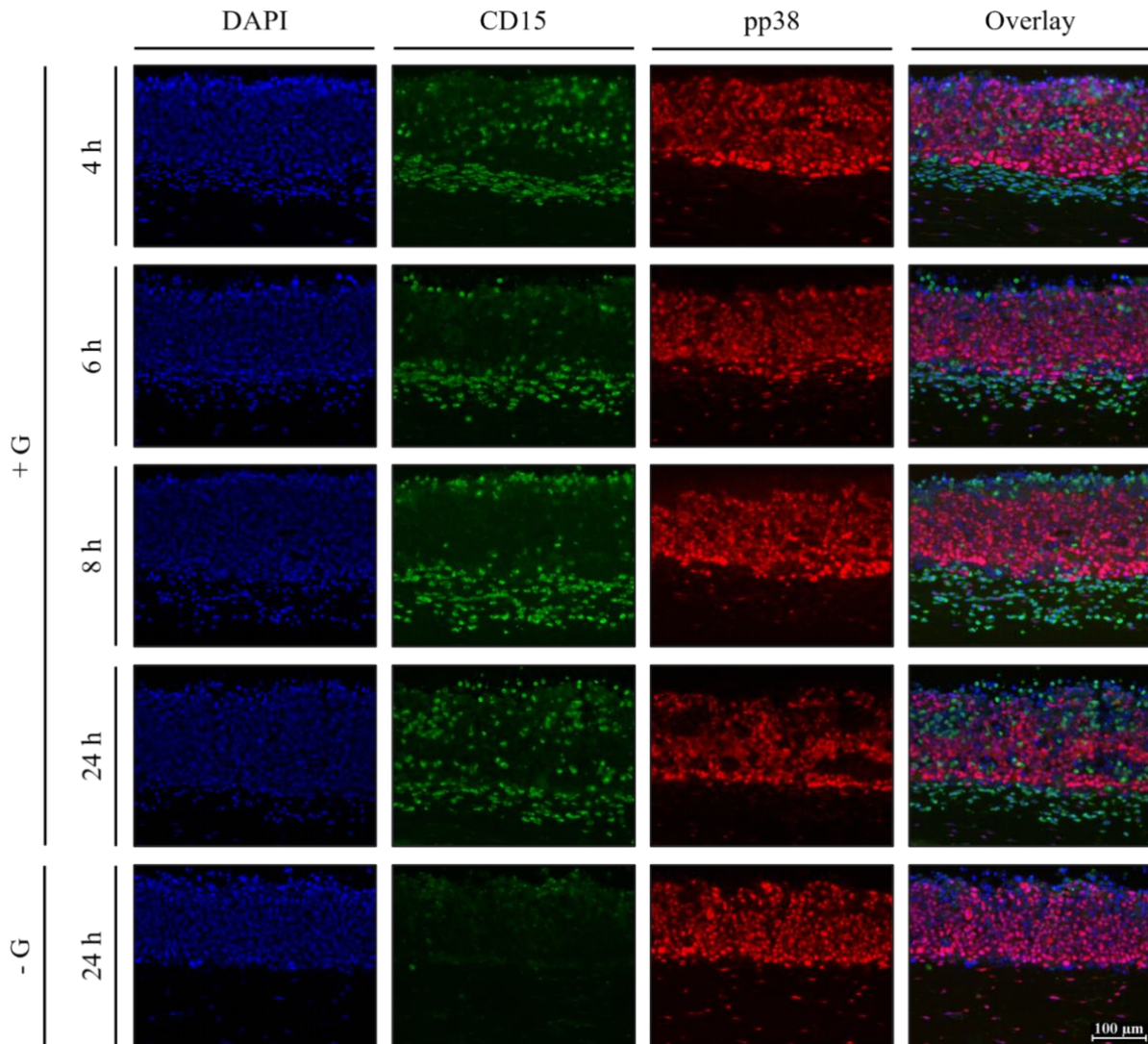
Im Folgenden wird die Aktivierung von p38 MAPK in 3D-Kulturen mit der PeCa-Zelllinie L2 in Abhängigkeit der immigrierten Granulozyten nach Zeit verglichen (Abbildung 49). Bei PeCa L2 zeigt sich in der granulozytenlosen Kultur sowie in 3D-Kulturen mit Granulozyten ein vor allem nukleär, aber auch zytoplasmatisch lokalisierter pp38 MAPK-Nachweis in der gesamten Epithelschicht. Im direkten Vergleich zur Kultur ohne Granulozyten resultiert aus Anwesenheit von Granulozyten, mit Ausnahme der vierundzwanzigstündigen Inkubation, eine verstärkte Aktivierung von p38 MAPK im gesamten Epithel. Darüber hinaus ist in 3D-Kulturen mit L2, die acht und insbesondere vierundzwanzig Stunden nach Zugabe der Granulozyten fixiert wurden, ein gesteigertes nukleäres und zytoplasmatisches Fluoreszenzsignal für pp38 MAPK im unteren Epitheldrittel sichtbar. Während Granulozyten, unabhängig der Inkubationszeit und Immigrationstiefe, bei L2 lediglich CD15 exprimieren, ist die p38 MAPK bei VHF phosphoryliert und damit aktiviert.



**Abbildung 49: Nachweis von Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen mit der Peniskarzinomzelllinie L2 mittels Immunfluoreszenz.** Organotypische 3D-Kulturen mit der Peniskarzinomzelllinie L2 wurden für 14 Tage kultiviert. Anschließend wurden je  $5 \times 10^6$  frisch isolierte Granulozyten von oben auf die Versuchskulturen gegeben und 4, 6, 8 oder 24 Stunden nach Granulozytenzugabe fixiert. Die Kontrollkulturen wurden

lediglich mit 1x PBS behandelt und nach 24 Stunden fixiert. Um den Einfluss der Granulozyten auf die Aktivierung von p38 MAPK beurteilen zu können, wurde eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung durchgeführt. Die Detektion des pp38-spezifischen Primärantikörpers erfolgte mittels Alexa Fluor 546-markiertem Sekundärantikörper. Der CD15-spezifische Primärantikörper wurde mithilfe eines Alexa Fluor 488-markierten Sekundärantikörpers detektiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI (1:50000) gefärbt. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mithilfe des Leica DMI6000 B Forschungsmikroskops (zweihundertfache Bildvergrößerung) fotodokumentiert. Abgebildet werden Immunfluoreszenz, CD15-Färbung und nukleäre DAPI-Färbung sowie deren Overlay. Repräsentative Bilder aus drei Färbungen einer Kultur werden gezeigt. CD = *cluster of differentiation*, DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, G = Granulozyten, pp38 = *phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase*.

Findet schließlich PeCa L3 Beachtung (Abbildung 50), ist nicht nur in 3D-Kulturen mit Granulozyten, unabhängig der Inkubationszeit, sondern auch in der Kultur ohne Granulozyten ein hauptsächlich nukleärer, jedoch auch zytoplasmatischer pp38 MAPK-Nachweis im gesamten Epithel feststellbar. Bereits ab vierstündiger bis einschließlich vierundzwanzigstündiger Inkubation der Granulozyten zeigt sich im Falle der Zelllinie L3 eine gesteigerte nukleäre rotfarbene Immunfluoreszenz für pp38 MAPK in zu Granulozyten benachbarten Tumorzellen des unteren Epitheldrittels. Folglich führt die Anwesenheit von Granulozyten zu einer verstärkten Phosphorylierung und damit Aktivierung von p38 MAPK bei PeCa L3. Vergleichend zu PeCa P2 und L2 exprimieren Granulozyten, unabhängig der Inkubationszeit und Immigrationstiefe, auch in 3D-Kulturen mit L3 ausschließlich CD15 und keine pp38 MAPK.



**Abbildung 50: Nachweis von Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen mit der Peniskarzinomzelllinie L3 mittels Immunfluoreszenz.** Organotypische 3D-Kulturen mit der Peniskarzinomzelllinie L3 wurden für 14 Tage kultiviert. Im Anschluss wurden je  $5 \times 10^6$  frisch isolierte Granulozyten von oben auf die Versuchskulturen gegeben und 4, 6, 8 oder 24 Stunden nach Granulozytenzugabe fixiert. Die Kontrollkulturen wurden lediglich mit 1x PBS behandelt und nach 24 Stunden fixiert. Eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung wurde durchgeführt, um den Einfluss der Granulozyten auf die Aktivierung von p38 MAPK zu untersuchen. Die Detektion des pp38-spezifischen Primärantikörpers erfolgte mittels Alexa Fluor 546-markiertem Sekundärantikörper. Der CD15-spezifische Primärantikörper wurde mithilfe eines Alexa Fluor 488-markierten Sekundärantikörpers detektiert. Zur Visualisierung der Zellkerne wurde DAPI (1:50000) verwendet. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mithilfe des Leica DMI6000 B Forschungsmikroskops (zweihundertfache Bildvergrößerung) fotodokumentiert. Dargestellt werden Immunfluoreszenz, CD15-Färbung und nukleäre DAPI-Färbung sowie deren Overlay. Repräsentative Bilder aus drei Färbungen einer Kultur werden abgebildet. CD = *cluster of differentiation*, DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, G = Granulozyten, pp38 = *phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase*.

Demzufolge zeigt sich in 3D-Kulturen mit und ohne Granulozyten, unabhängig der verwendeten PeCa-Zelllinie, ein vor allem nukleär, allerdings auch zytoplasmatisch lokalisierter pp38 MAPK-Nachweis im gesamten Epithel. Während nukleäre p38 MAPK insbesondere bei PeCa L3, jedoch ansatzweise auch bei P2, in Granulozyten umgebenden Tumorzellen des unteren Epitheldrittels verstärkt aktiviert ist, führt im Falle der Zelllinie L2 die Anwesenheit von Granulozyten, im direkten Vergleich zur granulozytenlosen Kultur, zu einer leicht gesteigerten pp38 MAPK-spezifischen Immunfluoreszenz in der gesamten Epithelschicht. Bei allen drei Peniskarzinomzelllinien exprimieren Granulozyten, unabhängig der Inkubationszeit und Immigrationstiefe, lediglich CD15 und keine pp38 MAPK. Im Gegensatz dazu ist bei VHF, unabhängig der verwendeten PeCa-Zelllinie, in Kulturen mit und ohne Granulozyten sowie über alle Zeitpunkte hinweg, p38 MAPK phosphoryliert und damit aktiviert.

Auf Basis dieser Daten liegt p38 MAPK in Granulozyten, unabhängig der verwendeten PeCa-Zelllinie, Inkubationszeit und Immigrationstiefe, nicht in phosphorylierter und damit nicht in aktivierter Form vor, sodass unter diesen Kulturbedingungen p38 MAPK-abhängige Signalwege in Granulozyten nicht aktiv zu sein scheinen. Nichtsdestotrotz zeigt sich ein deutlicher pp38 MAPK-Nachweis in Tumorzellen der HPV-positiven PeCa-Zelllinien P2, L2 und L3. Hervorzuheben ist die durch direkten Kontakt zu Granulozyten verstärkte Aktivierung p38 MAPK-abhängiger Signalwege in den penilen Tumorzellen.

## **5.8 Aktivierung von STAT3 in organotypischen 3D-Kulturen mit den HPV-positiven PeCa-Zelllinien P2, L2 und L3**

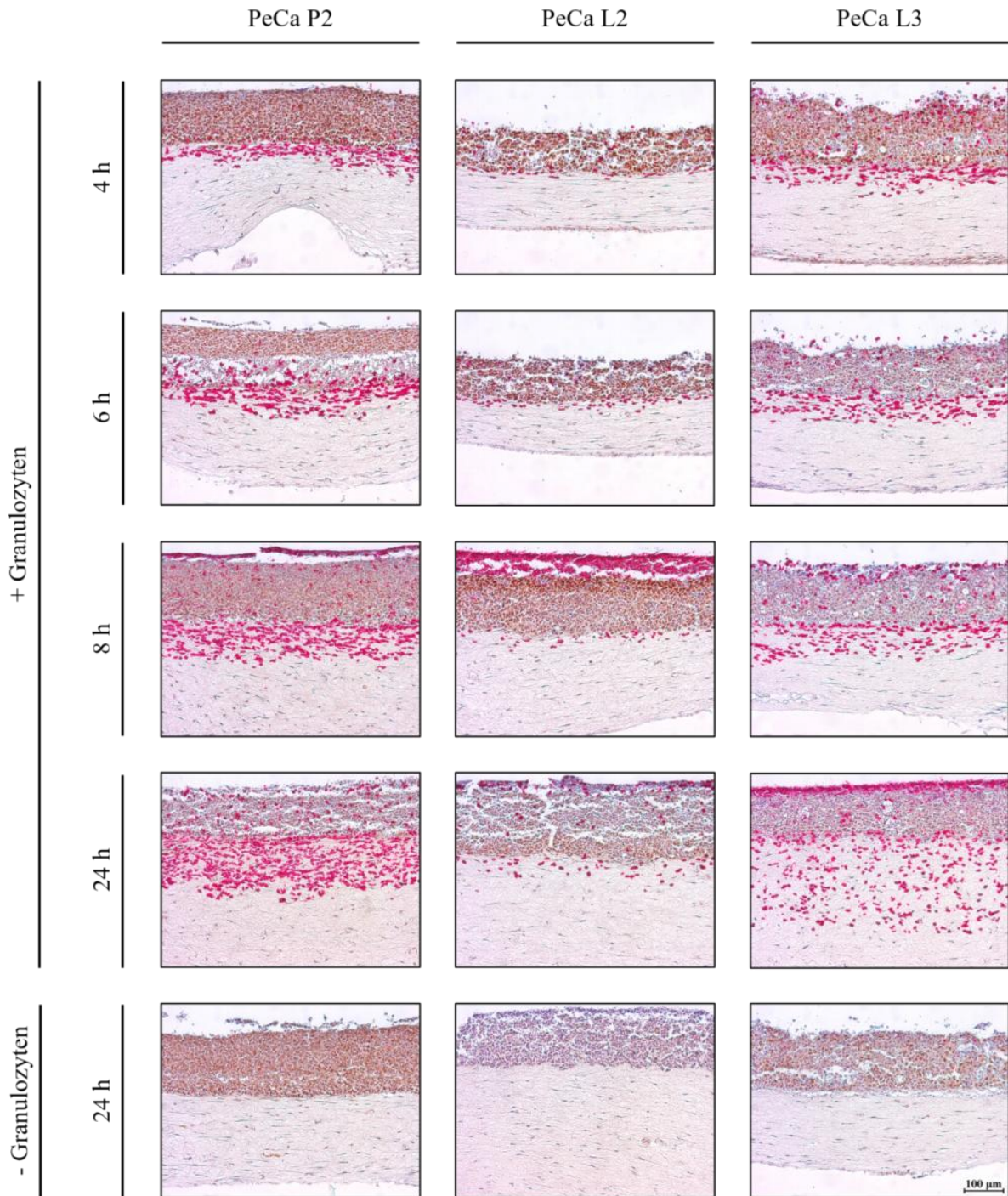
Vordaten der Arbeitsgruppe zeigten eine nukleäre STAT3-Phosphorylierung in humanen mit HPV16 beziehungsweise HPV18 in vitro transfizierten Vorhautkeratinozyten, die sich in direkter Nachbarschaft zu Granulozyten befanden (Vogelgesang, 2017). Daher stellte sich die Frage, ob Granulozyten ebenfalls die Aktivierung von STAT3 in Tumorzellen der HPV16-positiven PeCa-Zelllinien P2, L2 und L3 beeinflussen, sodass 3D-Kulturen mit und ohne Granulozyten immunhistochemisch mit pSTAT3 und CD15 gefärbt wurden (Abbildung 51).

Konzentriert man sich eingangs auf die granulozytenlose Kontrollkultur mit der Peniskarzinomzelllinie P2 ist pSTAT3 in der gesamten Epithelschicht nukleär nachweisbar. In der 3D-Kultur, die vier Stunden nach Zugabe der Granulozyten fixiert wurde, zeigen Tumorzellen der Zelllinie P2 erneut eine nukleäre Aktivierung von STAT3 im gesamten Epithel. Hervorzuheben ist hierbei die, im direkten Vergleich zur Kultur ohne Granulozyten, gesteigerte Farbintensität der pSTAT3-spezifischen Braunfärbung. Nach sechsständiger Inkubation der Granulozyten liegt STAT3 bei PeCa P2 weiterhin im gesamten Epithel phosphoryliert und damit aktiviert vor. Während acht Stunden nach Immigration der Granulozyten nur noch einzelne, vor allem in der unteren Epithelhälfte lokalisierte Tumorzellen pSTAT3 exprimieren, ist nach vierundzwanzigständiger Inkubation keine pSTAT3-spezifische Braunfärbung mehr bei PeCa P2 detektierbar. In 3D-Kulturen mit der Zelllinie P2 sind ausnahmslos alle immigrierten Granulozyten, unabhängig der Inkubationszeit und Immigrationstiefe, lediglich magentafarben gefärbt, sodass sie CD15, aber kein pSTAT3 exprimieren.

Bei PeCa L2 ist in der 3D-Kultur ohne Granulozyten keine pSTAT3-spezifische Braunfärbung sichtbar. Im Gegensatz dazu zeigt sich vier und sechs Stunden nach Immigration der Granulozyten in Kulturen mit L2 ein intensiver nukleärer pSTAT3-Nachweis im gesamten Epithel. Nach achtständiger Inkubation der Granulozyten konzentriert sich bei PeCa L2 die Aktivierung von STAT3 auf Tumorzellen des oberen Epitheldrittels, während sich in der unteren Epithelhälfte lediglich eine zarte pSTAT3-spezifische Braunfärbung zeigt. Diese Beobachtung ließe sich aufgrund der ausgeprägten Granulozytenansammlung oberhalb der 3D-Kultur mit L2 durch einen positiven Einfluss der Granulozyten auf die Aktivierung von STAT3 in Tumorzellen dieser Zelllinie erklären. Möglicherweise verursachen aber auch tote Zellen, die sich insbesondere in oberen Epithelschichten befinden und den Antikörper unspezifisch aufnehmen, den vermeintlich gesteigerten pSTAT3-Nachweis. In der organotypischen 3D-Kultur mit L2, die vierundzwanzig Stunden nach Zugabe der Granulozyten fixiert wurde, liegt STAT3 ausschließlich in Tumorzellen des unteren Epitheldrittels aktiviert vor. Demnach deckt sich bei PeCa L2 die pSTAT3-Expression mit dem von apikal nach basal gerichteten Migrationsverhalten der Granulozyten. Im Falle der Zelllinie L2 ist in allen eingewanderten Granulozyten CD15, jedoch kein pSTAT3 nachweisbar.

In der granulozytenlosen Kultur mit der Zelllinie L3 ist ein nukleärer pSTAT3-Nachweis im gesamten Epithel feststellbar. Lässt man Granulozyten in die Kultur mit PeCa L3 immigrieren, zeigt sich nach vier Stunden eine nukleäre Aktivierung von STAT3 im gesamten Epithel, die verglichen mit der Kultur ohne Granulozyten eine intensivere Braunfärbung für pSTAT3 aufweist. Sowohl nach sechsständiger, achtständiger und vierundzwanzigständiger Immigration der Granulozyten ist keine Expression von pSTAT3 mehr in 3D-Kulturen mit L3 erkennbar. Erneut sind ausnahmslos alle immigrierten Granulozyten, unabhängig der Inkubationszeit und Immigrationstiefe, magentafarben gefärbt. Demzufolge exprimieren Granulozyten in Kulturen mit PeCa L3 CD15, während STAT3 nicht aktiviert vorliegt.

Zusammenfassend zeigt die Immunhistochemie im direkten Zelllinienvergleich als auch im Vergleich der Kulturen mit beziehungsweise ohne Granulozyten eindeutige Unterschiede hinsichtlich der Aktivierung von STAT3 auf: In 3D-Kulturen ohne Granulozyten ist bei PeCa P2, gefolgt von L3, die intensivste pSTAT3-spezifische Braunfärbung im gesamten Epithel sichtbar. Dagegen ist in der granulozytenlosen Kultur mit L2 kein pSTAT3 nachweisbar. Während aus Anwesenheit der Granulozyten bei PeCa L2 eine erstmalige Aktivierung von STAT3 resultiert, führen sie bei P2 nach vier und sechs Stunden sowie bei L3 nach vierständiger Inkubation zu einer gesteigerten Expression von pSTAT3 in der gesamten Epithelschicht. Allerdings zeigt sich eine Intensitätsabnahme der pSTAT3-spezifischen Braunfärbung mit zunehmender Inkubationszeit der Granulozyten bei allen drei Peniskarzinomzelllinien. Granulozyten exprimieren, unabhängig der verwendeten PeCa-Zelllinie, Inkubationszeit und Immigrationstiefe, lediglich CD15 und kein pSTAT3. VHF sind bei PeCa P2, L2 und L3 in 3D-Kulturen mit und ohne Granulozyten sowie über alle Zeitpunkte hinweg höchstens schwach bräunlich gefärbt, sodass eine von dieser Zellart ausgehende pSTAT3-Expression fraglich erscheint.

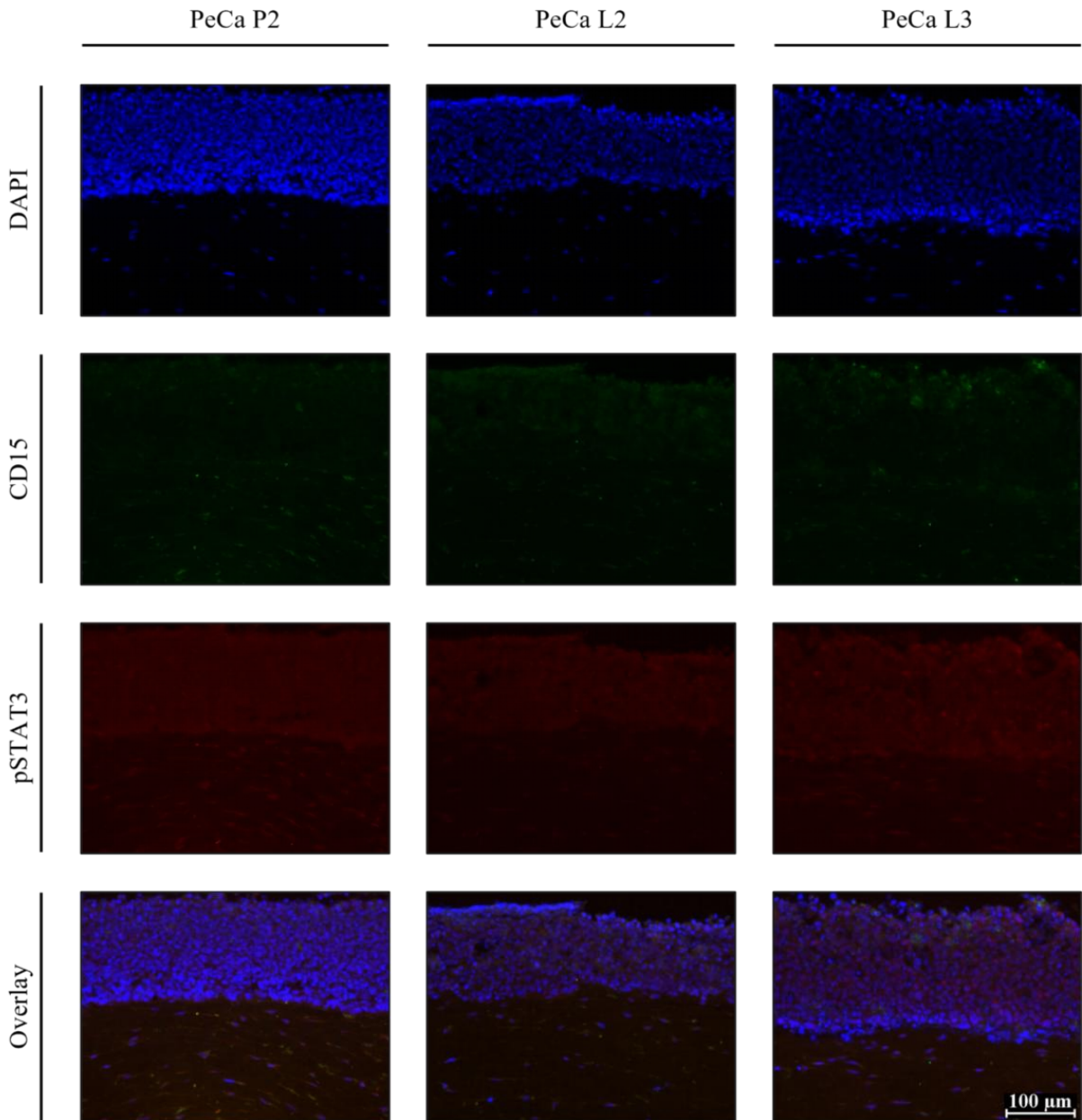


**Abbildung 51: Nachweis von pSTAT3 (Tyr705) und CD15 mittels Immunhistochemie.** Organotypische 3D-Kulturen mit den Peniskarzinomzelllinien P2, L2 und L3 wurden für 14 Tage kultiviert. Anschließend wurden je  $5 \times 10^6$  frisch isolierte Granulozyten von oben auf die Versuchskulturen gegeben und 4, 6, 8 oder 24 Stunden nach Granulozytenzugabe fixiert. Die Kontrollkulturen wurden lediglich mit 1x PBS behandelt und nach 24 Stunden fixiert. Um den Einfluss der Granulozyten auf die Aktivierung von STAT3 beurteilen zu können, wurde eine immunhistochemische Doppelfärbung durchgeführt. Die Detektion des pSTAT3-spezifischen Primärantikörpers erfolgte durch Verwendung eines Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers. Durch Zugabe der DAB-Peroxidase-Substratlösung entstand die Braunfärbung. Der CD15-spezifische Primärantikörper wurde mithilfe eines Alkalische-Phosphatase-gekoppelten Sekundärantikörpers detektiert. Das Hinzufügen der Red-Alkaline-Phosphatase-Substratlösung führte zur magentafarbenen Farbreaktion. Die Zellkerne wurden mit Hämatoxylin blau gefärbt. Die Fotodokumentation erfolgte

mittels Leica DMI6000 B Forschungsmikroskop bei zweihundertfacher Vergrößerung. Repräsentative Bilder aus drei Färbungen einer Kultur werden gezeigt. DAB = 3,3'-Diaminobenzidin.

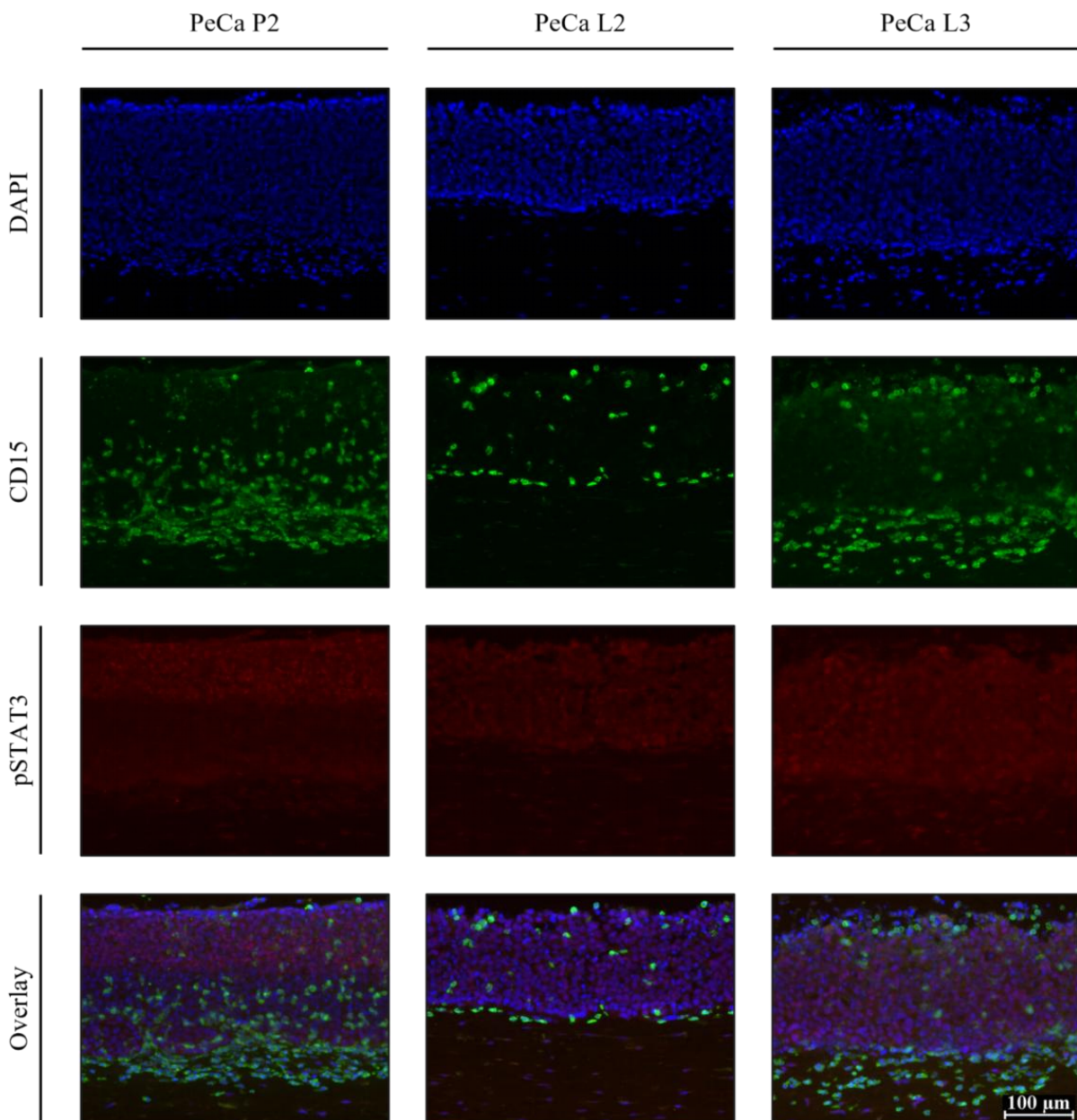
Da die rotbraunen Farbtöne der Immunhistochemie (Abbildung 51) nur bedingt voneinander differenziert werden können, wurde anschließend eine Immunfluoreszenzfärbung, die sich besser zur Visualisierung von Doppelfärbungen eignet, mit pSTAT3 und CD15 durchgeführt (Abbildungen 52 bis 59).

Widmet man sich als Erstes den 3D-Kulturen ohne Granulozyten (Abbildung 52), zeigt sich bei PeCa P2, L2 und L3 eine Hintergrundfärbung für pSTAT3 in der gesamten Epithelschicht. Erwartungsgemäß ist in granulozytenlosen Kulturen keine Expression des Granulozytenmarkers CD15 detektierbar. Bei VHF ist, unabhängig der verwendeten PeCa-Zelllinie, lediglich ein basales Aktivierungslevel für STAT3 sichtbar.



**Abbildung 52: Nachweis von pSTAT3 (Tyr705) und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen ohne Granulozyten mittels Immunfluoreszenz.** Organotypische 3D-Kulturen mit den Peniskarzinomzelllinien P2, L2 und L3 wurden für 14 Tage kultiviert. Die hier abgebildeten Kontrollkulturen wurden mit 1x PBS behandelt und nach 24 Stunden fixiert. Die Detektion des pSTAT3-spezifischen Primärantikörpers erfolgte mittels Alexa Fluor 546-markiertem Sekundärantikörper. Der CD15-spezifische Primärantikörper wurde mithilfe eines Alexa Fluor 488-markierten Sekundärantikörpers detektiert. Zur Darstellung der Zellkerne wurde DAPI (1:50000) verwendet. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mithilfe des Leica DMI6000 B Forschungsmikroskops (zweihundertfache Bildvergrößerung) fotodokumentiert. Gezeigt werden Immunfluoreszenz, CD15-Färbung und nukleäre DAPI-Färbung sowie deren Overlay. Repräsentative Bilder aus drei Färbungen einer Kultur werden abgebildet. CD = *cluster of differentiation*, DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, pSTAT3 = *phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3*.

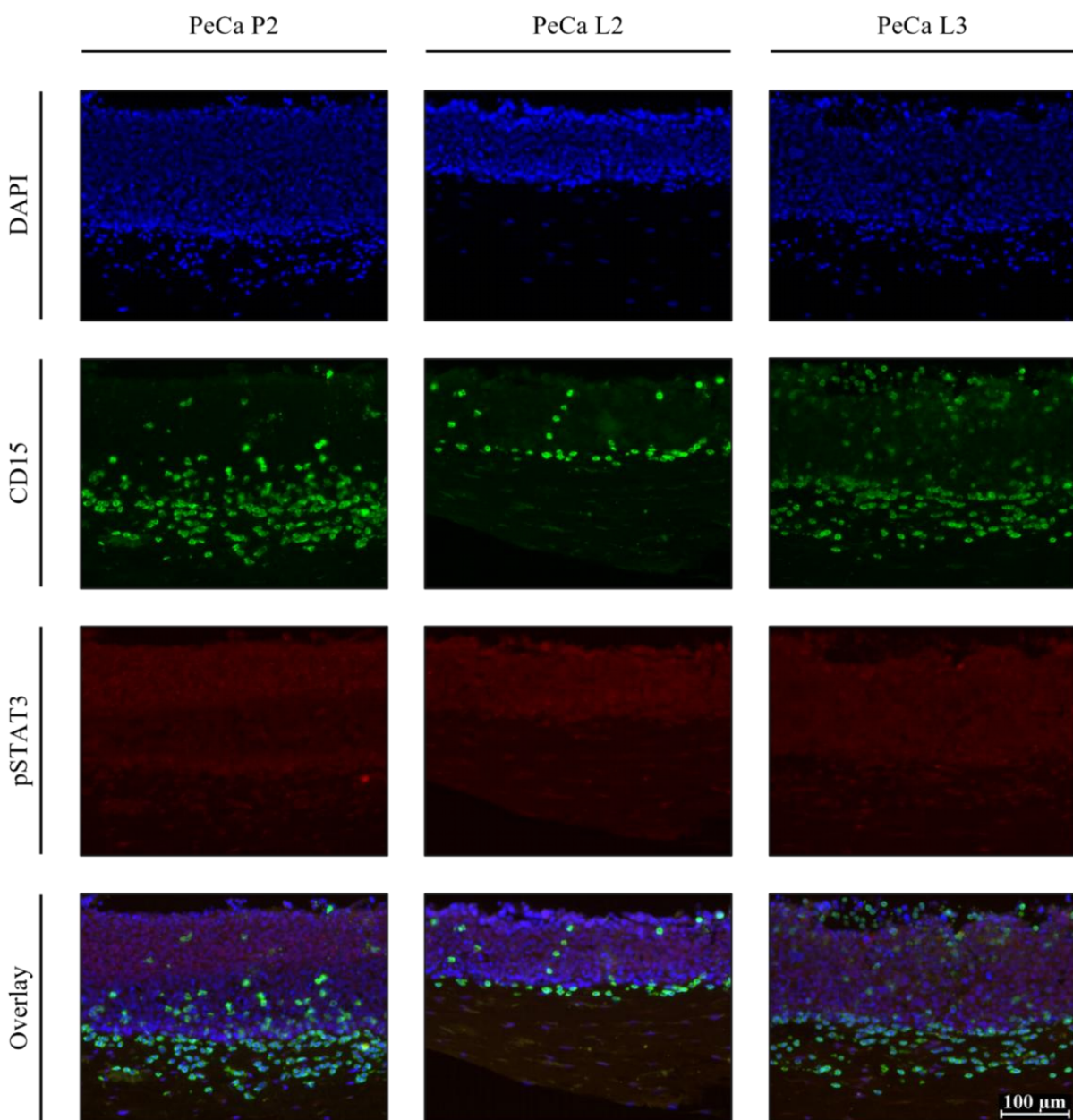
Vier Stunden nach Immigration der Granulozyten (Abbildung 53) ist insbesondere bei P2, gefolgt von L3 und zuletzt L2, eine dezente nukleäre Aktivierung von STAT3 im gesamten Epithel detektierbar. Alle eingewanderten Granulozyten zeigen, unabhängig der verwendeten PeCa-Zelllinie, ausschließlich eine CD15-Expression und keinen pSTAT3-Nachweis. VHF weisen bei allen drei PeCa-Zelllinien sowohl in Kulturen mit als auch ohne Granulozyten lediglich eine sehr schwache rotfarbene pSTAT3-spezifische Immunfluoreszenz auf.



**Abbildung 53: Nachweis von pSTAT3 (Tyr705) und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen mit Granulozyten für 4 Stunden mittels Immunfluoreszenz.** Organotypische 3D-Kulturen mit den Peniskarzinomzelllinien P2, L2 und L3 wurden für 14 Tage kultiviert. Anschließend wurden je  $5 \times 10^6$  frisch isolierte Granulozyten von oben auf die Versuchskulturen gegeben und 4 Stunden nach Granulozytenzugabe fixiert. Um den Einfluss der Granulozyten auf die Aktivierung von STAT3 beurteilen zu können, wurde eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung durchgeführt. Die Detektion des pSTAT3-spezifischen Primärantikörpers erfolgte mittels Alexa Fluor 546-markiertem Sekundärantikörper. Der CD15-spezifische Primärantikörper wurde mithilfe eines Alexa Fluor 488-

markierten Sekundärantikörpers detektiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI (1:50000) gefärbt. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mithilfe des Leica DMI6000 B Forschungsmikroskops (zweihundertfache Bildvergrößerung) fotodokumentiert. Abgebildet werden Immunfluoreszenz, CD15-Färbung und nukleäre DAPI-Färbung sowie deren Overlay. Repräsentative Bilder aus drei Färbungen einer Kultur werden gezeigt. CD = *cluster of differentiation*, DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, pSTAT3 = *phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3*.

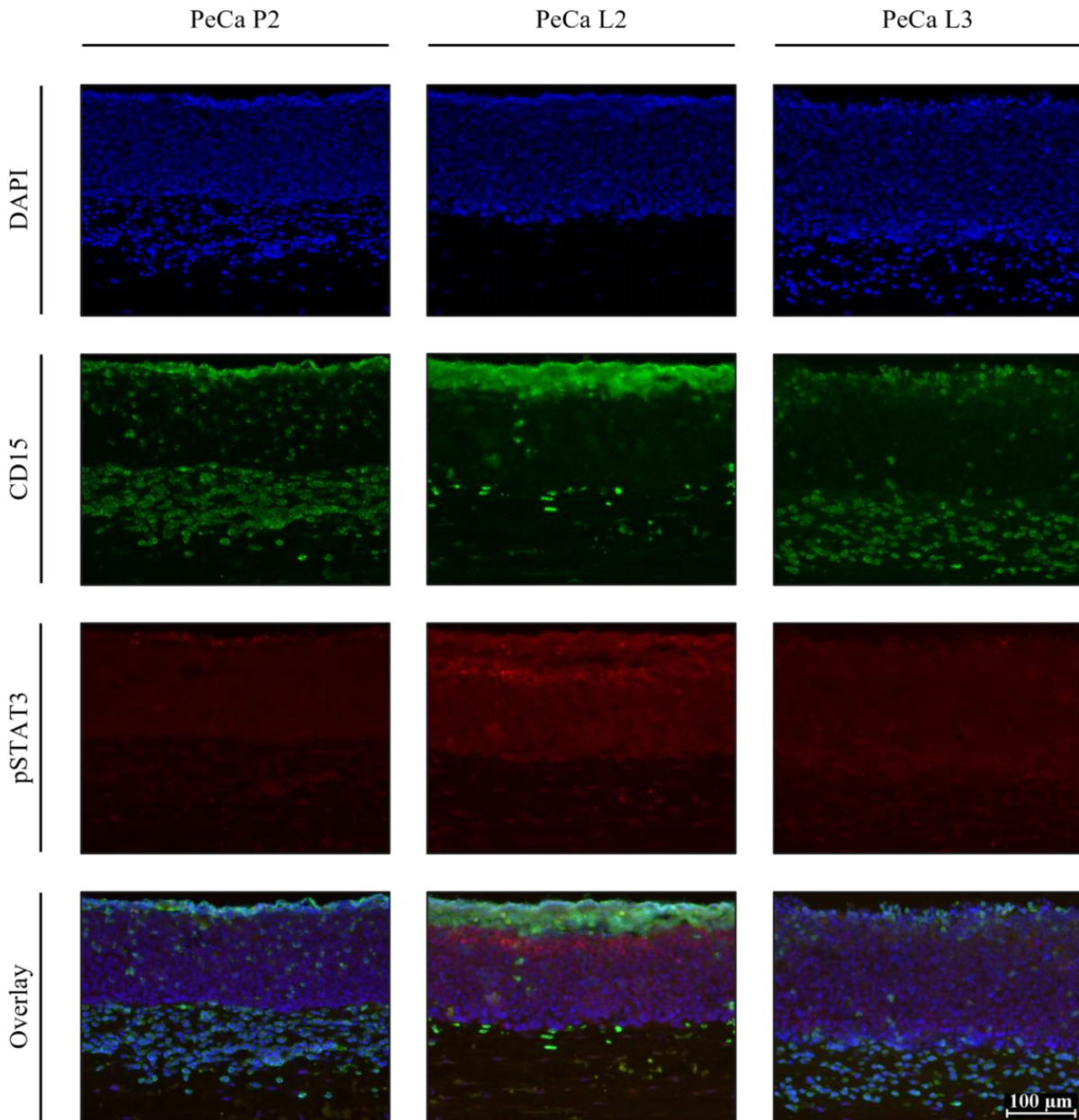
In organotypischen 3D-Kulturen, die sechs Stunden nach Zugabe der Granulozyten fixiert wurden (Abbildung 54), zeigt sich am stärksten bei PeCa P2, gefolgt von L3 und L2, ein schwacher nukleärer pSTAT3-Nachweis in der gesamten Epithelschicht. STAT3 liegt in Granulozyten, unabhängig der verwendeten PeCa-Zelllinie, nicht in phosphorylierter und damit nicht in aktivierter Form dar.



**Abbildung 54: Nachweis von pSTAT3 (Tyr705) und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen mit Granulozyten für 6 Stunden mittels Immunfluoreszenz.** Organotypische 3D-Kulturen mit den Peniskarzinomzelllinien P2, L2 und L3 wurden für 14 Tage kultiviert. Im Anschluss wurden je  $5 \times 10^6$

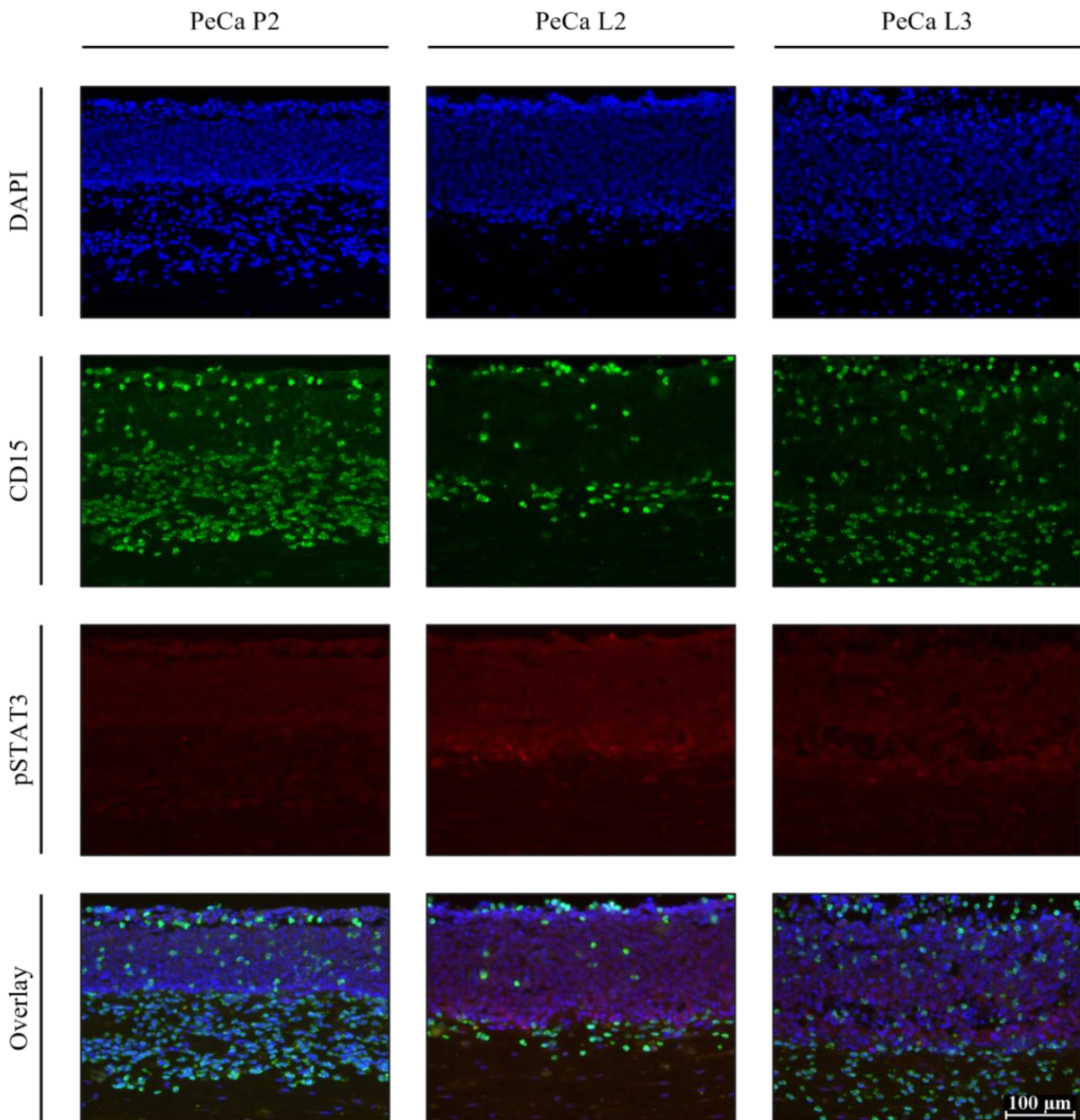
frisch isolierte Granulozyten von oben auf die Versuchskulturen gegeben und 6 Stunden nach Granulozytenzugabe fixiert. Der Einfluss der Granulozyten auf die Phosphorylierung von STAT3 wurde mittels Immunfluoreszenz-Doppelfärbung analysiert. Die Detektion des pSTAT3-spezifischen Primärantikörpers erfolgte mithilfe eines Alexa Fluor 546-markierten Sekundärantikörpers. Der CD15-spezifische Primärantikörper wurde mittels Alexa Fluor 488-markiertem Sekundärantikörper detektiert. Zur Visualisierung der Zellkerne wurde DAPI (1:50000) verwendet. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mithilfe des Leica DMI6000 B Forschungsmikroskops (zweihundertfache Bildvergrößerung) fotodokumentiert. Dargestellt werden Immunfluoreszenz, CD15-Färbung und nukleäre DAPI-Färbung sowie deren Overlay. Repräsentative Bilder aus drei Färbungen einer Kultur werden abgebildet. CD = *cluster of differentiation*, DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, pSTAT3 = *phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3*.

Nach achtstündiger Inkubation der Granulozyten (Abbildung 55) ist bei den drei PeCa-Zelllinien eine Hintergrundfärbung für pSTAT3 im gesamten Epithel sichtbar. Zudem zeigt sich in der 3D-Kultur mit L2 ein gesteigertes nukleär lokalisiertes Fluoreszenzsignal für pSTAT3 direkt unterhalb der Granulozytenauflagerung. Unter diesen Bedingungen scheinen Granulozyten STAT3-abhängige Signalwege in Tumorzellen der Zelllinie L2 zu aktivieren. Weiterhin exprimieren ausnahmslos alle immigrierten Granulozyten, unabhängig der verwendeten PeCa-Zelllinie, lediglich CD15, während STAT3 bei VHF basal aktiviert vorliegt.



**Abbildung 55: Nachweis von pSTAT3 (Tyr705) und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen mit Granulozyten für 8 Stunden mittels Immunfluoreszenz.** Organotypische 3D-Kulturen mit den Peniskarzinomzelllinien P2, L2 und L3 wurden für 14 Tage kultiviert. Anschließend wurden je  $5 \times 10^6$  frisch isolierte Granulozyten von oben auf die Versuchskulturen gegeben und 8 Stunden nach Granulozytenzugabe fixiert. Um den Einfluss der Granulozyten auf die Aktivierung von STAT3 beurteilen zu können, wurde eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung durchgeführt. Die Detektion des pSTAT3-spezifischen Primärantikörpers erfolgte mittels Alexa Fluor 546-markiertem Sekundärantikörper. Der CD15-spezifische Primärantikörper wurde mithilfe eines Alexa Fluor 488-markierten Sekundärantikörpers detektiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI (1:50000) gefärbt. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mithilfe des Leica DMI6000 B Forschungsmikroskops (zweihundertfache Bildvergrößerung) fotodokumentiert. Abgebildet werden Immunfluoreszenz, CD15-Färbung und nukleäre DAPI-Färbung sowie deren Overlay. Repräsentative Bilder aus drei Färbungen einer Kultur werden gezeigt. CD = *cluster of differentiation*, DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, pSTAT3 = *phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3*.

Lässt man Granulozyten in 3D-Kulturen immigrieren, zeigt sich nach vierundzwanzig Stunden (Abbildung 56) bei allen drei PeCa-Zelllinien eine Hintergrundfärbung für pSTAT3 in der gesamten Epithelschicht. Bei PeCa L2 ist die nukleäre Aktivierung von STAT3 in einzelnen, zu Granulozyten benachbarten Tumorzellen des unteren Epitheldrittels hervorzuheben. Erneut ist bei allen eingewanderten Granulozyten, unabhängig der verwendeten PeCa-Zelllinie, CD15 und kein pSTAT3 nachweisbar.

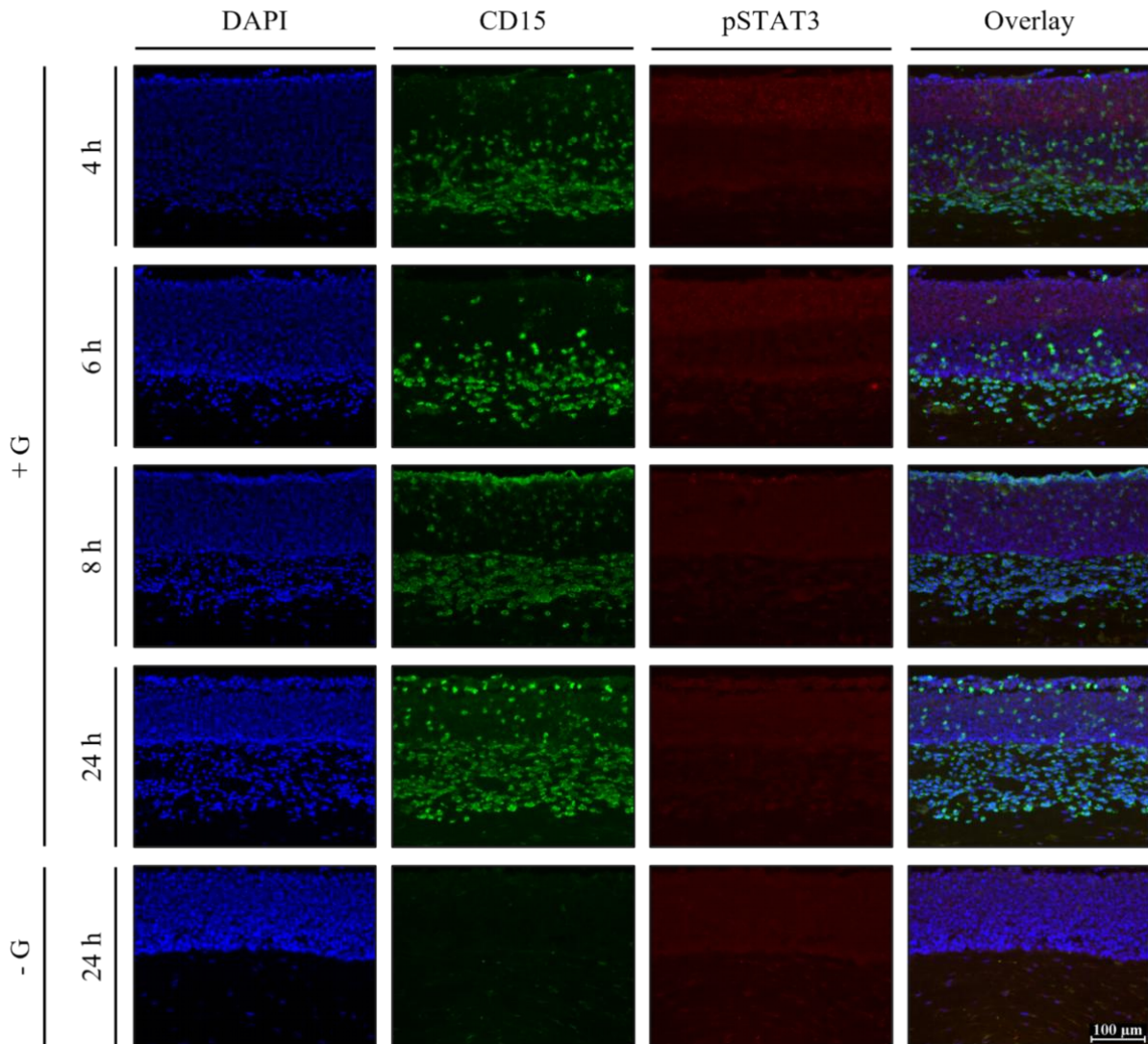


**Abbildung 56: Nachweis von pSTAT3 (Tyr705) und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen mit Granulozyten für 24 Stunden mittels Immunfluoreszenz.** Organotypische 3D-Kulturen mit den Peniskarzinomzelllinien P2, L2 und L3 wurden für 14 Tage kultiviert. Im Anschluss wurden je  $5 \times 10^6$  frisch isolierte Granulozyten von oben auf die Versuchskulturen gegeben und 24 Stunden nach Granulozytenzugabe fixiert. Eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung wurde durchgeführt, um den Einfluss der Granulozyten auf die Aktivierung von STAT3 zu untersuchen. Die Detektion des pSTAT3-spezifischen Primärantikörpers erfolgte mittels Alexa Fluor 546-markiertem Sekundärantikörper. Der CD15-spezifische Primärantikörper wurde mithilfe eines Alexa Fluor 488-markierten

Sekundärantikörper detektiert. Zur Darstellung der Zellkerne wurde DAPI (1:50000) verwendet. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mithilfe des Leica DMI6000 B Forschungsmikroskops (zweihundertfache Bildvergrößerung) fotodokumentiert. Gezeigt werden Immunfluoreszenz, CD15-Färbung und nukleäre DAPI-Färbung sowie deren Overlay. Repräsentative Bilder aus drei Färbungen einer Kultur werden abgebildet. CD = *cluster of differentiation*, DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, pSTAT3 = *phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3*.

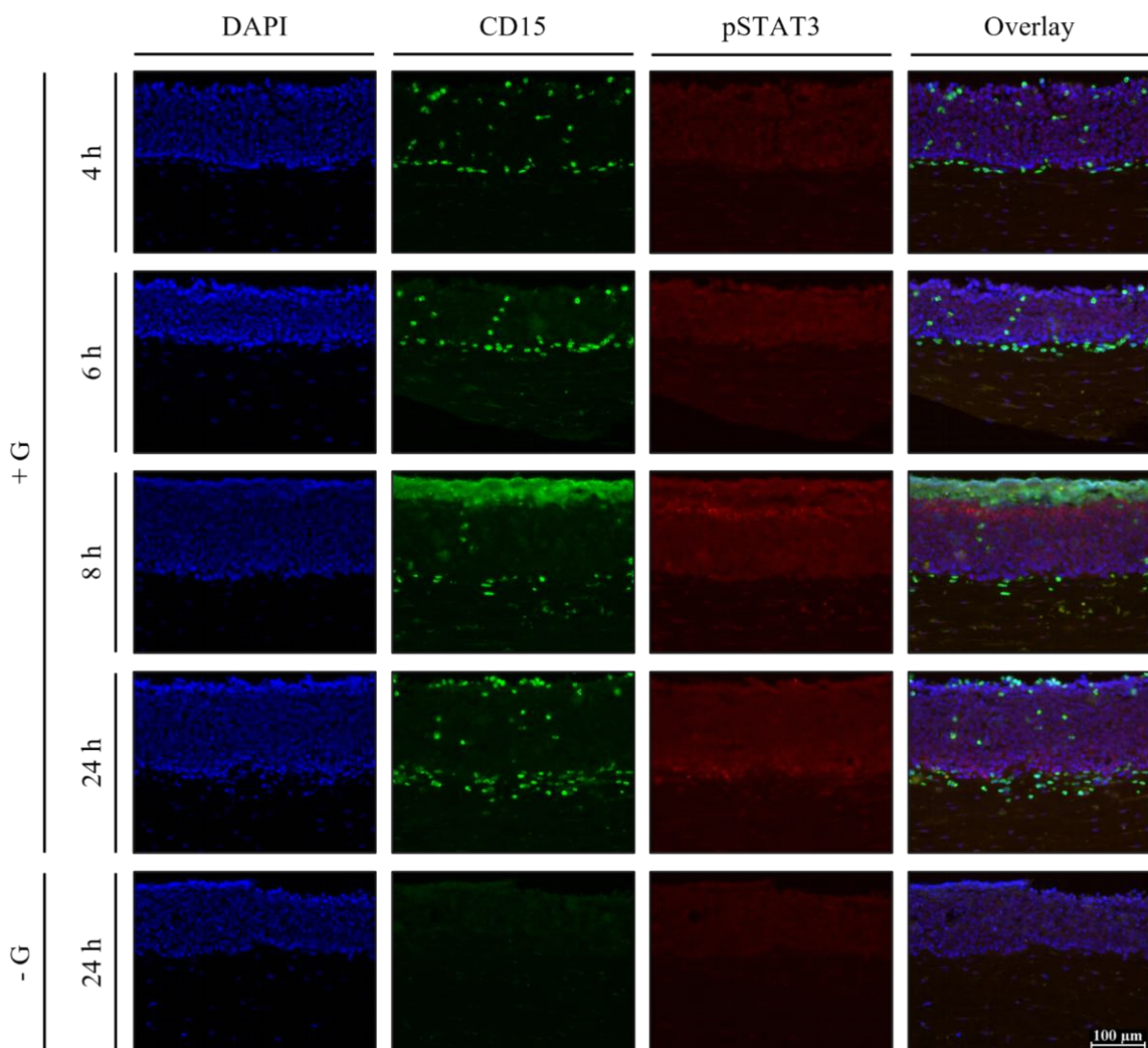
Im Folgenden wird die Aktivierung von STAT3 in 3D-Kulturen mit den Peniskarzinomzelllinien P2, L2 und L3 in Abhängigkeit der immigrierten Granulozyten pro Zeitpunkt verglichen (Abbildungen 57 bis 59).

Wird der Fokus zunächst auf PeCa P2 (Abbildung 57) gerichtet, ist in der Kultur ohne Granulozyten eine Hintergrundfärbung für pSTAT3 in der gesamten Epithelschicht detektierbar. Im direkten Vergleich zur granulozytenlosen Kultur zeigt sich bei P2 vier und sechs Stunden nach Immigration der Granulozyten eine dezente nukleäre im gesamten Epithel lokalisierte Aktivierung von STAT3. Demzufolge scheinen Granulozyten bei ihrem Weg durchs Epithel STAT3-abhängige Signalwege in Tumorzellen der Zelllinie P2 zu aktivieren. Mit zunehmender Inkubationszeit der Granulozyten ist in Kulturen mit P2 erneut lediglich eine Hintergrundfärbung für pSTAT3 nachweisbar. Bei PeCa P2 exprimieren ausnahmslos alle eingewanderten Granulozyten, unabhängig der Inkubationszeit und Immigrationstiefe, ausschließlich CD15.



**Abbildung 57: Nachweis von pSTAT3 (Tyr705) und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen mit der Peniskarzinomzelllinie P2 mittels Immunfluoreszenz.** Organotypische 3D-Kulturen mit der Peniskarzinomzelllinie P2 wurden für 14 Tage kultiviert. Anschließend wurden je  $5 \times 10^6$  frisch isolierte Granulozyten von oben auf die Versuchskulturen gegeben und 4, 6, 8 oder 24 Stunden nach Granulozytenzugabe fixiert. Die Kontrollkulturen wurden lediglich mit 1x PBS behandelt und nach 24 Stunden fixiert. Um den Einfluss der Granulozyten auf die Aktivierung von STAT3 beurteilen zu können, wurde eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung durchgeführt. Die Detektion des pSTAT3-spezifischen Primärantikörpers erfolgte mittels Alexa Fluor 546-markiertem Sekundärantikörper. Der CD15-spezifische Primärantikörper wurde mithilfe eines Alexa Fluor 488-markierten Sekundärantikörpers detektiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI (1:50000) gefärbt. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mithilfe des Leica DMI6000 B Forschungsmikroskops (zweihundertfache Bildvergrößerung) fotodokumentiert. Abgebildet werden Immunfluoreszenz, CD15-Färbung und nukleäre DAPI-Färbung sowie deren Overlay. Repräsentative Bilder aus drei Färbungen einer Kultur werden gezeigt. CD = *cluster of differentiation*, DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, G = Granulozyten, pSTAT3 = *phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3*.

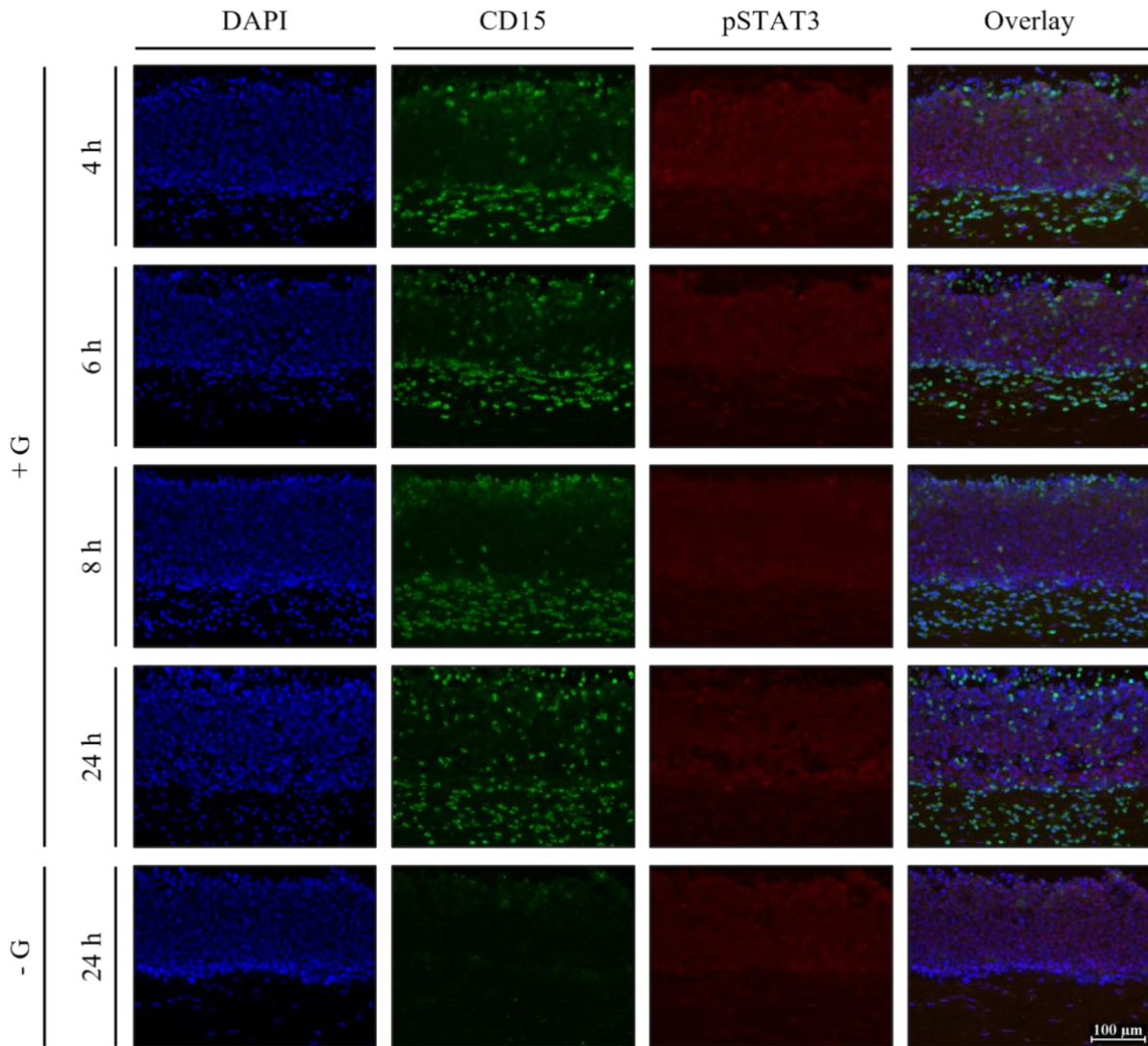
Im Falle der PeCa-Zelllinie L2 (Abbildung 58) ist nicht nur in der granulozytenlosen Kultur, sondern ebenfalls in 3D-Kulturen mit Granulozyten eine Hintergrundfärbung für pSTAT3 im gesamten Epithel sichtbar. Zudem zeigt sich acht Stunden nach Immigration der Granulozyten eine verstärkte nukleäre Aktivierung von STAT3 in sich direkt unterhalb der Granulozytenauflagerung befindenden Tumorzellen. Nach vierundzwanzigstündiger Inkubation der Granulozyten ist bei L2 ein gesteigertes nukleär lokalisiertes Fluoreszenzsignal für pSTAT3 in einzelnen, zu Granulozyten benachbarten Tumorzellen des unteren Epitheldrittels nachweisbar. Folglich spiegelt der pSTAT3-Nachweis in Kulturen mit L2 das von apikal nach basal gerichtete Einwanderungsverhalten der Granulozyten wider. Alle immigrierten Granulozyten zeigen bei PeCa L2, unabhängig der Inkubationszeit und Immigrationstiefe, eine CD15-Expression und keinen pSTAT3-Nachweis.



**Abbildung 58: Nachweis von pSTAT3 (Tyr705) und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen mit der Peniskarzinomzelllinie L2 mittels Immunfluoreszenz.** Organotypische 3D-Kulturen mit der Peniskarzinomzelllinie L2 wurden für 14 Tage kultiviert. Im Anschluss wurden je  $5 \times 10^6$  frisch isolierte Granulozyten von oben auf die Versuchskulturen gegeben und 4, 6, 8 oder 24 Stunden nach Granulozytenzugabe fixiert. Die Kontrollkulturen wurden lediglich mit 1x PBS behandelt und nach 24 Stunden fixiert. Der Einfluss der Granulozyten auf die Phosphorylierung von STAT3 wurde mittels Immunfluoreszenz-Doppelfärbung analysiert. Die Detektion des pSTAT3-spezifischen

Primärantikörpers erfolgte mithilfe eines Alexa Fluor 546-markierten Sekundärantikörpers. Der CD15-spezifische Primärantikörper wurde mittels Alexa Fluor 488-markiertem Sekundärantikörper detektiert. Zur Visualisierung der Zellkerne wurde DAPI (1:50000) verwendet. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mithilfe des Leica DMI6000 B Forschungsmikroskops (zweihundertfache Bildvergrößerung) fotodokumentiert. Dargestellt werden Immunfluoreszenz, CD15-Färbung und nukleäre DAPI-Färbung sowie deren Overlay. Repräsentative Bilder aus drei Färbungen einer Kultur werden abgebildet. CD = *cluster of differentiation*, DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, G = Granulozyten, pSTAT3 = *phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3*.

Findet abschließend PeCa L3 Beachtung (Abbildung 59), zeigt sich in der 3D-Kultur ohne Granulozyten eine im gesamten Epithel lokalisierte Hintergrundfärbung für pSTAT3. Vergleichend zu P2 führt die vierstündige und sechsstündige Anwesenheit von Granulozyten bei L3 zu einer dezenten nukleären Aktivierung von STAT3 in der gesamten Epithelschicht. Mit weiterer Inkubationszeit der Granulozyten ist bei L3 erneut lediglich eine Hintergrundfärbung für pSTAT3 nachweisbar. Aufgrund dieser Beobachtungen liegt die Vermutung nahe, dass Granulozyten bei ihrem Weg durch Epithel STAT3-abhängige Signalwege in Tumorzellen der Zelllinie L3 aktivieren. In Kulturen mit L3 exprimieren alle eingewanderten Granulozyten, unabhängig der Inkubationszeit und Immigrationstiefe, CD15 und kein pSTAT3. VHF zeigen bei PeCa P2, L2 und L3 nicht nur in 3D-Kulturen mit Granulozyten, sondern auch in Kulturen ohne Granulozyten über alle Zeitpunkte hinweg lediglich eine schwache pSTAT3-Expression.



**Abbildung 59: Nachweis von pSTAT3 (Tyr705) und CD15 in organotypischen 3D-Kulturen mit der Peniskarzinomzelllinie L3 mittels Immunfluoreszenz.** Organotypische 3D-Kulturen mit der Peniskarzinomzelllinie L3 wurden für 14 Tage kultiviert. Anschließend wurden je  $5 \times 10^6$  frisch isolierte Granulozyten von oben auf die Versuchskulturen gegeben und 4, 6, 8 oder 24 Stunden nach Granulozytenzugabe fixiert. Die Kontrollkulturen wurden lediglich mit 1x PBS behandelt und nach 24 Stunden fixiert. Um den Einfluss der Granulozyten auf die Aktivierung von STAT3 beurteilen zu können, wurde eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung durchgeführt. Die Detektion des pSTAT3-spezifischen Primärantikörpers erfolgte mittels Alexa Fluor 546-markiertem Sekundärantikörper. Der CD15-spezifische Primärantikörper wurde mithilfe eines Alexa Fluor 488-markierten Sekundärantikörpers detektiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI (1:50000) gefärbt. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mithilfe des Leica DMI6000 B Forschungsmikroskops (zweihundertfache Bildvergrößerung) fotodokumentiert. Abgebildet werden Immunfluoreszenz, CD15-Färbung und nukleäre DAPI-Färbung sowie deren Overlay. Repräsentative Bilder aus drei Färbungen einer Kultur werden gezeigt. CD = *cluster of differentiation*, DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, G = Granulozyten, pSTAT3 = *phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3*.

Abschließend ist anzumerken, dass STAT3 in Granulozyten nicht in phosphorylierter und damit nicht in aktivierter Form vorliegt. Auf Basis dieser Daten scheinen unter diesen Kulturbedingungen STAT3-abhängige Signalwege in Granulozyten nicht aktiv vorzuliegen. Interessanter scheint hier die Aktivierung der PeCa-Zellen zu sein: Die Nachbarschaft zu Granulozyten scheint sowohl p38 MAPK- als auch STAT3-abhängige Signalwege in den penilen Tumorzellen zu aktivieren. Die bisherigen Daten implizieren eine Aktivierung der Tumorzellen durch direkten Kontakt zu Granulozyten. Ein Effekt, der bereits in den 2D-Färbungen beobachtet wurde.

## 6 Diskussion

Neutrophile Granulozyten sind eine heterogene Population von Immunzellen mit einer nennenswerten kontext- beziehungsweise gewebespezifischen Plastizität bezüglich Phänotyp und Funktion, die im TME zu TANs reprogrammiert werden. TANs beeinflussen die Tumorprogression, Metastasierung und das Therapieansprechen entscheidend (Bonecchi et al., 2022; Jaillon et al., 2020; Silvestre-Roig et al., 2019).

Das Ziel dieser explorativen Studie bestand darin, die bislang unzureichend erforschten Interaktionen zwischen penilen Tumorzellen und Granulozyten zu analysieren. Die vorliegende Forschungsarbeit belegt die zeit- und zelllinienabhängige Immigration von Granulozyten in organotypische 3D-Kulturen mit den HPV-positiven Peniskarzinomzelllinien P2, L2 und L3, die sich unter anderem hinsichtlich der Expression funktionaler viraler Onkoproteine voneinander unterscheiden (Bernhard et al., 2021). Ferner wurde die gegenseitige Aktivierung von penilen Tumorzellen und Granulozyten nachgewiesen, wodurch die bedeutende Rolle des TME im Rahmen der Progression HPV-assoziiierter Tumorentitäten hervorgehoben wird.

### 6.1 Räumliche und zeitliche Auflösung der Immunzellmigration

Um die Dynamik der Immunzellmigration ins Gewebe untersuchen zu können, sind anspruchsvollere Kulturmodelle zur Abbildung der räumlichen und zeitlichen Auflösung erforderlich.

Zweidimensionale Zellkulturen (2D-Kulturen) gelten aufgrund ihrer einfachen Handhabung, Kosteneffizienz und guten Reproduzierbarkeit als etablierter Forschungsstandard (Gstraunthaler & Lindl, 2021, S. 312). Bei diesem Kulturmodell wachsen Zellen als adhärenter einschichtiger Zellrasen auf Kulturgefäßen (Jubelin et al., 2022). Bedingt durch eine polarisierte Zelladhäsion, zweidimensionalem Kontakt zwischen benachbarten Zellen und unlimitiertem Zugang der Zellen zu Nährstoffen, kommt es zu einer abnormen Zellvermehrung und unphysiologischen Verteilung von Zelloberflächenrezeptoren (Hoarau-Véchet et al., 2018). Folglich ahmen 2D-Kulturen weder in vivo Zell-Zell-Interaktionen noch das TME nach. Stattdessen stellen sie ein stark vereinfachtes Zellkultursystem dar (Jubelin et al., 2022).

Dagegen haben dreidimensionale Zellkulturmodelle (3D-Kulturen) das Potenzial die Lücke zwischen 2D-Modellen und in vivo Modellen zu schließen. Zwar ermöglichen in vivo Experimente, zum Beispiel mittels Mausmodell, Erkenntnisse in einer komplexeren Mikroumgebung, lassen sich aber angesichts interartlicher Unterschiede nicht vollständig auf den Menschen übertragen (Jubelin et al., 2022). Organotypische 3D-Kulturen wurden kürzlich beschrieben aufgrund der Ausbildung eines mehrschichtigen Epithels ein genaueres, der physiologischen Situation näheres Bild der HPV-Onkoprotein-getriebenen malignen Transformation zu liefern (Bernhard et al., 2021; Bley et al., 2022; Mohr et al., 2022). 3D-Kulturen bestehen aus Fibroblasten, die in eine extrazelluläre Matrix aus Kollagen eingebettet werden, sowie Keratinozyten oder Tumorzellen, die auf dieser Matrix an der Luft-

Medium-Grenze ausgesät werden, um das Wachstum eines mehrschichtigen Epithels zu induzieren (Anacker & Moody, 2012; Asselineau & Prunieras, 1984). Dieses Zellkulturmodell generiert eine Umgebung, die interzelluläre regulatorische Netzwerke widerspiegelt und dadurch Studien zur Manipulation von Granulozyten im Tumormikromilieu in einem physiologischeren Kontext ermöglicht (Bernhard et al., 2021; Bley et al., 2022; Mohr et al., 2022). Infolgedessen eignen sich lediglich 3D-Kulturmodelle zur Abbildung der räumlichen und zeitlichen Immunzellmigration.

3D-Kulturen wird ebenfalls zugeschrieben verschiedene Aspekte der Tumorbiologie, unter anderem die Tumorprogression, Gen- und Proteinexpression sowie das Therapieansprechen, besser darzustellen (Hoarau-Véchet et al., 2018; Jubelin et al., 2022; Kapałczyńska et al., 2018). Diesbezüglich wiesen verschiedene Studien kulturmodellabhängige Unterschiede nach. Kopf-Hals-Tumorzellen, die im 3D-Modell kultiviert wurden, zeigten im Vergleich zu Zellen, die im 2D-Modell gezüchtet wurden, ein vermindertes Therapieansprechen und Abweichungen in der Signalwegaktivierung (Heid et al., 2022; Melissaridou et al., 2019). Kumar et al. belegen zudem signifikante Unterschiede in der Genexpression sowie Expression von Zytokinen, Chemokinen, MMPs und HPV-Onkoproteinen zwischen 2D- und 3D-Modellen bei Zervixkarzinomzellen (Kumar et al., 2024). Diese Forschungsarbeit zeigte ebenfalls Abweichungen in der Zellmorphologie und Proteinexpression zwischen 2D- und 3D-Kulturmodellen auf und steht damit in Einklang mit publizierter Literatur. Demzufolge ist die Auswahl der Kultivierungsbedingungen zukünftiger Experimente in Abhängigkeit der wissenschaftlichen Fragestellungen von entscheidender Bedeutung. Zur Analyse der Immunzelldynamik sowie der Aktivierung im Gewebe sind organotypische 3D-Kulturen die Methode der Wahl, da dieses Modell gegenwärtig die einzige Tierversuchersatzmethode mit der notwendigen 3D-Architektur und Komplexität darstellt.

Tumorzellen, tumorassoziierte Stromazellen und tumorinfiltrierende Leukozyten, einschließlich T-Zellen, Makrophagen und Neutrophilen, locken durch Produktion verschiedener Wachstumsfaktoren, darunter G-CSF und GM-CSF, sowie Chemokine, unter anderem CXCL1, CXCL2, CXCL5 und CXCL8, und proinflammatorischer Zytokine, beispielsweise IL-6, IL-1 $\beta$  und IL-17, Neutrophile ins TME (Coffelt et al., 2015; Jaillon et al., 2020; SenGupta et al., 2019).

Vordaten der Arbeitsgruppe belegen eine gesteigerte Aktivität der HPV-Onkoproteine E6 und E7 bei PeCa P2 und L3 im Vergleich zu L2. Da hohe Level der HPV-Onkoproteine E6 und E7 über eine gesteigerte Expression von p63 zu einer erhöhten CXCL8-Freisetzung führen (Bernhard et al., 2021) und hierdurch verstärkt Neutrophile rekrutiert werden (Barker et al., 1991; Yoshiro, 2008), müssten Granulozyten bei diesen beiden penilen Zelllinien verstärkt einwandern. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen diese Hypothese. Obwohl P2 und L3 gleichviel beziehungsweise P2 sogar etwas mehr CXCL8 produziert (Bernhard, 2019; Braun, 2020), wandern mehr Granulozyten in 3D-Kulturen mit L3 ein. In den organotypischen 3D-Kulturen wirken neben CXCL8 noch weitere Chemokine, darunter CXCL1 und CXCL5, rekrutierend auf Neutrophile. Die Kombination dieser

zahlreichen chemotaktisch wirkenden Signale beeinflusst die Rekrutierung der Neutrophilen und liefert eine Erklärung für die beobachteten Unterschiede (D. Kim & Haynes, 2012).

Die Zytokinkonstellation bei PeCa P2, L2 und L3 wurde bereits durch unsere Arbeitsgruppe analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass das inflammatorische Zytokin *Macrophage Migration Inhibitory Factor* (MIF) sowohl bei 3D-Kulturen mit P2 als auch mit L3 enorm gesteigert vorliegt (Bernhard, 2019; Braun, 2020). MIF wirkt über den Chemokinrezeptor CXCR2 chemotaktisch auf Neutrophile (Bernhagen et al., 2007). Dumitru et al. belegen einen proportionalen Zusammenhang zwischen der Infiltration von Neutrophilen und der tumoralen MIF-Expression bei humanen Kopf-Hals-Tumoren. Durch tumorbedingtes MIF aktivierte Neutrophile scheinen zudem die Migrationseigenschaften von Kopf-Hals-Tumorzellen zu verbessern. Außerdem war eine erhöhte intratumorale MIF-Expression mit einem gesteigerten Risiko für Lymphknotenmetastasen sowie reduziertem Gesamtüberleben von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren assoziiert (Dumitru et al., 2011). Neben dem Chemokin CXCL1 waren die Zytokine IL-17 und IL-6 bei 3D-Kulturen mit L3, im Vergleich zu P2, gesteigert nachweisbar (Bernhard, 2019; Braun, 2020). CXCL1, beim Menschen ebenfalls *Gro- $\alpha$*  (*growth-related oncogene- $\alpha$* ) genannt, und IL-17 rekrutieren Neutrophile ebenfalls über CXCR2 (Sawant et al., 2016; L. Wu et al., 2020). Beim metastasierten Mammakarzinom scheint das von  $\gamma\delta$  T-Zellen exprimierte IL-17 die G-CSF-abhängige Expansion und Polarisierung von Neutrophilen über IL-1 $\beta$  zu induzieren (Coffelt et al., 2015). Ferner wiesen Hashizume et al. chemotaktische Eigenschaften von IL-6 nach (Hashizume et al., 2011). Zusammenfassend liegt somit im Falle von PeCa P2 und L3 ein Zytokinmilieu vor, welches besonders stark die Migration von Granulozyten ins Gewebe fördert.

Vordaten der Arbeitsgruppe assoziieren die Invasion von Neutrophilen ins Zentrum peniler Tumoren mit einem positivem HPV-Status, schlechterer Differenzierung und tendenziell höherem Tumorstadium (Bernhard et al., 2021) und stehen somit in Einklang mit externer Literatur, die eine hohe Infiltration von TANs ins Tumorgewebe verschiedener Karzinomentitäten mit einer schlechten Prognose verknüpft (Shaul & Fridlender, 2019). Da sich im peripheren Blut von Patienten verschiedener Tumorentitäten eine erhöhte Anzahl zirkulierender Neutrophiler zeigte, etablierte sich die Neutrophilen-Lymphozyten-Ratio (*neutrophil-to-lymphocyte ratio*, NLR) als prognostischer Marker (Coffelt et al., 2016). Die NLR berechnet sich als einfaches Verhältnis zwischen der Neutrophilen- und Lymphozytenzahl im peripheren Blut und stellt einen kostengünstigen Biomarker für die systemische Immunantwort dar (Buonacera et al., 2022). Die Metaanalyse von Templeton et al. assoziiert eine erhöhte NLR mit einem schlechteren Gesamtüberleben verschiedener Tumorentitäten (Templeton et al., 2014). Eine erhöhte NLR ging mit einem erniedrigten krebspezifischen Überleben und erhöhtem Risiko für Lymphknotenmetastasen bei Patienten mit Peniskarzinom einher (C. Hu et al., 2020; Kasuga et al., 2016; Saputra et al., 2022). Allerdings zeigte sich beim Peniskarzinom keine Assoziation zwischen NLR und Krankheitsstadium, Grading, Lokalisation oder Tumorgroße (Babadi et al., 2024). Nicht nur beim Peniskarzinom, sondern auch bei Kopf-Hals-Tumoren und beim Cervixkarzinom war eine erhöhte NLR mit einem erniedrigten

Gesamtüberleben assoziiert (Mascarella et al., 2017; Takenaka et al., 2022; Zou et al., 2020). Demnach stellt die Rekrutierung von Neutrophilen bei HPV-assoziierten Tumorentitäten keine Seltenheit dar, sondern dient als prognostischer Marker.

## 6.2 Gegenseitige Aktivierung von Tumorzellen und Neutrophilen

Im 3D-Modell wurde eine gesteigerte pSTAT3-Expression in humanen mit HPV16 beziehungsweise HPV18 in vitro transfizierten Vorhautkeratinozyten, die sich in direkter Nachbarschaft zu Granulozyten befanden, nachgewiesen (Vordaten der Arbeitsgruppe; Vogelgesang, 2017).

Die vorliegende Forschungsarbeit belegt die Aktivierung tumorprogressionsfördernder Signalwege in Granulozyten sowie in zu Granulozyten benachbarten HPV-positiven penilen Tumorzellen im 2D- und 3D-Kulturmodell. Da die Signalwegaktivierung der Tumorzellen den Migrationsbewegungen der Granulozyten zu folgen scheint, ist von einer gegenseitigen Aktivierung beider Zelltypen auszugehen. Ferner konnte im 2D-Modell gezeigt werden, dass Granulozyten, insbesondere in Kokulturen mit Fibroblasten, an penilen Tumorzellen haften. Allerdings traf dies nicht auf alle hinzugegebenen Granulozyten zu. Vergleichbar zu den Beobachtungen im 2D-Modell wanderte nur ein Teil der auf 3D-Kulturen gegebenen Granulozyten ein. Somit scheinen lediglich spezifische Granulozyten in der Lage zu sein im 2D-Modell an Tumorzellen zu binden beziehungsweise in 3D-Kulturen zu migrieren. Hierbei könnte es sich entweder um eine angeborene oder induzierte Fähigkeit der Granulozyten handeln (Silvestre-Roig et al., 2019).

Verschiedene Moleküle werden in der Literatur beschrieben, um Subpopulationen von Neutrophilen zu identifizieren. Clemmensen et al. definieren eine Neutrophilen-Subpopulation anhand der Expression des Granulaproteins *Olfactomedin 4* (OLFM4). Bei gesunden Individuen waren zirka 20 % bis 25 % der peripheren Neutrophilen im Blut OLFM4 positiv (Clemmensen et al., 2011). Dagegen fanden Welin et al. einen Anteil von 8 % bis 57 % OLFM4-positiver Neutrophiler. Jedoch ist bisher unklar, ob OLFM4-positive Neutrophile eine funktionelle Subpopulation darstellen (Welin et al., 2013). Abgesehen von OLFM4 wird LOX-1 (lectin-type oxidized low-density lipoprotein (LDL) receptor-1), ein Rezeptor für oxidiertes LDL, als Molekül zur Identifizierung einer Neutrophilen-Subpopulation in der Literatur beschrieben. Während nahezu keine LOX-1-positiven neutrophilen Granulozyten im Blut gesunder Spender nachgewiesen wurden, waren 5 % bis 15 % der Neutrophilen im Blut von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren beziehungsweise 15 % bis 50 % der Neutrophilen in Kopf-Hals-Tumorgewebe LOX-1-positiv (Condamine et al., 2016).

Neben gewebespezifischen Populationen, die ansässig oder immigriert sein könnten, werden verschiedene Reifestadien und Aktivierungszustände der Neutrophilen diskutiert (Silvestre-Roig et al., 2019). Es wäre denkbar, dass durch Zell-Zell-Interaktionen aktivierte Granulozyten zytoplasmatische Granula freisetzen, die Zelladhäsionsmoleküle enthalten, welche die Adhäsion der Granulozyten an Tumorzellen ermöglichen (Cowland & Borregaard, 2016).

Folglich stützen die vorliegenden Erkenntnisse die Hypothese der Heterogenität sowie phänotypischen und funktionellen Plastizität von Neutrophilen. Nichtsdestotrotz bedarf es diesbezüglich weiterführender systematischer Untersuchungen.

Die beobachtete gegenseitige Aktivierung von Tumorzellen und Neutrophilen könnte sowohl durch direkte Zell-Zell-Interaktionen als auch durch indirekte Mechanismen, etwa durch Freisetzung von Zytokinen oder Bildung von NETs, erfolgen (C. Hu et al., 2024).

Verschiedene Studien implizieren eine direkte Interaktion zwischen  $\beta$ 2-Integrinen, insbesondere Mac-1 (*macrophage-1 antigen*) und LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen-1*), auf Neutrophilen und ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) auf Tumorzellen (Huh et al., 2010; Spicer et al., 2012; Strell et al., 2007, 2010). Binden Neutrophile an ICAM-1 der Tumorzellen degranulieren sie (Barnett et al., 1998). Die hierdurch freigesetzten Proteasen brechen die Endothelbarriere auf, was die transendotheliale Migration der Tumorzellen erleichtert und letztlich deren Metastasierung begünstigt (Q. D. Wu et al., 2001). Huh et al. zeigten, dass Melanomzellen über eine verstärkte IL-8-Sekretion nicht nur Neutrophile anlocken, sondern ebenfalls deren  $\beta$ 2-Integrin-Expression um 75 % bis 100 % erhöhen (Huh et al., 2010). Ferner wird eine direkte Interaktion zwischen NGAL (*neutrophil gelatinase-associated lipocalin*) der Neutrophilen und der von Tumorzellen sezernierten MMP-9 diskutiert (Yan et al., 2001). Der Eins-zu-eins-Kontakt zwischen Neutrophilen und Tumorzellen führte außerdem zur Aktivierung von MAPK- und PI3K/AKT-Signalwegen in Tumorzellen (Jaillon et al., 2020; C. Yang et al., 2024)

Neutrophile sind in der Lage zirkulierende Tumorzellen (*circulating tumor cells*, CTCs) im Blutkreislauf zu begleiten und sie durch direkte Zell-Zell-Interaktionen vor extrinsischen Einflüssen und Immunüberwachung zu schützen. Bei 34 von insgesamt 70 Patientinnen mit Mammakarzinom (48,6 %) wurden CTCs im Blut nachgewiesen. Während die Mehrheit dieser CTCs (88,0 %) einzeln vorlagen, zeigten sich in 8,6 % CTC-Cluster und in 3,4 % der Fälle CTC-Leukozyten-Cluster. CTC-assoziierte Leukozyten waren vor allem Neutrophile. Diese Neutrophile wiesen ein Genexpressionsprofil auf, welches dem tumorfördernden N2-Phänotyp ähnelt (Szczerba et al., 2019). Killock bezieht sich auf den Artikel von Szczerba et al. und führt den Begriff der „Huckepack Neutrophile“ ein (Killock, 2019). CTCs exprimieren das Oberflächenprotein CD47, welches an SIRP $\alpha$  (*signal regulatory protein  $\alpha$* ) auf Neutrophilen bindet und dadurch die Phagozytose der CTCs verhindert (Behrens et al., 2022; Xiong et al., 2021). Somit fördern Neutrophile durch Bildung heterotypischer Aggregate das Überleben der CTCs und begünstigen deren Metastasierung (Szczerba et al., 2019). In der externen Literatur werden neben CTC-Leukozyten-Clustern auch heterotypische Aggregate aus Tumorzellen und DNA-Fäden der NETs beschrieben (Cools-Lartigue et al., 2013).

Tumorzellen und Neutrophile interagieren sowohl durch direkten Zell-Zell-Kontakt als auch durch Sekretion verschiedener Adhäsionsmoleküle, Zytokine und Chemokine. Diese Botenstoffe regulieren die Chemotaxis und Aktivierung der Neutrophilen und begünstigen deren Aggregation und Kommunikation mit Tumorzellen. Zudem modulieren sie zentrale Signalwege und Transkriptionsprozesse, die maßgeblich das Überleben und die Metastasierung von Tumorzellen beeinflussen (Huh et al., 2010; Liu et al., 2016; C. F. Wu et al., 2015; Zhu et al., 2020).

Neutrophile setzen Signalstoffe frei, die das Verhalten der Tumorzellen sowie die Dynamik des TME regulieren (Fridlender et al., 2009). IL-8, G-CSF, TGF- $\beta$  und IL-6 tragen zur Tumorprogression bei, wohingegen Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und IL-12 antitumorale Effekte vermitteln (C. Hu et al., 2024). Während IL-8 und G-CSF die Proliferation, das Überleben, die Invasion und Angiogenese von Tumorzellen begünstigen (Jaillon et al., 2020; D. J. J. Waugh & Wilson, 2008), induzieren TGF- $\beta$  und IL-6 die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) der Tumorzellen (Johnson et al., 2018; Massagué, 2008; Rokavec et al., 2014; T. Yu et al., 2021). IFN- $\gamma$  und IL-12 hemmen die Proliferation und Invasion von Tumorzellen, indem IFN- $\gamma$  natürliche Killerzellen und Makrophagen aktiviert, um Tumorzellen abzutöten und IL-12 die Th1-Polarisierung sowie die Aktivierung zytotoxischer T-Lymphozyten fördert (Dunn et al., 2002; Trinchieri, 2003). Im Gegensatz dazu beschreiben Cools-Lartigue et al. und Spiegel et al., dass Neutrophile beziehungsweise NETs Tumorzellen durch Bildung einer physikalischen Barriere und Freisetzung immunsuppressiver Zytokine vor der zytotoxischen Wirkung der natürlichen Killerzellen schützen (Cools-Lartigue et al., 2013; Spiegel et al., 2016).

Tumorzellen sezernieren CXCL1, IL-8 und G-CSF, um Neutrophile in das TME und den Blutkreislauf zu rekrutieren und zu aktivieren (Z. J. Han et al., 2022; Jaillon et al., 2020; SenGupta et al., 2021). Darüber hinaus scheint der IL-8-Signalweg die EMT der Tumorzellen zu erleichtern (Fernando et al., 2011).

Durch Rekrutierung von Neutrophilen begünstigen Tumorzellen die Freisetzung von NETs (Alfaro et al., 2016). Verschiedene aggressive Karzinomzelllinien fördern ihre Invasion und Migration durch die Bildung von NETs (Jin et al., 2021; Mantovani et al., 2011; Park et al., 2016). Die NE der NETs kann das Adhäsionsmolekül E-Cadherin, welches den interzellulären Kontakt der Tumorzellen vermittelt, proteolytisch spalten. Die hierdurch resultierende Dyshäsion der Tumorzellen ermöglicht deren Migration und dadurch das invasive Tumorwachstum (Gaida et al., 2012; X. Huang et al., 2024). Neben NE kann auch das NET-gebundene Cathepsin G Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) spalten, wodurch die Zellinvasion erleichtert wird. Außerdem begünstigt Cathepsin G einen invasiven Phänotyp hepatozellulärer Tumorzellen (Guan et al., 2021). Yang et al. belegen, dass NET-DNA durch Bindung an das Transmembranprotein CCDC25 auf Tumorzellen deren Zellmotilität über den Integrin-linked Kinase (ILK)/ $\beta$ -Parvin-Signalweg fördert (L. Yang, Liu, et al., 2020). Ferner erleichtern NETs die EMT der Tumorzellen, wodurch deren Migrationsfähigkeit ebenfalls verbessert wird (Freisinger & Huttenlocher, 2014; Grosse-Steffen et al., 2012; P. Hu et al., 2015; Jin et al., 2021; Martins-Cardoso et

al., 2020; Y. Wang et al., 2022). Die Hochregulation von Notch-1 scheint eine Schlüsselrolle in der NET-abhängigen Induktion der EMT zu spielen (Dimitrov et al., 2024). Demnach können NETs Tumorzellen binden, ihre Ausbreitung unterstützen und die Adhäsion an Zielorganen begünstigen (Ren et al., 2021). Darüber hinaus blockieren intratumorale NETs den Kontakt zwischen Tumorzellen und zytotoxischen Zellen, wodurch das Abtöten der Tumorzellen verhindert wird (Teijeira et al., 2020).

Im Verlauf der Tumorprogression sendet der Primarius Tumorzellen in spezialisierte Nischen anderer Gewebe aus. Diese Tumorzellen (*disseminated tumour cells*, DTCs) sind lebensfähig und therapieresistent, proliferieren zunächst aber nicht und werden daher als „ruhende Tumorzellen“ bezeichnet. Deren Reaktivierung führt zur Metastasierung und somit zum Krankheitsrückfall (Phan & Croucher, 2020; Sosa et al., 2014). Albregues et al. demonstrierten, dass eine durch chronische Tabakrauchexposition oder nasale Instillation von Lipopolysaccharid induzierte Lungenentzündung zur Umwandlung ruhender Tumorzellen in aggressive Lungenmetastasen führen kann. Aufgrund der chronischen Entzündung bilden Neutrophile NETs, welche das Erwachen ruhender Tumorzellen durch den Umbau der ECM fördern. Dabei bindet die DNA der NETs an das ECM-Protein Laminin, welches anschließend durch die NET-assoziierten Proteasen NE und MMP-9 gespalten wird. Diese NET-vermittelte proteolytische Modifikation des Laminins führt durch Integrin-vermittelte Signalwege zur Proliferation ruhender Tumorzellen. Demzufolge spielen NETs und NET-vermittelter ECM-Umbau eine entscheidende Rolle bei der entzündungsinduzierten Reaktivierung ruhender Tumorzellen im Mausmodell. NETs und deren nachgeschalteten Effektoren sind vielversprechende Angriffspunkte, um das Metastasierungsrisiko zu reduzieren (Aguirre Ghiso et al., 1999; Albregues et al., 2018). Des Weiteren scheint das Hoch- beziehungsweise Herabregulieren verschiedener Signalwege die ruhenden Tumorzellen zu beeinflussen. Bei ruhenden Karzinomzellen wurde eine erhöhte p38-Aktivität bei gleichzeitig reduzierter ERK-Aktivität (Aguirre-Ghiso et al., 2004; Ranganathan et al., 2006) als auch eine reduzierte AKT-Phosphorylierung nachgewiesen (Schewe & Aguirre-Ghiso, 2008).

Zusammenfassend implizieren die bisherigen Daten eine Aktivierung der Tumorzellen durch direkten und indirekten Kontakt zu Granulozyten, wodurch die zentrale Rolle der Granulozyten in der Tumorprogression untermauert wird.

### 6.3 Signalwegaktivierung bei HPV-positiven penilen Tumorzellen und anderen HPV-assoziierten Tumorentitäten

Diese Forschungsarbeit belegt, dass HPV-positive penile Tumorzellen im 2D-Modell eine erhöhte Expression von EGFR und pERK aufweisen, wohingegen im 3D-Modell eine gesteigerte Aktivierung der p38 MAPK festgestellt wurde. Hervorzuheben ist zudem die im 3D-Modell gezeigte Aktivierung von AKT, ERK, p38 MAPK und STAT3 in Granulozyten umgebenden Tumorzellen, welche den Migrationsbewegungen der Granulozyten folgte.

In der Fachliteratur finden sich teils widersprüchliche Aussagen zur Expression und klinischen Relevanz von pAKT beim Peniskarzinom. Azizi et al. und Stankiewicz et al. belegen eine gesteigerte Expression von pAKT (Ser473) in mittels Tissue Microarrays (TMA) analysierten penilen Tumorzellen (Azizi et al., 2019; Stankiewicz, Prowse, Ng, et al., 2011). Dagegen berichten andere Studien, die ebenfalls TMA oder frisches gefrorenes Tumorgewebe untersuchten, von einer geringen pAKT (Ser473)-Expression (Adimonye, Stankiewicz, Kudahetti, et al., 2018; Adimonye, Stankiewicz, La-Touche, et al., 2018; Chaux et al., 2014). Besonders hervorzuheben ist die Beobachtung, dass pAKT (Ser473) in PeIN-Läsionen stärker exprimiert wurde als in PeCa-Gewebe, woraus eine Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs in der frühen penilen Karzinogenese geschlussfolgert wird (Adimonye, Stankiewicz, La-Touche, et al., 2018). Hinsichtlich der Phosphorylierung von AKT an der Stelle Thr308 wiesen Adimonye et al. in 86 % der untersuchten PeCa-Proben eine im Vergleich zu gesundem Penisepithel niedrigere Expression nach (Adimonye, Stankiewicz, Kudahetti, et al., 2018). Diese Beobachtung steht in Einklang mit den Ergebnissen dieser Forschungsarbeit. Interessanterweise waren Stromazellen sowohl bei PeCa als auch in gesundem Penisepithel pAKT (Thr308)-positiv, weshalb die Autoren dem PI3K/AKT-Signalweg keine entscheidende Rolle in der penilen Karzinogenese beimessen (Adimonye, Stankiewicz, Kudahetti, et al., 2018). Kuasne et al. etablierten eine HPV16-positive PeCa-Zelllinie, die eine Überexpression des EGFR sowie eine geringe pAKT (Thr308)-Expression im *Reverse Phase Protein Array* zeigte und damit meine Daten untermauert (Kuasne et al., 2021). Multiple Studien konnten keine direkte Assoziation zwischen der Dysregulation des PI3K/AKT-Signalwegs, einschließlich der Phosphorylierung des Schlüsselproteins AKT, und einer HPV-Infektion feststellen, sodass diesem Signalweg eine Rolle in der HPV-unabhängigen penilen Karzinogenese zugeschrieben wird (Chaux et al., 2014; Ferrándiz-Pulido et al., 2013; Stankiewicz, Prowse, Ng, et al., 2011; Thomas et al., 2021). Die klinische Bedeutung der pAKT-Expression bei PeCa bleibt weiterhin Gegenstand kontroverser Diskussionen. So fanden Stankiewicz et al. eine negative Korrelation zwischen einer nukleären pAKT (Ser473)-Expression und dem Tumorstadium (Stankiewicz, Prowse, Ng, et al., 2011). Demgegenüber wurde eine verstärkte pAKT (Ser473)-Expression häufiger bei high-grade Tumoren beobachtet (Adimonye, Stankiewicz, La-Touche, et al., 2018; Chaux et al., 2014; Thomas et al., 2021). Während Azizi et al. eine Hochregulation des PI3K/AKT-Signalwegs bei vorliegender HPV-Infektion mit einer günstigen Prognose assoziierten (Azizi et al., 2019), bringt eine andere Studie die Aktivierung

des PI3K/AKT-Signalwegs und eine HPV-Infektion mit einem geringeren Gesamtüberleben in Verbindung (Thomas et al., 2021).

Bisher liegen nur wenige Studien zur Aktivierung von ERK, p38 MAPK und STAT3 beim Peniskarzinom vor. Eine Analyse auf Basis von TMA ergab, dass eine erhöhte Expression von pERK mit einem niedrigen Tumorstadium sowie einer guten histologischen Differenzierung des penilen Tumorgewebes korreliert (Ferrándiz-Pulido et al., 2013). Huang et al. konnten darüber hinaus einen direkten Zusammenhang zwischen der HPV-Integration und der Aktivierung von MAPK- und JAK/STAT-Signalwegen nachweisen (K. B. Huang et al., 2021). STAT3-Signalwege scheinen bei PeCa hochreguliert zu werden (Mo, Tong, Yin, et al., 2020; E. S. Yang et al., 2017). Die Arbeitsgruppe um de Barros zeigte, dass eine erhöhte Expression von pSTAT3 mit einer günstigen Prognose einhergeht, während eine gesteigerte STAT3-Expression mit einem aggressiveren Tumorverhalten und einer schlechteren Prognose assoziiert war (de Barros et al., 2023, 2024). Ferner deuten verschiedene Studien auf Konvergenzen zwischen den PI3K/AKT-, Ras/Raf/MEK/ERK- und JAK/STAT-Signalwegen beim Peniskarzinom hin (Mo et al., 2021; Mo, Tong, Huang, et al., 2020; Mo, Tong, Li, et al., 2020).

Neben Dysregulationen der PI3K/AKT- und MAPK-Signalwege offenbarte das mittels *Next-Generation Sequencing* ermittelte MicroRNA-Expressionsprofil des Peniskarzinoms auch Veränderungen in den Notch-, p53-, TGF- $\beta$ - und Wnt-Signalwegen, die ebenfalls maßgeblich an der Entstehung und Progression der penilen Tumoren beteiligt sein könnten (L. Zhang et al., 2015). Multiple Studien wiesen eine Beteiligung des Notch-Signalwegs an der Pathogenese des Peniskarzinoms nach (Chahoud et al., 2021; Ribera-Cortada et al., 2022). Des Weiteren wurde eine erhöhte Expression des Tumorsuppressors p53 mit einer ungünstigen Prognose in Verbindung gebracht, zeigte jedoch keine Korrelation mit einer HPV-Infektion (Ferrándiz-Pulido et al., 2013; Stankiewicz, Prowse, Ktori, et al., 2011). Außerdem scheint der Wnt-Signalweg bei PeCa, im Vergleich zu gesundem Gewebe, gesteigert aktiv zu sein (Arya et al., 2015; Bley et al., 2022).

Das Peniskarzinom ist eine seltene Tumorerkrankung zu der bislang nur wenig geforscht wurde und belastbare Studien mit ausreichender Fallzahl fehlen. Daher erscheint es sinnvoll, die gewonnenen Erkenntnisse zur Signalwegaktivierung mit anderen HPV-assoziierten Tumorentitäten, wie dem Zervixkarzinom und Kopf-Hals-Tumoren, zu vergleichen.

Im Kontext des Zervixkarzinoms beschreiben Bhattacharjee et al., dass das HPV-Onkoprotein E5 MAPK-Signalwege stimuliert, während E6 PI3K/AKT-, Wnt- und Notch-Signalwege beeinflusst und E7 den PI3K/AKT-Signalweg reguliert (Bhattacharjee et al., 2022). Vergleichbar zum Peniskarzinom implizieren multiple Studien die Konvergenz verschiedener Signalwege beim Zervixkarzinom, darunter PI3K/AKT-, JAK/STAT-, Notch-, p53-, Wnt- und MAPK-Signalwege. Die Aktivierung von PI3K/AKT-, MAPK-, Wnt- und Notch-Signalwegen bei gleichzeitiger Hemmung tumorsuppressiver Signalwege, wie p53 und RB, führt zu einer unkontrollierten Proliferation, verstärktem Überleben sowie gesteigerter Invasion und Migration zervikaler Tumorzellen (H. Wang et al., 2024). Außerdem

verknüpfen Li et al. die Induktion der EMT mit einer Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs (A. Li et al., 2018). Darüber hinaus scheint die Hochregulation des PI3K/AKT-Signalwegs zur Entwicklung von Resistenzmechanismen gegenüber Radiotherapie und Cisplatin-haltigen Chemotherapeutika beizutragen (T. J. Kim et al., 2006; N. Wang et al., 2018; Xia et al., 2010). Durch Förderung der Invasion und Metastasierung begünstigen aktivierte p38 MAPK- und Ras/Raf/MEK/ERK-Signalwege die Progression des Zervixkarzinoms (Zheng et al., 2018). Ferner scheint die Aktivierung des p38 MAPK-Signalwegs die EMT der zervikalen Tumorzellen zu fördern (L. Yang, Yu, et al., 2020). Unsere Arbeitsgruppe konnte einen Anstieg der pSTAT3-Expression von niedriggradigen zervikalen intraepithelialen Neoplasien (CIN1) zu hochgradigen Läsionen (CIN3) nachweisen, während im Übergang von CIN3 zum invasiven Zervixkarzinom ein Rückgang der pSTAT3-Expression beobachtet wurde. Darüber hinaus erhöhte die durch IL-6 induzierte STAT3-Aktivierung die Empfindlichkeit zervikaler Tumorzellen gegenüber chemotherapeutischen Behandlungen (Walch-Rückheim et al., 2016). Externe Literatur belegt eine gesteigerte Expression von pSTAT3 beim Zervixkarzinom im Vergleich zu gesundem Gewebe und bringt diese mit einer HPV-Infektion in Verbindung (Chen et al., 2007; Morgan & Macdonald, 2019; Shi et al., 2021; Shukla et al., 2010). Des Weiteren implizieren zwei Studien eine Korrelation zwischen einer erhöhten Expression von pSTAT3 und einer ungünstigen Prognose beim Zervixkarzinom (Abdullatif et al., 2024; Takemoto et al., 2009).

Vergleichbar zum Peniskarzinom zeigt sich auch bei Kopf-Hals-Tumoren in mindestens 80 % der Fälle eine Überexpression oder Mutation des EGFR. Die Aktivierung des EGFR initiiert eine Kaskade zellulärer Signalübertragungswege, darunter der Ras/Raf/MEK/ERK-, PI3K/AKT- sowie JAK/STAT-Signalweg (Bhat et al., 2021; Q. Li et al., 2023). Hervorzuheben ist, dass der PI3K/AKT-Signalweg in etwa 90 % der Kopf-Hals-Tumoren aktiviert ist (Jiang et al., 2024; Q. Li et al., 2023). Interessanterweise konnten Janecka-Widla et al. keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der pAKT (Thr308)-Expression bei HPV-positiven und HPV-negativen Kopf-Hals-Tumoren feststellen (Janecka-Widla et al., 2022). Die Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs trägt außerdem zur Strahlentherapieresistenz bei (Su et al., 2022). Chan et al. belegen eine gesteigerte Expression von pERK und pp38 MAPK in Kopf-Hals-Tumoren im Vergleich zu gesundem Gewebe (Chan et al., 2017). Diesbezüglich fanden Leelahavanchkul et al. pERK in unter 33 % der mehr als 400 untersuchten Kopf-Hals-Tumorproben, während p38 MAPK in 79 % der Fälle phosphoryliert und damit aktiviert vorlag (Leelahavanchkul et al., 2014). In gesunden Keratinozyten führte die Aktivierung der p38 MAPK zur Hemmung des ERK-Signalwegs, ein Regulationsmechanismus, der in Kopf-Hals-Tumorzellen offenbar aufgehoben ist, wodurch die Tumorzellen von der wachstumsfördernden Aktivität beider Signalkaskaden profitieren (Junttila et al., 2007). Eine erhöhte pERK-Expression wurde insbesondere bei Kopf-Hals-Tumoren mit fortgeschrittenen Lymphknotenmetastasen sowie Rezidiven beobachtet (Albanell et al., 2001) und korrelierte demzufolge mit einer ungünstigen Prognose (de Kort et al., 2023). Ma et al. implizieren, dass EMMPRIN über eine Aktivierung von MAPK-/ERK-Signalwegen eine Resistenz der Kopf-Hals-Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika vermittelt (Ma et al., 2017). Zudem wurde eine gesteigerte

Aktivierung von STAT3 bei Kopf-Hals-Tumoren beobachtet, die mit einer schlechten Prognose einherging (Johnson et al., 2020).

Zusammenfassend identifiziert die vorliegende Arbeit vielversprechende Aktivierungsmarker, insbesondere pERK im 2D-Modell und pp38 MAPK im 3D-Modell, und liefert damit eine fundierte Grundlage für weiterführende systematische Untersuchungen.

## 7 Ausblick

Diese Forschungsarbeit lieferte erste Hinweise auf die räumliche und zeitliche Dynamik der Neutrophilen-Immigration ins PeCa-TME sowie der Aktivierung von penilen Tumorzellen und Immunzellen. Um diese komplexe Interaktionsdynamik weiter aufzuschlüsseln, sind zukünftige Untersuchungen erforderlich, welche die zeitliche Dimension des TME systematisch berücksichtigen. Ein kritischer Aspekt ist hierbei die kurze Überlebenszeit der aus peripherem Blut isolierten Neutrophilen von wenigen Stunden. In dieser Studie wurde eine maximale Inkubationszeit von vierundzwanzig Stunden gewählt. Nach Gewebeamigration erhöht sich die Überlebensdauer der Neutrophilen auf drei bis fünf Tage, ein Effekt, der mittels organotypischer 3D-Kulturen nachgebildet werden kann. In künftigen Experimenten sollte daher das Bewegungsmuster, die phänotypischen Veränderungen und Signalweghierarchien über längere Zeiträume analysiert werden. Dies kann zusammen mit der zeitabhängigen wechselseitigen Aktivierung von Tumor- und Immunzellen mittels Live-Cell Imaging am konfokalen Fluoreszenzmikroskop detailliert untersucht werden.

Darüber hinaus lieferte die Arbeit erste Hinweise für relevante Signalweghierarchien als Ausgangspunkte weiterführender Untersuchungen. Ein umfassenderes Kinase-Profilung würde helfen, die zentralen Signalwegachsen und deren Dynamik mechanistisch aufzuklären. Auch hierfür ist es notwendig stärker auf komplexe 3D-Zellkulturmodelle zu setzen, um die *in vivo* Situation besser abzubilden und, wie bereits publizierte Vordaten der Arbeitsgruppe zeigten, damit klinisch relevante Erkenntnisse und Biomarker zu generieren.

In einem nächsten Schritt würden Einzelzell- und Multiomics-Analysen, insbesondere Proteomics, helfen, die Plastizität der Neutrophilen im Kontext des TME mit seiner zeitlichen und räumlichen Dimension auf molekularer Ebene zu erfassen. Die anschließende Validierung der Marker mit TMA-Färbungen und xenogenen Mausmodellen stellt schließlich entscheidende Schritte dar, um deren prognostisches und prädiktives Potential zu evaluieren. Langfristig könnten diese Erkenntnisse die Basis für zielgerichtete Interventionsstrategien bilden, welche die Neutrophilen-Signalhierarchien im TME therapeutisch nutzen, um neue Behandlungsoptionen für PeCa-Patienten zu eröffnen.

## 8 Literaturverzeichnis

- Abdullatif, A., Abdelrahman, A. E., Bakry, A., Gharieb, S. A., Ramadan, M. S., Wasfy, M. A., Abdelwanis, A. H., & Fouad, E. M. (2024). Clinicopathological significance of protein disulphide isomerase A3 and phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3 in cervical carcinoma. *Contemporary Oncology*, 28(1), 51–62. <https://doi.org/10.5114/wo.2024.139368>
- Adimonye, A., Stankiewicz, E., Kudahetti, S., Trevisan, G., Tinwell, B., Corbishley, C., Lu, Y. J., Watkin, N., & Berney, D. (2018). Analysis of the PI3K-AKT-mTOR pathway in penile cancer: Evaluation of a therapeutically targetable pathway. *Oncotarget*, 9(22), 16074–16086. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24688>
- Adimonye, A., Stankiewicz, E., La-Touche, S., Kudahetti, S., Trevisan, G., Tinwell, B., Corbishley, C., Lu, Y. J., Watkin, N., & Berney, D. (2018). PIK3CA copy number aberration and activation of the PI3K-AKT-mTOR pathway in varied disease states of penile cancer. *PLoS ONE*, 13(6), e0198905. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198905>
- Aguirre-Ghiso, J. A., Ossowski, L., & Rosenbaum, S. K. (2004). Green Fluorescent Protein Tagging of Extracellular Signal-Regulated Kinase and p38 Pathways Reveals Novel Dynamics of Pathway Activation during Primary and Metastatic Growth. *Cancer Research*, 64(20), 7336–7345. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0113>
- Aguirre Ghiso, J. A., Kovalski, K., & Ossowski, L. (1999). Tumor Dormancy Induced by Downregulation of Urokinase Receptor in Human Carcinoma Involves Integrin and MAPK Signaling. *Journal of Cell Biology*, 147(1), 89–103. <https://doi.org/10.1083/jcb.147.1.89>
- Albanell, J., Codony-Servat, J., Rojo, F., Del Campo, J. M., Sauleda, S., Anido, J., Raspall, G., Giralt, J., Roselló, J., Nicholson, R. I., Mendelsohn, J., & Baselga, J. (2001). Activated extracellular signal-regulated kinases: association with epidermal growth factor receptor/transforming growth factor alpha expression in head and neck squamous carcinoma and inhibition by anti-epidermal growth factor receptor treatments. *Cancer Research*, 61(17), 6500–6510.
- Albregues, J., Shields, M. A., Ng, D., Park, C. G., Ambrico, A., Poindexter, M. E., Upadhyay, P., Uyeminami, D. L., Pommier, A., Küttner, V., Bružas, E., Maiorino, L., Bautista, C., Carmona, E. M., Gimotty, P. A., Fearon, D. T., Chang, K., Lyons, S. K., Pinkerton, K. E., ... Egeblad, M. (2018). Neutrophil extracellular traps produced during inflammation awaken dormant cancer cells in mice. *Science*, 361(6409), eaao4227. <https://doi.org/10.1126/science.aao4227>
- Alfaro, C., Teijeira, A., Oñate, C., Perez, G., Sanmamed, M. F., Andueza, M. P., Alignani, D., Labiano, S., Azpilikueta, A., Rodriguez-Paulete, A., Garasa, S., Fusco, J. P., Aznar, A., Inoges, S., De Pizzol, M., Allegretti, M., Medina-Echeverz, J., Berraondo, P., Perez-Gracia, J. L., & Melero, I. (2016). Tumor-Produced Interleukin-8 Attracts human myeloid-derived suppressor cells and elicits extrusion of Neutrophil Extracellular Traps (NETs). *Clinical Cancer Research*, 22(15), 3924–3936. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2463>
- Alnajjar, H. M., Lam, W., Bolgeri, M., Rees, R. W., Perry, M. J. A., & Watkin, N. A. (2012). Treatment of Carcinoma In Situ of the Glans Penis with Topical Chemotherapy Agents. *European Association of Urology*, 62(5), 923–928. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2012.02.052>
- Anacker, D., & Moody, C. (2012). Generation of Organotypic Raft Cultures from Primary Human Keratinocytes. *Journal of Visualized Experiments*, 60, e3668. <https://doi.org/10.3791/3668>
- Andersson, P., Kolaric, A., Windahl, T., Kirrander, P., Söderkvist, P., & Karlsson, M. G. (2008). PIK3CA, HRAS and KRAS Gene Mutations in Human Penile Cancer. *The Journal of Urology*, 179(5), 2030–2034. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2007.12.040>
- Arya, M., Thrasivoulou, C., Henrique, R., Millar, M., Hamblin, R., Davda, R., Aare, K., Masters, J. R., Thomson, C., Muneer, A., Patel, H. R. H., & Ahmed, A. (2015). Targets of Wnt/β-Catenin Transcription in Penile carcinoma. *PLoS ONE*, 10(4), 1–13.

- <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124395>
- Asgari, R., Vaisi-Raygani, A., Aleagha, M. S. E., Mohammadi, P., Bakhtiari, M., & Arghiani, N. (2023). CD147 and MMPs as key factors in physiological and pathological processes. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *157*, 113983. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113983>
- Asselineau, D., & Prunieras, M. (1984). Reconstruction of 'simplified' skin: control of fabrication. *The British Journal of Dermatology*, *111*(Supplement 27), 219–222. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1984.tb15608.x>
- Azizi, M., Tang, D. H., Verduzco, D., Peyton, C. C., Chipollini, J., Yuan, Z., Schaible, B. J., Zhou, J. M., Johnstone, P. A., Giuliano, A., Dhillon, J., & Spiess, P. E. (2019). Impact of PI3K-AKT-mTOR Signaling Pathway Up-regulation on Prognosis of Penile Squamous-Cell Carcinoma: Results From a Tissue Microarray Study and Review of the Literature. *Clinical Genitourinary Cancer*, *17*(1), e80–e91. <https://doi.org/10.1016/j.clgc.2018.09.012>
- Babadi, S., Shahri, M. M., Nematollahi, S. F., Barpujari, A., Clark, A., Lucke-Wold, B., Sarejloo, S., Ghaedi, A., Bazrgar, A., & Khanzadeh, S. (2024). Relationship between NLR and penile squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *BMC Urology*, *24*, 194. <https://doi.org/10.1186/s12894-024-01569-7>
- Backes, D. M., Kurman, R. J., Pimenta, J. M., & Smith, J. S. (2009). Systematic review of human papillomavirus prevalence in invasive penile cancer. *Cancer Causes and Control*, *20*(4), 449–457. <https://doi.org/10.1007/s10552-008-9276-9>
- Barker, J. N. W. N., Jones, M. L., Mitra, R. S., Crockett-Torabe, E., Fantone, J. C., Kunkel, S. L., Warren, J. S., Dixit, V. M., & Nickoloff, B. J. (1991). Modulation of Keratinocyte-derived Interleukin-8 Which Is Chemotactic for Neutrophils and T Lymphocytes. *The American Journal of Pathology*, *139*(4), 869–876. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1886319/>
- Barnett, C. C., Moore, E. E., Mierau, G. W., Partrick, D. A., Biffl, W. L., Elzi, D. J., & Silliman, C. C. (1998). ICAM-1-CD18 interaction mediates neutrophil cytotoxicity through protease release. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, *274*(6), C1634–C1644. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1998.274.6.c1634>
- Barnholtz-Sloan, J. S., Maldonado, J. L., Pow-sang, J., & Giuliano, A. R. (2007). Incidence trends in primary malignant penile cancer. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, *25*(5), 361–367. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2006.08.029>
- Barocas, D. A., & Chang, S. S. (2010). Penile Cancer: Clinical Presentation, Diagnosis, and Staging. *Urologic Clinics of North America*, *37*(3), 343–352. <https://doi.org/10.1016/j.ucl.2010.04.002>
- Behrens, L. M., van den Berg, T. K., & van Egmond, M. (2022). Targeting the CD47-SIRPα Innate Immune Checkpoint to Potentiate Antibody Therapy in Cancer by Neutrophils. *Cancers*, *14*, 3366. <https://doi.org/10.3390/cancers14143366>
- Berman, T. A., & Schiller, J. T. (2017). Human Papillomavirus in Cervical Cancer and Oropharyngeal Cancer: One Cause, Two Diseases. *Cancer*, *123*(12), 2219–2229. <https://doi.org/10.1002/cncr.30588>
- Bernhagen, J., Krohn, R., Lue, H., Gregory, J. L., Zerneck, A., Koenen, R. R., Dewor, M., Georgiev, I., Schober, A., Leng, L., Kooistra, T., Fingerle-Rowson, G., Ghezzi, P., Kleemann, R., McColl, S. R., Bucala, R., Hickey, M. J., & Weber, C. (2007). MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nature Medicine*, *13*(5), 587–596. <https://doi.org/10.1038/nm1567>
- Bernhard, M. C. (2019). *Master thesis - The microenvironment of HPV-positive penile cancer and its impact on EGFR targeting immunotherapeutic approaches*. 1–131.
- Bernhard, M. C., Zwick, A., Mohr, T., Gasparoni, G., Khalmurzaev, O., Matveev, V. B., Loertzer, P., Pryalukhin, A., Hartmann, A., Geppert, C. I., Loertzer, H., Wunderlich, H., Naumann, C. M.,

- Kalthoff, H., Junker, K., Smola, S., & Lohse, S. (2021). The HPV and p63 Status in Penile Cancer Are Linked with the Infiltration and Therapeutic Availability of Neutrophils. *Molecular Cancer Therapeutics*, 20(2), 423–437. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-20-0173/88546>
- Bertelsen, B. I., Steine, S. J., Sandvei, R., Molven, A., & Laerum, O. D. (2006). Molecular analysis of the PI3K-AKT pathway in uterine cervical neoplasia: Frequent PIK3CA amplification and AKT phosphorylation. *International Journal of Cancer*, 118(8), 1877–1883. <https://doi.org/10.1002/ijc.21461>
- Bhat, A. A., Yousuf, P., Wani, N. A., Rizwan, A., Chauhan, S. S., Siddiqi, M. A., Bedognetti, D., El-Rifai, W., Frenneaux, M. P., Batra, S. K., Haris, M., & Macha, M. A. (2021). Tumor microenvironment: an evil nexus promoting aggressive head and neck squamous cell carcinoma and avenue for targeted therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00419-w>
- Bhattacharjee, R., Das, S. S., Biswal, S. S., Nath, A., Das, D., Basu, A., Malik, S., Kumar, L., Kar, S., Singh, S. K., Upadhye, V. J., Iqbal, D., Almojam, S., Roychoudhury, S., Ojha, S., Ruokolainen, J., Jha, N. K., & Kesari, K. K. (2022). Mechanistic role of HPV-associated early proteins in cervical cancer: Molecular pathways and targeted therapeutic strategies. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 174, 103675. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2022.103675>
- Bleeker, M. C. G., Heideman, D. A. M., Snijders, P. J. F., Horenblas, S., Dillner, J., & Meijer, C. J. L. M. (2009). Penile cancer: epidemiology, pathogenesis and prevention. *World Journal of Urology*, 27(2), 141–150. <https://doi.org/10.1007/s00345-008-0302-z>
- Bley, I. A., Zwick, A., Hans, M. C., Thieser, K., Wagner, V., Ludwig, N., Khalmurzaev, O., Matveev, V. B., Loertzer, P., Pryalukhin, A., Hartmann, A., Geppert, C. I., Loertzer, H., Wunderlich, H., Naumann, C. M., Kalthoff, H., Junker, K., Smola, S., & Lohse, S. (2022). IDKK1 inhibits canonical Wnt signaling in human papillomavirus-positive penile cancer cells. *Translational Oncology*, 15(1), 101267. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2021.101267>
- Bonecchi, R., Mantovani, A., & Jaillon, S. (2022). Chemokines as Regulators of Neutrophils: Focus on Tumors, Therapeutic Targeting, and Immunotherapy. *Cancers*, 14(3), 680. <https://doi.org/10.3390/cancers14030680>
- Börgermann, C., Schmitz, K. J., Sommer, S., Rübber, H., & Krege, S. (2009). Charakterisierung des EGF-Rezeptorstatus beim Peniskarzinom: Retrospektive Auswertung der Krankheitsverläufe von 45 Patienten. *Der Urologe. Ausg. A*, 48(12), 1483–1489. <https://doi.org/10.1007/s00120-009-2101-6>
- Boulet, G., Horvath, C., Broeck, D. Vanden, Sahebali, S., & Bogers, J. (2007). Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39(11), 2006–2011. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.07.004>
- Braun, F. L. (2020). *Bachelor thesis - Influence of the tumor microenvironment on the HPV driven penile carcinogenesis*. 1–84.
- Buck, C. B., & Trus, B. L. (2012). The Papillomavirus Virion: A Machine Built to Hide Molecular Achilles' Heels. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 726, 403–422. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0980-9\\_18](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0980-9_18)
- Buonacera, A., Stancanelli, B., Colaci, M., & Malatino, L. (2022). Neutrophil to Lymphocyte Ratio: An Emerging Marker of the Relationships between the Immune System and Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(7), 3636. <https://doi.org/10.3390/ijms23073636>
- Buzas, E. I. (2023). The roles of extracellular vesicles in the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 23(4), 236–250. <https://doi.org/10.1038/s41577-022-00763-8>
- Chahoud, J., Gleber-Netto, F. O., McCormick, B. Z., Rao, P., Lu, X., Guo, M., Morgan, M. B., Chu, R. A., Martinez-Ferrer, M., Eterovic, A. K., Pickering, C. R., & Pettaway, C. A. (2021). Whole-

- exome Sequencing in Penile Squamous Cell Carcinoma Uncovers Novel Prognostic Categorization and Drug Targets Similar to Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 27(9), 2560–2570. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-4004>
- Chan, L. P., Liu, C., Chiang, F. Y., Wang, L. F., Lee, K. W., Chen, W. T., Kuo, P. L., & Liang, C. H. (2017). IL-8 promotes inflammatory mediators and stimulates activation of p38 MAPK/ERK-NF- $\kappa$ B pathway and reduction of JNK in HNSCC. *Oncotarget*, 8(34), 56375–56388. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16914>
- Chaux, A., Munari, E., Cubilla, A. L., Hicks, J., Lecksell, K., Burnett, A. L., & Netto, G. J. (2014). Immunohistochemical expression of the mammalian target of rapamycin pathway in penile squamous cell carcinomas: a tissue microarray study of 112 cases. *Histopathology*, 64(6), 863–871. <https://doi.org/10.1111/his.12338>
- Chen, C. L., Hsieh, F. C., Lieblein, J. C., Brown, J., Chan, C., Wallace, J. A., Cheng, G., Hall, B. M., & Lin, J. (2007). Stat3 activation in human endometrial and cervical cancers. *British Journal of Cancer*, 96(4), 591–599. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603597>
- Chesson, H. W., Dunne, E. F., Hariri, S., & Markowitz, L. E. (2014). The Estimated Lifetime Probability of Acquiring Human Papillomavirus in the United States. *Sexually Transmitted Diseases*, 41(11), 660–664. <https://doi.org/10.1097/OLQ.0000000000000193>
- Chiosea, S. I., Grandis, J. R., Lui, V. W. Y., Diergaard, B., Maxwell, J. H., Ferris, R. L., Kim, S. W., Luvison, A., Miller, M., & Nikiforova, M. N. (2013). PIK3CA, HRAS and PTEN in human papillomavirus positive oropharyngeal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*, 13(602). <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-602>
- Clemmensen, S. N., Bohr, C. T., Rørvig, S., Glenthøj, A., Mora-Jensen, H., Cramer, E. P., Jacobsen, L. C., Larsen, M. T., Cowland, J. B., Tanassi, J. T., Heegaard, N. H. H., Wren, J. D., Silahatoglu, A. N., & Borregaard, N. (2011). Olfactomedin 4 defines a subset of human neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*, 91(3), 495–500. <https://doi.org/10.1189/jlb.0811417>
- Coffelt, S. B., Kersten, K., Doornebal, C. W., Weiden, J., Vrijland, K., Hau, C. S., Versteegen, N. J. M., Ciampricotti, M., Hawinkels, L. J. A. C., Jonkers, J., & De Visser, K. E. (2015). IL-17-producing  $\gamma\delta$  T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature*, 522(7556), 345–348. <https://doi.org/10.1038/nature14282>
- Coffelt, S. B., Wellenstein, M. D., & De Visser, K. E. (2016). Neutrophils in cancer: neutral no more. *Nature Reviews Cancer*, 16(7), 431–446. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.52>
- Condamine, T., Gabrilovich, D. I., Dominguez, G. A., Youn, J.-I., Kossenkov, A. V., Mony, S., Alicea-Torres, K., & T. (2016). Lectin-type oxidized LDL receptor-1 distinguishes population of human polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells in cancer patients. *Science Immunology*, 1(2), aaf8943. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aaf8943>.Lectin-type
- Cools-Lartigue, J., Spicer, J., McDonald, B., Gowing, S., Chow, S., Giannias, B., Bourdeau, F., Kubes, P., & Ferri, L. (2013). Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(8), 3446–3458. <https://doi.org/10.1172/JCI67484>
- Cowland, J. B., & Borregaard, N. (2016). Granulopoiesis and granules of human neutrophils. *Immunological Reviews*, 273(1), 11–28. <https://doi.org/10.1111/imr.12440>
- Crispen, P. L., & Mydlo, J. H. (2010). Penile Intraepithelial Neoplasia and Other Premalignant Lesions of the Penis. *Urologic Clinics of North America*, 37(3), 335–342. <https://doi.org/10.1016/j.ucl.2010.04.003>
- Cubilla, A. L., Lloveras, B., Alejo, M., Clavero, O., Chaux, A., Kasamatsu, E., Monfuleda, N., Tous, S., Alemany, L., Klaustermeier, J., Muñoz, N., Quint, W., De Sanjose, S., & Bosch, F. X. (2011). Value of p16INK4a in the Pathology of Invasive Penile Squamous Cell Carcinomas: A Report of

- 202 Cases. *American Journal of Surgical Pathology*, 35(2), 253–261.  
<https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e318203cdba>
- Cuenda, A., & Rousseau, S. (2007). p38 MAP-Kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1773(8), 1358–1375.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2007.03.010>
- Dai, L., Guinea, M. C., Slomiany, M. G., Bratoeva, M., Grass, G. D., Tolliver, L. B., Maria, B. L., & Toole, B. P. (2013). CD147-Dependent Heterogeneity in Malignant and Chemoresistant Properties of Cancer Cells. *American Journal of Pathology*, 182(2), 577–585.  
<https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.10.011>
- Darnell, J. E. (1997). STATs and Gene Regulation. *Science*, 277(5332), 1630–1635.  
<https://doi.org/10.1126/science.277.5332.1630>
- de Barros, F. D., Guimarães, G. C., Martins, M. R., Marinho, F. da S., Soares, F. A., & Torres, L. C. (2024). Expression of CD44(high)CD24(Low) cells, SOX2, and STAT3 transcription factors on peripheral blood and tumor tissue of penile squamous cell carcinoma. *Journal of Surgical Oncology*, 130(4), 929–943. <https://doi.org/10.1002/jso.27749>
- de Barros, F. D., Torres, L. C., Araujo, C., da Silva Marinho, F., Dubourcq, B. C., Dubourcq, L. C., & Guimarães, G. C. (2023). Prognostic utility of SOX2, STAT3, and CD44high/CD24low expression in penile cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 149(5), 2081–2094. <https://doi.org/10.1007/s00432-022-04222-8>
- de Kort, W. W. B., de Ruiter, E. J., Haakma, W. E., Driehuis, E., Devriese, L. A., van Es, R. J. J., & Willems, S. M. (2023). p-mTOR, p-ERK and PTEN Expression in Tumor Biopsies and Organoids as Predictive Biomarkers for Patients with HPV Negative Head and Neck Cancer. *Head and Neck Pathology*, 17(3), 697–707. <https://doi.org/10.1007/s12105-023-01576-4>
- De Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H. U., & zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324(1), 17–27. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.03.033>
- De Vries, H. M., Brouwer, O. R., Heijmink, S., Horenblas, S., & Vegt, E. (2019). Recent developments in penile cancer imaging. *Current Opinion in Urology*, 29(2), 150–155.  
<https://doi.org/10.1097/MOU.0000000000000585>
- Di Lorenzo, G., Buonerba, C., Gaudio, G., Gigantino, V., Quarto, G., De Domenico, R., Caraglia, M., Di Trollo, R., Ascierio, P. A., De Placido, S., Perdonà, S., & Franco, R. (2013). EGFR mutational status in penile cancer. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 17(5), 501–505.  
<https://doi.org/10.1517/14728222.2013.783571>
- Dillner, J., Von Krogh, G., Horenblas, S., & Meijer, C. J. L. M. (2000). Etiology of Squamous Cell Carcinoma of the Penis. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology*, 205, 189–193.  
<https://doi.org/10.1080/00365590050509913>
- Dimitrov, J., Maddalena, M., Terlizzi, C., Altobelli, G. G., Pellegrino, S., Mehmood, T., De Rosa, V., Iommelli, F., & Del Vecchio, S. (2024). Dynamic roles of neutrophil extracellular traps in cancer cell adhesion and activation of Notch 1-mediated epithelial-to-mesenchymal transition in EGFR-driven lung cancer cells. *Frontiers in Immunology*, 15(October), 1470620.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1470620>
- Doorbar, J. (2005). The papillomavirus life cycle. *Journal of Clinical Virology*, 32(Supplement 1), S7–S15. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2004.12.006>
- Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, I. G., Stoler, M., Broker, T. R., & Stanley, M. A. (2012). The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. *Vaccine*, 30(Supplement 5), F55–F70.  
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.06.083>
- Dumitru, C. A., Gholaman, H., Trellakis, S., Bruderek, K., Dominas, N., Gu, X., Bankfalvi, A., Whiteside, T. L., Lang, S., & Brandau, S. (2011). Tumor-derived macrophage migration

- inhibitory factor modulates the biology of head and neck cancer cells via neutrophil activation. *International Journal of Cancer*, 129(4), 859–869. <https://doi.org/10.1002/ijc.25991>
- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology*, 3(11), 991–998. <https://doi.org/10.1038/ni1102-991>
- Dunne, E. F., & Park, I. U. (2013). HPV and HPV-Associated Diseases. *Infectious Disease Clinics of North America*, 27(4), 765–778. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2013.09.001>
- Eckert, R. L. (1989). Structure, Function, and Differentiation of the Keratinocyte. *Physiological Reviews*, 69(4), 1316–1346. <https://doi.org/10.1152/physrev.1989.69.4.1316>
- Egawa, N., Nakahara, T., Ohno, S., Narisawa-Saito, M., Yugawa, T., Fujita, M., Yamato, K., Natori, Y., & Kiyono, T. (2012). The E1 Protein of Human Papillomavirus Type 16 Is Dispensable for Maintenance Replication of the Viral Genome. *Journal of Virology*, 86(6), 3276–3283. <https://doi.org/10.1128/jvi.06450-11>
- Fenner, F., Goody, D., Protzel, C., Erbersdobler, A., Richter, C., Hartz, J. M., Naumann, C. M., Kalthoff, H., Herchenröder, O., Hakenberg, O. W., & Pützer, B. M. (2018). E2F1 Signalling is Predictive of Chemoresistance and Lymphogenic Metastasis in Penile Cancer: A Pilot Functional Study Reveals New Prognostic Biomarkers. *European Urology Focus*, 4(4), 599–607. <https://doi.org/10.1016/j.euf.2017.02.009>
- Fernando, R. I., Castillo, M. D., Litzinger, M., Hamilton, D. H., & Palena, C. (2011). IL-8 signaling plays a critical role in the epithelial-mesenchymal transition of human carcinoma cells. *Cancer Research*, 71(15), 5296–5306. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-0156>
- Ferrándiz-Pulido, C., Hernández-Losa, J., Masferrer, E., Vivancos, A., Somoza, R., Marés, R., Valverde, C., Salvador, C., Placer, J., Morote, J., Pujol, R. M., Ramon y Cajal, S., de Torres, I., Toll, A., & García-Patos, V. (2015). Identification of Somatic Gene Mutations in Penile Squamous Cell Carcinoma. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 54(10), 629–637. <https://doi.org/10.1002/gcc.22274>
- Ferrándiz-Pulido, C., Masferrer, E., Toll, A., Hernandez-Losa, J., Mojal, S., Pujol, R. M., Ramon Y Cajal, S., De Torres, I., & Garcia-Patos, V. (2013). mTOR Signaling Pathway in Penile Squamous Cell Carcinoma: pmTOR and peIF4E Over Expression Correlate with Aggressive Tumor Behavior. *The Journal of Urology*, 190(6), 2288–2295. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2013.06.015>
- Ficarra, V., Akduman, B., Bouchot, O., Palou, J., & Tobias-Machado, M. (2010). Prognostic Factors in Penile Cancer. *Urology*, 76(Supplement 2A), S66–S73. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2010.04.008>
- Finnen, R. L., Erickson, K. D., Chen, X. S., & Garcea, R. L. (2003). Interactions between Papillomavirus L1 and L2 Capsid Proteins. *Journal of Virology*, 77(8), 4818–4826. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.8.4818-4826.2003>
- Flaherty, A., Kim, T., Giuliano, A., Magliocco, A., Hakky, T. S., Pagliaro, L. C., & Spiess, P. E. (2014). Implications for human papillomavirus in penile cancer. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 32, 53.e1-53.e8. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2013.08.010>
- Flemming, S., Luissint, A. C., Nusrat, A., & Parkos, C. A. (2018). Analysis of leukocyte transepithelial migration using an in vivo murine colonic loop model. *JCI Insight*, 3(20), e99722. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.99722>
- Fossum, S., Mallett, S., & Neil Barclay, A. (1991). The MRC OX-47 antigen is a member of the immunoglobulin superfamily with an unusual transmembrane sequence. *European Journal of Immunology*, 21(3), 671–679. <https://doi.org/10.1002/eji.1830210320>
- Freisinger, C. M., & Huttenlocher, A. (2014). Live Imaging and Gene Expression Analysis in

- Zebrafish Identifies a Link between Neutrophils and Epithelial to Mesenchymal Transition. *PLoS ONE*, 9(11), e112183. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112183>
- Fridlender, Z. G., & Albelda, S. M. (2012). Tumor-associated neutrophils: friend or foe? *Carcinogenesis*, 33(5), 949–955. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs123>
- Fridlender, Z. G., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G., Ling, L., Worthen, G. S., & Albelda, S. M. (2009). Polarization of Tumor-Associated Neutrophil (TAN) Phenotype by TGF- $\beta$ : “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell*, 16(3), 183–194. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.06.017>
- Gaida, M. M., Steffen, T. G., Günther, F., Tschaharganeh, D. F., Felix, K., Bergmann, F., Schirmacher, P., & Hänsch, G. M. (2012). Polymorphonuclear neutrophils promote dyshesion of tumor cells and elastase-mediated degradation of E-cadherin in pancreatic tumors. *European Journal of Immunology*, 42(12), 3369–3380. <https://doi.org/10.1002/eji.201242628>
- Gaykalova, D. A., Manola, J. B., Ozawa, H., Zizkova, V., Morton, K., Bishop, J. A., Sharma, R., Zhang, C., Michailidi, C., Considine, M., Tan, M., Fertig, E. J., Hennessey, P. T., Ahn, J., Koch, W. M., Westra, W. H., Khan, Z., Chung, C. H., Ochs, M. F., & Califano, J. A. (2015). NF- $\kappa$ B and STAT3 Transcription Factor Signatures Differentiate HPV-positive and HPV-negative Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *International Journal of Cancer*, 137(8), 1879–1889. <https://doi.org/10.1002/ijc.29558>
- Giroglou, T., Florin, L., Schäfer, F., Streeck, R. E., & Sapp, M. (2001). Human Papillomavirus Infection Requires Cell Surface Heparan Sulfate. *Journal of Virology*, 75(3), 1565–1570. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.3.1565-1570.2001>
- Graham, S. V. (2017). The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review. *Clinical Science*, 131(17), 2201–2221. <https://doi.org/10.1042/CS20160786>
- Graham, S. V. (2010). Human papillomavirus: gene expression, regulation and prospects for novel diagnostic methods and antiviral therapies. *Future Microbiology*, 5(10), 1493–1506. <https://doi.org/10.2217/fmb.10.107>
- Granot, Z., & Jablonska, J. (2015). Distinct Functions of Neutrophil in Cancer and Its Regulation. *Mediators of Inflammation*, 2015(Article ID 701067), 1–11. <https://doi.org/10.1155/2015/701067>
- Grass, G. D., Ercan, D., Obermayer, A. N., Shaw, T., Stewart, P. A., Chahoud, J., Dhillon, J., Lopez, A., Johnstone, P. A. S., Rogatto, S. R., Spiess, P. E., & Eschrich, S. A. (2023). An Assessment of the Penile Squamous Cell Carcinoma Surfaceome for Biomarker and Therapeutic Target Discovery. *Cancers*, 15(14), 3636. <https://doi.org/10.3390/cancers15143636>
- Grass, G. D., Tolliver, L. B., Bratoeva, M., & Toole, B. P. (2013). CD147, CD44, and the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Signaling Pathway Cooperate to Regulate Breast Epithelial Cell Invasiveness. *Journal of Biological Chemistry*, 288(36), 26089–26104. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.497685>
- Grass, G. D., & Toole, B. P. (2016). How, with whom and when: an overview of CD147-mediated regulatory networks influencing matrix metalloproteinase activity. *Bioscience Reports*, 36(1), 1–16. <https://doi.org/10.1042/BSR20150256>
- Grosse-Steffen, T., Giese, T., Giese, N., Longerich, T., Schirmacher, P., Hänsch, G. M., & Gaida, M. M. (2012). Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Pancreatic Tumor Cell Lines: The Role of Neutrophils and Neutrophil-Derived Elastase. *Clinical & Developmental Immunology*, 2012, 720768. <https://doi.org/10.1155/2012/720768>
- Gstraunthaler, G., & Lindl, T. (2021). *Zell- und Gewebekultur: Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen* (8. Aufl.). Springer Spektrum. <https://link.springer.com/10.1007/978-3-662-62606-1>
- Guan, X., Lu, Y., Zhu, H., Yu, S., Zhao, W., Chi, X., Xie, C., & Yin, Z. (2021). The Crosstalk

- Between Cancer Cells and Neutrophils Enhances Hepatocellular Carcinoma Metastasis via Neutrophil Extracellular Traps-Associated Cathepsin G Component: A Potential Therapeutic Target. *Journal of Hepatocellular Carcinoma*, 8, 451–465. <https://doi.org/10.2147/jhc.s303588>
- Guo, H., Majmudar, G., Jensen, T. C., Biswas, C., Toole, B. P., & Gordon, M. K. (1998). Characterization of the gene for human EMMPRIN, a tumor cell surface inducer of matrix metalloproteinases. *Gene*, 220(1–2), 99–108. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(98\)00400-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(98)00400-4)
- Guo, Y., Pan, W., Liu, S., Shen, Z., Xu, Y., & Hu, L. (2020). ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, 19, 1997–2007. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.8454>
- Gutiérrez-Hoya, A., & Soto-Cruz, I. (2020). Role of the JAK/STAT Pathway in Cervical Cancer: Its Relationship with HPV E6/E7 Oncoproteins. *Cells*, 9(10), 2297. <https://doi.org/10.3390/cells9102297>
- Hakenberg, O. W., Dräger, D. L., Erbersdobler, A., Naumann, C. M., Jünemann, K. P., & Protzel, C. (2018). The Diagnosis and Treatment of Penile Cancer. *Deutsches Arzteblatt International*, 115(39), 646–652. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2018.0646>
- Han, Z. D., He, H. C., Bi, X. C., Qin, W. J., Dai, Q. S., Zou, J., Ye, Y. K., Liang, Y. X., Zeng, G. H., Zhu, G., Chen, Z. N., & Zhong, W. D. (2010). Expression and Clinical Significance of CD147 in Genitourinary Carcinomas. *Journal of Surgical Research*, 160(2), 260–267. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2008.11.838>
- Han, Z. J., Li, Y. B., Yang, L. X., Cheng, H. J., Liu, X., & Chen, H. (2022). Roles of the CXCL8-CXCR1/2 Axis in the Tumor Microenvironment and Immunotherapy. *Molecules*, 27, 137. <https://doi.org/10.3390/molecules27010137>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hanchanale, V., Yeo, L., Subedi, N., Smith, J., Wah, T., Harnden, P., Bhattarai, S., Chilka, S., & Eardley, I. (2016). The accuracy of magnetic resonance imaging (MRI) in predicting the invasion of the tunica albuginea and the urethra during the primary staging of penile cancer. *BJU International*, 117(3), 439–443. <https://doi.org/10.1111/bju.13041>
- Hasan, S., Francis, A., Hagenauer, A., Hirsh, A., Kaminsky, D., Traughber, B., Abouassaly, R., & Ellis, R. (2015). The role of brachytherapy in organ preservation for penile cancer: A meta-analysis and review of the literature. *Brachytherapy*, 14(4), 517–524. <https://doi.org/10.1016/j.brachy.2015.03.008>
- Hashizume, M., Higuchi, Y., Uchiyama, Y., & Mihara, M. (2011). IL-6 plays an essential role in neutrophilia under inflammation. *Cytokine*, 54(1), 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2011.01.007>
- He, C., Mao, D., Hua, G., Lv, X., Chen, X., Angeletti, P. C., Dong, J., Remmenga, S. W., Rodabaugh, K. J., Zhou, J., Lambert, P. F., Yang, P., Davis, J. S., & Wang, C. (2015). The Hippo/YAP pathway interacts with EGFR signaling and HPV oncoproteins to regulate cervical cancer progression. *EMBO Molecular Medicine*, 7(11), 1426–1449. <https://doi.org/10.15252/emmm.201404976>
- He, Y., Sun, M. M., Zhang, G. G., Yang, J., Chen, K. S., Xu, W. W., & Li, B. (2021). Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 425. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00828-5>
- Heid, J., Affolter, A., Jakob, Y., Kern, J., Rotter, N., Tenschert, E., & Lammert, A. (2022). 3D cell culture alters signal transduction and drug response in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncology Letters*, 23(6), 177. <https://doi.org/10.3892/ol.2022.13297>
- Henken, F. E., Banerjee, N. S., Snijders, P. J. F., Meijer, C. J. L. M., De-Castro Arce, J., Rösl, F.,

- Broker, T. R., Chow, L. T., & Steenbergen, R. D. M. (2011). PIK3CA-mediated PI3-kinase signalling is essential for HPV-induced transformation in vitro. *Molecular Cancer*, *10*(71), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-10-71>
- Hoarau-Véchet, J., Raffii, A., Touboul, C., & Pasquier, J. (2018). Halfway between 2D and animal models: Are 3D cultures the ideal tool to study cancer-microenvironment interactions? *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(1), 181. <https://doi.org/10.3390/ijms19010181>
- Hölters, S., Khalmurzaev, O., Pryalukhin, A., Loertzer, P., Janssen, M., Heinzelbecker, J., Ueberdiek, S., Pfuhl, T., Smola, S., Agaimy, A., Geppert, C., Loertzer, H., Krah, X., Wunderlich, H., Wagenpfeil, S., Bohle, R. M., Stöckle, M., Matveev, V., Hartmann, A., & Junker, K. (2019). Challenging the prognostic impact of the new WHO and TNM classifications with special emphasis on HPV status in penile carcinoma. *Virchows Archiv*, *475*(2), 211–221. <https://doi.org/10.1007/s00428-019-02566-0>
- Hoppe-Seyler, K., Bossler, F., Braun, J. A., Herrmann, A. L., & Hoppe-Seyler, F. (2018). The HPV E6/E7 Oncogenes: Key Factors for Viral Carcinogenesis and Therapeutic Targets. *Trends in Microbiology*, *26*(2), 158–168. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.07.007>
- Hoshino, R., Chatani, Y., Yamori, T., Tsuruo, T., Oka, H., Yoshida, O., Shimada, Y., Ari-I, S., Wada, H., Fujimoto, J., & Kohno, M. (1999). Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. *Oncogene*, *18*(3), 813–822. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202367>
- Hoxhaj, G., & Manning, B. D. (2020). The PI3K–AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. *Nature Reviews Cancer*, *20*(2), 74–88. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0216-7>
- Hu, C., Bai, Y., Li, J., Zhang, G., Yang, L., Bi, C., Zhao, B., Yang, Y., Li, R., Wu, H., Wang, Q., & Qin, Y. (2020). Prognostic value of systemic inflammatory factors NLR, LMR, PLR and LDH in penile cancer. *BMC Urology*, *20*(1), 57. <https://doi.org/10.1186/s12894-020-00628-z>
- Hu, C., Long, L., Lou, J., Leng, M., Yang, Q., Xu, X., & Zhou, X. (2024). CTC-neutrophil interaction: A key driver and therapeutic target of cancer metastasis. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *180*, 117474. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.117474>
- Hu, P., Shen, M., Zhang, P., Zheng, C., Pang, Z., Zhu, L., & Du, J. (2015). Intratumoral neutrophil granulocytes contribute to epithelial-mesenchymal transition in lung adenocarcinoma cells. *Tumor Biology*, *36*(10), 7789–7796. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3484-1>
- Hu, X., Huang, J., Wen, S., Fu, J., & Chen, M. (2017). Comparison of efficacy between brachytherapy and penectomy in patients with penile cancer: a meta-analysis. *Oncotarget*, *8*(59), 100469–100477. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18761>
- Huang, K. B., Guo, S. J., Li, Y. H., Zhang, X. K., Chen, D., Spiess, P. E., Li, Z. S., Deng, C. Z., Chen, J. P., Zhou, Q. H., Hu, Z., Ma, X., Jin, J. T., Cao, Y., Luo, J. H., Wang, X. Bin, Zhou, F. J., Liu, R. Y., & Han, H. (2021). Genome-Wide Profiling Reveals HPV Integration Pattern and Activated Carcinogenic Pathways in Penile Squamous Cell Carcinoma. *Cancers*, *13*(23), 6104. <https://doi.org/10.3390/cancers13236104>
- Huang, X., Nepovimova, E., Adam, V., Sivak, L., Heger, Z., Valko, M., Wu, Q., & Kuca, K. (2024). Neutrophils in Cancer immunotherapy: friends or foes? *Molecular Cancer*, *23*(1), 107. <https://doi.org/10.1186/s12943-024-02004-z>
- Huh, S. J., Liang, S., Sharma, A., Dong, C., & Robertson, G. P. (2010). Transiently Entrapped Circulating Tumor Cells Interact with Neutrophils to Facilitate Lung Metastasis Development. *Cancer Research*, *70*(14), 6071–6082. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4442>
- Huibregtse, J. M., Scheffner, M., & Howley, P. M. (1991). A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *The EMBO Journal*,

- 10(13), 4129–4135. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb04990.x>
- Jaillon, S., Ponzetta, A., Di Mitri, D., Santoni, A., Bonecchi, R., & Mantovani, A. (2020). Neutrophil diversity and plasticity in tumour progression and therapy. *Nature Reviews Cancer*, 20(9), 485–503. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-0281-y>
- Janecka-Widła, A., Majchrzyk, K., Mucha-Małecka, A., Słonina, D., & Biesaga, B. (2022). Prognostic potential of Akt, pAkt(Ser473) and pAkt(Thr308) immunoreactivity in relation to HPV prevalence in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Pathology Research and Practice*, 229, 153684. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2021.153684>
- Jiang, Q., Xiao, J., Hsieh, Y. C., Kumar, N. L., Han, L., Zou, Y., & Li, H. (2024). The Role of the PI3K/Akt/mTOR Axis in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Biomedicines*, 12(7), 1610. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12071610>
- Jin, W., Yin, H., Li, H., Yu, X. J., Xu, H. X., & Liu, L. (2021). Neutrophil extracellular DNA traps promote pancreatic cancer cells migration and invasion by activating EGFR/ERK pathway. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 25(12), 5443–5456. <https://doi.org/10.1111/jcmm.16555>
- Johnson, D. E., Burtness, B., Leemans, C. R., Lui, V. W. Y., Bauman, J. E., & Grandis, J. R. (2020). Head and neck squamous cell carcinoma. *Nature Reviews. Disease Primers*, 6(1), 92. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00224-3>
- Johnson, D. E., O’Keefe, R. A., & Grandis, J. R. (2018). Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 15(4), 234–248. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2018.8>
- Jones, J. T., Akita, R. W., & Sliwkowski, M. X. (1999). Binding specificities and affinities of egf domains for ErbB receptors. *FEBS Letters*, 447(2–3), 227–231. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00283-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00283-5)
- Jubelin, C., Muñoz-Garcia, J., Griscom, L., Cochonneau, D., Ollivier, E., Heymann, M. F., Vallette, F. M., Oliver, L., & Heymann, D. (2022). Three-dimensional in vitro culture models in oncology research. *Cell and Bioscience*, 12(1), 155. <https://doi.org/10.1186/s13578-022-00887-3>
- Junger, W. G. (2008). Purinergic regulation of neutrophil chemotaxis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(16), 2528–2540. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8095-1>
- Junttila, M. R., Ala-Aho, R., Jokilehto, T., Peltonen, J., Kallajoki, M., Grenman, R., Jaakkola, P., Westermarck, J., & Kähäri, V. M. (2007). p38 $\alpha$  and p38 $\delta$  mitogen-activated protein kinase isoforms regulate invasion and growth of head and neck squamous carcinoma cells. *Oncogene*, 26(36), 5267–5279. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210332>
- Kapałczyńska, M., Kolenda, T., Przybyła, W., Zajączkowska, M., Teresiak, A., Filas, V., Ibbs, M., Bliźniak, R., Łuczewski, Ł., & Lamperska, K. (2018). 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science*, 14(4), 910–919. <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.63743>
- Kash, N., Lee, M. A., Kollipara, R., Downing, C., Guidry, J., & Tyring, S. K. (2015). Safety and Efficacy Data on Vaccines and Immunization to Human Papillomavirus. *Journal of Clinical Medicine*, 4(4), 614–633. <https://doi.org/10.3390/jcm4040614>
- Kashofer, K., Winter, E., Halbwedl, I., Thueringer, A., Kreiner, M., Sauer, S., & Regauer, S. (2017). HPV-negative penile squamous cell carcinoma: disruptive mutations in the TP53 gene are common. *Modern Pathology*, 30(7), 1013–1020. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2017.26>
- Kasuga, J., Kawahara, T., Takamoto, D., Fukui, S., Tokita, T., Tadenuma, T., Narahara, M., Fusayasu, S., Terao, H., Izumi, K., Ito, H., Hattori, Y., Teranishi, J. I., Sasaki, T., Makiyama, K., Miyoshi, Y., Yao, M., Yumura, Y., Miyamoto, H., & Uemura, H. (2016). Increased neutrophil-to-lymphocyte ratio is associated with disease-specific mortality in patients with penile cancer.

- BMC Cancer*, 16, 396. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2443-6>
- Kidd, L. C., Chaing, S., Chipollini, J., Giuliano, A. R., Spiess, P. E., & Sharma, P. (2017). Relationship between human papillomavirus and penile cancer - implications for prevention and treatment. *Translational Andrology and Urology*, 6(5), 791–802. <https://doi.org/10.21037/tau.2017.06.27>
- Killock, D. (2019). CTCs “piggyback” off neutrophils. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 16(4), 208. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0188-2>
- Kim, D., & Haynes, C. L. (2012). Neutrophil chemotaxis within a competing gradient of chemoattractants. *Analytical Chemistry*, 84(14), 6070–6078. <https://doi.org/10.1021/ac3009548>
- Kim, T. J., Lee, J. W., Song, S. Y., Choi, J. J., Choi, C. H., Kim, B. G., Lee, J. H., & Bae, D. S. (2006). Increased expression of pAKT is associated with radiation resistance in cervical cancer. *British Journal of Cancer*, 94(11), 1678–1682. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603180>
- Knerr-Rupp, K. (2017). *Untersuchung der Rolle des Serin-Protease-Inhibitors SerpinB3 in der zervikalen Karzinogenese unter Zuhilfenahme des 3D-Zellkulturmodells*. Saarländische Universitäts-und Landesbibliothek.
- Kuasne, H., Do Canto, L. M., Aagaard, M. M., Muñoz, J. J. M., De Jamblinne, C., Marchi, F. A., Scapulatempo-Neto, C., Faria, E. F., Lopes, A., Carréno, S., & Rogatto, S. R. (2021). Penile Cancer-Derived Cells Molecularly Characterized as Models to Guide Targeted Therapies. *Cells*, 10(4), 814. <https://doi.org/10.3390/cells10040814>
- Kumar, R., Iden, M., Tsaih, S. W., Schmidt, R., Ojesina, A. I., & Rader, J. S. (2024). Deciphering the divergent transcriptomic landscapes of cervical cancer cells grown in 3D and 2D cell culture systems. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 12, 1413882. <https://doi.org/10.3389/fcell.2024.1413882>
- Laurent-Puig, P., Lievre, A., & Blons, H. (2009). Mutations and Response to Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors. *Clinical Cancer Research*, 15(4), 1133–1139. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0905>
- Lavens, N., Gupta, R., & Wood, L. A. (2010). EGFR overexpression in squamous cell carcinoma of the penis. *Current Oncology*, 17(1), 4–6. <https://doi.org/10.3747/co.v17i1.471>
- Lavoie, H., Gagnon, J., & Therrien, M. (2020). ERK signalling: a master regulator of cell behaviour, life and fate. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(10), 607–632. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0255-7>
- Leelahavanichkul, K., Amornphimoltham, P., Molinolo, A. A., Basile, J. R., Koontongkaew, S., & Gutkind, J. S. (2014). A role for p38 MAPK in head and neck cancer cell growth and tumor-induced angiogenesis and lymphangiogenesis. *Molecular Oncology*, 8(1), 105–118. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2013.10.003>
- Leitlinienprogramm Onkologie. (2020). S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Peniskarzinoms, Langversion 1.0. *Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF, AWMF Registernummer: 043-042OL*, 1–110. <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/peniskarzinom/>
- Leung, T. W., Liu, S. S., Leung, R. C., Chu, M. M., Cheung, A. N., & Ngan, H. Y. (2015). HPV 16 E2 Binding Sites 1 and 2 Become More Methylated Than E2 Binding Site 4 During Cervical Carcinogenesis. *Journal of Medical Virology*, 87(6), 1022–1033. <https://doi.org/10.1002/jmv.24129>
- Levine, A. J. (1997). p53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. *Cell*, 88(3), 323–331. <https://doi.org/10.1016/s0092-86742981871-1>
- Lewis, T. S., Shapiro, P. S., & Ahn, N. G. (1998). Signal Transduction through MAP Kinase

- Cascades. *Advances in Cancer Research*, 74, 49–139. [https://doi.org/10.1016/s0065-230x\(08\)60765-4](https://doi.org/10.1016/s0065-230x(08)60765-4)
- Li, A., Gu, Y., Li, X., Sun, H., Zha, H., Xie, J., Zhao, J., Huang, M., Chen, L., Peng, Q., Zhang, Y., Weng, Y., & Zhou, L. (2018). S100A6 promotes the proliferation and migration of cervical cancer cells via the PI3k/Akt signaling pathway. *Oncology Letters*, 15(4), 5685–5693. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8018>
- Li, M., Beard, P., Estes, P. A., Lyon, M. K., & Garcea, R. L. (1998). Intercapsomeric Disulfide Bonds in Papillomavirus Assembly and Disassembly. *Journal of Virology*, 72(3), 2160–2167. <https://doi.org/10.1128/jvi.72.3.2160-2167.1998>
- Li, Q., Tie, Y., Alu, A., Ma, X., & Shi, H. (2023). Targeted therapy for head and neck cancer: signaling pathways and clinical studies. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 31. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01297-0>
- Lim, L., Hu, M. H., Fan, D., Tu, H. F., Tsai, Y. C., Cheng, M., Wang, S., Chang, C. L., Wu, T. C., & Hung, C. F. (2024). STAT1-Deficient HPV E6/E7-Associated Cancers Maintain Host Immunocompetency against Therapeutic Intervention. *Vaccines*, 12(4), 430. <https://doi.org/10.3390/vaccines12040430>
- Liu, Y., Gu, Y., Han, Y., Zhang, Q., Jiang, Z., Zhang, X., Huang, B., Xu, X., Zheng, J., & Cao, X. (2016). Tumor Exosomal RNAs Promote Lung Pre-metastatic Niche Formation by Activating Alveolar Epithelial TLR3 to Recruit Neutrophils. *Cancer Cell*, 30(2), 243–256. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.06.021>
- Lui, V. W. Y., Hedberg, M. L., Li, H., Vangara, B. S., Pendleton, K., Zeng, Y., Lu, Y., Zhang, Q., Du, Y., Gilbert, B., Freilino, M., Sauerwein, S., Peyser, N., Xiao, D., Diergaarde, B., Wang, L., Chiosea, S., Seethala, R., Johnson, J. T., ... Grandis, J. R. (2013). Frequent mutation of the PI3K pathway in head and neck cancer defines predictive biomarkers. *Cancer Discovery*, 3(7), 761–769. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0103>
- Lüllmann, H., Mohr, K., Hein, L., & Wehling, M. (2016). *Pharmakologie und Toxikologie: Arzneimittelwirkungen verstehen - Medikamente gezielt einsetzen* (18. Aufl.). Georg Thieme Verlag. <https://eref.thieme.de/10.1055/b-004-129674>
- Luttmann, W., Bratke, K., Küpper, M., & Myrtek, D. (2014). *Der Experimentator: Immunologie* (4. Aufl.). Springer Spektrum. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-642-41899-0>
- Ma, C., Wang, J., Fan, L., & Guo, Y. (2017). Inhibition of CD147 expression promotes chemosensitivity in HNSCC cells by deactivating MAPK/ERK signaling pathway. *Experimental and Molecular Pathology*, 102(1), 59–64. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2017.01.002>
- Mantovani, A., Cassatella, M. A., Costantini, C., & Jaillon, S. (2011). Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*, 11(8), 519–531. <https://doi.org/10.1038/nri3024>
- Martínez-Limón, A., Joaquin, M., Caballero, M., Posas, F., & de Nadal, E. (2020). The p38 Pathway: From Biology to Cancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6), 1913. <https://doi.org/10.3390/ijms21061913>
- Martinez-Zapien, D., Ruiz, F. X., Poirson, J., Mitschler, A., Ramirez, J., Forster, A., Cousido-Siah, A., Masson, M., Vande Pol, S., Podjarny, A., Travé, G., & Zanier, K. (2016). Structure of the E6/E6AP/p53 complex required for HPV-mediated degradation of p53. *Nature*, 529(7587), 541–545. <https://doi.org/10.1038/nature16481>
- Martins-Cardoso, K., Almeida, V. H., Bagri, K. M., Rossi, M. I. D., Mermelstein, C. S., König, S., & Monteiro, R. Q. (2020). Neutrophil Extracellular Traps (NETs) Promote Pro-Metastatic Phenotype in Human Breast Cancer Cells through Epithelial–Mesenchymal Transition. *Cancers*, 12(6), 1542. <https://doi.org/10.3390/cancers12061542>

- Mascarella, M. A., Mannard, E., Silva, S. D., & Zeitouni, A. (2017). Neutrophil-to-lymphocyte ratio in head and neck cancer prognosis: A systematic review and meta-analysis. *Head & Neck*, *40*(5), 1091–1100. <https://doi.org/10.1002/hed.25075>
- Massagué, J. (2008). TGF $\beta$  in Cancer. *Cell*, *134*(2), 215–230. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.001>
- McBride, A. A., & Warburton, A. (2017). The role of integration in oncogenic progression of HPV-associated cancers. *PLoS Pathogens*, *13*(4), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006211>
- McCubrey, J. A., Steelman, L. S., Chappell, W. H., Abrams, S. L., Wong, E. W. T., Chang, F., Lehmann, B., Terrian, D. M., Milella, M., Tafuri, A., Stivala, F., Libra, M., Basecke, J., Evangelisti, C., Martelli, A. M., & Franklin, R. A. (2007). Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1773*(8), 1263–1284. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.10.001>
- Melissaridou, S., Wiechec, E., Magan, M., Jain, M. V., Chung, M. K., Farnebo, L., & Roberg, K. (2019). The effect of 2D and 3D cell cultures on treatment response, EMT profile and stem cell features in head and neck cancer. *Cancer Cell International*, *19*, 16. <https://doi.org/10.1186/s12935-019-0733-1>
- Metcalf, D. (1988). Colony stimulating factors and hemopoiesis. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore*, *17*(2), 166–170.
- Misra, S., Chaturvedi, A., & Misra, N. C. (2004). Penile carcinoma: a challenge for the developing world. *The Lancet Oncology*, *5*(4), 240–247. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(04\)01427-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(04)01427-5)
- Mo, M., Li, Y., & Hu, X. (2021). Serum CXCL5 level is associated with tumor progression in penile cancer. *Bioscience Reports*, *41*(1), BSR20202133. <https://doi.org/10.1042/BSR20202133>
- Mo, M., Tong, S., Huang, W., Cai, Y., Zu, X., & Hu, X. (2020). High serum CCL20 is associated with tumor progression in penile cancer. *Journal of Cancer*, *11*(23), 6812–6822. <https://doi.org/10.7150/jca.48939>
- Mo, M., Tong, S., Li, T., Zu, X., & Hu, X. (2020). Serum CXCL13 level is Associated with Tumor Progression and Unfavorable Prognosis in Penile Cancer. *OncoTargets and Therapy*, *13*, 8757–8769. <https://doi.org/10.2147/OTT.S263980>
- Mo, M., Tong, S., Yin, H., Jin, Z., Zu, X., & Hu, X. (2020). SHCBP1 regulates STAT3/c-Myc signaling activation to promote tumor progression in penile cancer. *American Journal of Cancer Research*, *10*(10), 3138–3156.
- Mohr, T., Zwick, A., Hans, M. C., Bley, I. A., Braun, F. L., Khalmurzaev, O., Matveev, V. B., Loertzer, P., Pryalukhin, A., Hartmann, A., Geppert, C. I., Loertzer, H., Wunderlich, H., Naumann, C. M., Kalthoff, H., Junker, K., Smola, S., & Lohse, S. (2022). The prominent role of the S100A8/S100A9-CD147 axis in the progression of penile cancer. *Frontiers in Oncology*, *12*(October), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.891511>
- Montes Cardona, C. E., & García-Perdomo, H. A. (2017). Incidence of penile cancer worldwide: systematic review and meta-analysis. *Revista Panamericana de Salud Publica*, *41*, 1–10. <https://doi.org/10.26633/rpsp.2017.117>
- Moody, C. A., & Laimins, L. A. (2010). Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature Reviews Cancer*, *10*(8), 550–560. <https://doi.org/10.1038/nrc2886>
- Moon, S. Y., Kim, K. D., Yoo, J., Lee, J. H., & Hwangbo, C. (2021). Phytochemicals Targeting JAK–STAT Pathways in Inflammatory Bowel Disease: Insights from Animal Models. *Molecules*, *26*(9), 2824. <https://doi.org/10.3390/molecules26092824>
- Morgan, E. L., & Macdonald, A. (2019). Autocrine STAT3 activation in HPV positive cervical cancer through a virus-driven Rac1—NF $\kappa$ B—IL-6 signalling axis. *PLoS Pathogens*, *15*(6), e1007835.

- <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007835>
- Morgan, E. L., & Macdonald, A. (2020). Manipulation of JAK/STAT Signalling by High-Risk HPVs: Potential Therapeutic Targets for HPV-Associated Malignancies. *Viruses*, *12*(9), 977. <https://doi.org/10.3390/v12090977>
- Naumann, C. M., Sperveslage, J., Hamann, M. F., Leuschner, I., Weder, L., Al-Najar, A. A., Lemke, J., Sipos, B., Jünemann, K. P., & Kalthoff, H. (2012). Establishment and Characterization of Primary Cell Lines of Squamous Cell Carcinoma of the Penis and its Metastasis. *The Journal of Urology*, *187*(6), 2236–2242. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2012.01.035>
- Nebreda, A. R., & Porras, A. (2000). p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends in Biochemical Sciences*, *25*(6), 257–260. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)01595-4](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01595-4)
- Nyati, M. K., Morgan, M. A., Feng, F. Y., & Lawrence, T. S. (2006). Integration of EGFR inhibitors with radiochemotherapy. *Nature Reviews Cancer*, *6*(11), 876–885. <https://doi.org/10.1038/nrc1953>
- Olesen, T. B., Sand, F. L., Rasmussen, C. L., Albieri, V., Toft, B. G., Norrild, B., Munk, C., & Kjær, S. K. (2019). Prevalence of human papillomavirus DNA and p16 INK4a in penile cancer and penile intraepithelial neoplasia: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Oncology*, *20*(1), 145–158. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30682-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30682-X)
- Pagliari, L. C., Williams, D. L., Daliani, D., Williams, M. B., Osai, W., Kincaid, M., Wen, S., Thall, P. F., & Pettaway, C. A. (2010). Neoadjuvant Paclitaxel, Ifosfamide, and Cisplatin Chemotherapy for Metastatic Penile Cancer: A Phase II Study. *Journal of Clinical Oncology*, *28*(24), 3851–3857. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.29.5477>
- Park, J., W., W. R., Amoozgar, Z., Maiorino, L., Fein, M. R., Jorns, J., Schott, A. F., Kinugasa-Katayama, Y., Lee, Y., Won, N. H., Nakasone, E. S., Hearn, S. A., Küttner, V., Qiu, J., Almeida, A. S., Perurena, N., Kessenbrock, K., Goldberg, M. S., & Egeblad, M. (2016). Cancer cells induce metastasis-supporting neutrophil extracellular DNA traps. *Science Translational Medicine*, *8*(361), 361ra138. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aag1711>
- Pearson, G., Robinson, F., Gibson, T. B., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K., & Cobb, M. H. (2001). Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions. *Endocrine Reviews*, *22*(2), 153–183. <https://doi.org/10.1210/er.22.2.153>
- Phan, T. G., & Croucher, P. I. (2020). The dormant cancer cell life cycle. *Nature Reviews Cancer*, *20*(7), 398–411. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-0263-0>
- Pizzocaro, G., Nicolai, N., & Milani, A. (2009). Taxanes in Combination with Cisplatin and Fluorouracil for Advanced Penile Cancer: Preliminary Results. *European Association of Urology*, *55*(3), 546–551. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2008.07.014>
- Protzel, C., Alcaraz, A., Horenblas, S., Pizzocaro, G., Zlotta, A., & Hakenberg, O. W. (2009). Lymphadenectomy in the Surgical Management of Penile Cancer. *European Association of Urology*, *55*(5), 1075–1088. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2009.02.021>
- Protzel, C., & Hakenberg, O. W. (2009). Chemotherapy in Patients with Penile Carcinoma. *Urologia Internationalis*, *82*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1159/000176016>
- Pyeon, D., Pearce, S. M., Lank, S. M., Ahlquist, P., & Lambert, P. F. (2009). Establishment of Human Papillomavirus Infection Requires Cell Cycle Progression. *PLoS Pathogens*, *5*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000318>
- Qiu, J., Hu, F., Shao, T., Guo, Y., Dai, Z., Nie, H., Olasunkanmi, O. I., Qi, Y., Chen, Y., Lin, L., Zhao, W., Zhong, Z., & Wang, Y. (2021). Blocking of EGFR Signaling Is a Latent Strategy for the Improvement of Prognosis of HPV-Induced Cancer. *Frontiers in Oncology*, *11*, 633794. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.633794>

- Rajalingam, K., Schreck, R., Rapp, U. R., & Albert, Š. (2007). Ras oncogenes and their downstream targets. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1773(8), 1177–1195. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2007.01.012>
- Ranganathan, A. C., Zhang, L., Adam, A. P., & Aguirre-Ghiso, J. A. (2006). Functional Coupling of p38-Induced Up-regulation of BiP and Activation of RNA-Dependent Protein Kinase-Like Endoplasmic Reticulum Kinase to Drug Resistance of Dormant Carcinoma Cells. *Cancer Research*, 66(3), 1702–1711. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3092>
- Ren, J., He, J., Zhang, H., Xia, Y., Hu, Z., Loughran, P., Billiar, T., Huang, H., & Tsung, A. (2021). Platelet TLR4-ERK5 axis facilitates NET-mediated capturing of circulating tumor cells and distant metastasis after surgical stress. *Cancer Research*, 81(9), 2373–2385. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-3222>
- Ribera-Cortada, I., Guerrero-Pineda, J., Trias, I., Veloza, L., Garcia, A., Marimon, L., Diaz-mercedes, S., Alamo, J. R., Rodrigo-calvo, M. T., Vega, N., Del Campo, R. L., Parra-medina, R., Ajami, T., Martínez, A., Reig, O., Ribal, M. J., Corral-molina, J. M., Jares, P., Ordi, J., & Rakislova, N. (2022). Pathogenesis of Penile Squamous Cell Carcinoma: Molecular Update and Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijms23010251>
- Richards, R. M., Lowy, D. R., Schiller, J. T., & Day, P. M. (2006). Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(5), 1522–1527. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508815103>
- Ringerike, T., Blystad, F. D., Levy, F. O., Madshus, I. H., & Stang, E. (2002). Cholesterol is important in control of EGF receptor kinase activity but EGF receptors are not concentrated in caveolae. *Journal of Cell Science*, 115(6), 1331–1340. <https://doi.org/10.1242/jcs.115.6.1331>
- Robert Koch-Institut. (2018). Wissenschaftliche Begründung für die Empfehlung der HPV-Impfung für Jungen im Alter von 9 bis 14 Jahren. *Epidemiologisches Bulletin*, 26, 233–254. [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2018/Ausgaben/26\\_18.html](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2018/Ausgaben/26_18.html)
- Roepstorff, K., Thomsen, P., Sandvig, K., & Van Deurs, B. (2002). Sequestration of Epidermal Growth Factor Receptors in Non-caveolar Lipid Rafts Inhibits Ligand Binding. *Journal of Biological Chemistry*, 277(21), 18954–18960. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201422200>
- Rokavec, M., Öner, M. G., Li, H., Jackstadt, R., Jiang, L., Lodygin, D., Kaller, M., Horst, D., Ziegler, P. K., Schwitalla, S., Slotta-huspenina, J., Bader, F. G., Greten, F. R., & Hermeking, H. (2014). IL-6R/STAT3/miR-34a feedback loop promotes EMT-mediated colorectal cancer invasion and metastasis. *Journal of Clinical Investigation*, 124(4), 1853–1867. <https://doi.org/10.1172/JCI73531DS1>
- Romero, F. R., Richter Pereira Dos Santos Romero, K., De Mattos, M. A. E., Camargo Garcia, C. R., De Carvalho Fernandes, R., & Cardenuto Perez, M. D. (2005). Sexual function after partial penectomy for penile cancer. *Journal of Urology*, 66(6), 1292–1295. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2005.06.081>
- Rubenich, D. S., Omizzollo, N., Szczepański, M. J., Reichert, T. E., Whiteside, T. L., Ludwig, N., & Braganhol, E. (2021). Small extracellular vesicle-mediated bidirectional crosstalk between neutrophils and tumor cells. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 61, 16–26. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2021.08.002>
- Rubin, M. A., Kleter, B., Zhou, M., Ayala, G., Cubilla, A. L., Quint, W. G. V., & Pirog, E. C. (2001). Detection and Typing of Human Papillomavirus DNA in Penile Carcinoma: Evidence for Multiple Independent Pathways of Penile Carcinogenesis. *American Journal of Pathology*, 159(4), 1211–1218. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)62506-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62506-0)
- Sabeena, S., Bhat, P., Kamath, V., & Arunkumar, G. (2017). Possible non-sexual modes of

- transmission of human papilloma virus. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 43(3), 429–435. <https://doi.org/10.1111/jog.13248>
- Sadeghi, R., Gholami, H., Zakavi, S. R., Kakhki, V. R. D., & Horenblas, S. (2012). Accuracy of 18F-FDG PET/CT for Diagnosing Inguinal Lymph Node Involvement in Penile Squamous Cell Carcinoma. *Clinical Nuclear Medicine*, 37(5), 436–441. <https://doi.org/10.1097/rlu.0b013e318238f6ea>
- Samuels, Y., Wang, Z., Bardelli, A., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., Yan, H., Gazdar, A., Powell, S. M., Riggins, G. J., Willson, J. K. V., Markowitz, S., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., & Velculescu, V. E. (2004). High Frequency of Mutations of the PIK3CA Gene in Human Cancers. *Science*, 304(5670), 554. <https://doi.org/10.1126/science.1096502>
- Saputra, H. M., Hidayatullah, F., Kloping, Y. P., Renaldo, J., Chung, E., & Hakim, L. (2022). Prognostic value of neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) in penile cancer: A systematic review and meta-analysis. *Annals of Medicine and Surgery*, 81, 104335. <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2022.104335>
- Sastre-Garau, X., & Harlé, A. (2020). Pathology of HPV-Associated Head and Neck Carcinomas: Recent Data and Perspectives for the Development of Specific Tumor Markers. *Frontiers in Oncology*, 10, 528957. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.528957>
- Satsuka, A., Mehta, K., & Laimins, L. (2015). p38MAPK and MK2 Pathways Are Important for the Differentiation-Dependent Human Papillomavirus Life Cycle. *Journal of Virology*, 89(3), 1919–1924. <https://doi.org/10.1128/jvi.02712-14>
- Sawant, K. V., Poluri, K. M., Dutta, A. K., Sepuru, K. M., Troshkina, A., Garofalo, R. P., & Rajarathnam, K. (2016). Chemokine CXCL1 mediated neutrophil recruitment: Role of glycosaminoglycan interactions. *Scientific Reports*, 6, 33123. <https://doi.org/10.1038/srep33123>
- Schewe, D. M., & Aguirre-Ghiso, J. A. (2008). ATF6 $\alpha$ -Rheb-mTOR signaling promotes survival of dormant tumor cells in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(30), 10519–10524. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800939105>
- Schmitz, S. (2020). *Der Experimentator: Zellkultur* (4. Aufl.). Springer Spektrum. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-662-58951-9>
- Schmitz, S., & Desel, C. (2018). *Der Experimentator: Zellbiologie*. Springer Spektrum. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-662-56111-9>
- Sedigh, O., Falcone, M., Ceruti, C., Timpano, M., Preto, M., Oderda, M., Kuehhas, F., Sibona, M., Gillo, A., Gontero, P., Rolle, L., & Frea, B. (2015). Sexual function after surgical treatment for penile cancer: Which organ-sparing approach gives the best results? *Canadian Urological Association Journal*, 9(7–8), E423–E427. <https://doi.org/10.5489/cuaj.2801>
- SenGupta, S., Hein, L. E., & Parent, C. A. (2021). The Recruitment of Neutrophils to the Tumor Microenvironment Is Regulated by Multiple Mediators. *Frontiers in Immunology*, 12, 734188. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.734188>
- SenGupta, S., Subramanian, B. C., & Parent, C. A. (2019). Getting TANned: how the tumor microenvironment drives neutrophil recruitment. *Journal of Leukocyte Biology*, 105(3), 449–462. <https://doi.org/10.1002/JLB.3RI0718-282R>
- Shabbir, M., Muneer, A., Kalsi, J., Shukla, C. J., Zacharakis, E., Garaffa, G., Ralph, D., & Minhas, S. (2011). Glans Resurfacing for the Treatment of Carcinoma In Situ of the Penis: Surgical Technique and Outcomes. *European Association of Urology*, 59(1), 142–147. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2010.09.039>
- Shaul, M. E., & Fridlender, Z. G. (2019). Tumour-associated neutrophils in patients with cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 16(10), 601–620. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0222-4>

- Shi, S., Ma, H. Y., & Zhang, Z. G. (2021). Clinicopathological and prognostic value of STAT3/p-STAT3 in cervical cancer: A meta and bioinformatics analysis. *Pathology Research and Practice*, 227, 153624. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2021.153624>
- Shukla, S., Mahata, S., Shishodia, G., Pandey, A., Tyagi, A., Vishnoi, K., Basir, S. F., Das, B. C., & Bharti, A. C. (2013). Functional Regulatory Role of STAT3 in HPV16-Mediated Cervical Carcinogenesis. *PLoS ONE*, 8(7), e67849. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067849>
- Shukla, S., Shishodia, G., Mahata, S., Hedau, S., Pandey, A., Bhambhani, S., Batra, S., Basir, S. F., Das, B. C., & Bharti, A. C. (2010). Aberrant expression and constitutive activation of STAT3 in cervical carcinogenesis: implications in high-risk human papillomavirus infection. *Molecular Cancer*, 9, 282. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-282>
- Sievert, K. D., Dräger, D. L., Köhn, F. M., Milerski, S., Protzel, C., & Hakenberg, O. W. (2018). Peniskarzinom: Diagnose und Staging. *Der Urologe. Ausg. A*, 57(4), 418–422. <https://doi.org/10.1007/s00120-018-0602-x>
- Silvestre-Roig, C., Fridlender, Z. G., Glogauer, M., & Scapini, P. (2019). Neutrophil Diversity in Health and Disease. *Trends in Immunology*, 40(7), 565–583. <https://doi.org/10.1016/j.it.2019.04.012>
- Simons, K., & Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387(6633), 569–572. <https://doi.org/10.1038/42408>
- Sosa, M. S., Bragado, P., & Aguirre-Ghiso, J. A. (2014). Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. *Nature Reviews Cancer*, 14(9), 611–622. <https://doi.org/10.1038/nrc3793>
- Spicer, J. D., McDonald, B., Cools-Lartigue, J. J., Chow, S. C., Giannias, B., Kubes, P., & Ferri, L. E. (2012). Neutrophils Promote Liver Metastasis via Mac-1–Mediated Interactions. *Cancer Research*, 72(16), 3919–3927. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-2393>
- Spiegel, A., Brooks, M. W., Houshyar, S., Reinhardt, F., Ardolino, M., Fessler, E., Chen, M. B., Krall, J. A., DeCock, J., Zervantonakis, I. K., Iannello, A., Iwamoto, Y., Cortez-Retamozo, V., Kamm, R. D., Pittet, M. J., Raulet, D. H., & Weinberg, R. (2016). Neutrophils Suppress Intraluminal NK Cell-Mediated Tumor Cell Clearance and Enhance Extravasation of Disseminated Carcinoma Cells. *Cancer Discovery*, 6(6), 630–649. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-1157>
- Spieß, P. E., Dhillon, J., Baumgarten, A. S., Johnstone, P. A., & Giuliano, A. R. (2016). Pathophysiological Basis of Human Papillomavirus in Penile Cancer: Key to Prevention and Delivery of More Effective Therapies. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 66(6), 481–495. <https://doi.org/10.3322/caac.21354>
- Stankiewicz, E., Prowse, D. M., Ktori, E., Cuzick, J., Ambrosine, L., Zhang, X., Kudahetti, S., Watkin, N., Corbishley, C., & Berney, D. M. (2011). The retinoblastoma protein/p16 INK4A pathway but not p53 is disrupted by human papillomavirus in penile squamous cell carcinoma. *Histopathology*, 58(3), 433–439. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2011.03762.x>
- Stankiewicz, E., Prowse, D. M., Ng, M., Cuzick, J., Mesher, D., Hiscock, F., Lu, Y., Watkin, N., Corbishley, C., Lam, W., & Berney, D. M. (2011). Alternative HER/PTEN/Akt Pathway Activation in HPV Positive and Negative Penile Carcinomas. *PLoS ONE*, 6(3), e17517. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017517>
- Stark, M. A., Huo, Y., Burcin, T. L., Morris, M. A., Olson, T. S., & Ley, K. (2005). Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity*, 22(3), 285–294. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.01.011>
- Stites, E. C., & Ravichandran, K. S. (2009). A Systems Perspective of Ras Signaling in Cancer. *Clinical Cancer Research*, 15(5), 1510–1513. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-2753>
- Straight, S. W., Herman, B., & McCance, D. J. (1995). The E5 Oncoprotein of Human Papillomavirus

- Type 16 Inhibits the Acidification of Endosomes in Human Keratinocytes. *Journal of Virology*, 69(5), 3185–3192. <https://doi.org/10.1128/jvi.69.5.3185-3192.1995>
- Strell, C., Lang, K., Niggemann, B., Zaenker, K. S., & Entschladen, F. (2007). Surface molecules regulating rolling and adhesion to endothelium of neutrophil granulocytes and MDA-MB-468 breast carcinoma cells and their interaction. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(24), 3306–3316. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7402-6>
- Strell, C., Lang, K., Niggemann, B., Zaenker, K. S., & Entschladen, F. (2010). Neutrophil granulocytes promote the migratory activity of MDA-MB-468 human breast carcinoma cells via ICAM-1. *Experimental Cell Research*, 316(1), 138–148. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2009.09.003>
- Su, Y. C., Lee, W. C., Wang, C. C., Yeh, S. A., Chen, W. H., & Chen, P. J. (2022). Targeting PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway as a Radiosensitization in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(24), 15749. <https://doi.org/10.3390/ijms232415749>
- Suzuki, S., & Ishikawa, K. (2014). Combined inhibition of EMMPRIN and epidermal growth factor receptor prevents the growth and migration of head and neck squamous cell carcinoma cells. *International Journal of Oncology*, 44(3), 912–917. <https://doi.org/10.3892/ijo.2013.2238>
- Szczerba, B. M., Castro-Giner, F., Vetter, M., Krol, I., Gkoutela, S., Landin, J., Scheidmann, M. C., Donato, C., Scherrer, R., Singer, J., Beisel, C., Kurzeder, C., Heinzelmann-Schwarz, V., Rochlitz, C., Weber, W. P., Beerenwinkel, N., & Aceto, N. (2019). Neutrophils escort circulating tumour cells to enable cell cycle progression. *Nature*, 566(7745), 553–557. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0915-y>
- Takemoto, S., Ushijima, K., Kawano, K., Yamaguchi, T., Terada, A., Fujiyoshi, N., Nishio, S., Tsuda, N., Ijichi, M., Kakuma, T., Kage, M., Hori, D., & Kamura, T. (2009). Expression of activated signal transducer and activator of transcription-3 predicts poor prognosis in cervical squamous-cell carcinoma. *British Journal of Cancer*, 101(6), 967–972. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605212>
- Takenaka, Y., Oya, R., Takemoto, N., & Inohara, H. (2022). Neutrophil-to-lymphocyte ratio as a prognostic marker for head and neck squamous cell carcinoma treated with immune checkpoint inhibitors: Meta-analysis. *Head & Neck*, 44(5), 1237–1245. <https://doi.org/10.1002/hed.26997>
- Tang, D. H., Yan, S., Ottenhof, S. R., Draeger, D., Baumgarten, A. S., Chipollini, J., Protzel, C., Zhu, Y., Ye, D.-W., Hakenberg, O. W., Horenblas, S., Watkin, N. A., & Spiess, P. E. (2017). Glansctomy as Primary Management of Penile Squamous Cell Carcinoma: An International Study Collaboration. *Urology*, 109, 140–144. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2017.08.004>
- Tang, D. H., Yan, S., Ottenhof, S. R., Draeger, D., Baumgarten, A. S., Chipollini, J., Protzel, C., Zhu, Y., Ye, D.-W., Hakenberg, O. W., Horenblas, S., Watkin, N. A., & Spiess, P. E. (2018). Laser ablation as monotherapy for penile squamous cell carcinoma: A multi-center cohort analysis. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 36(4), 147–152. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2017.09.028>
- Tang, Y., Kesavan, P., Nakada, M. T., & Yan, L. (2004). Tumor-stroma interaction: positive feedback regulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) expression and matrix metalloproteinase-dependent generation of soluble EMMPRIN. *Molecular Cancer Research*, 2(2), 73–80.
- Tang, Y., Nakada, M. T., Rafferty, P., Laraio, J., McCabe, F. L., Millar, H., Cunningham, M., Snyder, L. A., Bugelski, P., & Yan, L. (2006). Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Expression by EMMPRIN via the PI3K-Akt Signaling Pathway. *Molecular Cancer Research*, 4(6), 371–377. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-06-0042>
- Teijeira, Á., Garasa, S., Gato, M., Alfaro, C., Migueliz, I., Cirella, A., de Andrea, C., Ochoa, M. C.,

- Otano, I., Etxeberria, I., Andueza, M. P., Nieto, C. P., Resano, L., Azpilikueta, A., Allegretti, M., de Pizzol, M., Ponz-Sarvisé, M., Rouzaut, A., Sanmamed, M. F., ... Melero, I. (2020). CXCR1 and CXCR2 Chemokine Receptor Agonists Produced by Tumors Induce Neutrophil Extracellular Traps that Interfere with Immune Cytotoxicity. *Immunity*, 52(5), 856-871.e8. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.03.001>
- Templeton, A. J., McNamara, M. G., Šeruga, B., Vera-Badillo, F. E., Aneja, P., Ocaña, A., Leibowitz-Amit, R., Sonpavde, G., Knox, J. J., Tran, B., Tannock, I. F., & Amir, E. (2014). Prognostic Role of Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Solid Tumors: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of the National Cancer Institute*, 106(6). <https://doi.org/10.1093/jnci/dju124>
- Théry, C., Ostrowski, M., & Segura, E. (2009). Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 9(8), 581–593. <https://doi.org/10.1038/nri2567>
- Thierry, F., & Yaniv, M. (1987). The BPV1-E2 trans-acting protein can be either an activator or a repressor of the HPV18 regulatory region. *The EMBO Journal*, 6(11), 3391–3397. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1987.tb02662.x>
- Thomas, A., Reetz, S., Stenzel, P., Tagscherer, K., Roth, W., Schindeldecker, M., Michaelis, M., Rothweiler, F., Cinatl, J., Cinatl, J., Dotzauer, R., Vakhrusheva, O., Albersen, M., Macher-Goeppinger, S., Haferkamp, A., Juengel, E., Neisius, A., & Tsauro, I. (2021). Assessment of PI3K/mTOR/AKT Pathway Elements to Serve as Biomarkers and Therapeutic Targets in Penile Cancer. *Cancers*, 13(10), 2323. <https://doi.org/10.3390/cancers13102323>
- Trinchieri, G. (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*, 3(2), 133–146. <https://doi.org/10.1038/nri1001>
- Uphoff, C. C., & Drexler, H. G. (2013). Detection of Mycoplasma Contaminations. *Methods in Molecular Biology*, 946, 1–13. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-128-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-128-8_1)
- Uphoff, C. C., & Drexler, H. G. (2014). Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures. *Current Protocols in Molecular Biology*, 106, 28.4.1-28.4.14. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb2804s106>
- Veglia, F., Perego, M., & Gabrilovich, D. (2018). Myeloid-derived suppressor cells coming of age. *Nature Immunology*, 19(2), 108–119. <https://doi.org/10.1038/s41590-017-0022-x>
- Vogelgesang, M. (2017). *Die Rolle der neutrophilen Granulozyten und des IL-6 Transsignalings in der zervikalen Karzinogenese*. 1–118.
- Wagner, E. F., & Nebreda, Á. R. (2009). Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nature Reviews Cancer*, 9(8), 537–549. <https://doi.org/10.1038/nrc2694>
- Walch-Rückheim, B., Pahne-Zeppenfeld, J., Fischbach, J., Wickenhauser, C., Horn, L. C., Tharun, L., Büttner, R., Mallmann, P., Stern, P., Kim, Y. J., Bohle, R. M., Rübe, C., Ströder, R., Juhasz-Böss, I., Solomayer, E. F., & Smola, S. (2016). STAT3/IRF1 Pathway Activation Sensitizes Cervical Cancer Cells to Chemotherapeutic Drugs. *Cancer Research*, 76(13), 3872–3883. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-1306>
- Wang, H., Liu, C., Jin, K., Li, X., Zheng, J., & Wang, D. (2024). Research advances in signaling pathways related to the malignant progression of HSIL to invasive cervical cancer: A review. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 180, 117483. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.117483>
- Wang, N., Hou, M. S., Zhan, Y., Shen, X. B., & Xue, H. Y. (2018). MALAT1 promotes cisplatin resistance in cervical cancer by activating the PI3K/AKT pathway. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 22(22), 7653–7659. <https://doi.org/10.26355/eurrev-201811-16382>
- Wang, Y., Liu, F., Chen, L., Fang, C., Li, S., Yuan, S., Qian, X., Yin, Y., Yu, B., Fu, B., Zhang, X., & Li, Y. (2022). Neutrophil Extracellular Traps (NETs) Promote Non-Small Cell Lung Cancer Metastasis by Suppressing lncRNA MIR503HG to Activate the NF-κB/NLRP3 Inflammasome

- Pathway. *Frontiers in Immunology*, 13, 867516. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.867516>
- Wang, Z. (2017). ErbB Receptors and Cancer. *Methods in Molecular Biology*, 1652, 3–35. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7219-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7219-7_1)
- Waugh, D. J. J., & Wilson, C. (2008). The interleukin-8 pathway in cancer. *Clinical Cancer Research*, 14(21), 6735–6741. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4843>
- Waugh, M. G., Lawson, D., & Hsuan, J. J. (1999). Epidermal growth factor receptor activation is localized within low-buoyant density, non-caveolar membrane domains. *The Biochemical Journal*, 337, 591–597. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1220014/>
- Wee, P., & Wang, Z. (2017). Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. *Cancers*, 9(5), 52. <https://doi.org/10.3390/cancers9050052>
- Welin, A., Amirbeagi, F., Christenson, K., Björkman, L., Björnsdóttir, H., Forsman, H., Dahlgren, C., Karlsson, A., & Bylund, J. (2013). The Human Neutrophil Subsets Defined by the Presence or Absence of OLFM4 Both Transmigrate into Tissue In Vivo and Give Rise to Distinct NETs In Vitro. *PLoS ONE*, 8(7), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069575>
- Wellenstein, M. D., Coffelt, S. B., Duits, D. E. M., van Miltenburg, M. H., Slagter, M., de Rink, I., Henneman, L., Kas, S. M., Prekovic, S., Hau, C. S., Vrijland, K., Drenth, A. P., de Korte-Grimmerink, R., Schut, E., van der Heijden, I., Zwart, W., Wessels, L. F. A., Schumacher, T. N., Jonkers, J., & de Visser, K. E. (2019). Loss of p53 triggers Wnt-dependent systemic inflammation to drive breast cancer metastasis. *Nature*, 572(7770), 538–542. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1450-6>
- Wells, A. (1999). EGF receptor. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 31(6), 637–643. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(99\)00015-1](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(99)00015-1)
- White, E. A., Münger, K., & Howley, P. M. (2016). High-Risk Human Papillomavirus E7 Proteins Target PTPN14 for Degradation. *MBio*, 7(5), e01530-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.01530-16>
- Wilson, V. G., West, M., Woytek, K., & Rangasamy, D. (2002). Papillomavirus E1 Proteins: Form, Function, and Features. *Virus Genes*, 24(3), 275–290. <https://doi.org/10.1023/a:1015336817836>
- Wu, C. F., Andzinski, L., Kasnitz, N., Kröger, A., Klawonn, F., Lienenklaus, S., Weiss, S., & Jablonska, J. (2015). The lack of type I interferon induces neutrophil-mediated pre-metastatic niche formation in the mouse lung. *International Journal of Cancer*, 137(4), 837–847. <https://doi.org/10.1002/ijc.29444>
- Wu, L., Awaji, M., Saxena, S., Varney, M. L., Sharma, B., & Singh, R. K. (2020). IL-17–CXC Chemokine Receptor 2 Axis Facilitates Breast Cancer Progression by Up-Regulating Neutrophil Recruitment. *American Journal of Pathology*, 190(1), 222–233. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2019.09.016>
- Wu, Q. D., Wang, J. H., Condrón, C., Bouchier-Hayes, D., & Paul Redmond, H. (2001). Human neutrophils facilitate tumor cell transendothelial migration. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 280(4), C814–C822. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2001.280.4.c814>
- Xia, S., Zhao, Y., Yu, S., & Zhang, M. (2010). Activated PI3K/Akt/COX-2 Pathway Induces Resistance to Radiation in Human Cervical Cancer HeLa Cells. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 25(3), 317–323. <https://doi.org/10.1089/cbr.2009.0707>
- Xin, X., Zeng, X., Gu, H., Li, M., Tan, H., Jin, Z., Hua, T., Shi, R., & Wang, H. (2016). CD147/EMMPRIN overexpression and prognosis in cancer: A systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*, 6, 32804. <https://doi.org/10.1038/srep32804>
- Xiong, S., Dong, L., & Cheng, L. (2021). Neutrophils in cancer carcinogenesis and metastasis. *Journal of Hematology and Oncology*, 14(1), 173. <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01187-y>
- Yan, L., Borregaard, N., Kjeldsen, L., & Moses, M. A. (2001). The High Molecular Weight Urinary

- Matrix Metalloproteinase (MMP) Activity Is a Complex of Gelatinase B/MMP-9 and Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin (NGAL). Modulation of MMP-9 activity by NGAL. *Journal of Biological Chemistry*, 276(40), 37258–37265. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106089200>
- Yan, L., Zucker, S., & Toole, B. P. (2005). Roles of the multifunctional glycoprotein, emmprin (basigin; CD147), in tumour progression. *Thrombosis and Haemostasis*, 93(2), 199–204. <https://doi.org/10.1160/TH04-08-0536>
- Yang, C., Li, L., Ye, Z., Zhang, A., Bao, Y., Wu, X., Ren, G., Jiang, C., Wang, O., & Wang, Z. (2024). Mechanisms underlying neutrophils adhesion to triple-negative breast cancer cells via CD11b-ICAM1 in promoting breast cancer progression. *Cell Communication and Signaling*, 22(1), 340. <https://doi.org/10.1186/s12964-024-01716-5>
- Yang, E. S., Willey, C. D., Mehta, A., Crowley, M. R., Crossman, D. K., Chen, D., Anderson, J. C., Naik, G., Della Manna, D. L., Cooper, T. S., & Sonpavde, G. (2017). Kinase analysis of penile squamous cell carcinoma on multiple platforms to identify potential therapeutic targets. *Oncotarget*, 8(13), 21710–21718. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15558>
- Yang, L., Liu, Q., Zhang, X., Liu, X., Zhou, B., Chen, J., Huang, D., Li, J., Li, H., Chen, F., Liu, J., Xing, Y., Chen, X., Su, S., & Song, E. (2020). DNA of neutrophil extracellular traps promotes cancer metastasis via CCDC25. *Nature*, 583(7814), 133–138. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2394-6>
- Yang, L., Yu, Y., Xiong, Z., Chen, H., Tan, B., & Hu, H. (2020). Downregulation of SEMA4C Inhibit Epithelial- Mesenchymal Transition (EMT) and the Invasion and Metastasis of Cervical Cancer Cells via Inhibiting Transforming Growth Factor-beta 1 (TGF-b1)-Induced Hela cells p38 Mitogen- Activated Protein Kinase (MAPK) Ac. *Medical Science Monitor*, 26, e918123. <https://doi.org/10.12659/MSM.918123>
- Yap, J. L., Worlikar, S., MacKerell, A. D., Shapiro, P., & Fletcher, S. (2011). Small-Molecule Inhibitors of the ERK Signaling Pathway: Towards Novel Anticancer Therapeutics. *ChemMedChem*, 6(1), 38–48. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201000354>
- Yarden, Y. (2001). The EGFR family and its ligands in human cancer: signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *European Journal of Cancer*, 37(Supplement 4), S3–S8. [https://doi.org/10.1016/s0959-8049\(01\)00230-1](https://doi.org/10.1016/s0959-8049(01)00230-1)
- Yarden, Y., & Schlessinger, J. (1987a). Epidermal Growth Factor Induces Rapid, Reversible Aggregation of the Purified Epidermal Growth Factor Receptor. *Biochemistry*, 26(5), 1443–1451. <https://doi.org/10.1021/bi00379a035>
- Yarden, Y., & Schlessinger, J. (1987b). Self-Phosphorylation of Epidermal Growth Factor Receptor: Evidence for a Model of Intermolecular Allosteric Activation. *Biochemistry*, 26(5), 1434–1442. <https://doi.org/10.1021/bi00379a034>
- Yarden, Y., & Sliwkowski, M. X. (2001). Untangling the ErbB Signalling Network. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(2), 127–137. <https://doi.org/10.1038/35052073>
- Yoshiro, K. (2008). The role of chemokines in neutrophil biology. *Frontiers in Bioscience*, 13, 2400–2407. <https://doi.org/10.2741/2853>
- Yu, H., Littlewood, T., & Bennett, M. (2015). Akt isoforms in vascular disease. *Vascular Pharmacology*, 71, 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2015.03.003>
- Yu, T., Tang, Q., Chen, X., Fan, W., Zhou, Z., Huang, W., & Liang, F. (2021). TGF- $\beta$ 1 and IL-17A mediate the protumor phenotype of neutrophils to regulate the epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 50(4), 353–361. <https://doi.org/10.1111/jop.13122>
- Zhang, B., Srirangam, A., Potter, D. A., & Roman, A. (2005). HPV16 E5 protein disrupts the c-Cbl-EGFR interaction and EGFR ubiquitination in human foreskin keratinocytes. *Oncogene*, 24(15),

- 2585–2588. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208453>
- Zhang, L., Wei, P., Shen, X., Zhang, Y., Xu, B., Zhou, J., Fan, S., Hao, Z., Shi, H., Zhang, X., Kong, R., Xu, L., Gao, J., Zou, D., & Liang, C. (2015). MicroRNA Expression Profile in Penile Cancer Revealed by Next-Generation Small RNA Sequencing. *PLoS ONE*, *10*(7), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131336>
- Zhang, S., Li, W., & Liang, F. (2016). Clinical value of fluorine-18 2-fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography/computed tomography in penile cancer. *Oncotarget*, *7*(30), 48600–48606. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9375>
- Zhang, X., Wu, L., Xiao, T., Tang, L., Jia, X., Guo, Y., Zhang, J. L., Li, J., He, Y., Su, J., Zhao, S., Tao, J., Zhou, J., Chen, X., & Peng, C. (2018). TRAF6 regulates EGF-induced cell transformation and cSCC malignant phenotype through CD147/EGFR. *Oncogenesis*, *7*(17), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41389-018-0030-1>
- Zhao, Y., Luan, J., Feng, F., & Chen, Z. N. (2017). CD147 and HPV16 oncoprotein expression in cervical squamous cell carcinoma and the clinical implications. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, *10*(4), 4807–4817.
- Zheng, H. Y., Shen, F. J., Tong, Y. Q., & Li, Y. (2018). PP2A Inhibits Cervical Cancer Cell Migration by Dephosphorylation of p-JNK, p-p38 and the p-ERK/MAPK Signaling Pathway. *Current Medical Science*, *38*(1), 115–123. <https://doi.org/10.1007/s11596-018-1854-9>
- Zhou, Q. H., Deng, C. Z., Li, Z. S., Chen, J. P., Yao, K., Huang, K. B., Liu, T. Y., Liu, Z. W., Qin, Z. K., Zhou, F. J., Huang, W., Han, H., & Liu, R. Y. (2018). Molecular characterization and integrative genomic analysis of a panel of newly established penile cancer cell lines. *Cell Death and Disease*, *9*(6), 684. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0736-1>
- Zhu, K., Li, P., Mo, Y., Wang, J., Jiang, X., Ge, J., Huang, W., Liu, Y., Tang, Y., Gong, Z., Liao, Q., Li, X., Li, G., Xiong, W., Zeng, Z., & Yu, J. (2020). Neutrophils: Accomplices in metastasis. *Cancer Letters*, *492*, 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.07.028>
- Zinn, M., Aumailley, M., Krieg, T., & Smola, H. (2006). Expression of laminin 5 by parental and c-Ha-ras-transformed HaCaT keratinocytes in organotypic cultures. *European Journal of Cell Biology*, *85*(5), 333–343. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2005.12.002>
- Zou, P., Yang, E., & Li, Z. (2020). Neutrophil-to-lymphocyte ratio is an independent predictor for survival outcomes in cervical cancer: a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*, *10*(1), 21917. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79071-x>
- zur Hausen, H. (1977). Human Papillomaviruses and Their Possible Role in Squamous Cell Carcinomas. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, *78*, 1–30. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-66800-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-66800-5_1)
- zur Hausen, H. (1996). Papillomavirus infections - a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1288*(2), F55–F78. [https://doi.org/10.1016/0304-419X\(96\)00020-0](https://doi.org/10.1016/0304-419X(96)00020-0)

## 9 Appendix

**Tabelle 17: Rohdaten der maximalen Einwanderungstiefe von Granulozyten in organotypische 3D-Kulturen mit PeCa P2**

PeCa P2	4 h	6 h	8 h	24 h
<b>Bild 1</b>	208,914 $\mu\text{m}$	294,272 $\mu\text{m}$	303,704 $\mu\text{m}$	299,931 $\mu\text{m}$
<b>Bild 2</b>	204,670 $\mu\text{m}$	295,215 $\mu\text{m}$	324,454 $\mu\text{m}$	311,249 $\mu\text{m}$
<b>Bild 3</b>	208,443 $\mu\text{m}$	261,732 $\mu\text{m}$	287,670 $\mu\text{m}$	347,090 $\mu\text{m}$
<b>arithmetisches Mittel ± Standardabweichung</b>	<b>207,342 <math>\mu\text{m}</math> ± 1,899 <math>\mu\text{m}</math></b>	<b>283,740 <math>\mu\text{m}</math> ± 15,567 <math>\mu\text{m}</math></b>	<b>305,276 <math>\mu\text{m}</math> ± 15,058 <math>\mu\text{m}</math></b>	<b>319,423 <math>\mu\text{m}</math> ± 20,102 <math>\mu\text{m}</math></b>

**Tabelle 18: Rohdaten der maximalen Einwanderungstiefe von Granulozyten in organotypische 3D-Kulturen mit PeCa L2**

PeCa L2	4 h	6 h	8 h	24 h
<b>Bild 1</b>	124,971 $\mu\text{m}$	124,028 $\mu\text{m}$	157,039 $\mu\text{m}$	210,329 $\mu\text{m}$
<b>Bild 2</b>	116,954 $\mu\text{m}$	132,045 $\mu\text{m}$	157,982 $\mu\text{m}$	224,005 $\mu\text{m}$
<b>Bild 3</b>	133,460 $\mu\text{m}$	149,494 $\mu\text{m}$	170,715 $\mu\text{m}$	237,681 $\mu\text{m}$
<b>arithmetisches Mittel ± Standardabweichung</b>	<b>125,128 <math>\mu\text{m}</math> ± 6,739 <math>\mu\text{m}</math></b>	<b>135,189 <math>\mu\text{m}</math> ± 10,631 <math>\mu\text{m}</math></b>	<b>161,912 <math>\mu\text{m}</math> ± 6,237 <math>\mu\text{m}</math></b>	<b>224,005 <math>\mu\text{m}</math> ± 11,166 <math>\mu\text{m}</math></b>

**Tabelle 19: Rohdaten der maximalen Einwanderungstiefe von Granulozyten in organotypische 3D-Kulturen mit PeCa L3**

PeCa L3	4 h	6 h	8 h	24 h
<b>Bild 1</b>	217,874 $\mu\text{m}$	270,221 $\mu\text{m}$	344,732 $\mu\text{m}$	421,129 $\mu\text{m}$
<b>Bild 2</b>	233,908 $\mu\text{m}$	250,886 $\mu\text{m}$	331,527 $\mu\text{m}$	403,681 $\mu\text{m}$
<b>Bild 3</b>	181,090 $\mu\text{m}$	273,522 $\mu\text{m}$	330,585 $\mu\text{m}$	405,095 $\mu\text{m}$
<b>arithmetisches Mittel ± Standardabweichung</b>	<b>210,957 <math>\mu\text{m}</math> ± 22,111 <math>\mu\text{m}</math></b>	<b>264,876 <math>\mu\text{m}</math> ± 9,984 <math>\mu\text{m}</math></b>	<b>335,615 <math>\mu\text{m}</math> ± 6,458 <math>\mu\text{m}</math></b>	<b>409,968 <math>\mu\text{m}</math> ± 7,913 <math>\mu\text{m}</math></b>

**Tabelle 20: Rohdaten der Granulozytenmigration in absoluten Zahlen**

Inkubationszeit	Bild	PeCa P2		PeCa L2		PeCa L3	
		E	K	E	K	E	K
4 h	1	63	61	45	32	123	103
	2	59	54	36	27	128	121
	3	67	68	33	24	107	109
	<b>arithmetisches Mittel</b>	<b>63</b>	<b>61</b>	<b>38</b>	<b>27,666</b>	<b>119,333</b>	<b>111</b>
6 h	1	95	163	19	32	102	140
	2	85	153	22	29	93	145
	3	88	188	28	31	86	148
	<b>arithmetisches Mittel</b>	<b>89,333</b>	<b>168</b>	<b>23</b>	<b>30,666</b>	<b>93,666</b>	<b>144,333</b>
8 h	1	98	241	19	34	77	227
	2	102	270	18	35	84	232
	3	103	280	17	37	83	220
	<b>arithmetisches Mittel</b>	<b>101</b>	<b>263,666</b>	<b>18</b>	<b>35,333</b>	<b>81,333</b>	<b>226,333</b>
24 h	1	110	321	14	51	58	286
	2	106	332	15	61	71	296
	3	101	345	11	58	66	259
	<b>arithmetisches Mittel</b>	<b>105,666</b>	<b>332,666</b>	<b>13,333</b>	<b>56,666</b>	<b>65</b>	<b>280,333</b>

Absolute Anzahl immigrierter Granulozyten pro Bildausschnitt. E = Epithelschicht, K = Kollagen-Fibroblasten-Schicht.

**Tabelle 21: Rohdaten der Granulozytenmigration in relativen Zahlen**

Inkubationszeit	Bild	PeCa P2		PeCa L2		PeCa L3	
		E	K	E	K	E	K
4 h	1	50,806	49,194	58,442	41,558	54,425	45,575
	2	52,212	47,788	57,143	42,857	51,406	48,594
	3	49,630	50,370	57,895	42,105	49,537	50,463
	<b>arithmetisches Mittel</b>	<b>50,883</b>	<b>49,117</b>	<b>57,826</b>	<b>42,174</b>	<b>51,789</b>	<b>48,211</b>
6 h	1	36,822	63,178	37,255	62,745	42,149	57,851
	2	35,714	64,286	43,137	56,863	39,076	60,924
	3	31,884	68,116	47,458	52,542	36,752	63,248
	<b>arithmetisches Mittel</b>	<b>34,807</b>	<b>65,193</b>	<b>42,617</b>	<b>57,383</b>	<b>39,326</b>	<b>60,674</b>
8 h	1	28,909	71,091	35,849	64,151	25,329	74,671
	2	27,419	72,581	33,962	66,038	26,582	73,418
	3	26,893	73,107	31,481	68,519	27,393	72,607
	<b>arithmetisches Mittel</b>	<b>27,740</b>	<b>72,260</b>	<b>33,764</b>	<b>66,236</b>	<b>26,435</b>	<b>73,565</b>
24 h	1	25,522	74,478	21,538	78,462	16,860	83,140
	2	24,201	75,799	19,737	80,263	19,346	80,654
	3	22,646	77,354	15,942	84,058	20,308	79,692
	<b>arithmetisches Mittel</b>	<b>24,123</b>	<b>75,877</b>	<b>19,072</b>	<b>80,928</b>	<b>18,838</b>	<b>81,162</b>

Relativer Anteil immigrierter Granulozyten pro Bildausschnitt [%]. E = Epithelschicht, K = Kollagen-Fibroblasten-Schicht.

## 10 Publikation

Islam Mohamed, **Kristin Burckhardt** & Stefan Lohse (2025). Adaptation of the living therapeutic materials concept to the immune sensing of neutrophil granulocytes. *Journal of Leukocyte Biology*, 117(7), qiaf086. <https://doi.org/10.1093/jleuko/qiaf086>.

## 11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meine tiefe Dankbarkeit nachstehenden Personen entgegenbringen, ohne deren Unterstützung diese Promotionsarbeit nicht möglich gewesen wäre.

Zunächst möchte ich mich bei Frau Univ.-Prof. Dr. med. Sigrun Smola für die Möglichkeit der Durchführung meiner Doktorarbeit am Institut für Virologie am Universitätsklinikum des Saarlandes bedanken. Ihr entgegengebrachtes Vertrauen ermöglichte es mir einen detaillierten Einblick in die HPV-getriebene Grundlagenforschung zu erlangen.

Besonderer Dank gebührt Herrn Privatdozent Dr. rer. nat. Stefan Lohse, meinem Doktorvater und Betreuer, für die hervorragende Betreuung, hilfreichen Anregungen und motivierenden Worte. Bei allen Herausforderungen stand er mir stets mit Rat und Tat zur Seite und hatte jederzeit ein offenes Ohr für mich. Für sein Engagement möchte ich mich herzlich bei ihm bedanken.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. univ. et scient. med. Philipp Staber, Direktor der Klinik für Hämatologie, Onkologie, Klinische Immunologie und Rheumatologie am Universitätsklinikum des Saarlandes, danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens meiner Doktorarbeit.

Des Weiteren danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die freundliche Aufnahme, harmonische Arbeitsatmosphäre und gute Zusammenarbeit. Vielen Dank an Muriel Hans, Isabelle Bley und Katrin Thieser für die kompetente Einarbeitung sowie Dr. rer. nat. Anabel Zwick und Dr. rer. nat. Markus Vogelgesang für fachkundige Ratschläge während den Versuchsdurchführungen.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie für ihre liebevolle Unterstützung und den uneingeschränkten Rückhalt während meines Medizinstudiums und meiner Promotion bedanken.

## **12 Lebenslauf**

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