



Charakterisierung der funktionellen Rolle  
des Merkelzell-Polyomavirus sT-Antigens in  
der Metastasierung des Merkelzellkarzinoms

**Dissertation**

Zur Erlangung des Doktorgrades an der Fakultät für Mathematik,  
Informatik und Naturwissenschaften, Fachbereich Biologie der  
Universität Hamburg

vorgelegt von

**Tabea Schlemeyer**

Hamburg, März 2021

**Gutachter:**

1. Prof. Dr. Nicole Fischer
2. Prof. Dr. Thomas Dobner

Datum der Disputation: 29.06.2021

---

## Zusammenfassung

Das Merkelzell-Polyomavirus (MCPyV) ist eines von heutzutage 14 bekannten humanen Polyomaviren und nachweislich die Ursache für die Entstehung von über 80 % aller Merkelzellkarzinome (MCC), einem seltenen, jedoch höchst aggressivem Hauttumor. Somit ist das MCPyV das einzige humane Polyomavirus, welches Tumorgenese in seinem eigenen Wirt auslösen kann. Eine der größten Herausforderungen stellt dabei das hohe Metastasierungspotential des MCCs dar, was auch die Fünf-Jahres-Überlebensrate widerspiegelt, die nur etwa bei 20 % liegt. Im Gegensatz zu anderen Polyomaviren, bei denen das Large Tumor-Antigen (LT-Ag) von entscheidender Bedeutung für die Transformation ist, gibt es für das MCPyV hingegen zahlreiche Hinweise, dass vor allem dem small Tumor-Antigen (sT-Ag) eine besondere Rolle in der Transformation und insbesondere in der Metastasierung zukommt. So konnte zum Beispiel nachgewiesen werden, dass allein die Expression des sT-Ags zur *in-vitro* Transformation von Rattenfibroblasten führt. Darüber hinaus konnte in *in-vivo*-Experimenten ebenfalls bestätigt werden, dass die Expression des sT-Ags zusammen mit der Expression des Transkriptionsfaktors *ATOH1* in einen MCC-ähnlichen-Phänotypen in transgenen Mäusen resultiert. Zusätzlich zum Beitrag des sT-Ags an der Tumorentstehung konnte von unserer Arbeitsgruppe in einem Xenograft-Mausmodell für die MCC-Metastasierung gezeigt werden, dass die Expression des sT-Ags mit der Tumorprogression korreliert und das sT-Ag somit einen entscheidenden Faktor für die Metastasierung darstellt. Außerdem ist sowohl die Expression des sT-Ags als auch die des LT-Ags notwendig für die Zellproliferation und das Überleben von MCC-Tumoren und -Zelllinien.

Um die Rolle des sT-Ags in der Metastasierung genauer zu analysieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Doxycyclin-induzierbares-shRNA-Knockdown-System für die Tumorantigene (T-Ag) in WaGa-Zellen, einer MCPyV-positiven MCC-Zelllinie, etabliert. Einer der ersten und zentralen Schritte in der Metastasierung, welcher die Grundlage für die Ausbreitung von Tumorzellen darstellt, ist die Anheftung von Tumorzellen an das Endothel. In dieser Arbeit konnte durch Adhäsionsversuche erstmalig nachgewiesen werden, dass verschiedene MCPyV-positive Zelllinien unter dynamischen Bedingungen mit dem humanen E-Selektin interagieren, welches auf dem Endothel exprimiert wird. Mit Hilfe des etablierten induzierbaren shRNA-Knockdown-Systems konnte gezeigt werden, dass in WaGa-Zellen die Anheftung an das

---

humane E-Selektin durch das sT-Ag vermittelt wird. Ein Einfluss des T-Ag-Knockdowns auf die Zellinvasion von WaGa-Zellen konnte in dieser Arbeit hingegen nicht beobachtet werden.

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit durch ein Zelloberflächen-Screening der WaGa-Zellen nachgewiesen werden, dass das sT-Ag die Expression von verschiedenen Molekülen auf der Oberfläche der WaGa-Zellen modifiziert. Insbesondere CD44 wird neben weiteren potentiellen E-Selektin-Liganden durch das sT-Ag auf der Zelloberfläche reguliert, und könnte in der Anheftung an das humane E-Selektin von Bedeutung sein. Ebenso unterstreichen die Daten einer Transkriptomanalyse die Beteiligung des sT-Ags in der Metastasierung, da u.a. die Prozessierung und Bindung von Selektin-Liganden, aber auch von vielen anderen Prozessen, die an der Tumorgenese beteiligt sind, transkriptionell durch das sT-Ag verändert werden. Die Funktion von CD44 als Selektin-Ligand von WaGa-Zellen konnte jedoch weder durch eine WaGa CD44 shRNA-Knockdown-Zelllinie noch mittels eines CD44-blockierenden Antikörpers bestätigt werden, sodass die Anheftung der WaGa-Zellen an das humane E-Selektin vermutlich unabhängig von CD44 geschieht.

Neben seiner Bedeutung für die Adhäsion von Tumorzellen an das Endothel, deuten die Daten der Transkriptomanalyse und die Ergebnisse des Zelloberflächenmarker-Screenings darüber hinaus auf eine weitere Rolle des sT-Ags in der angeborenen Immunantwort hin. So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Expression des sT-Ags die Apoptose der Zellen verhindert und Apoptose durch Knockdown der T-Ag vermutlich über ein intrinsisches Signal unabhängig von CD95, welches durch das sT-Ag auf der WaGa-Zelloberfläche herunterreguliert wird, ausgelöst wird. Hinsichtlich seiner Rolle in der angeborenen Immunantwort konnte in Phagozytose-Assays gezeigt werden, dass durch den Knockdown des sT-Ags signifikant mehr WaGa-Zellen von primären humanen Makrophagen phagozytiert werden. Dieser Effekt konnte sowohl durch CD47-siRNA-Knockdown als auch durch die Blockierung mit einem therapeutischen anti-CD47 Antikörper in verschiedenen MCC-Zelllinien auf CD47 zurückgeführt werden, welches durch das sT-Ag auf der Zelloberfläche hochreguliert wird und ein wichtiges „*don't eat me*“-Signal für die Makrophagen des Immunsystems darstellt.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das MCPyV sT-Ag auf verschiedene Arten zur Metastasierung im MCC beiträgt. Zum einen vermittelt das sT-Ag die Adhäsion an das humane E-Selektin des Endothels und verändert die Expression von

---

wichtigen Molekülen auf der Zelloberfläche. Unter anderem wird auch z.B. ADAM10 auf der WaGa-Zelloberfläche durch das sT-Ag hochreguliert, welches nachweislich an vielen Tumor-assoziierten Prozessen beteiligt ist und in der Prozessierung von Selektin-Liganden von Bedeutung sein könnte. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass das sT-Ag Phagozytose verhindert und das „*don't eat me*“-Signal CD47 benutzt, um die Wirts-Immunantwort zu umgehen. Diese wichtigen Erkenntnisse können zum besseren Verständnis der Metastasierung des MCCs beisteuern und neue vielversprechende Therapiemöglichkeiten eröffnen.

---

## Summary

Merkel Cell Polyomavirus (MCPyV) is one out of 14 known human polyomaviruses to date. Interestingly, it represents the only human polyomavirus which is known to cause tumors in its own host being the causative agent for over 80 % of all Merkel Cell Carcinomas (MCC), a rare but highly aggressive form of skin cancer. This cancer shows rapid progression with a 5-year survival rate  $\leq 20$  %, defining MCC metastasis as one of the main challenges in MCC therapy. Different to other polyomaviruses, where large tumor antigen (LT-Ag) is required for transformation, MCPyV encoded small tumor antigen (sT-Ag) is the main viral oncoprotein, which plays a major role in MCC tumorigenesis and metastasis formation. For instance, MCPyV sT-Ag expression has been shown to be responsible for transformation of rodent fibroblasts *in vitro*, and together with the transcription factor *ATOH1* for induction of MCC-like lesions *in vivo* in transgenic mice. In addition to sT-Ag contributing to tumor initiation, it was previously shown by our group that sT-Ag expression also correlates with tumor progression in a xenograft mouse MCC metastasis model thus, suggesting sT-Ag being an essential driver in metastasis. Further, the expression of both tumor antigens (T-Ag), sT- and LT-Ag, is required for cell proliferation and survival of MCC cell lines.

To follow up on the mechanism of sT-Ag contributing to MCC metastasis, an inducible knockdown-system for the T-Ags in WaGa cells, a patient-derived MCPyV-positive cell line, was established in this work. One of the first steps in metastasis, in order to migrate into distant tissues, is the attachment of a tumor cell to the endothelium. This study is the first one showing that different MCPyV-positive MCC cell lines interact with the human E-selectin, which is expressed on the endothelium. Using the inducible knockdown-system for the T-Ags, it could be demonstrated that cell adhesion to the human E-selectin is mediated by the expression of sT-Ag, and knockdown of both T-Ag as well as sT-Ag alone leads to a reduced number of adhesion events. However, no effect on cell invasion could be observed upon T-Ag knockdown in invasion assays.

To further elucidate the role of sT-Ag in MCC metastasis, transcriptome analysis and an analysis of the WaGa cell surface, using a cell surface marker screen, were performed. As expected, sT-Ag changes the expression of various cell surface proteins on the cell surface of the WaGa cell line. Especially the cell adhesion molecule CD44 was shown to be regulated

---

by sT and might play an important role in the process of cell attachment, representing a common ligand of the human E-selectin. Additionally, transcriptome analysis underlined the involvement of sT-Ag in metastasis, altering gene transcription of genes involved in the processing and binding of carbohydrate-selectin ligands and in the regulation of many cancer-associated processes. Nevertheless, cell adhesion of WaGa cells to the human E-selectin was not dependent on expression of CD44, one of the most common E-selectin ligands, when using WaGa CD44-shRNA knockdown cells or a CD44 blocking antibody.

Apart from its significance for cell adhesion of tumor cells to the endothelium, RNA-seq data and data from the surface marker screen indicated also another interesting role for sT-Ag in the innate immune system. Blocking of the FAS-receptor CD95 showed that sT-induced apoptosis occurs independent of the CD95 receptor, so that apoptosis in MCC cell lines is most likely induced in an intrinsic manner. Further confirming the role of sT-Ag for the innate immune system, sT-Ag knockdown led to an increased attraction and phagocytosis of WaGa cells to primary human macrophages in a phagocytosis assay. In addition, it could be demonstrated that CD47-siRNA knockdown in WaGa cells and the application of an anti-CD47 therapeutic antibody to different MCC cell lines, disturbed CD47 signaling, which is found to be upregulated by sT-Ag on the WaGa cell surface. As CD47 represents an important „*don't eat me*“ -signal to the immune system, MCC cells escape immune recognition this way.

Together, this work proposes that MCPyV sT-Ag expression contributes to metastasis formation in MCC in many different ways. On the one hand, sT-Ag increases cell adhesion of WaGa cells to the human E-selectin and changes expression of various cell surface proteins. Between those also e.g. ADAM10 was found to be upregulated by sT-Ag on the cell surface, which has been shown to be involved in many cancer-associated processes and might also play a role in the processing of selectin ligands. On the other hand, it could be shown that sT-Ag impairs phagocytosis by CD47 as a mechanism of host-immune evasion. These findings might significantly contribute to the understanding of sT-induced MCC progression thereby opening new therapeutic strategies for MCC treatment.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>		<b>III</b>
<b>Summary</b>		<b>VI</b>
<b>1 Einleitung</b>		<b>1</b>
1.1	Polyomaviren . . . . .	1
1.2	Das Merkelzell-Polyomavirus und das Merkelzellkarzinom . . . . .	3
1.3	Das Merkelzellkarzinom . . . . .	4
1.3.1	Die MCPyV-induzierte Tumorgenese . . . . .	8
1.3.2	MCC-Immunevasion . . . . .	11
1.3.3	Therapiemöglichkeiten . . . . .	15
1.4	Das Merkelzell-Polyomavirus . . . . .	18
1.4.1	Epidemiologie . . . . .	18
1.4.2	Der Genomaufbau des MCPyV . . . . .	18
1.4.3	Viraler Lebenszyklus des MCPyV . . . . .	19
1.4.4	Die MCPyV-Tumorantigene . . . . .	22
1.5	Metastasierung . . . . .	28
1.5.1	Extravasation . . . . .	30
1.6	Ziel dieser Arbeit . . . . .	32
<b>2 Material &amp; Methoden</b>		<b>34</b>
2.1	Chemikalien & kommerzielle Systeme . . . . .	34
2.2	Reagenzien & Laborhilfsmittel . . . . .	35
2.3	Geräte & Zubehör . . . . .	36
2.4	Software . . . . .	37
2.5	Plasmide . . . . .	37
2.6	Oligonukleotide . . . . .	38
2.7	Antikörper . . . . .	40
2.8	Lösungen & Puffer . . . . .	42
2.9	Enzyme . . . . .	44

2.10	Bakterienkultur . . . . .	45
2.10.1	Medien für die Bakterienkultur . . . . .	45
2.10.2	Herstellung kompetenter Bakterien . . . . .	45
2.11	Zellkultur . . . . .	46
2.11.1	Verwendete Zelllinien . . . . .	46
2.11.2	Verwendete Medien, Zusätze & Reagenzien . . . . .	48
2.12	Kultivierung eukaryotischer Zellen . . . . .	51
2.12.1	Zelllinien . . . . .	51
2.12.2	Herstellung des 2T2-Antikörpers . . . . .	51
2.12.3	Isolation primärer humaner Makrophagen . . . . .	52
2.13	Herstellung von shRNA-Knockdown Zelllinien . . . . .	53
2.13.1	Tet-On-System . . . . .	54
2.13.2	Klonierung der shRNAs . . . . .	55
2.14	Lentivirale Transduktion . . . . .	55
2.14.1	Produktion lentiviraler Überstände . . . . .	55
2.14.2	Bestimmung des Virustiters mittels Titration . . . . .	56
2.14.3	Lentivirale Transduktion und FACS Cell Sorting . . . . .	57
2.15	DNA-Techniken . . . . .	58
2.15.1	Hitzeschock-Transformation und Isolation von Plasmid-DNA . . . . .	58
2.15.2	Transfektion von siRNA . . . . .	59
2.15.3	Analytische Plasmidaufreinigung . . . . .	59
2.15.4	Präparative Plasmidaufreinigung . . . . .	60
2.15.5	Restriktionsverdau von DNA . . . . .	60
2.15.6	Agarose-Gelelektrophorese . . . . .	60
2.15.7	Aufreinigung von DNA aus Agarose-Gelen und anderen Reaktionen . . . . .	61
2.15.8	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten . . . . .	61
2.15.9	Ligation von DNA-Fragmenten . . . . .	62
2.16	RNA-Techniken . . . . .	63
2.16.1	RNA-Isolation mit TRIzol . . . . .	63
2.16.2	RNA-Isolation mit RNeasy Mini Kit . . . . .	64
2.16.3	RNA-Sequenzierung (RNA-Seq) . . . . .	64
2.16.4	cDNA-Synthese . . . . .	65

2.16.5	Quantitative-Real-Time-PCR mit SYBR-Green . . . . .	66
2.17	Protein-Techniken . . . . .	68
2.17.1	Herstellung von Proteinlysaten aus eukaryotischen Zellen . . . . .	68
2.17.2	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford Reagenz . . . . .	68
2.17.3	SDS-Page und Western Blot . . . . .	68
2.17.4	Immunfluoreszenz . . . . .	70
2.18	<i>In-vitro</i> -Assays . . . . .	71
2.18.1	Induktion der shRNA-Knockdown-Zelllinien . . . . .	71
2.18.2	Proliferationsassays . . . . .	71
2.18.3	Dynamische Adhäsionsversuche . . . . .	72
2.18.4	Statische Adhäsionsversuche . . . . .	74
2.18.5	Zellinvasions-Assay . . . . .	75
2.18.6	Durchflusszytometrie (FACS) . . . . .	76
2.18.7	Phagozytose-Assay . . . . .	81
2.18.8	Apoptose-Assay . . . . .	82
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>83</b>
3.1	Etablierung eines induzierbaren shRNA-Knockdown-Systems der T-Antigene in WaGa-Zellen . . . . .	83
3.2	Proliferations-Assays der WaGa shRNA-Knockdown-Zelllinien . . . . .	87
3.2.1	MTT-Assays . . . . .	87
3.2.2	Wachstumskurven . . . . .	88
3.3	Analyse des Bindungsverhaltens von MCC-Zelllinien an Selektine . . . . .	89
3.3.1	Dynamische Adhäsion von MCC-Zelllinien an humane/murine E- & P-Selektine . . . . .	89
3.3.2	Dynamische Adhäsion von WaGa-Zellen an das humane E-Selektin in Abhängigkeit der MCPyV-T-Antigene . . . . .	92
3.3.3	Dynamische Adhäsion von WaGa-Zellen an Endothelzellen . . . . .	93
3.3.4	Adhäsion unter statischen Bedingungen . . . . .	94
3.4	Analyse der Zellinvasion in Abhängigkeit der MCPyV-T-Antigene . . . . .	95
3.5	Differentielle Genexpression in Abhängigkeit des MCPyV-sT-Antigens . . . . .	96

3.6	Zelloberflächen-Screening von WaGa-Zellen . . . . .	103
3.6.1	Exprimierte Liganden auf der WaGa-Zelloberfläche . . . . .	103
3.6.2	Differenzielle Expression von Zelloberflächenmolekülen in Abhängigkeit des MCPyV-sT-Antigens . . . . .	106
3.6.3	Bestätigungsexperimente des Zelloberflächen-Screenings . . . . .	108
3.7	Der Einfluss von CD44 auf die dynamische Adhäsion von WaGa-Zellen . . . . .	111
3.8	Die Funktion von CD95 in der durch T-Antigen-Knockdown induzierten Apoptose	113
3.9	Der Einfluss von CD47 auf die MCC-Immunantwort . . . . .	115
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>118</b>
4.1	Das Dox-induzierbare shRNA-System reguliert effizient die Expression des sT- und LT-Antigens herunter . . . . .	119
4.2	Die Interaktion von MCC-Zelllinien mit Selektinen . . . . .	120
4.2.1	Selektin-Bindung in dynamischen Adhäsionsversuchen . . . . .	121
4.2.2	Selektin-Bindung in der statischen Adhäsion . . . . .	122
4.2.3	Die Bindung von WaGa-Zellen erfolgt unabhängig von CD44 . . . . .	123
4.2.4	Die statische Bindung des murinen E-Selektins erfolgt (teilweise) über Sialyl-Lewis X . . . . .	124
4.3	Die MCPyV-T-Antigene haben keinen Einfluss auf die Zellinvasion . . . . .	125
4.4	Der Einfluss des sT-Antigens auf die differentielle Genexpression . . . . .	127
4.5	Der Einfluss des sT-Antigens auf die Expression von Zelloberflächenmolekülen	130
4.6	Die Rolle des sT-Antigens im MCC . . . . .	132
4.6.1	Das sT-Antigen verhindert Apoptose unabhängig von CD95 . . . . .	132
4.6.2	Das sT-Antigen verhindert die Phagozytose primärer humaner Makro- phagen durch das „ <i>don't eat me</i> “-Signal CD47 . . . . .	135
4.6.3	Die Rolle des sT-Antigens in der Immunevasion . . . . .	138
<b>5</b>	<b>Fazit &amp; Ausblick</b>	<b>142</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>145</b>
	<b>Anhang</b>	<b>176</b>

<b>Indizes</b>	<b>203</b>
Abbildungsverzeichnis . . . . .	203
Tabellenverzeichnis . . . . .	205
Abkürzungsverzeichnis . . . . .	206
<b>Danksagung</b>	<b>211</b>
<b>Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>213</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Polyomaviren

Polyomaviren (PyV) sind in unserer Umwelt omnipräsent und weit verbreitet in verschiedenen Vertebraten (besonders in Vögeln, Nagetieren und Menschen). Sie bestehen aus einem relativ kleinen, doppelsträngigen DNA-Genom, welches von einem unbehüllten Kapsid ikosaedrischer Form umschlossen wird. Während PyV in Vögeln gefährliche Krankheiten auslösen können, wie z.B die durch PyV ausgelöste Papageienkrankheit, verlaufen Infektionen im Menschen meist asymptomatisch. In immunsupprimierten Personen hingegen kann eine PyV-Infektion auch schwere Krankheitsverläufe mit sich bringen [1].

Das erste Polyomavirus, das murine Polyomavirus (MPyV), wurde 1953 bei Versuchen mit dem murinen Leukämievirus (MLV) von Ludwig Gross entdeckt [2]. Anschließend konnten Stewart et al. [3] erstmals die transformierenden Eigenschaften des MPyV beschreiben, indem sie neugeborene Mäuse mit dem Virus infizierten und die Entstehung multipler Tumore beobachteten. Folglich leitet sich auch der Familienname der *Polyomaviridae* aus dem Griechischen ab (poly=mehrere; -oma=Tumor). Einige Jahre später wurde das Simian Virus 40 (SV40) als zweites Mitglied der *Polyomaviridae* in kontaminiertem Poliovirus-Impfstoff, der in Zellkultur, in Nierenzellen von Makaken produziert wurde, entdeckt [4]. Dies löste große Bedenken für die öffentliche Gesundheit aus, da in Experimenten gezeigt wurde, dass die transformierenden Eigenschaften von SV40 zu Tumoren in neugeborenen Hamstern führen. Epidemiologische Studien zeigten jedoch keinen signifikanten Anstieg von Tumorerkrankungen in der Bevölkerung nach der in den 60igern durchgeführten Impfung [5][6][7]. Sowohl SV40 als auch MPyV wurden jahrelang als Modellsysteme zur Aufklärung grundlegender eukaryotischer Zellprozesse, wie z.B. der DNA-Replikation, RNA-Transkription und Prozessierung und der onkogenen Transformation verwendet [1].

Die ersten humanen Polyomaviren wurden 1971 entdeckt und wurden nach den Initialen der Patienten benannt, aus denen sie isoliert wurden. So wurde das JC-Polyomavirus (JCPyV) aus dem Hirn eines immungeschwächten Patienten mit progressiver multifokaler Leukoencephalopathie (PML) isoliert [8]. Ungefähr zeitgleich wurde das BK-Polyomavirus (BKPyV) aus dem Urin eines Nierentransplantat-Empfängers isoliert [9], weshalb die damit einhergehende

Krankheit bei Nierentransplantationen als Polyomavirus-assoziierte Nephropathie (PVAN) bezeichnet wird.

Obwohl in den nächsten Jahren einige neue Polyomaviren in Tieren entdeckt wurden, konnten bis zum Jahr 2007 keine weiteren humanen Polyomaviren identifiziert werden. Erst mit der Entwicklung neuer molekularbiologischer Methoden und vor allem neuer Sequenzierungstechnologien war es möglich, neue humane Polyomaviren ausfindig zu machen. Neben dem JCPyV und BKPyV konnten in der folgenden Zeit die humanen Polyomaviren (HPyV) 6, 7, 9, 10 und 12 (benannt nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung, [10][11][12][13]) sowie das KIPyV [14] und das WUPyV [15] (benannt nach den Institutionen, die sie entdeckt haben) identifiziert werden. Außerdem wurden einige weitere Polyomaviren nach dem Ort ihrer Entdeckung benannt, wie das Malawi Polyomavirus (MWPyV) [16], das St. Louis Polyomavirus (STLPyV) [17] und das New Jersey Polyomavirus (NJPyV-2013) [18]. Darüber hinaus konnten zwei weitere Polyomaviren identifiziert werden, die mit Erkrankungen von immungeschwächten Patienten in Verbindung stehen. Das Trichodysplasia spinulosa-Polyomavirus (TSPyV) [19], welches die gleichnamige Hautkrankheit auslöst, und das Merkelzell-Polyomavirus (MCPyV) [20], welches mit dem Merkelzellkarzinom (MCC) assoziiert ist.

Zusammengefasst sind bis heute 14 humane Polyomaviren bekannt, von denen vier (BKPyV, JCPyV, TSPyV und MCPyV) humanpathogen in immunsupprimierten Patienten sind. Einen Überblick über ihre Verwandtschaftsverhältnisse und nahen Verwandten in anderen Wirten gibt der phylogenetische Stammbaum in Abbildung 1, der auf einer Analyse der Aminosäuresequenzen des jeweiligen Large T-Antigens (LT-Ag) basiert [21].

Eine Besonderheit stellt das MCPyV dar, welches als einziges humanes Virus Tumore im eigenen Wirt verursachen kann. Interessanterweise ist dieses eng verwandt mit dem Waschbär-Polyomavirus (engl. *racoon*, RacPyV), welches als einziges Virus tierischen Ursprungs ebenfalls zu Tumoren in seinem natürlichen Wirt führen kann [22]. Ein wichtiger Unterschied besteht jedoch darin, dass das RacPyV in den Tumorzellen episomal vorliegt und nicht wie im MCC das MCPyV-Genom in das Wirtszellgenom der Tumorzelle integriert ist [20][22].

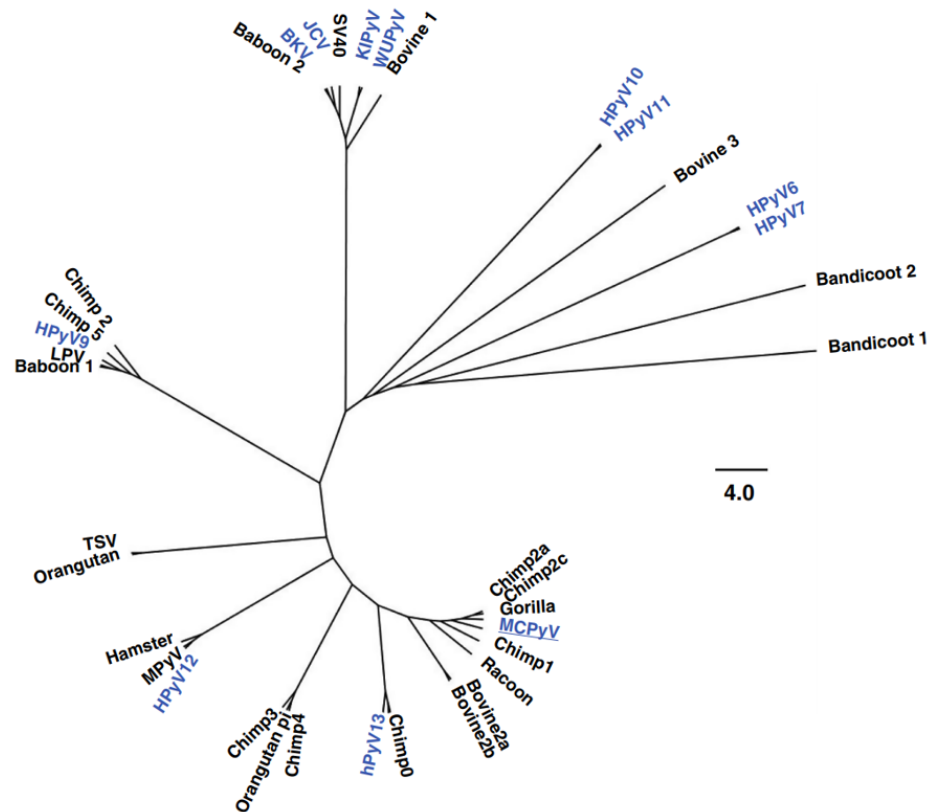


Abbildung 1 Phylogenetische Analyse der Aminosäuresequenz des LT-Antigens humaner und nah verwandter Polyomaviren in anderen Wirten. Die humanen Polyomaviren sind in blau dargestellt, ihre nahen Verwandten in anderen Wirten in schwarz. Entnommen aus [21].

## 1.2 Das Merkelzell-Polyomavirus und das Merkelzellkarzinom

Heutzutage ist bekannt, dass bis zu 20 % aller humanen Tumore durch Infektionen verursacht werden. Neben dem Bakterium *Helicobacter Pylori*, dessen chronische Infektion einen Risikofaktor für die Entstehung eines Magenkarzinoms sowie eines MALT (engl. *Mucosa Associated Lymphoid Tissue*)-Lymphoms darstellt [23], konnten bisher sieben humane Tumore identifiziert werden. Zu diesen zählen die Hepatitis B und C Viren (HBV und HCV), welche in chronischen Verläufen zu einem Leberkarzinom führen können, das humane Papillomvirus (HPV), welches die häufigste Ursache für die Ausbildung eines Zervixkarzinoms ist, das Epstein-Barr-Virus (EBV), welches sowohl mit dem Hodgkin- und Burkitt-Lymphom als auch Nasopharynx- und Magenkarzinomen assoziiert ist, das humane Herpesvirus 8 (HHV8 bzw. KSHV), welches an der Entstehung des Karposi-Sarkoms, von primären Effusions-Lymphomen und der multizentrischen Morbus Castleman beteiligt ist, das



humane T-lymphotrope Virus 1 (HTLV-1), welches adulte T-Zell-Leukämie verursachen kann, und das Merkelzell-Polyomavirus (MCPyV), welches als Hauptursache für die Entstehung des Merkelzellkarzinoms (MCC) identifiziert werden konnte [24].

Dabei ist das MCPyV das einzige humane Polyomavirus, welches in der Familie der *Polyomaviridae* zur Tumorgenese im eigenen Wirt führen kann. 2008 wurde das Virus mittels Transkriptomanalyse von vier MCC-Tumorbiopsien erstmalig von Moore et al. [20] beschrieben. Seitdem konnten zahlreiche Studien zeigen, dass das MCPyV kausal für die Entstehung der Mehrzahl aller MCC verantwortlich ist [21][25].

### 1.3 Das Merkelzellkarzinom

Das MCC (engl. *Merkel cell carcinoma*) ist ein seltenes, jedoch höchst aggressives neuroendokrines Karzinom der Dermis. Typischerweise entsteht dieser äußerst maligne Hauttumor an Körperregionen, die intensiv der Sonnenstrahlung ausgesetzt sind (z.B. Gesicht, Nacken und Extremitäten), und zeichnet sich vor allem durch sein hohes Metastasierungspotenzial und der damit einhergehenden erhöhten Sterblichkeitsrate aus [1][26]. Zudem tritt das MCC meist in älteren und immunsupprimierten Patienten auf, weshalb zusätzlich zur chronischen UV-Exposition, auch fortgeschrittenes Alter als Risikofaktor gilt. In selteneren Fällen können hingegen auch junge Erwachsene betroffen sein und das Karzinom sich in weniger sonnenexponierten Körperregionen bilden [1].



**Abbildung 2 Merkelzellkarzinom.** Merkelzellkarzinome bilden rötliche, kuppelartige Auswucherungen und entstehen meist an Körperregionen, die häufig der UV-Strahlung ausgesetzt sind. Entnommen aus [27].

Morphologisch zeichnet sich das MCC durch die Bildung eines rötlich bis violetten, kuppelartigen Knotens mit glatter Oberfläche aus (Abbildung 2). Diese Auswucherung kann sich sehr schnell vergrößern und neigt schon früh zu Metastasenbildung in anderen Organen, weshalb

eine frühe Diagnose und entsprechende Behandlung des MCCs von großer Bedeutung für den Krankheitsverlauf ist [28]. Die Diagnose erfolgt standardmäßig durch eine Biopsie der betroffenen Stelle, durch welche die Proliferation der basophilen Tumorzellen in der Dermis und/oder Hypodermis überprüft wird. Typischerweise wird dazu die Expression des Tumormarkers Zytokeratin 20 (CK20), sowie die Expression weiterer neuroendokriner Tumormarker, wie Chromogranin A oder Synaptophysin zu Rate gezogen [29]. Die Wichtigkeit einer frühen Diagnose spiegelt sich auch in der Fünf-Jahres-Überlebensrate wider, die für Patienten mit einem lokal begrenzten MCC bei nur etwa 51 % liegt. Hat sich der Tumor hingegen bereits ausgebreitet und die Lymphknoten befallen, sinkt die Überlebensrate auf 35 % sowie bei zunehmender Metastasierung sogar auf 14 % [30]. Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose sind bereits bei rund der Hälfte aller Patienten die Lymphknoten von Metastasen befallen [31]. Darüber hinaus kommt es in bis zu 8 % der MCCs zur Bildung von Metastasen in entfernten Organen, die am häufigsten in der Leber, den Knochen und der Lunge auftreten. In selteneren Fällen wurden auch Metastasen im Gehirn beobachtet [32]. Obwohl das MCC zwar bis zu 40-mal seltener auftritt als das maligne Melanom und weniger als 1 % der nicht-melanozytären Hauttumore ausmacht, ist die Überlebenswahrscheinlichkeit jedoch dramatisch geringer. So kommt es, dass das MCC mit einer Gesamtmortalitätsrate von etwa 30 % die Statistik der Sterblichkeitsraten aller bekannten Hautkrebsarten anführt [29][33][34].

Einen prognostischen Marker für den Krankheitsverlauf unter anderem im Mammakarzinom [35], Magenkarzinom [36] und Plattenepithelkarzinom [37] stellen nachweislich zirkulierende Tumorzellen (engl. *circulating tumor cells*, CTC) dar. Auch im MCC konnte kürzlich eine Korrelation zwischen der Anwesenheit von CTCs und der Überlebensrate festgestellt werden: Über einen Zeitraum von zwei Jahren überlebten 80 % der CTC-negativen Patienten, jedoch nur 29 % der CTC-positiven Patienten [38][39][40]. Weitere prognostische Marker, die nachweislich mit der Invasion und Metastasierung des MCCs korrelieren, sind die Expression von Tenascin-C [41][42], ALOX15 [43] und D2-40 [44], einem Marker der Lymphgefäßendothelien. Zudem könnte die Expression von PDGFR (*Platelet-derived growth factor receptor*), c-kit (CD117), und PI3K (Phosphoinositid-3-Kinasen) mit einer schlechteren Prognose für den Krankheitsverlauf verknüpft sein [45][46][47][48]. Im Gegensatz dazu konnte die Expression von NOTCH3 [49] und pSTAT5B [50] und [51] mit einem positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf assoziiert werden. Obwohl einige weitere mögliche Biomarker im MCC untersucht

wurden, konnte jedoch lange Zeit kein geeigneter Biomarker gefunden werden, der verlässlich den Therapieerfolg beim MCC vorhersagt. Neue Hoffnung auf einen verlässlichen Biomarker bringen jedoch neuere Studien, die zeigen, dass sowohl die Expression der zirkulierenden zellfreien miR-375 [52] als auch die Expression der NSE (engl. *Neuron-Specific Enolase*) [53] mit der Tumorlast korreliert.

In 80-90 % aller MCC ist das virale Genom des MCPyV monoklonal in das Wirtsgenom integriert [20][54][55], was unter anderem die konstitutive Expression der beiden Tumoran-tigene (T-Ag), small T-Antigen (sT-Ag) und LT-Ag, zur Folge hat (siehe Abschnitt 1.4.4) [54]. Dabei erfolgt die Integration der viralen DNA an einer zufälligen Position im humanen Genom, bevorzugt jedoch in Regionen mit eukromatischen Chromatin, die aktiv transkribiert werden. Die monoklonale Integration in den Tumorzellen mit identischer Integrationsstelle in allen Tumorzellen lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Integration der viralen DNA in das Wirtsgenom der Tumorgenese vorausgeht. Bei der Integration kommt es zu einer Mutation, die zu einer verkürzten Form des LT-Ags ( $LT_{trunc}$ ) führt und die Replikation des Virus, sowie die lytische Produktion von MCPyV-Viruspartikel verhindert (siehe Abschnitt 1.3.1 und 1.4.3.) [56][57]. Diese Mutation ist von Patient zu Patient unterschiedlich, führt aber immer zu einem Verlust des C-Terminus des LT-Ags, wodurch das Virus die Fähigkeit verliert, sich zu replizieren [20][25][55]. Das sT-Ag hingegen ist von den verkürzenden Mutationen nicht betroffen und bleibt intakt.

10-20 % aller MCC sind MCPyV-negativ [20]. Einige Studien zeigen jedoch, dass MCPyV-negative Tumore mit 40 Mutationen/Megabasen (Mb) eine bis zu 100-fach höhere Gesamtmutationalast vorweisen als MCPyV-positive Tumore mit 0,4-0,75 Mutationen/Mb [28][58][59]. Im Gegensatz zu MCPyV-positiven MCC treten in diesen häufig Mutationen in Genen auf, welche charakteristisch für UV-Schäden sind, wie z.B. *TP53*, *RB1*, *Notch1* und *HRAS* [28][59][60][61][62][63]. Außerdem gehen diese meistens einher mit Mutationen in bekannten Tumorsuppressorgenen, wie p53 oder dem Rb-Protein, sowie Genen der DNA-Schadensantwort oder Chromatin-Modifikation [28][59][64][65]. Diese erhöhte Gesamtmutationalast MCPyV-negativer MCC deutet auf unterschiedliche Mechanismen in der Entstehung von MCPyV-positiven und MCPyV-negativen MCC hin. Dass die Mutationsrate in MCPyV-positiven Tumoren so gering ist, zeigt, dass in diesen die Tumorgenese durch die T-Ag, LT-Ag und

sT-Ag induziert wird, weshalb es von Interesse ist, diese als therapeutische Zielmoleküle zu betrachten.

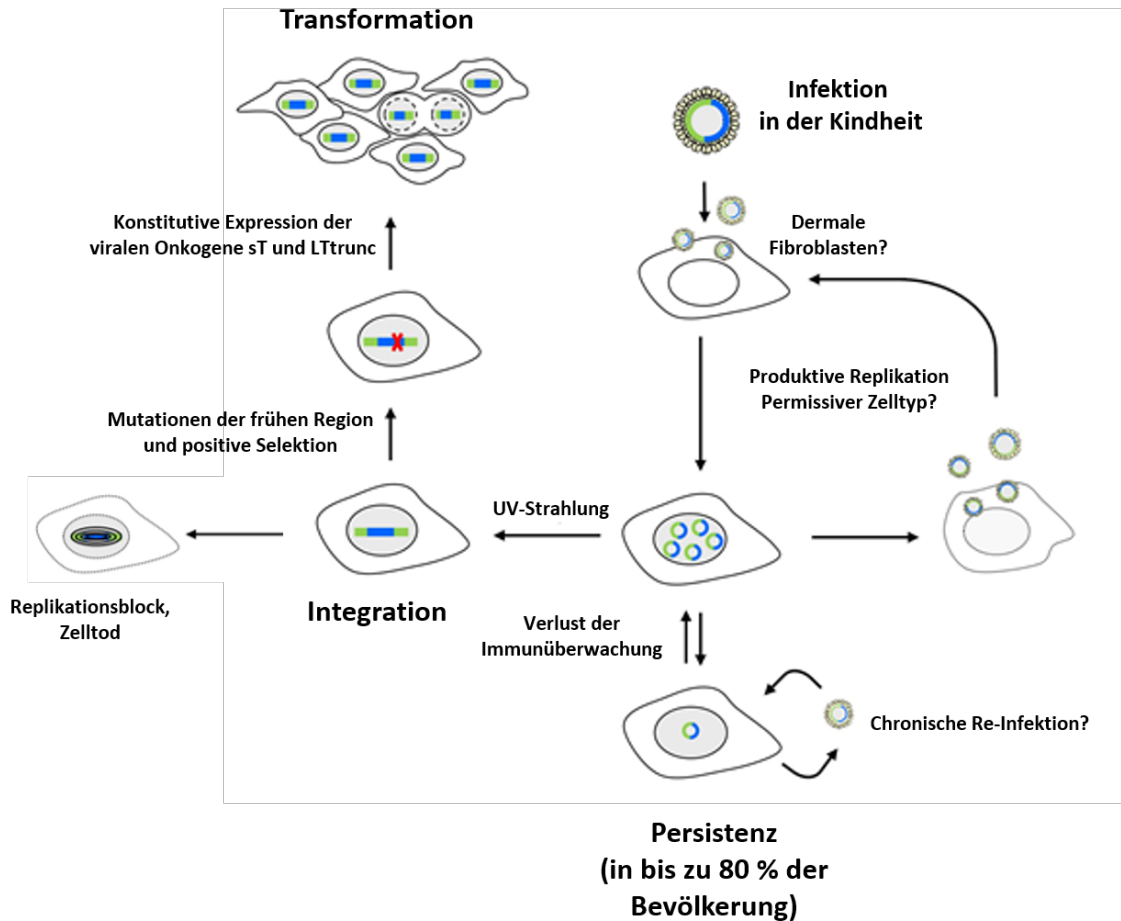
In den letzten Jahrzehnten hat sich die Anzahl der diagnostizierten MCC durch Fortschritte in der Diagnostik deutlich erhöht. Die weltweite Inzidenz bewegt sich momentan zwischen 0,10-1,6 Fällen pro 100.000 Einwohnern [32]. Besonders gefährdet durch die hohe UV-Belastung sind die Einwohner Australiens mit 1,6 Fällen pro 100.00 Einwohner [66]. Im Gegensatz zu den USA, wo im Jahr 2013 die Inzidenz bei 0,7 Fällen pro 100.000 Einwohnern [67] lag, ist die Mehrheit der in Australien auftretenden Karzinome jedoch MCPyV-negativ (über 70 %) und häufig durch UV-bedingte Mutationen geprägt [48][68]. In Europa liegt die Inzidenz Studien zu Folge bei 0,26-0,43 Fällen pro 100.000 Einwohnern im Jahr [69][70]. Die Inzidenz korreliert stark mit fortgeschrittenem Alter, die Überlebensrate hingegen ist signifikant höher in Patienten unter 70 Jahren als bei älteren Patienten [66][69]. Generell sind in etwa zu 2/3 Männer und 1/3 Frauen betroffen [32]. Die Tendenz deutet aufgrund zunehmender Lebenserwartung und hoher UV-Belastung in Richtung weiterhin steigender Fallzahlen.

Die Namensgebung des MCCs beruht auf strukturellen und immunhistochemischen Ähnlichkeiten mit den Merkelzellen der Epidermis, die eine wichtige Rolle für den Tastsinn spielen [71][72]. Da Merkelzellen bereits terminal differenziert sind und sich nicht mehr teilen, aber aufgrund von identischen Integrationsstellen des viralen Genoms in Primärtumor und Metastasen davon ausgegangen wird, dass die Integration der viralen DNA in das Wirtsgenom der klonalen Expansion der Tumorzellen vorausgeht, wird heutzutage jedoch nicht mehr angenommen, dass sie als Ursprungszellen für die Transformation und somit für die Entstehung des MCCs dienen [73]. Anstelle dessen sind (epi-)dermale Stammzellen oder Vorläufer von B-Lymphozyten in den Fokus gerückt, in der Hoffnung, die Ursprungszelle für die Entstehung eines MCC ausfindig zu machen [34]. Auch mit der Identifikation von humanen dermalen Fibroblasten als putative Wirtszelle des MCPyV, was jedoch kontrovers diskutiert wird und bisher noch nicht in unabhängigen Experimenten bestätigt werden konnte, bleibt weiterhin unklar, welches die Ursprungszelle des MCCs ist [74].

### 1.3.1 Die MCPyV-induzierte Tumorgenese

Es gibt verschiedene Theorien zum Ursprung des MCCs (Abbildung 3). Zum einen wird angenommen, dass sich das MCC aus seiner Wirtszelle, dem natürlichen Reservoir des MCPyV, bilden könnte. Hier könnten UV-induzierte Mutationen persistierender Episomen innerhalb der permissiven Zellen zur Transformation und Integration des Virusgenoms beitragen. Zum anderen besteht die Vermutung, dass die MCC-Entstehung von der versehentlichen Infektion einer nicht-permissiven Zelle ausgeht, welche die virale Replikation verhindert und somit eine initiale Voraussetzung für die Transformation darstellen könnte [21]. Da sowohl die Transformation einer permissiven als auch einer nicht-permissiven Zelle für die Entstehung eines MCC denkbar ist, bleibt weiterhin unklar, aus welcher Zelle ein MCC entsteht. Dennoch konnten bisher einige grundlegende Prinzipien, die zur Tumorgenese durch das MCPyV führen, identifiziert werden.

Demzufolge müssen für die MCPyV-induzierte Tumorgenese drei Dinge unabhängig voneinander geschehen: Die Integration des viralen Genoms in die Wirtszelle, das Auftreten von spezifische Mutationen, welche die virale Replikation verhindern, und die konstitutive Expression der viralen T-Ag, welche den Zellzyklus deregulieren und die Zellproliferation stimulieren.



**Abbildung 3** Schematisches Modell der MCPyV-induzierten Tumorgeneses (vereinfacht).

Die Erstinfektion mit dem MCPyV erfolgt bereits in der frühen Kindheit und verläuft meist asymptomatisch. In 80 % der Bevölkerung persistiert das MCPyV episomal. Als putative Wirtszelle konnten kürzlich dermale Fibroblasten identifiziert werden; eine Bestätigung durch *in-vivo*-Experimente steht jedoch noch aus. Immunsuppression begünstigt die Virusproduktion und die erhöhte Viruslast ermöglicht im Zusammenwirken mit weiteren Risikofaktoren (wie z.B. UV-Strahlung) die monoklonale Integration des viralen Genoms in das Wirtsgenom. Unabhängig davon kommt es zu Mutationen des T-Ag Locus, die das Virus replikationsinkompetent zurücklassen. Die daraus resultierende konstitutive Expression der T-Ag führt zur unkontrollierten Proliferation und schließlich zur Transformation und Entstehung des MCCs. Bislang ist unklar, in welcher zeitlichen Reihenfolge Integration und Mutation ablaufen. Entnommen und modifiziert aus [75].

Die Integration des viralen Genoms ist einer der ersten Schritte, die für die Transformation notwendig sind. Sie erfolgt an einem zufälligen Ort des humanen Genoms, bevorzugt jedoch in Regionen mit euchromatischem, offenem Chromatin, in denen Gene aktiv transkribiert werden. Kürzlich konnten Czech-Sioli et al. [76] zeigen, dass die Integration im Allgemeinen nach zwei verschiedenen zellulären Mechanismen der DNA-Schadensantwort erfolgt: der Nicht-homologen End-Verknüpfung (engl. *non-homologous end joining* (NHEJ)) und der mikrohomologisch vermittelten Bruch-induzierten Replikation (engl. *microhomology-mediated*

*break-induced replication* (MMBIR)). Dabei sind die Integrationsstellen von Patient zu Patient unterschiedlich und gelten daher nicht direkt als Auslöser für die Transformation. Die Integrationsstellen innerhalb eines Patienten sind hingegen identisch, d.h. die jeweiligen Primärtumore und daraus resultierende Metastasen eines Patienten weisen identische Integrationsmuster auf [20][56][68][77][78][79][80]. Aus diesem Grund wird angenommen, dass die Integration der viralen DNA der Tumorentwicklung vorausgeht und die Zelle erst im Nachhinein klonal expandiert. Darüber hinaus weisen alle MCPyV-Sequenzen aus MCC-Tumoren Mutationen im zweiten Exon des LT-Ags auf, was zur Expression einer verkürzten Form des LT-Ags in den Tumorzellen führt. Dieser verkürzten Form des LT-Ags,  $LT_{trunc}$ , fehlt sowohl die C-terminale OBD als auch die Helikase-Domäne, wodurch das Virus nicht mehr in der Lage ist, an den viralen *ori* zu binden und somit die virale Replikation innerhalb der Tumorzelle zu induzieren [20][55][81]. Daraus resultiert die konstitutive Expression der T-Ag im Tumor, wohingegen die Gene der späten Region in den Tumorzellen nun nicht mehr exprimiert werden können. Dies hat einerseits die Transformation der Wirtszelle zur Folge, andererseits hat sich gezeigt, dass die Expression der T-Ag auch entscheidend für die Erhaltung des transformierten Zustands ist [82][83][84]. Dies zeigt sich auch dadurch, dass das LT-Ag voller Länge im Gegensatz zu  $LT_{trunc}$  nur begrenzt transformierende Eigenschaften in *in-vitro*-Experimenten aufweist [85]. Auf die (transformierenden) Eigenschaften der MCPyV-T-Ag wird detailliert in Abschnitt 1.4.4 eingegangen.

Obwohl die OBD und die Helikase-Domäne in allen MCPyV-positiven Tumoren durch die Mutation des C-Terminus verloren gehen, bleibt die RB-Bindedomäne auch in der verkürzten Form des LT-Ags immer erhalten (siehe Abschnitt 1.4.4). Zusätzlich weist die starke Bindung zwischen  $LT_{trunc}$  und dem Rb-Protein darauf hin, dass ein positiver Selektionsdruck zum Erhalt der RB-Bindedomäne besteht und diese für die Tumorgenese eine essentielle Rolle spielt. Die Bindung des Rb-Proteins führt zur Aktivierung der E2F-abhängigen Transkription, was eine Deregulation des Zellzyklus zur Folge hat. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine intakte Rb-Bindedomäne entscheidend für die Aufrechterhaltung des Zell- bzw. des Tumorwachstums *in-vitro* und *in-vivo* ist [81][84][85]. Diese Erkenntnisse untermauern die Tatsache, dass Transformation in Polyomaviren grundsätzlich mit dem Verlust der viralen Replikation, der dauerhaften Deregulation des Zellzyklus und der Stimulation der Zellproliferation einhergeht [86][87][88][89].

Außerdem wird vermutet, dass der Entstehung eines MCC eine Phase der akuten Virämie vorausgeht, da MCC-Patienten deutlich höhere Antikörpertiter gegen MCPyV-VP1 aufweisen als der Durchschnitt der Bevölkerung [90][91]. Diese deutlich gesteigerte Virusreplikation wird vermutlich durch ein geschwächtes Immunsystem der (vor allem älteren) Patienten ausgelöst und könnte die monoklonale Integration des viralen Genoms in das Wirtsgenom, wie es in 80 % aller MCC zu finden ist, begünstigen [20][54][55]. Neben einer erhöhten Konzentration an Antikörpern gegen MCPyV-VP1 besitzen MCC-Patienten auch Antikörper gegen die MCPyV-T-Ag, dessen Titer mit der Ausbreitung des Tumors korrelieren. Zudem konnte beobachtet werden, dass die Antikörpertiter für die T-Ag bereits vor dem Auftreten von Rezidiven ansteigen und bei erfolgreicher Behandlung zurückgehen, sodass diese als prognostische Marker genutzt werden können [92][93][94].

Das Zusammenkommen all dieser Faktoren könnte einer der Gründe sein, warum es nur in seltenen Fällen zur Entstehung eines MCC kommt, obwohl das Virus in über 80 % der gesamten Population kursiert. Darüber hinaus stellt die Unfähigkeit des MCPyV infektiöse Viruspartikel in den Tumorzellen zu generieren eine sogenannte „dead-end“-Situation für den viralen Lebenszyklus dar. Die Bildung des MCC kann somit eher als seltene Komplikation der MCPyV-Infektion angesehen werden statt einer Überlebensstrategie des Virus. Welche molekularen Mechanismen allerdings genau zur Entstehung des MCC beitragen, sowie in welcher zeitlichen Abfolge die Integration des viralen Genoms und die Mutation der frühen Region stattfinden, bleibt bislang noch unklar.

### **1.3.2 MCC-Immunevasion**

Im Allgemeinen muss eine Tumorzelle drei Phasen überstehen, bevor es zur Ausbildung eines Primärtumors kommt: Initial transformierte Zellen müssen der Beseitigung durch das Immunsystem entgehen, es muss sich ein Gleichgewicht einstellen, in welchem das Immunsystem die Ausbreitung der Tumorzellen beschränkt, und die Tumorzellen müssen in der Lage sein, die Immunantwort zu umgehen, um sich auszubreiten [95]. Da vor allem für Menschen mit T-Zell-Dysfunktion (wie z.B. HIV-Patienten und Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie) und Menschen mit Immunschwäche (z.B. nach Organtransplantation und Immuntherapie) ein erhöhtes Risiko besteht ein MCC auszubilden, ist lange



bekannt, dass MCCs immunogen sind und das Immunsystem für dessen Entstehung eine wichtige Rolle spielt [96][97][98]. Unabhängig davon gilt darüber hinaus Immunsuppression nach der Entstehung eines MCC als zusätzlicher Risikofaktor für eine erhöhte Mortalitätsrate [99][100][101]. Dadurch, dass jedoch nur ca. 10 % aller MCC-Patienten so eine offensichtliche Immunschwäche aufweisen, wird angenommen, dass es mit fortschreitendem Alter zu einem Verlust der Immunüberwachung kommt.

Wie viele andere Tumorarten nutzen auch die Tumorzellen des MCC verschiedene Strategien, um der Immunantwort des Wirtes zu entgehen. Von besonderer Bedeutung für die Immunevasion des MCC ist vor allem die T-Zellantwort des adaptiven Immunsystems. Eine besondere Rolle spielen hier infiltrierende Immunzellen, dabei besonders  $CD8^+$  T-Zellen, die mit einer positiven Prognose assoziiert werden [102][103][104]. Normalerweise binden T-Zellen mittels ihres CLA-Rezeptors (engl. *cutaneous lymphocyte antigen*) an das E-Selektin, welches auf dem Endothel exprimiert wird und vermitteln auf diese Weise die Migration der aktivierten T-Zellen in Richtung des Tumors [105]. In 52 % aller MCC konnte jedoch eine verminderte E-Selektin-Expression festgestellt werden [106]. Sowohl diese Tatsache als auch die Beobachtung, dass in einem Teil der MCC Tumore komplett der CLA-Rezeptor fehlt [107], führen zu einer geringeren Anzahl an Tumor-infiltrierenden T-Zellen, die zu einer Inhibierung der T-Zell-Migration im MCC-Tumorgewebe und infolgedessen der Beseitigung der Tumorzellen führen. Ein weiterer Mechanismus, um die Immunantwort zu unterdrücken, ist das Herunterregulieren von MHC-Klasse I-Rezeptoren auf der Zelloberfläche, die für die Erkennung und Beseitigung durch  $CD8^+$  T-Zellen unerlässlich sind. Damit übereinstimmend sind in MCPyV-positiven und MCPyV-negativen MCC alle HLA-Allele herunterreguliert. Interessanterweise konnte ebenfalls ein Zusammenhang zwischen dem Verlust eines speziellen  $CD8^+$  T-Zellen erkennenden HLA-Allels und der Entwicklung einer Chemoresistenz gegenüber zellulären Immuntherapien beschrieben werden [108][109].

Neben dem Herunterregulieren von zellulären Rezeptoren für die Immunerkennung werden häufig auch inhibitorische Rezeptoren auf aktivierten T-Zellen durch chronische Exposition mit den T-Ag oder durch eine persistente Infektion hochreguliert. Mit der Zeit kann dies zu einem Zustand der Überreizung und einem damit einhergehenden Funktionsverlust der T-Zellen führen, was als T-Zell-Erschöpfung bezeichnet wird. In MCC äußert sich dies durch die Expression der T-Zell-Rezeptoren PD-1, CTLA-4 und TIM-3. Interessanterweise konnte

in *in-vitro*-Experimenten die Immunantwort durch eine Behandlung mit den stimulatorischen Zytokinen IL-2 und IL-15 oder durch Co-Kultivierung mit PD-1 oder TIM-3 Inhibitoren reaktiviert werden, was für den Einsatz von Immun-Checkpoint-Inhibitoren (CPI) in der MCC-Therapie spricht [92][107].

Einen weiteren Mechanismus, um die Immunantwort zu umgehen, stellt die Inaktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch Rezeptoren auf der Zelloberfläche der Tumorzellen dar. Ein Beispiel liefert hier PD-L1, der in MCC sowie auch in vielen anderen Tumoren hochreguliert ist [110]. PD-L1 wird hauptsächlich durch Sekretion von Typ-II-Interferon, welches durch aktivierte T-Zellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) in der Mikroumgebung des Tumors sekretiert wird, auf den Tumorzellen exprimiert. Durch die Bindung an seinen Rezeptor PD-1 kommt es schließlich zur Inaktivierung von T-Zellen [111][112]. Zusätzlich kann PD-L1 sowie auch PD-L2 auf Antigen-präsentierenden Zellen (APC) in der Mikroumgebung des Tumors hochreguliert werden und auf diese Weise die T-Zellantwort im MCC inhibieren [107][113]. Noch unklar bleibt die Rolle der regulatorischen T-Zellen ( $T_{regs}$ ) im MCC.  $T_{regs}$  können CD8<sup>+</sup> T-Zellen und APCs inaktivieren und somit möglicherweise die Ausbreitung des Tumors unterstützen. Obwohl die Anzahl an  $T_{regs}$  im Tumorgewebe deutlich höher als in normaler Haut ist, konnten diese bislang nicht eindeutig mit einer besseren oder schlechteren Prognose assoziiert werden [114].

Allerdings ist nicht nur die T-Zellantwort des adaptiven Immunsystems von wesentlicher Bedeutung für die Immunantwort, sondern auch das angeborene Immunsystem. So ist einer der zentralen Regulatoren für die DNA-Sensorik der angeborenen Immunantwort, das STING (engl. *stimulator of IFN genes*)-Protein in allen MCCs herunterreguliert. Zudem resultiert Expression von STING in MCC-Zelllinien in einer Reaktivierung der Produktion inflammatorischer Zytokine und Chemokine sowie in erhöhter T-Zell-Migration [115]. Außerdem zeigt vor allem die Infiltration von NK-Zellen in das Tumorgewebe eine verbesserte MCC-Prognose [102][103][104]. In vielen MCCs sind die MHC-Klasse I Moleküle MIC A und MIC B auf der Zelloberfläche durch die T-Ag mittels epigenetischer Mechanismen herunterreguliert und fehlen in MCC-Zelllinien sogar komplett, was zu einer Inhibierung der NK-Zellen-vermittelten Zellyse führt [116]. Dieser Ansatz wird auch für innovative Therapien benutzt, in denen aktivierte NK-Zellen infundiert oder die Expression von MIC A und MIC B artifiziell induziert wird [114].

Des Weiteren konnte in MCC-Gewebe eine Infiltration von  $CD68^+$  und  $CD163^+$  Makrophagen beobachtet werden, welche innerhalb der Tumormikroumgebung die Hauptquelle für die Expression von PD-L1 darstellen. Diese Tumor-assoziierten Makrophagen sind meist M2-Makrophagen und üben durch Produktion von Zytokinen immunsuppressive Effekte aus, indem sie die Immunantwort modifizieren und das Tumorstadium und die Gefäße durch Produktion von Wachstumsfaktoren wie VEGF (engl. *Vascular Endothelial Growth Factor*) verstärken. Obwohl infiltrierende Makrophagen in MCPyV-positiven MCC deutlich häufiger auftreten als in MCPyV-negativen MCC, konnten diese im Gegensatz zur Infiltration von T-Zellen und NK-Zellen noch nicht mit einer MCC-Verlaufsprognose assoziiert werden [104][117].

Aufgrund der Tatsache, dass über 80 % aller MCCs MCPyV-positiv sind, wird vermutet, dass vor allem die T-Ag eine entscheidende Rolle für die Immunogenität besitzen und die adaptive Immunantwort induzieren. Diese Annahme wird dadurch bestärkt, dass die T-Ag in den meisten Tumoren überexprimiert sind und ca. 50 % der Patienten Antikörper gegen MCPyV-LT aufweisen [93][94][118]. Jedoch gibt es bislang keine Hinweise darauf, dass MCPyV-positive MCC immunogener sind als MCPyV-negative MCCs. Des Weiteren konnten MCPyV-spezifische  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen sowohl im Blut als auch im Tumor von Patienten mit MCPyV-positiven MCC nachgewiesen werden [119][120]. Damit einhergehend konnten auf molekularer Ebene bisher einige Effekte der T-Ag auf das Immunsystem beschrieben werden. So konnten Shahzad et al. [121] nachweisen, dass das LT-Ag des MCPyV, ebenso wie das des BKPyV und andere Tumorstämme (EBV, HBV und HPV), wirkungsvoll die Genexpression des TLR9-Rezeptors über die direkte Interaktion mit den  $C/EBP\alpha$  und  $C/EBP\beta$  Transaktivatoren herunterregulieren kann. Auf diese Weise und zusätzlich durch die indirekte Interaktion des MCPyV-sT-Ag mit dem NEMO-Komplex via PP4C wird der  $NF\kappa B$ -Signalweg inhibiert und die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine (IL-12, IL-6, IL-8,  $TNF\alpha$ ) vermindert [122][123]. Des Weiteren induzieren die MCPyV-T-Ag die Expression der Wirts-microRNAs miR-375, miR-30a-3p und miR-30a-5p, die mehrere Gene herunterregulieren, die für die Autophagie verantwortlich sind (ATG7, p62, BECN1) und somit das Zellüberleben in MCC fördern [124]. Zusätzlich wird die Autophagie vermieden, indem das MCPyV-sT-Ag den Akt-mTor-Pathway aktiviert [125].

Abgesehen von den T-Ag zeigen einige wenige Studien, dass die Immunantwort im MCC auch durch die microRNA MCV-miR-M1 beeinflusst werden kann. Diese interagiert beispielsweise mit SP100 und moduliert somit indirekt die Sekretion von CXCL-8 und reguliert auf diese Weise zahlreiche Gene, die in der Immunevasion involviert sind [126].

Zusammenfassend sind sowohl die Tumormikroumgebung als auch die adaptive T-Zellantwort von wesentlicher Bedeutung in der Immunüberwachung. Zahlreiche Therapien zielen daher auf die Wiederherstellung und Aktivierung der Immunantwort ab. Erfolgsversprechend sind vor allem CPIs, die auf die PD-1/PD-L1/L2-Achse abzielen, auf die im nächsten Abschnitt genauer eingegangen wird.

### **1.3.3 Therapiemöglichkeiten**

In den letzten Jahren konnten durch das Aufkommen von Immuntherapien große Fortschritte bei der Behandlung des MCCs erzielt werden. Bei der Standardbehandlung wird grundsätzlich nicht zwischen MCPyV-positiven und MCPyV-negativen MCC unterschieden, da der Einfluss des Status auf den klinischen Verlauf nicht eindeutig geklärt ist [34][127][128][129]. Die Ersttherapie für lokale MCCs, die sich noch nicht weiter ausgebreitet haben, besteht standardmäßig in der operativen Entfernung des Primärtumors in Kombination mit nachfolgender Radio- und Chemotherapie. In bis zu 60 % der Fälle ist diese Erstbehandlung erfolgreich und 10 % der Fälle können auf diese Weise sogar vollständig kuriert werden [130][131][132][133]. Problematisch ist jedoch die vergleichsweise hohe Rezidivrate, die bei 30-40 % der Patienten in den ersten zwei Jahren nach der Diagnose liegt [134][135]. Eine weitere Herausforderung der Behandlung besteht darin, dass die Patienten sehr schnell (innerhalb von 3 Monaten) eine Chemoresistenz gegenüber den verabreichten Chemotherapeutika aufbauen und der Behandlungserfolg mit weiteren Behandlungen deutlich abnimmt (20 %) [130][131][132][133]. Außerdem zeigt die Chemotherapie bei Patienten fortgeschrittenen Alters häufig keine Wirkung.

Bis zum Jahr 2017 konnten auch Patienten mit fortgeschrittenem MCC nur mit konventioneller Chemotherapie behandelt werden, da noch keine Medikamente für die Behandlung zugelassen waren. Erst mit zunehmendem Verständnis über die Rolle des Immunsystems in MCC, und speziell mit dem Einsatz von CPIs, konnten die Behandlungsmöglichkeiten in den letzten

Jahren revolutioniert werden. Vielversprechend sind vor allem CPI gegen den Immunrezeptor PD-1 und seine Liganden PD-L1 und PD-L2. Hier konnte Avemulab im März 2017 in den USA und wenig später auch in Europa als erstes Medikament zur Behandlung von fortgeschrittenen MCCs zugelassen werden [29]. Avemulab ist ein monoklonaler Antikörper, der PD-L1 blockiert und somit die Interaktion mit PD-1 verhindert. Mittlerweile wird dieser als Standardbehandlung für fortgeschrittene, bereits metastasierte MCCs verwendet. Der Behandlungserfolg für Avemulab (und andere CPIs) liegt hier bei 51 %, davon konnten 22 % der Patienten vollständig geheilt werden und 29 % der Patienten sprachen zumindest teilweise auf die Behandlung an [136]. Aus diesem Grund ist es dringend notwendig, eine alternative Therapie für die Patienten zu finden, die nicht auf die Behandlung reagieren. Außerdem wird weiterhin nach adäquaten Biomarkern und prognostischen Markern für die Immunantwort gesucht, die darauf hinweisen, ob die Behandlung mit PD-1-Inhibitoren erfolgversprechend ist [29].

Weitere monoklonale Antikörper gegen PD-L1 (Pembrolizumab und Nivolumab) und ein weiterer CPI (Ipilimumab), der die CTLA-4 Achse der Immunantwort blockiert, sind bereits für die Behandlung von anderen Hauttumoren zugelassen. In klinischen Studien werden diese für die MCC-Behandlung noch auf ihre Wirksamkeit und Sicherheit vor allem in ihrer Kombination getestet. Als CPIs der nächsten Generation werden außerdem Inhibitor-Moleküle (z.B. LAG-3, TIM-3 und TIGIT [137]) individuell und in Kombination getestet, die von T-Zellen in der Mikroumgebung des Tumors exprimiert werden und ebenfalls auf die PD-1/PD-L1 Achse abzielen. Aber auch alternative immunbasierte Strategien, wie die Antigen-Präsentation und die Produktion pro-inflammatorischer Signale zu stimulieren, sowie die Co-Stimulation von T-Zellen anzuregen, werden derzeit genauer als Behandlungsmöglichkeit untersucht [29]. Auch die Umkehrung anderer Tumor-vermittelter Mechanismen zur Immunevasion, wie u.a. die Blockierung des „*don't eat me*“- Signals CD47, welches mit dem SIRP $\alpha$ -Rezeptor auf der Makrophagenoberfläche interagiert, und mit der Aktivierung der Immunantwort einhergeht, ist vielversprechend [138][139]. Einen weiteren vielversprechenden Ansatz bieten außerdem zellbasierte Therapien, wie der Einsatz von NK-Zellen oder der adoptive T-Zelltransfer. So war es bereits möglich, einen Patienten mit fortgeschrittenem MCC mittels *ex vivo* expandierten polyklonalen MCPyV-LT-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Kombination mit

lokaler Administration von  $\text{IFN}\gamma$  zur Stimulation der HLA-I Expression im Tumor erfolgreich zu behandeln [29][140].

Trotz vieler Fortschritte, die in den letzten Jahren durch die Immuntherapie erzielt werden konnten, bleibt es in Zukunft wichtig, alternative Behandlungsmethoden zu erforschen, da nur 50 % der Patienten auf die Standard-Therapie mit CPIs ansprechen. Eine weitere Herausforderung bleibt es ebenfalls, einen prognostischen Marker für die MCC-Therapie mit PD-1-Inhibitoren zu identifizieren, um die Behandlung zu optimieren und keine Zeit zu verlieren.

## 1.4 Das Merkelzell-Polyomavirus

### 1.4.1 Epidemiologie

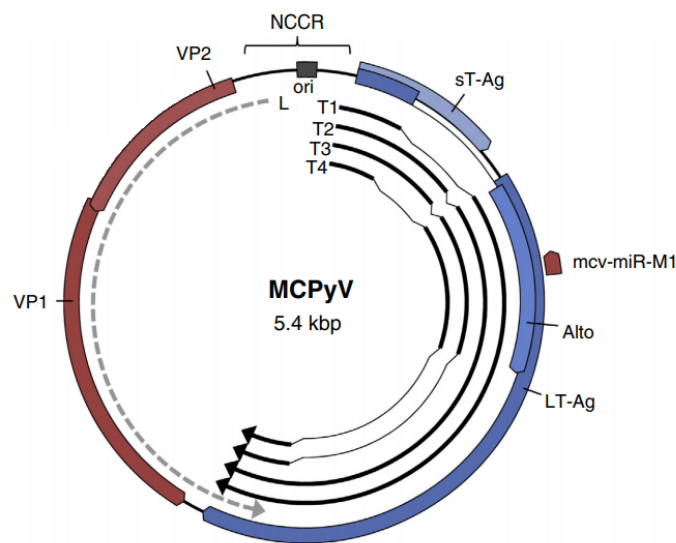
Ähnlich wie Herpesviren führt eine Infektion mit Polyomaviren zu einer lebenslangen Persistenz [141]. Das MCPyV konnte in Hautabstrichen isoliert werden: in  $\geq 80\%$  per Polymerasekettenreaktion (PCR) untersuchten Hautabstrichen kann das Virus nachgewiesen werden [10][142]. Außerdem sind in 42-80 % der Bevölkerung spezifische Antikörper gegen das MCPyV-Kapsidprotein VP1 im Blut nachweisbar [90][91][143][144]. Während in pränatalen Blutproben noch keine Antikörper gegen das VP1-Protein nachgewiesen werden können [145], erhöht sich die MCPyV-Seropositivität hingegen deutlich in Kleinkindern [146]. Daher wird davon ausgegangen, dass die Infektion bereits in der frühen Kindheit stattfindet und das Virus mit der Erstinfektion eine lebenslange Persistenz im Wirt etabliert [10]. Die Infektion verläuft meist asymptomatisch und bleibt unentdeckt [147].

Der Nachweis des MCPyV auf der Haut [10], in zahlreichen weiteren Körperflüssigkeiten [148], zusammen mit dem Nachweis im Abwasser [149] und auf verschiedenen Oberflächen in der Umwelt [150] deutet daraufhin, dass das Virus hauptsächlich durch Schmierinfektion und/oder fäkal-oral übertragen wird.

### 1.4.2 Der Genomaufbau des MCPyV

Das Genom des MCPyV ähnelt stark dem Genom anderer Polyomaviren und besteht aus einer zirkulären, doppelsträngigen DNA von 5,4 kbp Größe. Es handelt sich um ein unbehülltes Virus, dessen Genom von einer ikosaederischen Kapsidhülle umschlossen wird. Das Virusgenom wird in eine frühe und eine späte Region, sowie eine nicht kodierende Kontrollregion (engl. *non-coding-control-region*, NCCR) unterteilt (Abbildung 4). Die NCCR enthält sowohl Promotorelemente für die Expression der frühen und späten Gene als auch den viralen Replikationsursprung (engl. *origin of replication*, ori) [21][151]. Die frühe Region wird in erster Linie in der initialen Phase einer Infektion exprimiert und kodiert für drei verschiedene T-Ag, die durch alternatives Spleißen erzeugt werden: LT-Ag, sT-Ag und 57kT-Ag [1][20]. Auf die Eigenschaften und Struktur der T-Ag wird detailliert in Abschnitt 1.4.4 eingegangen. Zusätzlich wird durch einen alternativen Leserahmen ein ALTO-Protein (engl. *Alternate*

*frame of the Large T open reading frame*) erzeugt. Die Funktion von 57kT-Ag und ALTO in der viralen Replikation wurden bisher noch nicht vollständig geklärt [152]. In der späten Phase einer Infektion werden die beiden Kapsidproteine VP1 und VP2 transkribiert, deren Genprodukte das Viruskapsid formen [153]. Außerdem kodiert das MCPyV-Genom eine microRNA (mcv-miR-M1), die im Bereich der frühen Region lokalisiert ist und komplementär zur DNA-Sequenz ist. Durch die Komplementarität ergibt sich, dass die Transkripte der frühen Region abgebaut werden. Auf diese Weise reguliert das MCPyV die Expression der frühen Genprodukte, eine wichtige Funktion für das Virus, um durch das Immunsystem unerkant im Wirt zu persistieren [154][155][156].



**Abbildung 4 Schematische Darstellung des MCPyV-Genoms.** Die frühe Genregion (blau) kodiert die T-Ag, die späte Genregion (rot) hingegen kodiert die Strukturproteine VP1 und VP2, sowie die virale micro-RNA mcv-miR-M1, welche *antisense* zur DNA-Sequenz verläuft. Durch alternatives Spleißen der frühen Region entstehen die verschiedenen T-Ag-Transkripte LT-Ag (T1), sT-Ag (T2-T3) und 57kT-Ag (T4). Frühe und späte Genregion werden durch die nicht-kodierende Kontrollregion (NCCR) separiert, die den viralen Replikationsursprung (*ori*) und wichtige Promotorelemente beherbergt. Entnommen und modifiziert aus [21].

### 1.4.3 Viraler Lebenszyklus des MCPyV

Die Wirtszelle des MCPyV konnte bislang nicht eindeutig identifiziert werden. Da das MCPyV jedoch auf der Haut nachgewiesen werden kann und die mit dem MCPyV assoziierte Erkrankung, das MCC, in der Haut lokalisiert ist [10][142], wird das Reservoir des MCPyV ebenfalls in der Haut vermutet. Obwohl Liu et al. im Jahr 2016 humane dermale Fibroblasten als putative Wirtszelle des MCPyV veröffentlicht haben [74], steht eine unabhängige



Bestätigung durch andere Arbeitsgruppen sowie eine Bestätigung in *in-vivo*-Experimenten noch aus, sodass die Wirtszelle für das MCPyV noch immer kontrovers diskutiert wird. Das unvollständige Wissen über das natürliche Reservoir des MCPyV erschwert die Etablierung eines permissiven Modellsystems zur weiteren Untersuchung des Virus. Bislang konnte von daher nur mit einem semi-permissiven System gearbeitet werden, in welchem ein rekombinant hergestelltes MCPyV-Genom mittels Transfektion in die Zelle eingebracht wird. Mit Hilfe dieses semi-permissiven Systems können zwar biologische Prozesse, wie die DNA-Replikation und Transkription untersucht werden, jedoch können auf diese Weise keine infektiösen Viruspartikel produziert werden [57][157]. Aufgrund des Fehlens eines vollständig permissiven Infektionssystems und Limitierungen in *in-vitro* und *in-vivo* Transformationsmodellen, wurden daher vor allem MCC-Zelllinien untersucht, die aus Patienten isoliert wurden, um die Biologie des MCPyV weiter zu erforschen. Obwohl bereits einige MCC-Zelllinien etabliert werden konnten, sind diese häufig schwierig *in-vitro* zu kultivieren und nur wenige wachsen effizient ohne die Zugabe von Supplementen [55]. Von diesen konnten die MCC-Zelllinien WaGa [82], Mkl-1 [158], Ms-1 [159] und BroLi [82] im Bezug auf die Integration des MCPyV, die Expression der viralen Proteine und die Induktion von Tumoren in Xenograft-Mausmodellen ausführlich untersucht werden [77][82][159][160][39]. Trotz alledem bleibt der virale Lebenszyklus für das MCPyV noch wenig verstanden. Im Gegensatz dazu konnte der virale Lebenszyklus intensiv für den Modellorganismus SV40 und das Mauspolyomavirus untersucht und beschrieben werden, welche einige Ähnlichkeiten zum viralen Lebenszyklus des MCPyV aufweisen [1].

Der Lebenszyklus des MCPyV lässt sich grob in eine frühe und eine späte Phase der Infektion unterteilen. Mit der Anheftung der Viruspartikel an die Zelloberfläche, die beim MCPyV in erster Linie über Glycosaminoglykane, wie Heparan- und Chondroitinsulfat, und sialisierte Co-Faktoren vermittelt wird [161][162], beginnt die erste Phase der Infektion, in welcher die Gene der frühen Region exprimiert werden. Polyomaviren verfügen über einen hochspezifischen Zelltropismus und infizieren vorwiegend ruhende Zellen [1]. Um trotzdem die DNA-Replikationsmechanismen der Wirtszelle für sich nutzen zu können, benutzen sie verschiedene Mechanismen, durch welche diese zugänglich gemacht werden können. Es hat sich gezeigt, dass vor allem die Expression des LT-Ag essentiell für die Initiation der viralen DNA-Replikation und die Regulation des Zellzyklus ist. Aus diesem Grund besitzen die LT-Ag aller Polyomaviren ein konserviertes LxCxE-Motiv, mit welchem sie das zelluläre Retinoblastoma-

Protein (Rb) binden und inaktivieren können [81][85]. Auf diese Weise wird der Zellzyklus in die S-Phase vorangetrieben, wodurch die zellulären DNA-Replikationsmechanismen des Wirtes aktiviert und für das MCPyV zugänglich gemacht werden. Zusätzlich, wie bei allen Polyomaviren der Fall, bindet auch beim MCPyV das LT-Ag mit seiner *Origin Binding Domain* (OBD) an das konservierte GRGGC-Motiv innerhalb des viralen *ori*, um die DNA-Replikation zu initiieren. Das LT-Ag fungiert hier als Helikase, indem es die virale DNA entwindet und somit den Grundstein für die virale Replikation legt [57][156][163][164]. Auf die Rolle der T-Ag in der Regulation des Zellzyklus und in der Transformation wird detaillierter im Abschnitt 1.4.4 eingegangen.

Trifft das MCPyV hingegen auf eine nicht-permissive Zelle, kann dieses entweder gar nicht erst in die Zelle eindringen, weil kein spezifischer Rezeptor für den Zelleintritt vorhanden ist, oder es kommt, wie in allen PyV, nach dem Eindringen während des Replikationszyklus zum Replikationsblock, da die Replikation durch fehlende Wirtsfaktoren nicht unterstützt wird. Werden dann die PyV-T-Ag exprimiert, führen sie die Zelle wie zuvor beschrieben dauerhaft in die S-Phase, da keine Virusproduktion und Viruspartikelfreisetzung stattfinden kann. Bei der anschließenden Zellteilung kann entweder das virale Episom verloren gehen und der ursprüngliche Phänotyp wiederhergestellt werden (abortive Transformation) oder das virale Episom kann in das Wirtsgenom integrieren und zur Transformation und darauffolgender Tumorgenese führen [165][166][167].

Mit dem Beginn der viralen DNA-Replikation setzt häufig auch die späte Phase der Infektion ein, infolgedessen die Expression der Strukturproteine VP1 und VP2 erfolgt [10][157]. Im Gegensatz zu anderen Polyomaviren konnte für das MCPyV bis dato keine Expression eines VP3 Strukturproteins beobachtet werden [153][156]. Durch die virale DNA-Replikation werden Viruspartikel im Nukleus akkumuliert und anschließend an der Kernmembran durch die Polymerisierung der Strukturproteine in die einzelnen Viruskapside verpackt. Wie die reifen Viruspartikel letztendlich freigesetzt werden, ist für das MCPyV noch nicht vollständig geklärt. Für die anderen humanpathogenen Polyomaviren BKyV und JCPyV sowie für SV40 konnte hingegen bereits nachgewiesen werden, dass die Viruspartikel durch Lyse der Wirtszelle freigesetzt werden [1][168].

Der Übergang von der Expression der frühen zur Expression der späten Gene wird durch unterschiedliche Mechanismen vermittelt, wie u.a. zelluläre Transkriptionsfaktoren, Veränderungen in der RNA Prozessierung und LT-Bindung an der NCCR sowie dessen Umlagerung [1][169][170][171][172][173]. Im Gegensatz zu anderen Polyomaviren konnte für das MCPyV bislang noch kein Faktor identifiziert werden, der effizient die Expression der späten Genprodukte induziert. Auch diese Tatsache ist möglicherweise einer der Gründe, weshalb bislang kein vollständig permissives Modellsystem etabliert werden konnte. Infolgedessen konnten auch die Mechanismen, die zur Persistenz des MCPyV im Menschen führen bzw. diese erhalten, bislang nicht genauer untersucht werden. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass die miRNA-MCV-m1 für die Persistenz des Virus von entscheidender Bedeutung sein könnte. Da diese *antisense* und vollständig komplementär zur LT mRNA verläuft, ist sie in der Lage dessen Expression herunterzuregulieren und vermutlich somit die Persistenz des MCPyV zu unterstützen [156].

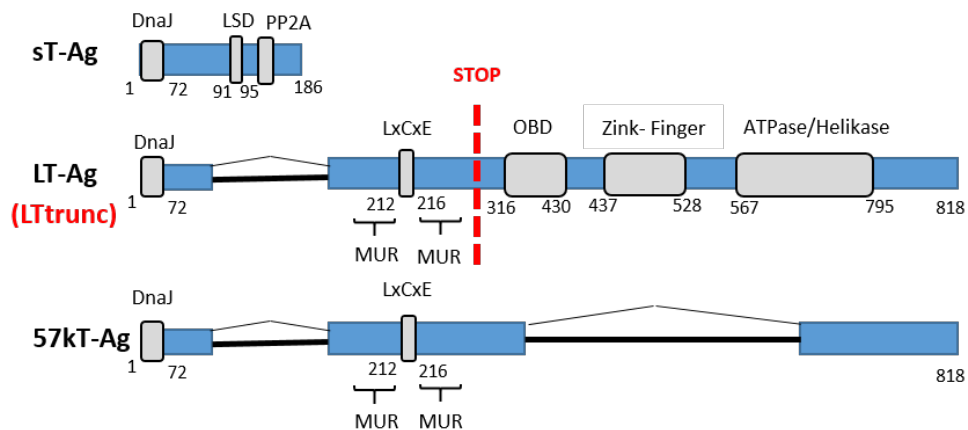
#### 1.4.4 Die MCPyV-Tumorantigene

Obwohl nachgewiesen werden konnte, dass die T-Ag anderer humaner Polyomaviren, wie JCV und BKV, stark transformierend in Nagetieren sind, ist das MCPyV das einzige humane Polyomavirus, welches bisher mit der Tumorgenese im eigenen Wirt assoziiert werden konnte [174]. Um das onkogene Potential des MCPyV besser zu verstehen, wurde deshalb in den letzten Jahren verstärkt daran gearbeitet die Funktion der beiden MCPyV-T-Ag, LT-Ag und sT-Ag, zu entschlüsseln. Zwar konnten sowohl durch *in-vitro* als auch einige *in-vivo*-Experimente Erkenntnisse über die transformierenden Eigenschaften der MCPyV-T-Ag hinzugewonnen werden, trotzdem bleiben noch viele Fragen zur Tumorgenese unbeantwortet. Im Folgenden wird zusammengefasst, was bisher über die individuelle Struktur und Funktion der T-Ag, LT-Ag und sT-Ag, sowie ihre bisher identifizierten Interaktionspartner bekannt ist. Die Funktion des 57-kT-Ag und des ALTO-Proteins hingegen sind bisher nur wenig verstanden und werden an dieser Stelle nicht weiter diskutiert.

Die MCPyV-T-Ag sind in der frühen Genregion lokalisiert und werden somit vor allem in der frühen Phase einer MCPyV-Infektion exprimiert. Eine schematische Übersicht der MCPyV-T-Ag ist in Abbildung 5 dargestellt. Durch die Integration des viralen Genoms in

die Wirts-DNA werden das sT-Ag und die verkürzte Form des LT-Ags,  $LT_{trunc}$ , konstitutiv im Tumor exprimiert. Aufgrund der verkürzenden Mutationen des LT-Ags im Tumor wird vermutet, dass  $LT_{trunc}$  für die Transformation entscheidend ist, und das LT-Ag voller Länge hingegen eher für die Infektion von Bedeutung sein könnte. Houben et al. [82][84] konnten nachweisen, dass sowohl MCPyV-positive MCC-Zelllinien *in-vitro* als auch MCC-Tumore *in-vivo* abhängig von der Expression der T-Ag sind. So führt der Knockdown beider T-Ag zu einer Verminderung der Zellproliferation und löst Apoptose aus. Wird in MCPyV-positiven Zellen hingegen nur das sT-Ag herunterreguliert, reduziert dies zwar ebenfalls das Zellwachstum, löst jedoch nicht den Zelltod aus [125].

Alle T-Ag verfügen über einen identischen N-Terminus, der die DnaJ-Domäne beherbergt. Diese ist, wie auch in SV40 [175] und BKPyV [89], essentiell für die Bindung des zellulären Hitzeschockproteins 70 (HSC70), welche für die Inaktivierung des Rb-Proteins und dem damit einhergehenden Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus unerlässlich ist [176].



**Abbildung 5 Schematische Darstellung des MCPyV-T-Antigen Lokus.** Die frühe Region des MCPyV-Genoms kodiert für die drei verschiedenen Tumorantigene LT-Ag, sT-Ag und 57kT-Ag, die durch alternatives Spleißen erzeugt werden. Alle T-Ag teilen sich die N-terminale DnaJ-Domäne. Das sT-Ag verfügt außerdem über ein PP2A-Bindemotiv und die LSD-Domäne. Das LT-Ag teilt sich mit dem 57kT-Ag die Rb-Bindedomäne (LxCxE), welches jeweils von den beiden für das MCPyV einzigartigen MUR-Regionen flankiert wird. Zusätzlich besitzt das LT-Ag eine Origin-bindende Domäne, ein Zinkfinger-Motiv und eine Helikase-ATPase Domäne, um die virale DNA-Replikation zu initiieren. Diese Domänen werden jedoch in der verkürzten Form  $LT_{trunc}$  im MCC durch die Integration des Virus in das Wirtsgenom eliminiert (STOP-Mutationen, rot). LSD: *Large-T stabilizing domain*; PP2A: *Protein-Phosphatase 2A*; MUR: *Merkel-Unique-Region*; LxCxE: *Rb binding motif*; OBD: *origin binding domain*. Angegeben sind die Aminosäurepositionen der bekannten funktionalen Domänen des sT- und LT-Ags.

**Das LT-Tumorantigen** besitzt zudem mit dem LxCxE-Motiv eine Rb-Bindedomäne, welche von den sogenannten *MCPyV-Unique-Regions* (MUR) flankiert wird, eine Origin-bindende Domäne (OBD), ein Zinkfinger-Motiv und eine Helikase-ATPase-Domäne [20]. Obwohl das MCPyV-LT-Ag einige konservierte Funktionen mit anderen PyV-T-Ag teilt, liegt die Aminosäuresequenz-Identität mit den LT-Ag anderer humaner Polyomaviren bei nur etwa 30 % [20][148]. Von zentraler Rolle in der Transformation scheint die Rb-Bindedomäne zu sein, da sie in allen verkürzenden Mutationen immer erhalten bleibt. Verstärkt wird diese Vermutung durch die Erkenntnis, dass eine intakte Rb-Bindedomäne essentiell für die Zellproliferation und für das Wachstum des Tumors ist. Die Bindung des Rb-Proteins erfolgt, wie in anderen Polyomaviren, über das LxCxE-Motiv und aktiviert zusammen mit der Bindung des HSC70-Proteins durch die DnaJ-Domäne die E2F-abhängige Transkription [85][176]. Dies ermöglicht es den Zellen, direkt in die S-Phase des Zellzyklus überzugehen, sodass die Wirts-Replikationsmaschinerie zugänglich wird. Flankiert wird das LxCxE-Motiv durch die MUR1 und MUR2, die einzigartig für das MCPyV-LT sind und nicht in anderen Polyomaviren vorkommen. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass diese mit verschiedenen E3-Ubiquitin-Ligasen interagieren und somit essentiell für die Stabilität des LT-Proteins, sowie dem damit verbundenen Zellwachstum sind und auch wichtig für die virale Latenz sein könnten [177]. Als einzige Interaktionspartner der MUR1 konnten bisher Brd4 (engl. *Bromodomain-containing protein 4*) [178] und das lysosomale Protein Vam6p [57][179] identifiziert werden, die einen positiven bzw. negativen Effekt auf die virale Replikation ausüben. Im Gegensatz zur positiven Selektion für den Erhalt des N-Terminus, wirkt ein negativer Selektionsdruck gegen den Erhalt des C-Terminus. So kann das MCPyV durch den Verlust der OBD und der Helikase-Domäne nicht mehr an das virale Genom binden und das Virus wird replikationsinkompetent [25][55].

Die Integration des viralen Genoms in das Wirtsgenom führt somit zur Expression der verkürzten Form des LT-Ags,  $LT_{trunc}$  [20][81]. In MCC-Zelllinien und MCC-Tumoren können  $LT_{trunc}$  verschiedenster Längen nachgewiesen werden, die alle mit einem Verlust der viralen Replikation einhergehen. So zeigt  $LT_{trunc}$  zusammen mit dem sT-Ag in *in-vitro*-Experimenten mit primären Rattenfibroblasten ein deutlich erhöhtes Transformationspotential, wohingegen das Vollängen-LT-Ag zusammen mit dem sT-Ag kaum transformierend ist [85]. Dies begründet sich wahrscheinlich dadurch, dass das  $LT_{trunc}$  eine deutlich stärkere Bindungsaffinität zum Rb-

Protein aufweist als das Volllängen-LT-Ag. Darüber hinaus weist das  $LT_{trunc}$  eine geringere Ubiquitinierung auf, als das Volllängen-LT, was vermutlich mit einer höheren Stabilität des  $LT_{trunc}$  und der Interaktion mit der Ubiquitin-Ligase USP7 einhergeht [180]. Eine wichtige Rolle spielt in diesem Zusammenhang auch die Interaktion des sT-Ags mit der Ubiquitinligase Fbw7, die im nächsten Abschnitt genauer beschrieben wird. Des Weiteren kann das LT-Ag im Gegensatz zu  $LT_{trunc}$  indirekt die p53-abhängige Transkription inhibieren [85]. In MCC-Zelllinien und MCC-Tumoren hingegen wird p53 jedoch nur gering exprimiert. Kürzlich konnte allerdings nachgewiesen werden, dass durch die Bindung des LT-Ags an das Rb-Protein p53 aktiviert wird und, im Gegensatz dazu, die Co-Expression des sT-Ags die p53-Aktivierung reduziert. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das sT-Ag dabei über den sT-MycL-EP400-Komplex agiert und über die E3-Ubiquitin-Ligasen MDM2 und MDM4 als negativer Regulator von p53 wirkt [181].

Auf weitere Funktionen und Interaktionspartner des LT-Ag wird an dieser Stelle nicht genauer eingegangen, da in dieser Arbeit die Rolle des sT-Ags im Vordergrund steht.

**Das sT-Tumorantigen** besteht aus 186 Aminosäuren und teilt davon N-terminal 78 Aminosäuren mit dem LT-Ag. Im Gegensatz zum LT-Ag ist das sT-Ag nicht von den verkürzenden Mutationen der frühen Region betroffen. Die Rolle des sT-Ag in der Tumorgenese ist vielfältig und bisher noch nicht vollständig geklärt, jedoch gibt es zahlreiche Hinweise, die auf eine Beteiligung des sT-Ag in Transformation und vor allem in der Metastasierung sprechen. Dies steht im Kontrast zu anderen Polyomaviren, in denen das LT-Ag die entscheidende Rolle für die Transformation darstellt. So konnte gezeigt werden, dass das sT-Ag ohne die Anwesenheit des LT-Ags primäre Ratten-Fibroblasten transformieren kann [125]. Kontrovers diskutiert, jedoch vermutlich von wesentlicher Bedeutung ist hierbei die LT-stabilisierende-Domäne (engl. *LT-Stabilization-Domain*, LSD), mittels welcher das sT-Ag die E3-Ubiquitin-Ligase Fbw7 bindet [177][182][183]. Die allosterische Bindung über die positive Ladung von Fbw7 hat eine Inhibierung des  $SCF^{FBW7}$ -Ligase-Komplexes zur Folge, wodurch das LT-Ag stabilisiert wird und dessen Effekte auf den Zellzyklus und die DNA-Replikation verstärkt werden [184]. Zusätzlich wird der Abbau weiterer Zielproteine von Fbw7 inhibiert, darunter verschiedene Onkogene wie c-Myc oder Cyclin E, was entscheidend für die Transformation sein könnte [182]. Wie auch die sT-Ag anderer Polyomaviren bindet das MCPyV sT-Ag

ebenfalls die Protein-Phosphatase 2A (PP2A) [185]. Anders als das SV40 sT-Ag bindet das MCPyV sT-Ag jedoch nicht die PP2A A $\alpha$  Untereinheit, sondern die PP2A A $\beta$  Untereinheit, und PP2A scheint in diesem Fall nicht ausschlaggebend für die Transformation *in-vitro* und *in-vivo* zu sein, wird jedoch für eine effiziente virale Replikation benötigt [122][125][186][187]. Zusätzlich zu PP2A konnte mit PP4C (engl. *protein phosphatase 4 catalytic subunit*) ein weiterer Interaktionspartner aus der Familie der Protein-Phosphatasen identifiziert werden. Das sT-Ag bindet an die regulatorische Untereinheit PP4R1, wodurch ein Komplex mit PP4C gebildet wird und dem sT-Ag zusätzlich eine Interaktion mit dem NF $\kappa$ B essential modulator (NEMO) ermöglicht wird. Anschließend inhibiert das sT-Ag die IKK $\alpha$ /IKK $\beta$ -vermittelte Phosphorylierung von I $\kappa$ B, woraufhin das NF $\kappa$ B-Heterodimer nicht mehr in den Zellkern transportiert werden kann und die NF $\kappa$ B-abhängige Transkription inhibiert wird. Diese Interaktionen mit PP4C und NEMO sind einzigartig für das MCPyV sT [188].

NF $\kappa$ B-abhängige Transkriptionsfaktoren sind essentiell in vielen Signalwegen wie Zellproliferation, Apoptose und in der Immunantwort, wodurch das sT-Ag die Transformation unterstützen könnte. In diesem Sinne konnten Wang et al. [189] kürzlich zeigen, dass das MCPyV sT-Ag im Gegensatz zu den kutanen Polyomaviren HPV6 und HP7 nicht nur den kanonischen NF $\kappa$ B-Signalweg inhibiert, sondern auch mittels seiner LSD-Domäne und epigenetischer Regulation den nicht-kanonischen NF $\kappa$ B-Signalweg auslöst, um die p53-vermittelte Seneszenz zu umgehen und in einem Seneszenz-assoziierten Phänotyp resultiert. Weitere Studien zeigen, dass das sT-Ag, wie auch viele andere Onkoviren, den Akt-mTor-Pathway moduliert. Das MCPyV-sT-Ag inhibiert die Dephosphorylierung des eIF4E-Bindeproteins (4E-BP1) und somit wird dessen Hyperphosphorylierung konserviert, was zu einer Deregulation der Cap-abhängigen Translation führt und die Tumorgenese vorantreiben könnte [125].

Auf eine entscheidende Rolle des sT-Ags in der Metastasierung weist zudem seine Funktion in Tumor-assoziierten-Prozessen wie der Motilität, Migration und Invasion hin. Dementsprechend konnten Whitehouse et al. [190] zeigen, dass das MCPyV sT-Ag die Expression von Proteinen fördert, die für die Mikrotubuli-assoziierte Organisation und Dynamik des Zytoskeletts relevant sind. Vermutlich wird dies ebenfalls durch die zuvor beschriebene Interaktion des sT-Ags mit PP4C induziert, welche einerseits zur gesteigerten Bildung von Filopodien an den Zellen führt und andererseits die Dephosphorylierung des Mikrotubuli-assoziierten Proteins Stathmin

auslöst [190]. Auf diese Weise ist das sT-Ag in der Lage das Zytoskelett zu destabilisieren und die Motilität und Migration der Zellen zu steigern, Prozesse, welche die Metastasierung erleichtern [191]. Außerdem sind für diesen Prozess die zellulären Sheddasen ADAM10 (engl. *A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10*) und ADAM17 [192], sowie die Rho-GTPasen CDC42 und RhoA essentiell [190]. Auch die Modulation von Ionen-Kanälen könnte die Metastasierung favorisieren. So konnte gezeigt werden, dass das sT-Ag die Chlorid-Ionen-Kanäle CLIC1 und CLIC2 hochreguliert und dies die Motilität und Invasion der Zellen beeinflusst [193]. Kürzlich konnte zusätzlich auch eine verstärkte Migration und Invasion der Zellen durch die sT-induzierte Aktivierung des p38-MAPK-Kinase Signalwegs [194] und Induktion der Matrix-Metallo-Protease 9 (MMP-9) [177] beschrieben werden.

Aufgrund des spezie- und zellspezifischen Wirtstropismus von Polyomaviren ist die Etablierung eines geeigneten *in-vivo*-Modells schwierig. Nichtsdestotrotz konnten bisher einige transgene Mausmodelle oder auch Xenograft-Modelle etabliert werden, mit denen vor allem die Tumorgenese und Metastasierung des MCC besser untersucht werden können. So zeigen *in-vivo*-Experimente in transgenen Mäusen, dass allein das sT-Ag transformierend ist und die Expression zusammen mit dem Transkriptionsfaktor ATOH1 (engl. *Atonal BHLH Transcription Factor 1*) zu einem MCC-ähnlichen-Phänotypen führt [187][160]. Des Weiteren konnten Knips et al. [39] durch Injektion der MCC-Zelllinien WaGa und Mkl-1 in Scid-Mäuse das erste *in-vivo*-Modell für MCC-Metastasierung etablieren. Zudem konnte festgestellt werden, dass die sT-Expression innerhalb der Metastasen signifikant höher als im Vergleich zum Primärtumor und den Parentalzelllinien war. Außerdem korreliert erhöhte sT-Expression in den Tumoren mit der Hochregulation von Wachstumsfaktoren und Genen, die in der inflammatorischen Immunantwort von wesentlicher Bedeutung sind [39].

Des Weiteren konnte kürzlich nachgewiesen werden, dass das sT-Ag auch durch epigenetische Mechanismen zur Transformation beitragen könnte. So bindet das MCPyV sT-Ag spezifisch das Myc-Homolog L-Myc und rekrutiert dieses zum EP400-Komplex, welcher an spezifische Gen-Promotoren bindet und auf diese Weise die Genexpression bestimmter Gene reguliert, wie z.B. MDM2, MDM4 [195], LSD1, RCOR2 und INSM1 [196]. Knockdown des LSD1-Repressor-Komplexes geht hingegen mit reduziertem Zellwachstum *in vitro* und *in vivo* einher. Darüber hinaus konnte eine antagonistische Rolle für LSD1 und den nicht-kanonischen BAF (ncBAF) Chromatin-Remodelling-Komplex in der Regulation bestimmter Gene beschrieben



werden [197]. Des Weiteren induziert das MCPyV sT-Ag die (Hyper-)Phosphorylierung des Histons H2AX, Histon 3 und 4 und aktiviert somit durch epigenetische Modifikationen die DNA-Schadensantwort [198].

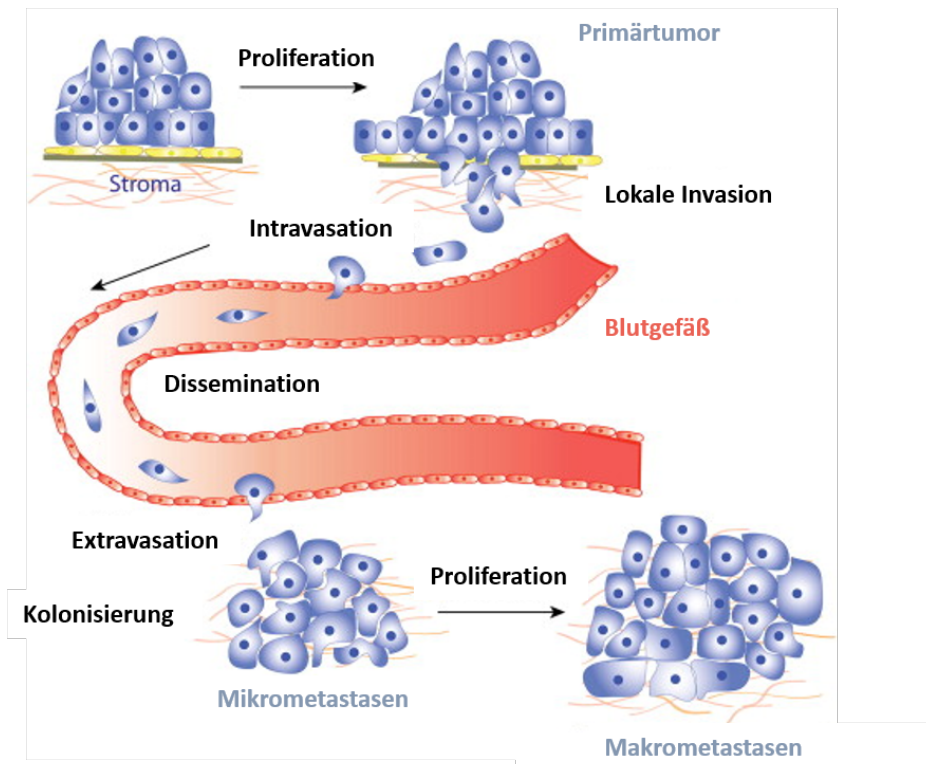
Obwohl viele Faktoren auf eine Beteiligung des sT-Ags an Tumorgenese und Metastasierung hinweisen, bleibt bisher noch ungeklärt, ob das sT-Ag essentiell ist um die Transformation zu induzieren oder erforderlich ist um den transformierten Zustand der Zellen zu erhalten.

## 1.5 Metastasierung

Die Metastasierung maligner Tumorzellen vom Primärtumor in entfernte Organe, ist vermutlich einer der wichtigsten Schritte von Tumorerkrankungen und stellt in über 90 % die Hauptursache für den Tod dar [199]. Obwohl in den letzten Jahrzehnten große Fortschritte in der Behandlung von Primärtumoren erzielt werden konnten, bleibt die Metastasierung in einigen Tumorarten jedoch noch immer eine der größten Herausforderungen. Um neue Therapiemöglichkeiten zu erforschen, ist es daher essentiell die Prozesse der Metastasierung besser zu verstehen [200][201].

Die Ausbreitung des Primärtumors in weitere Organe bzw. Gewebe ist ein komplexer Prozess aus mehreren Schritten, der bis heute noch nicht vollständig verstanden ist. Abbildung 6 zeigt ein schematisches Modell des Metastasierungsprozesses. Als initialer Schritt für die Metastasierung ist die Transformation einer normalen Zelle zur Tumorzelle notwendig, die zu einem unkontrollierten Wachstum der Zellen führt. Hat der Primärtumor eine bestimmte Größe erreicht, separieren sich die Tumorzellen vom Primärtumor und es kommt zur lokalen Invasion, um die Nährstoffversorgung des wachsenden Tumors sicherzustellen. Dazu lagern sich die Tumorzellen an den Wänden der Blutgefäße an und sezernieren u.a. verschiedene Matrix-Metalloproteasen, um die Gefäßwand und die darunterliegende Basalmembran aufzulösen und zu durchdringen. Auf diese Weise gelangen die Tumorzellen in die Blut- bzw. Lymphbahn (Intravasation) und können durch den gesamten Körper transportiert werden (Dissemination). Entgehen die Tumorzellen der Immunantwort und überleben den Transport durch die Blutbahn, kann es zum Eindringen, der sogenannten Extravasation, der Tumorzellen in umliegendes Gewebe kommen. Sind die Zellen in der Lage, sich dort anzusiedeln

(Kolonisierung), weiterhin zu vermehren und zusätzlich neue Blutgefäße auszubilden, entstehen Metastasen. Da all diese Schritte jedoch in einer bestimmten Reihenfolge erfolgen müssen damit es zur Bildung von Metastasen kommt, ist die Metastasierung in den meisten Tumorarten ein höchst ineffizienter Prozess [202][203][204].



**Abbildung 6** Schematisches Modell der verschiedenen Stufen des Metastasierungsprozesses. Ausgelöst durch unkontrollierte Proliferation durchdringen die Tumorzellen des Primärtumors die ECM (Lokale Invasion) und dringen in den Blutkreislauf ein (Intravasation). So können sich die Tumorzellen im gesamten Körper ausbreiten (Dissemination), in entfernte Gewebe eindringen (Extravasation) und sich dort als Mikrometastasen ansiedeln (Kolonisierung). Durch unkontrollierte Proliferation kommt es schließlich zur Bildung von Makrometastasen. Entnommen und modifiziert aus [205].

Da im Rahmen dieser Arbeit die Rolle des sT-Ags in der Metastasierung des MCC analysiert wurde, wird im Folgenden genauer auf die Extravasation von Tumorzellen eingegangen.

### 1.5.1 Extravasation

Einen der entscheidenden Prozesse stellt in der Metastasierung die Extravasation von endothelialen Blutgefäßen dar, wodurch die Tumorzellen in entfernte Gewebe eindringen können. Einen Schlüsselprozess stellt dabei die Anheftung der Tumorzellen an die Endothelzellen der Blutgefäßwand dar. Da auf Tumorzellen häufig die gleichen Oberflächenmoleküle hochreguliert sind, wie auf Leukozyten exprimiert werden, wird vermutet, dass Tumorzellen versuchen die Eigenschaften von Leukozyten zu imitieren und so in der Lage sind in den Blutkreislauf einzudringen. Die Extravasation durch das Endothel ist ein dynamischer Prozess und wird durch eine streng regulierte Signalkaskade, welche durch Selektine, Integrine und Immunglobulin-Zelladhäsionsmoleküle (IgCAMs) vermittelt wird, reguliert [206].

Der initiale Kontakt von zirkulierenden Tumorzellen bzw. Leukozyten mit den Endothelzellen der Blutgefäßwand wird durch Selektine vermittelt [207][208]. Diese gehören zu einer Familie von Zelladhäsionsmolekülen, die aus E-Selektinen (in Endothelzellen), P-Selektinen (in Endothelzellen und Thrombozyten (engl. *platelets*)) und L-Selektinen (in Leukozyten) besteht und bei inflammatorischen Prozessen auf den Endothelzellen hochreguliert werden, um das Eindringen von Leukozyten zu ermöglichen. Sie erkennen sialysierte- und fucosylierte Kohlenhydratstrukturen (z.B. Sialyl-Lewis X/A, CD44, CD24, PSGL-1, uvm.) auf zirkulierenden Zellen. Damit einhergehend konnte außerdem nachgewiesen werden, dass die Expression dieser kanonischen Selektin-Liganden mit erhöhter Metastasierung korreliert und somit zu einer schlechteren Prognose für den Krankheitsverlauf führt [209]. Die Bindung zwischen Selektinen und ihren Liganden an der Zelloberfläche erfolgt dabei  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig und ist abhängig von den dynamischen Scherkräften des Blutstroms innerhalb der Blutgefäße. Diese Wechselwirkungen führen zu einem transienten *Tethering* und *Rolling* der Zellen auf der Zelloberfläche, sodass die intrazelluläre Signalübertragung aktiviert wird [208][210][211]. Dieser erste Selektin-vermittelte Kontakt zwischen Tumorzellen und dem Endothel ist essentiell für die Ausbildung von Metastasen. So konnten *in-vivo*-Experimente zeigen, dass die Injektion humaner Tumorzellen in E- und P-Selektin Knockout-Mäuse die Bildung von Metastasen deutlich reduziert [212][213]. Wenig bekannt ist jedoch bisher, ob artspezifische Unterschiede in den Tumorzell-Liganden bestehen. Allerdings können Interaktionen der Selektine mit ihren Liganden nicht nur unter dynamischen Bedingungen, sondern auch unter

statischen Bedingungen stattfinden. Dies kann z.B. durch mechanische Hindernisse im Blutgefäß ausgelöst werden, was unabhängig vom Durchmesser der Blutgefäße beobachtet werden konnte [209][214][215]. Kürzlich konnten Starzonek et al. [216] zeigen, dass die dynamische und statische Adhäsion in humanen bzw. murinen E/P-Selektinen durch unterschiedliche Liganden vermittelt wird [216].

Parallel mit der initialen Anheftung der Zellen an die Zelloberfläche kommt es vermutlich zur Ausschüttung von Chemokinen und der daraus resultierenden Aktivierung der Integrine in der Basalmembran. Diese gehören ebenfalls zur Gruppe der Adhäsionsmoleküle und vermitteln die feste Adhäsion der Tumorzellen (bzw. Leukozyten) an das Endothel [204][206][210]. Durch die feste Adhäsion wird eine intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst, welche wichtig für diverse zelluläre Funktionen ist und u.a. zum Abbau von Zell-Zellverbindungen zwischen den Endothelzellen führt, sodass die Migration der Zellen durch das Endothel ermöglicht wird. Haben die Tumorzellen bzw. Leukozyten das Endothel erfolgreich durchdrungen, müssen sie im nächsten Schritt die Basalmembran durchqueren, um sich weiter auszubreiten. Dazu sezernieren die Tumorzellen verschiedene MMPs, welche in der Lage sind die Basalmembran abzubauen und zusätzlich die weitere Migration der Zellen im Gewebe zu stimulieren [203][217]. Dies ermöglicht letztendlich zusammen mit der Ausschüttung von Zytokinen die Transmigration der Zellen durch die ECM, sodass die Tumorzellen anschließend in den Blutstrom eindringen, in entfernte Gewebe disseminieren und dort extravasieren können.

Die Liganden auf der Zelloberfläche, mit denen die Selektine und Integrine des Endothels interagieren, sind sehr divers. Aus diesem Grund konnte bisher auch noch nicht vollständig geklärt werden, welche Rezeptoren Tumorzellen genau für welchen Schritt der lokalen Invasion und Extravasation verwenden. Hier spielt höchstwahrscheinlich auch die Art des Tumors eine Rolle [202]. Diese Liganden im MCC zu identifizieren könnte von wesentlicher Bedeutung sein, um die Ausbreitung des Tumors zu verhindern und neue Therapiemöglichkeiten für die MCC-Behandlung eröffnen.

## 1.6 Ziel dieser Arbeit

Das humane MCPyV ist nachweislich die Ursache für die Entstehung von über 80 % aller MCC, einem seltenen, jedoch höchst aggressivem Hauttumor [20]. Interessanterweise ist das MCPyV das einzige humane Polyomavirus, welches bekannterweise Tumorgenese in seinem eigenen Wirt auslösen kann. Um die virale Tumorgenese durch das MCPyV besser zu verstehen und damit auch mögliche neue therapeutische Ansätze entwickeln zu können, wurde in den letzten Jahren verstärkt daran gearbeitet, die Funktion der beiden MCPyV kodierten Tumorantigene, LT- und sT-Ag, zu entschlüsseln [21][25][82]. Im Gegensatz zu anderen Polyomaviren, bei welchen das LT-Ag von entscheidender Bedeutung für die Transformation ist, gibt es für das MCPyV hingegen zahlreiche Hinweise, dass vor allem dem sT-Ag eine besondere Rolle in der Tumorumitiation und insbesondere in der Tumorprogression bzw. Metastasierung zukommt [39][125][187][160]. Durch Limitierungen in *in-vitro*- und in *in-vivo*-Transformationsmodellen sowie kontroverser Theorien über die Ursprungszelle des MCCs, sind die Tumorgenese und Metastasierung bisher nur sehr begrenzt verstanden. Kürzlich konnte jedoch unsere Arbeitsgruppe das erste *in-vivo*-Mausmodell für die Metastasierung im MCC etablieren [39], in welchem erstmalig nachgewiesen werden konnte, dass die sT-Expression innerhalb der Metastasen gegenüber dem Primärtumor signifikant erhöht ist. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die Expression des sT-Ags mit der Metastasierung im MCC korreliert. Weitere Erkenntnisse über die Funktion des sT-Ags in der Metastasierung könnten daher neue Therapiemöglichkeiten eröffnen, indem beispielsweise bestimmte Signalwege blockiert werden, die zur Ausbreitung des Tumors führen. Ziel dieser Arbeit ist es daher die Funktion des sT-Ags in der Metastasierung zu charakterisieren.

Um die Rolle des sT-Ags genauer zu analysieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Dox-induzierbares-shRNA-Knockdownsystem in WaGa-Zellen, einer MCPyV-positiven MCC-Zelllinie, die aus einem Patienten isoliert wurde, etabliert. Dieses System ermöglicht es die T-Ag temporär herunterzuregulieren und sowohl den individuellen Effekt des sT-Ags als auch das Zusammenwirken beider T-Ag Proteine im zellulären Kontext zu analysieren. Mit Hilfe dieses Systems wurden in dieser Arbeit verschiedene *in-vitro*-Experimente durchgeführt.

Das Hauptaugenmerk lag dabei auf der Untersuchung des Einflusses des sT-Ags auf essentielle Schritte im Metastasierungsprozess, welche die Extravasation von Tumorzellen und somit die

Dissemination durch den Blutstrom und die Ausbildung von Metastasen in entfernte Gewebe begünstigen können. Zu diesem Zweck wurde in verschiedenen *in-vitro*-Assays sowohl die Adhäsion von MCC-Zelllinien an das Endothel, als auch die Invasion von WaGa-Zellen durch die ECM in Abhängigkeit der T-Ag untersucht. Um zu verstehen, wie das sT-Ag diese Prozesse auf molekularer Ebene beeinflusst, wurde zusätzlich analysiert, welche transkriptionellen Veränderungen durch die Expression des sT-Ags ausgelöst werden und welchen Effekt das sT-Ag auf die Expression von Zelloberflächenmolekülen in WaGa-Zellen hat.

Um die Tumorgenese und -progression des MCCs besser zu verstehen, ist es von großer Bedeutung nachzuvollziehen, wie das sT-Ag die Metastasierung beeinflusst. Durch die funktionelle Untersuchung sT-induzierter Veränderungen in Tumorzellen liefert diese Arbeit somit zahlreiche neue Ansatzpunkte für die weitere Untersuchung innovativer Therapiemöglichkeiten in der MCC-Behandlung.

## 2 Material & Methoden

### 2.1 Chemikalien & kommerzielle Systeme

Alle Standard-Chemikalien, die in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden von Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (München) oder Merck (Darmstadt) bezogen. Eine Übersicht über alle verwendeten kommerziellen Systeme ist in Tabelle 1 zu finden.

**Tabelle 1** Übersicht verwendeter kommerzieller Systeme

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Biorad Protein Assay	Biorad (München)
DNA Plasmid Purification Kit	Macherey-Nagel (Düren)
NucleoBond® PC100	
PCR clean-up, Gel extraction Kit	Macherey-Nagel (Düren)
PeqGold Plasmid Miniprep Kit	Peqlab (Erlangen)
MTT Cell Growth Kit	Merck Millipore (Billerica, USA)
RNeasy® Mini Kit	Qiagen (Hilden)
Qubit® RNA BR Assay Kit	Invitrogen (Darmstadt)
femtoLucent Plus HRP Kit	G-Biosciences (St. Louis, USA)
ECL Western Blotting Detection Reagents	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
DNA-free™ DNA Removal Kit	Invitrogen (Darmstadt)
MACS® Marker Screen, human	Milteny Biotech (Bergisch Gladbach)
Cultrex® BME Cell Invasion Assay	R&D Systems (Minneapolis, USA)
Pacific Blue™ Annexin V	Biolegend (San Diego, USA)
CellTrace™ Cell Labeling Kit	Invitrogen (Darmstadt)
Phusion® High-Fidelity PCR Kit	New England Biolabs (Frankfurt a.M.)

## 2.2 Reagenzien & Laborhilfsmittel

In Tabelle 2 sind alle Reagenzien und Laborhilfsmittel zusammengefasst, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

**Tabelle 2** Übersicht verwendeter Reagenzien und Laborhilfsmittel

Name	Hersteller
Ampicillin Sodium Salt	Sigma (München)
Aqua	B. Braun (Melsungen)
BSA (engl. <i>Bovine Serum Albumin</i> )	GE Healthcare (Freiburg)
Calcein-AM Viability Dye	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 100 mM)	Invitrogen (Karlsruhe)
cOmplete <sup>TM</sup> Protease Inhibitor- Cocktail / Mini	Roche Diagnostics (München)
Color Protein Marker	NEB (Frankfurt a.M.)
Dithiothreitol (DTT)	Sigma (München)
Deckgläser	A.Hartenstein (Würzburg)
Doxycyclin	Sigma (München)
Kanamycinsulfat	Roth (Karlsruhe)
Interleukin 1 $\alpha$ (IL-1 $\alpha$ )	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Magermilchpulver	Roth (Karlsruhe)
Maxima SYBR Green/ROX qPCR- Master Mix (2x)	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Sigma (München)
Objektträger	Glaswarenfabrik Karl Hecht (Sondheim)
Paraformaldehyd (16 %)	Electron Microscopy Sciences (Hatfield, PA, USA)
Polyethylenimin (PEI)	Polyscience Inc. (Washington, USA)



Phosphatase, alkaline (AP)	Roche Diagnostics (München)
Polybrene <sup>®</sup>	Sigma (München)
Poly-L-Lysin	Sigma (München)
Röntgenfilme	Fuji-Film Europe (Düsseldorf)
Roti <sup>®</sup> -GelStain	Roth (Karlsruhe)
Roti <sup>®</sup> -PVDF-Membran (0,45 µm)	Roth (Karlsruhe)
Sterilfilter Millex-GP (0,22 µm)	Merck Millipore (Darmstadt)
Ultra Pure <sup>™</sup> Agarose	Invitrogen (Darmstadt)
µ-slides VI 0.4 ibiTreat	ibidi GmbH (Gräfelfing)
QIAshredder	Qiagen (Hilden)
CD14 Beads	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Separation columns LS	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Vectashield mounty medium with DAPI	Vector Laboratories Inc. (Burlingame, CA, USA)
Viromer <sup>®</sup> BLUE- Transfektionsreagenz	Lipocalyx (Halle (Saale))
Whatman-Papier	A. Hartenstein (Würzburg)
Zeocin	Sigma (München)

---

### 2.3 Geräte & Zubehör

In dieser Arbeit wurden Geräte und Zubehör von folgenden Herstellern verwendet: Agfa, Agilent, Biorad, BD Biosciences, Binder, Eppendorf, Illumina, Invitrogen, Leica, Nikon, Sarstedt, Tecan, PeqLab, Qiagen, Zeiss.

## 2.4 Software

Für die Datenauswertung und -visualisierung wurden folgende Programme verwendet: Microsoft Office (Excel, Powerpoint, Word), CLC DNA Workbench (Version 8.0.1, Qiagen), BD FACSDiva™ Software, FlowJo™, Ingenuity Pathway Analysis® (IPA®, Qiagen), Gel Doc XR (Bio Rad), Rotorgene Q Series Software (Qiagen), Graph Pad Prism 5, Image J, Volocity Demo (Version 6.1.1, Perkin Elmer), Leica Confocal Software, CapImage Software (Version 8.6).

## 2.5 Plasmide

Eine Übersicht aller Plasmide, die in dieser Arbeit verwendet wurden, ist in Tabelle 3 zu finden.

**Tabelle 3** Übersicht verwendeter Plasmide

Name	Vektor	Insert
FH1tUTG	FH1tUTG	induzierbarer Tet-On Vektor mit H1 promoter für shRNA Expression von Marco Herold [218]
LeGo-iC2	LeGo-iC2	Leervektor mit SFFV promoter, IRES-mCherry [219]
LeGo-iC2-sT	LeGo-iC2	sT-Ag aus MSCV-N-MCV-sT über EcoRT/NotI kloniert in LeGo-iC2; hergestellt von Christina Hartig
Lenti gag-pol	phCMV	gag pol
Lenti rev	phCMV	rev
Lenti VSV env	phCMV	VSV env

## 2.6 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide und shRNAs wurden von der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg) synthetisiert, sowie alle siRNAs von der Firma Horizon Discovery (Waterbeach, UK). Die Sequenzen und ihre Anwendungen sind in Tabelle 4 und Tabelle 5 dargestellt.

**Tabelle 4** Übersicht verwendeter Primer

<b>Name</b>	<b>Sequenz (5'→3')</b>	<b>Anwendung</b>
MCPyV-sT-Fw	GTCTCGCCAGCATTGTAGTC	RT-qPCR
MCPyV-sT-Rv	CCTCGTCAACACAGAGGAAG	
TBP-Fw	CCCATGACTCCCATGACC	RT-qPCR
TBP-Rv	TTTACAACCAAGATTCACACTGTGG	
MCV_sT_EcoRI_Fw	GCGGCGAATTCACCATGGATTTAGT- CCTAAATAGG	Klonierung
MCV_sT_NotI_Rv	TAGCGGCCGCCTTTGTACAAGAAAG- CTGGG	Klonierung

**Tabelle 5** Übersicht verwendeter Oligonukleotide für shRNAs und siRNAs

<b>Name</b>	<b>Sequenz (5'→3')</b>
shRNA sT	sense: TCCCAAGTTGTCTCGCCAGCATTGTTCAAGAGACAAT- GCTGGCGAGACAACTTTTTTTT antisense: TCGAAAAAAAAAGTTGTCTCGCCAGCATTGTCTCT- TGAACAATGCTGGCGAGACAACTT
shRNA sT & LT	sense: TCCCATCCACAAGCTCAGAAGTGACTTCTCTATTCAA- GAGATAGAGAAGTCACTTCTGAGCTTGTGGATTTTTT antisense: TCGAAAAAAAAATCCACAAGCTCAGAAGTGACTTCT- CTATCTCTTGAATAGAGAAGTCACTTCTGAGCTTGTGGAT
shRNA scrambled	sense: TCCCCTGACTAGGATAGTACTCTTCAAGAGAGAGTAC- TATCCTAGTCAGTTTTT antisense: TCGAAAAAACTGACTAGGATAGTACTCTCTCTTG- AAGAGTACTATCCTAGTCAG
siRNA CD47	sense: GCUACUGGCCUUGGUUUAUUU-dTdT antisense: AAUUAACCAAGGCCAGUAGC-dTdT
siRNA scrambled	On-TARGETplus Non-targeting Pool

## 2.7 Antikörper

In Tabelle 6 ist eine Übersicht aller Antikörper, die in dieser Arbeit verwendet wurden, dargestellt.

**Tabelle 6** Übersicht verwendeter Antikörper

<b>Name</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Anwendung</b>
2T2-Antikörper	Anti-MCPyV sT aus Überstand der monoklonalen 2T2-Hybridomzelllinien, die von Christopher Buck zur Verfügung gestellt wurde. Entweder selbst hergestellt (2T2, 1:1) oder aufkonzentriert von Patrick Moore (2T2, 1:50)	Western Blot
Anti-MCPyV LT	Cm2b4 (1:1000 WB, 1:500 IF), monoklonaler Maus-Antikörper IgG2b , erkennt LT-Ag und 57kT-Ag (Santa Cruz Biotechnology)	Western Blot & Immunfluoreszenz
Anti- $\alpha$ -Aktin	Klon C4, erkennt alle Formen von Aktin in Vertebraten, monoklonaler Maus-Antikörper IgG1K (1:10.000, Chemicon)	Western Blot
Ziege Anti-Maus IgG-HRP	Sekundärer-Antikörper, HRP konjugiert (1:10000, GE Healthcare)	Western Blot
Ziege anti-Maus TRITC	Sekundärer-Antikörper (1:1000, Dianova)	Immunfluoreszenz
Anti-human CD44	monoklonaler Maus-Antikörper, APC-konjugiert (Milteny Biotec)	FACS
Anti-human CD47	monoklonaler Maus-Antikörper, APC-konjugiert (Milteny Biotec)	FACS
Anti-human CD156c (ADAM10)	monoklonaler Maus-Antikörper, APC-konjugiert (Milteny Biotec)	FACS
Anti-human CD95	monoklonaler Maus-Antikörper, APC-konjugiert (Milteny Biotec)	FACS
Maus anti-human CD47	Klon B6.H12.2, blockiert CD47-abhängige Phagozytose (Thermo Fischer)	Neutralisation

Maus anti-Fas	Klon ZB4, blockiert CD95L induzierte Apoptose (EMD Millipore Corp.,)	Neutralisation
Maus IgG1	Isotypkontrolle für anti-CD47 und anti-CD95 IgG1 Antikörper (Thermo Fischer)	Neutralisation
rhE-Selectin/Fc Chimera	rekombinantes humanes E-Selektin, gekoppelt an Fc-Fragment (NS0-derived, R&D Systems)	Adhäsionsversuche
rmE-Selectin/Fc Chimera	rekombinantes murines E-Selektin, gekoppelt an Fc-Fragment (NS0-derived, R&D Systems)	Adhäsionsversuche
rhP-Selectin/Fc Chimera	rekombinantes humanes P-Selektin, gekoppelt an Fc-Fragment (NS0-derived, R&D Systems)	Adhäsionsversuche
rmP-Selectin/Fc Chimera	rekombinantes murines P-Selektin, gekoppelt an Fc-Fragment (NS0-derived, R&D Systems)	Adhäsionsversuche
rhIgG1 Fc	Isokontrolle, rekombinantes humanes Fc-Fragment (NS0-derived, R&D Systems)	Adhäsionsversuche
LEAF <sup>TM</sup> Purified anti-mouse/human CD44	CD44-blockierender Antikörper (Biolegend #103014)	Adhäsionsversuche
mouse IgG2b	Isotypkontrolle (R&D Systems #MAB004)	Adhäsionsversuche
Goat anti-Human IgG-Biotin	Biotin-konjugierter anti-human IgG-Antikörper (Sigma Aldrich)	Adhäsionsversuche
APC-Streptavidin	APC-gekoppelter Streptavidin-Antikörper (Thermo Fischer Scientific #21126)	Adhäsionsversuche
Anti-CA19-9 (121SLE) Alexa Fluor 488	Anti-Sialyl-Lewis-A Antikörper (Novus Biologicals NBP2- 54349AF488)	FACS
Anti-CD15s (CSLEX1) Alexa Fluor 488	Anti-Sialyl-Lewis-X Antikörper (BD Bioscience #563528)	FACS
mouse IgM Alexa Fluor 488	Isotypkontrolle (BioLegend #401617)	FACS

## 2.8 Lösungen & Puffer

Alle weiteren allgemeinen Lösungen und Puffer, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 7 aufgelistet.

**Tabelle 7** Allgemeine Lösungen und Puffer

Name	Zusammensetzung
6 x DNA-Ladepuffer	60 % (v/v) Glycerol
	0,3 % (w/v) Bromphenolblau
	0,3 % (v/v) Xylenecyanol
4 x Protein Ladepuffer	12 % SDS
	40 % (v/v) Glycerol (86 %)
	0,2 M Tris HCl, pH 7,0
	0,004 % (w/v) Bromphenolblau
	5 % (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol
Blot-Puffer A, pH 10,4	0,3 M Tris
	10 % (v/v) Methanol
Blot-Puffer B, pH 10,4	0,025 M Tris
	10 % (v/v) Methanol
Blot-Puffer C, pH 9,4	0,025 M Tris
	0,025 M Aminohexansäure
	10 % (v/v) Methanol
PBS (phosphate buffered saline) pH 7,5	140 mM NaCl
	25 mM KCl
	0,5 mM MgCl <sub>2</sub>
	1 mM CaCl <sub>2</sub>
	10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>

---

PBS-Tween	1x PBS 0,05 % (v/v) Tween 20
Permeabilisierungspuffer für Immunfluoreszenz	1 x PBS 1 % Triton X-100 0,1 % Natriumcitrat
Blocklösung für Immunfluoreszenz	1 x PBS 1 % Triton X-100 0,5 % Tween 20 3 % BSA Albumin Fraktion
TAE, pH 7,8	2 M Tris HCl 0,25 M Natriumacetat 0,5 M EDTA
TE, pH 7,5	10 mM Tris HCl 1 mM EDTA

---



## 2.9 Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme sind in Tabelle 8 aufgeführt. Für den Restriktionsverdau wurden ausschließlich Fast-Digest Enzyme verwendet. Alle Enzyme wurden mit den vom Hersteller gelieferten Puffersystemen verwendet.

**Tabelle 8** Übersicht verwendeter Enzyme

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
EcoRI	New England Biolabs (NEB, Frankfurt a. M.)
NotI	New England Biolabs (NEB, Frankfurt a. M.)
BsmBI	New England Biolabs (NEB, Frankfurt a. M.)
XhoI	New England Biolabs (NEB, Frankfurt a. M.)
Quick-Ligase	Invitrogen (Karlsruhe)
T4-DNA-Ligase (400 U1/mL)	Invitrogen (Karlsruhe)
T4-DNA-Ligase (2 000 000 U1/mL)	New England Biolabs (NEB, Frankfurt a. M.)
Superscript IV	Invitrogen (Karlsruhe)
RNase H	Invitrogen (Karlsruhe)
muriner RNase Inhibitor-Cocktail	Invitrogen (Karlsruhe)
DNase I	Invitrogen (Karlsruhe)

## 2.10 Bakterienkultur

### 2.10.1 Medien für die Bakterienkultur

#### **Luria-Broth-Medium (LB-Medium) Luria/ Miller:**

LB-Medium für Molekularbiologie von Roth (Karlsruhe)

Einwaage von 25 g/mol, Autoklavieren 15 min, 121°C, Druck: 1,1 kg/cm<sup>2</sup>

Für LB-Amp: Zugabe von 100 mg/L Ampicillin

#### **Luria-Broth-Agarplatten (LB-Platten):**

LB-Agar für Molekularbiologie von Roth (Karlsruhe)

Einwaage von 40 g/l, Autoklavieren 15 min, 121°C, Druck: 1,1 kg/cm<sup>2</sup>

Für LB-Amp-Platten: Nach Abkühlen auf 55°C Zugabe von 100 mg/L Ampicillin

### 2.10.2 Herstellung kompetenter Bakterien

Es wurden chemisch kompetente Bakterien der Stämme *E.coli Top Ten* und *E.coli BL21 Star* hergestellt. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer ist in Tabelle 9 zu finden. Zur Herstellung wurde eine Vorkultur mit 20 mL LB-Medium mit einer Kolonie des jeweiligen Bakterienstammes angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Am Folgetag wurden 200 mL LB-Medium mit 2 mL der Vorkultur (Verhältnis 1:100) angeimpft, mit 0,8 mL MgSO<sub>4</sub> (1M) und 2 mL KCl (1M) versetzt und bis zu einer OD<sub>600</sub> zwischen 0,3 und 0,5 bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Als die OD erreicht wurde, wurden die Bakterien für 15 min auf Eis inkubiert und im Anschluss für 5 min bei 6000 xg und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet in insgesamt 60 mL TFB1-Puffer aufgenommen und für 60 min auf Eis inkubiert. Dann wurde das Pellet erneut abzentrifugiert (5 min, 6000 xg, 4 °C) und in insgesamt 8 mL TFB2-Puffer resuspendiert. Die Bakterien wurden in 100 µL aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten Bakterien wurden bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

**Tabelle 9** Puffer für die Herstellung kompetenter Bakterien

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
TFB1-Puffer, pH 5,8 (eingestellt mit CH <sub>3</sub> COOH)	15 % (v/v) Glycerin 10 mM CaCl <sub>2</sub> 30 mM Kaliumacetat 100 mM RbCl <sub>2</sub> 50 mM MnCl <sub>2</sub>
TFB2-Puffer, pH 6,8 (eingestellt mit KOH)	15 % (v/v) Glycerin 10 mM MOPS 75 mM CaCl <sub>2</sub> 10 mM RbCl <sub>2</sub>

## 2.11 Zellkultur

### 2.11.1 Verwendete Zelllinien

Alle Zelllinien, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 10 dargestellt.

**Tabelle 10** Übersicht verwendeter Zelllinien

<b>Name</b>	<b>Beschreibung</b>
HEK293	Humane epitheliale Nierenzellen; (ATCC Nr. CRL-1573)
Lenti-X 293T <sup>TM</sup>	Subklon aus HEK293 Zellen, der stabil SV40 LT-Ag exprimiert (Clontech Catalag No. 632180)
nHDF	Neonatale humane dermale Fibroblasten, isoliert aus neonatalem Präputium (engl. <i>foreskin</i> ) eines Spenders (Lonza, CC-2509)
HCT116	humane kolorektale Karzinomzellen, isoliert aus einem kolorektalen Karzinom, Mutation im <i>ras</i> Proto-Onkogen (ATCC Nr. CCL-247)

HCT116sT	HCT116-Zellen, die stabil sT exprimieren durch Transduktion mit dem $\gamma$ -retroviralem Vektor MSCV-N-MCV-sT und Selektion mit Puromycin; hergestellt von Manja Czech-Sioli
HUVEC	engl. <i>Human umbilical vein endothelial cells</i> , humane Endothelzellen aus der Nabelschnur, zur Verfügung gestellt von Udo Schumacher
WaGa	Suspensionszellen, MCPyV-positive MCC-Zelllinie
Mkl-1	Suspensionszellen, MCPyV-positive MCC-Zelllinie
Ms-1	Suspensionszellen, MCPyV-positive MCC-Zelllinie
BroLi	Suspensionszellen, MCPyV-positive MCC-Zelllinie
WaGa shRNA sT	WaGa Zellen, die eine Dox-induzierbare shRNA gegen das sT-Ag exprimieren
WaGa shRNA sTLT	WaGa Zellen, die eine Dox-induzierbare shRNA gegen das sT-Ag und LT-Ag exprimieren
WaGa shRNA scr	WaGa Zellen, die eine Dox-induzierbare shRNA gegen eine zufällige Sequenz exprimieren (Kontrolle)
WaGa CD44 shRNA	WaGa Zellen, die stabil eine shRNA gegen CD44 exprimieren
WaGa CD44 Kontrolle	WaGa Zellen, die stabil eine Kontroll-shRNA exprimieren (beide hergestellt von AG Udo Schumacher)
2T2	2T2-Hybridomzelllinie von Christopher Buck (NIH, MD, USA), fusioniert aus murinen, immunisierten B-Zellen und Myelomzellen (SP2/mIL-6) für die Produktion des monoklonalen sT-Antikörpers

### 2.11.2 Verwendete Medien, Zusätze & Reagenzien

In Tabelle 11 sind alle verwendeten Medien, Medienzusätze und Puffer, mit denen in der Zellkultur gearbeitet wurde, aufgelistet. Eine Übersicht über die Zusammensetzung der Medien bzw. Puffer und welche Medien für welche Zellen verwendet wurden, ist in Tabelle 12 zu finden.

**Tabelle 11** Übersicht über die verwendeten Medien(-zusätze) & Reagenzien für die Zellkultur

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
DMEM-Medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium) + Glutamax	Gibco (Bleiswijk, Niederlande)
RPMI-Medium 1640 (Roswell Park Memorial Institute Nr. 1640 Medium)	Gibco (Bleiswijk, Niederlande)
DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline)	Gibco (Bleiswijk, Niederlande)
Endothelzell-Medium	Promocell (Heidelberg)
Endothelzell-Medium-SupplementMix	Promocell (Heidelberg)
FBS (engl. <i>Fetal Bovine Serum</i> )	Gibco (Paisley, UK)
Penicillin-Streptomycin (P/S)	Gibco (Grand Islands, NY, USA)
L-Glutamin	Gibco (Grand Islands, NY, USA)
Trypsin/EDTA, 0,05 %	Gibco (Paisley, UK)
Puromycin	Gibco (Grand Islands, NY, USA)
Trypanblau	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Opti-MEM <sup>®</sup> (I Reduced Serum Medium)	Gibco (Paisley, UK)
Lymphozyten-Separationsmedium (LSM)	GE Healthcare (Freiburg)
Hybridoma-SFM	Gibco (Grand Islands, NY, USA)
50x HFCS (Hybridoma Fusion and Cloning Supplement, #11363735001)	Roche Diagnostics (München)

**Tabelle 12** Übersicht über die Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien nach Zelllinien und sonstige verwendete Puffer

<b>Zelllinie</b>	<b>Mediumzusammensetzung</b>
WaGa, Mkl-1, BroLi & WaGa shRNA-Zelllinien	RPMI 1640 10 % FBS 1 % P/S 5 mM L-Glutamin
Ms-1	RPMI 1640 20 % FBS 1 % P/S 5 mM L-Glutamin
WaGa CD44 shRNA & Kontrolle	RPMI 1640 10 % FBS 1 % P/S 5 mM L-Glutamin 1 µg/mL Puromycin
HEK293, Lenti-X™ 293T, nHDF, HCT116, HCT116sT	DMEM 10 % FBS 1 % P/S
Primäre Makrophagen (Monozyten-Medium)	RPMI-Medium 1640 20 % humanes Serumalbumin
Monozyten-Puffer	25 mL DPBS 0,5 % humanes Serumalbumin 2 mM EDTA pH 7,4

---

HUVEC	Endothelzell-Medium Endothelzellmedium-SupplementMix 1 % P/S
HFCS-RPMI-Medium (2T2-Hybridomzellen)	RPMI 1640 1x HFCS 10 % FBS 1 % P/S
Einfriermedium (2T2)	50 % konditioniertes HFCS-RPMI-Medium 40 % FBS 10 % DMSO
Einfriermedium (für alle Zellen)	90 % FBS 10 % DMSO
FACS-Puffer	500 mL DBPS 2 % FBS 1 mM EDTA

---

## 2.12 Kultivierung eukaryotischer Zellen

### 2.12.1 Zelllinien

Alle Zellen wurden in Polystyrol-Zellkulturflaschen oder -schalen im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert. Die verwendeten Zellkulturmedien und Zusätze sind in Tabelle 11 aufgelistet. Adhärente Zelllinien wurden zum Passagieren der Zellen einmal mit DBPS (Sigma-Aldrich) gewaschen, mit Trypsin-EDTA-Lösung (0,25 %, Thermo Fischer) für 5 min inkubiert und durch Zugabe von Medium abgelöst und im Verhältnis 1:5 bzw. 1:10 gesplittet. Anschließend wurde das Trypsin in der Trypsin-EDTA-Zellsuspension durch Zugabe von DMEM-Medium, welches FBS (engl. *fetal bovine serum*) enthält, inaktiviert. Die MCPyV-positiven Suspensionszelllinien wurden einmal pro Woche herunterzentrifugiert (700 xg, 3 min, RT), in frischem RPMI Medium resuspendiert und im Verhältnis 1:3 oder 1:5 neu ausgesät. Für alle Experimente wurden die Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt, wobei die Suspensionszelllinien zuvor mit Trypanblau (1:1 bzw. 1:10) verdünnt wurden. Trypanblau ist ein Farbstoff, der durch die Zellmembran abgestorbener Zellen eindringt und somit einen Aufschluss über die Zellvitalität gibt.

Zur Langzeitlagerung wurden die Zelllinien abtrypsiniert (adhärente Zellen) und mittels Zentrifugation pelletiert (1000 xg, 3 min, RT). Die Zellen wurden in FBS mit 10 % DMSO resuspendiert und in CryoPure Gefäße überführt. Um die Bildung von Eiskristallen zu vermeiden, wurden die CryoPure Gefäße zuerst im Mr. Frosty™- Gefrierbehälter (Thermo Fischer) für mind. 24 h bei -80 °C gelagert und so langsam heruntergekühlt, bevor die Zellen im Stickstofftank in der Gasphase gelagert wurden. Zum Auftauen wurden die Zellen im 37 °C Wasserbad kurz erwärmt, einmal mit dem entsprechenden Zellkulturmedium gewaschen um DMSO-Reste zu entfernen und in frischem Medium ausgesät.

### 2.12.2 Herstellung des 2T2-Antikörpers

Zur Detektion des sT-Ags im Western Blot wurde der 2T2-Antikörper aus der 2T2-Hybridomzelllinie gewonnen, die von Christopher Buck (NIH, MD, USA) zur Verfügung gestellt wurde. Dazu wurden die Zellen aufgetaut und in RPMI-Medium supplementiert mit 1x HFCS Supplement (Roche Diagnostics #11363735001), 10 % FBS und 1% P/S aufgenommen, da die



Hybridomzellen abhängig von IL-6-Expression sind. Die Zellen wurden stehend in T-75 bzw. T-175 Flaschen im 37 °C Brutschrank in mindestens 25 mL 1x HFCS-RPMI-Medium kultiviert. Sobald die Farbe des Mediums leicht gelblich wurde, wurden die Zellen durch Zugabe von 1x HFCS-RPMI-Medium expandiert und auf mehrere Flaschen aufgeteilt. Auf diese Weise wurden die Zellen bis zu einer Anzahl von etwa  $1 \cdot 10^8$  Zellen expandiert, bevor sie abzentrifugiert und in 50 mL Hybridoma-SFM-Selektionsmedium (Invitrogen) zur Selektion der monoklonalen Antikörper aufgenommen wurden. Als das Medium nach einigen Tagen der Selektion leicht gelblich wurde, wurden die Zellen abzentrifugiert und der Hybridomzellüberstand aliquotiert. Zur längeren Haltbarkeit wurde der Überstand mit Natriumazid (1:1000) versetzt und bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Zum Einfrieren der 2T2-Hybridomzellen wurde ein spezielles Einfriermedium verwendet, dass zu 50 % aus konditioniertem Überstand der 2T2-Zellen, 40 % FBS und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma) besteht. Um diese finale Konzentration zu erreichen, wurden die Zellen abzentrifugiert, in ca. 700 µL konditioniertem 2T2-Medium aufgenommen und für 15-30 min bei 4 °C gelagert. Dann wurde das gleiche Volumen eines 80 % FBS/20 % DMSO-Gemisches dazugegeben und die 2T2-Hybridomzellen in einem Mr. Frosty™- Gefrierbehälter bei -80 °C weggefroren.

### **2.12.3 Isolation primärer humaner Makrophagen**

Primäre Makrophagen wurden aus Blutproben aus der Transfusionsmedizin isoliert. Für die Monozyten-Präparation wurden pro 20 mL Blut jeweils 15 mL Lymphozyten-Separationsmedium (LSM) in drei Falcons vorgelegt, vorsichtig mit dem Blut überschichtet und für 30 min und 1500 rpm bei 4 °C zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurden 10 mL eiskaltes RPMI-Medium in drei neue Falcons vorgelegt. Nach der Zentrifugation wurde vorsichtig die milchige Phase (buffy coat) abgenommen und zum vorgekühlten RPMI-Medium gegeben. Im Anschluss wurde das Volumen auf 50 mL mit eiskaltem RPMI-Medium aufgefüllt und erneut zentrifugiert (10min, 1500 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde vorsichtig verworfen und jedes Pellet mit 10 mL RPMI-Medium gewaschen und die Pellets aus drei Falcons in zwei Falcons zusammengeführt. Es wurde ein zweites Mal mit eiskaltem RPMI-Medium gewaschen und dazu wiederum auf ein Gesamtvolumen von 50 mL aufgefüllt, wiederum zentrifugiert (10 min,

1500 rpm, 4 °C) und die Pellets aus den verbleibenden zwei Falcons in einem Falcon vereint. Im letzten Waschschrift wurde noch einmal mit RPMI-Medium auf 50 mL aufgefüllt und zentrifugiert (10 min, 1500 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1,5 mL eiskaltem Monozyten-Puffer aufgenommen. Um aus den Buffy-Coats die Monozyten zu isolieren, wurden im nächsten Schritt 250 µL CD14 Microbeads hinzugegeben, gevortext und für 15 min auf Eis inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Separationssäulen inklusive Filtern auf einem magnetischen Rack vorbereitet. Dafür wurden die Separationssäulen mit 900 µL Monozyten-Puffer equilibriert. Die Zellen wurden auf die Säule gegeben und nach dem Durchlaufen zweimal mit 1 mL Monozyten-Puffer gewaschen. Dann wurden 3 mL Monozyten-Puffer hinzugefügt, die Säule vom magnetischen Rack entfernt und die Zellen mit einem Stempel in ein neues Falcon gedrückt, in dem bereits 20 mL RPMI-Medium vorgelegt wurden. Die Zellsuspension wurde mit RPMI-Medium auf 30 mL aufgefüllt und mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Zellsuspension wurde auf eine Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen verdünnt und pro Well 1 mL in einer 6-Well-Mikrotiterplatte ausgesät. Nach 4 h wurde das Medium durch Monozyten-Medium (RPMI + 20 % humanes Serumalbumin) ersetzt und nach 24 h erneut Medium gewechselt. Wenn die Monozyten nach ca. 10 Tagen vollständig zu Makrophagen ausdifferenziert waren, wurden sie visuell begutachtet und für Experimente verwendet.

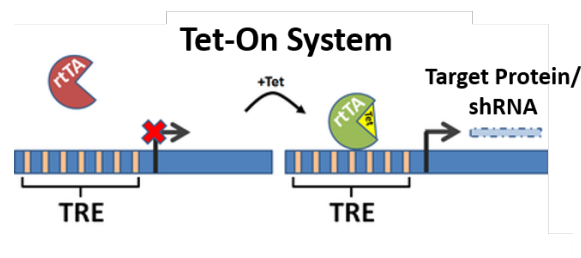
### 2.13 Herstellung von shRNA-Knockdown Zelllinien

Um den individuellen Effekt der MCPyV T-Ag - und insbesondere die Rolle des sT-Ag - in der Metastasierung zu analysieren, wurden drei verschiedene shRNA-Knockdown Zelllinien generiert. Ausgehend von der MCPyV-positiven MCC-Zelllinie WaGa wurde eine Zelllinie für den individuellen Knockdown des sT-Ag (WaGa shRNA sT), eine für den simultanen Knockdown beider T-Ag (WaGa shRNA sTLT), und eine Kontrollzelllinie, um Off-Target-Effekte auszuschließen (WaGa shRNA scr), hergestellt. Eine Übersicht der verwendeten Sequenz für die shRNAs ist in Tabelle 5 zu finden. Im Folgenden wird die Herstellung der WaGa shRNA-Knockdown-Zelllinien im Detail beschrieben.

### 2.13.1 Tet-On-System

Die Grundlage für die Experimente mit den WaGa shRNA-Knockdown-Zelllinien stellt in dieser Arbeit ein sogenanntes Tet-On-System dar. Dieses beruht auf einem induzierbaren, lentiviralen Plasmid (FH1tUTG), welches sich durch seinen H1 Promoter besonders für die Expression von shRNAs eignet. Durch die Zugabe eines Tetrazyklin-Antibiotikums wie z.B. Doxycyclin (Dox) wird die shRNA exprimiert (Tet-On-System) und bestimmte Zielgene können auf diese Weise temporär herunterreguliert werden.

Das Prinzip dieses Systems beruht dabei auf einem reversen Tetrazyklin-abhängigen Transaktivator (engl. *reverse tetracycline-controlled transactivator*, rtTA), der ein Fusionsprotein aus dem Tet-Repressor (TetR) und dem Transaktivator-Protein VP16 des Herpes-Simplex-Virus ist. Der rtTA wurde genetisch so modifiziert, dass es nur in Anwesenheit von einem Tetrazyklin-Antibiotikum an die Sequenz des Tet-Operators (tetO) im TRE (engl. *Tetracycline Response Element*) des Zielgens binden kann (Abbildung 7). Nach Zugabe von Dox wird dieses in den Zellkern transportiert und dort vom rtTA gebunden. Diese Interaktion mit dem TRE ermöglicht schließlich die Transkription des Zielgens. Ohne die Zugabe von Dox ist dies nicht möglich und das Zielgen kann nicht transkribiert werden. Nach der Transkription werden die shRNAs schließlich mit Hilfe der Ribonuklease-Enzyme Droscha und Dicer weiter zu kurzen siRNA bzw. miRNA und mRNA prozessiert. Durch den RISC-Komplex sind diese schließlich in der Lage die Expression komplementäre Gentranskripte gezielt herunterzuregulieren.



**Abbildung 7** Das Prinzip des Tet-ON-Systems. Das rtTA kann nur in Anwesenheit eines Tetrazyklin-Antibiotikums wie z.B. Dox an die Sequenz des tetO im TRE binden. Erst die Zugabe von Dox ermöglicht die Expression des Zielproteins. Entnommen und modifiziert aus [220]. rtTA: *reverse tetracycline-controlled transactivator*; Tet: *tetracycline*; tetO: *Tet-Operator*; TRE: *Tetracycline Response Element*.

### 2.13.2 Klonierung der shRNAs

Die Oligonukleotide für die shRNAs wurden einzelsträngig synthetisiert und an den Enden mit Restriktionsschnittstellen für *BsmBI* und *XhoI* versehen. Für das Annealing der Oligonukleotide zu einem doppelsträngigem Fragment wurden in einem 1,5 mL-Reaktionsgefäß jeweils 11,25 µL vom Forward und Reverse Oligo (100 pmol/µL) mit 2,5 µL Annealing-Puffer versetzt. In einem Becherglas wurde Wasser zum Sieden gebracht, die Reaktionsgefäße vorsichtig hineingestellt und alles langsam auf RT abgekühlt, um ein komplementäres Zusammenlagern der Oligonukleotide zu ermöglichen. Im Anschluss wurden die Annealing-Produkte 1:400 mit Annealing-Puffer verdünnt.

Der Tet-On-Vektor FH1tUTG wurde mit den Fast-Digest Restriktionsenzymen *BsmBI* und *XhoI* für 20 min bei 37 °C verdaut, anschließend auf ein Agarose-Gel aufgetragen und mit dem Gel Extraction Kit (Macherey-Nagel) aufgereinigt. Im nächsten Schritt wurde der geschnittene Vektor zusammen mit den annealten Oligos (1:10) mittels Quick-Ligase in einem 10 µL-Gesamtvolumen für 10 min bei RT ligiert. Zum gesamten Ligationsansatz wurden direkt 100 µL *BL21Star* kompetente Bakterien hinzugegeben, der Mix für 30 min auf Eis inkubiert und durch 30 s Hitzeschock bei 42 °C transformiert. Die Insertion der Oligonukleotide wurde durch die Firma Microsynth (Seqlab, Göttingen) mittels Sanger-Sequenzierung überprüft.

## 2.14 Lentivirale Transduktion

### 2.14.1 Produktion lentiviraler Überstände

Zur Herstellung von lentiviralen Überständen wurden Lenti-X 293T Zellen mit Polyethylenimin (PEI, Polysciences, Inc.) transfiziert. PEI ist ein Polymer, welches durch seine stark positive Ladung die stark negative Ladung der DNA neutralisiert und somit Aufnahme von DNA in die Zelle erleichtert. Für die Transfektion wurden  $5 \times 10^6$  Lenti-X 293T Zellen in eine 10 cm Schale ausgesät (bzw.  $1 \times 10^7$  in eine 15 cm Schale), um eine Konfluenz von ca. 80-90 % zu erreichen. Am Folgetag wurden die verschiedenen Lenti-Verpackungsplasmide der dritten Generation (phCMV-gag-pol, phCMV-rev und phCMV-VSV-g env), sowie das lentivirale Plasmid mit PEI transfiziert (siehe Tabelle 13). Dazu wurde 1 mL OptiMEM vorgelegt und die entsprechenden Mengen der Verpackungsplasmide hinzugegeben und zuletzt PEI im

Verhältnis 1:10, entspricht 150  $\mu\text{L}$  (bzw. 338  $\mu\text{L}$ ), dazugegeben. Der Transfektionsansatz wurde für 30 min bei RT inkubiert. In dieser Zeit wurde das Medium gegen DMEM-Medium ohne Zusätze ausgetauscht und nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Transfektionsansatz vorsichtig auf die Zellen getropft und die Zellkulturschalen dabei vorsichtig geschwenkt. Nach 6-8 h wurde das Transfektionsmedium schließlich durch komplettes DMEM-Medium mit 20 mM HEPES und 1 mM Natriumpyruvat ausgetauscht. Nach 48 h und 72 h wurde der Virusüberstand geerntet, sterilfiltriert, aliquotiert und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.14.2 Bestimmung des Virustiters mittels Titration

Die zur Herstellung lentiviraler Überstände verwendeten LeGo-Plasmide verfügen jeweils über einen fluoreszierenden Selektionsmarker, sodass die Virustiter über Durchflusszytometrie (FACS) bestimmt werden können, um vergleichbare Transduktionsraten zu erhalten. Dafür wurden für  $5 \cdot 10^4$  adhärenente Zellen in einer 24-Well-Mikrotiterplatte ausgesät und am darauffolgenden Tag mit unterschiedlichen Mengen an Viruspartikeln in Anwesenheit von 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Polybren transduziert. Für die Titerbestimmung der Suspensionszellen wurden  $2 \cdot 10^5$  Zellen ausgesät und es wurde direkt nach dem Aussäen transduziert. Anschließend wurden die Platten für 1 h bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und  $1000\text{ xg}$  zentrifugiert und am Folgetag das Medium gewechselt. Nach 48 h wurde die Anzahl der mCherry- oder GFP-positiven Zellen per FACS bestimmt und der Virustiter wie folgt berechnet:

$$T = \frac{N \cdot P}{V}$$

wobei:

T = Virustiter in ffu/ $\mu\text{L}$  (fluorescence forming units)

N = Anzahl Zellen

P = Prozent transduzierter Zellen [%]

V = Volumen hinzugegebener Viruspartikel [mL]

Für die sT-Überexpressions-Experimente (Abschnitt 2.18.6) wurden HEK293, nHDFs and WaGa Zellen mit einer Multiplizität der Infektion (MOI, engl. *multiplicity of infection*) von 1 und 8 µg/mL Polybren transduziert. Die MOI gibt das Verhältnis von infektiösen Viruspartikeln im Vergleich zur Zielzelle an, d.h. bei einer MOI von 1 werden genau so viele Viruspartikel eingesetzt wie sich Zellen in der Kultur befinden. Werden Zellen in einer Zellkultur mit Viruspartikeln infiziert, dann lässt sich die MOI dieser Kultur wie folgt berechnen:

$$V_{MOI} = \frac{N \cdot P}{T}$$

wobei:

T = Virustiter [ffu/µL]

N = Anzahl Zellen

P = Prozent fluoreszierender Zellen [%]

$V_{MOI}$  = Volumen hinzuzugebener Viruspartikel für eine bestimmte MOI [mL]

### 2.14.3 Lentivirale Transduktion und FACS Cell Sorting

Mit dem Ziel eine stabile MCC-Zelllinie mit induzierbarem shRNA-Knockdown der T-Ag zu generieren, wurden die WaGa Zellen mit den verschiedenen shRNA-Konstrukten transduziert. Dazu wurden  $4 \cdot 10^5$  WaGa Zellen in 1 mL RPMI-Medium in einer 6-Well-Mikrotiterlatte ausgesät und in Anwesenheit von 2 µL Polybren (8 µg/mL) wurde jeweils 1 mL des entsprechenden Virusüberstands hinzugegeben. Es wurde für 1 h bei 1000 xg und 37 °C zentrifugiert und am Folgetag ein Mediumwechsel durchgeführt. Nach 48 h wurden die Zellen abzentrifugiert, in 200 µL PBS aufgenommen und die GFP-positiven Zellen mittels BD FACSAria<sup>TM</sup> Fusion (BD Biosciences, Heidelberg) von der FACS Core Unit des UKEs selektiert. Diese wurden anschließend weiter kultiviert und noch ein zweites Mal mittels FACS sortiert, um eine reine Zellpopulation zu erhalten. Die Reinheit der Zellpopulation wurde überprüft und lag bei über 99,5 %, sodass die Zellen schließlich für die *in vitro*-Assays dieser Arbeit verwendet wurden.

**Tabelle 13** Übersicht transfizierter Plasmid DNA-Mengen

Plasmid	Menge pro 10 cm-Schale	Menge pro 15 cm-Schale
LeGo Plasmid	10 µg	22,5 µg
gag-pol	10 µg	22,5 µg
rev	5 µg	11,25 µg
VSV env	2 µg	4,5 µg

Zur Kontrolle der Funktionalität der shRNAs wurden zunächst HCT116sT-Zellen verwendet, da die sT-Proteinmengen in WaGa-Zellen eher gering sind. Diese wurden mit den lentiviralen Überständen der shRNAs transduziert und anschließend für einige Tage mit 100 µg/µL Zeocin selektioniert. Drei bzw. fünf Tage nach Induktion der HCT116sT oder WaGa-shRNA-Zelllinien mit Dox bzw. DMSO (Abschnitt 2.18.1) wurden mittels RT-qPCR und Western Blotting sT- und/oder LT-Expressionslevel bestimmt.

## 2.15 DNA-Techniken

### 2.15.1 Hitzeschock-Transformation und Isolation von Plasmid-DNA

100 µL *Top10* oder *BL21Star* kompetente Bakterien wurden standardmäßig mit 1 µg Plasmid-DNA 30 min auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte durch einen 30 s langen Hitzeschock bei 42 °C im Thermoblock. Danach wurden die Bakterien sofort für 5 min auf Eis gelagert, im Anschluss mit 500 µL LB-Medium aufgefüllt und für mindestens 1 h bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Lentivirale Vektoren (wie z.B. LeGo-Vektoren) wurden grundsätzlich nur bei einer Temperatur von 30 °C inkubiert, um Rekombinationen zu vermeiden. Nach der Transformation wurden 100 µL der Bakterienkultur auf einer Agarplatte mit entsprechender Antibiotika-Resistenz ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag wurden 200 mL LB Medium mit einem Klon von der Agarplatte angeimpft und diese wurde über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Am darauffolgendem Tag wurde die Plasmid-DNA mit dem QIAGEN Plasmid Midi Kit isoliert und die DNA-Konzentration am NanoDrop™ 1000 Spektrophotometer bestimmt.

### 2.15.2 Transfektion von siRNA

Als Transfektion wird die nicht-virale Einbringung von DNA oder RNA in eukaryotische Zellen bezeichnet. In dieser Arbeit wurde siRNA mit Hilfe des Transfektionsreagenzes Viomer<sup>®</sup> BLUE in WaGa Zellen transfiziert. Dieses Reagenz basiert auf einem mittelgroßen verzweigten Polymer und verfügt über eine neutrale Ladung, sodass die Aufnahme von siRNAs in die Zelle optimiert wird.

Für die Transfektion der CD47 bzw. scrambled siRNA wurden  $6 \cdot 10^6$  Zellen in 10 mL RPMI-Medium in einer T25-Zellkulturflasche ausgesät. In einem 1,5 mL Reaktionsgefäß wurden 5  $\mu$ L Viomer<sup>®</sup> BLUE Transfektionsreagenz vorgelegt und 450  $\mu$ L des mitgelieferten Puffers dazugegeben und schnell gut durchmischt. In einem weiteren Reaktionsgefäß wurden 50  $\mu$ L der entsprechenden siRNA in einer Konzentration von 10 nmol vorgelegt. Im nächsten Schritt wurde die siRNA zum Transfektionsreagenz gegeben, gut durchmischt und für 15 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde das Transfektionsgemisch vollständig zu den Zellen gegeben und diese vorsichtig geschwenkt. Am nächsten Tag wurde die Transfektion wiederholt, dafür wurde der identische Transfektionsansatz vom ersten Tag benutzt und zu den Zellen gegeben. Der siRNA-Knockdown wurde in jedem Experiment mittels FACS-Analyse überprüft.

### 2.15.3 Analytische Plasmidaufreinigung

Mit der analytische Isolation (PeqGold Miniprep Kit, PeqLab) wurden Plasmide aus Klonierungen isoliert, um die Insertion zu überprüfen. Es wurden 2 mL LB-Medium mit entsprechender Antibiotikaresistenz mit einer Bakterienkolonie von einer Agarplatte angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Plasmide mit Hilfe des PeqGold Plasmid Miniprep Kits gemäß Herstelleranweisung isoliert. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch mittels NanoDrop 2000 (PeqLab) gemessen. Die Korrektheit aller klonierten Vektoren wurde von der Firma Microsynth (Seqlab, Göttingen) mittels Sanger-Sequenzierung überprüft.



#### 2.15.4 Präparative Plasmidaufreinigung

Für die qualitativ hochwertige Aufreinigung größerer Mengen Plasmid-DNA für die Transfektion, wurde ein Aufreinigungskit für Plasmid-DNA (DNA Plasmid Purification Kits NucleoBond® PC 100, Macherey und Nagel, Düren) verwendet. Dazu wurden 200 mL LB-Medium mit entsprechendem Selektionsantibiotikum mit einer Bakterienkolonie angeimpft und bei 37 °C bzw. 30 °C bei Plasmiden lentiviralen Ursprungs über Nacht im Schüttler inkubiert. Die Plasmidisolierung wurde gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch mittels NanoDrop 2000 (PeqLab, Erlangen) bestimmt.

#### 2.15.5 Restriktionsverdau von DNA

Der Restriktionsverdau ist eine Methode zum Schneiden von DNA an spezifischen DNA-Sequenzen mit Hilfe von Restriktionsenzymen bzw. Restriktionsendonukleasen. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Fast-Digest Restriktionsenzyme von New England Biolabs (NEB, Frankfurt a. M.) mit dem mitgelieferten 10x Puffersystem verwendet. Es wurden standardmäßig 1 µg Plasmid-DNA mit 2 µL 10x Fast Digest Puffer und 1 µL des jeweiligen Restriktionsenzym mit dH<sub>2</sub>O bis zu einem Volumen von 20 µL aufgefüllt und 20 min bei 37 °C verdaut. Direkt im Anschluss wurde der komplette Restriktionsansatz in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und die Größe des Fragments wurde durch einen Vergleich mit einem Größenstandard überprüft. Bei Bedarf wurde das DNA-Fragment für die weitere Verwendung ausgeschnitten und aufgereinigt.

#### 2.15.6 Agarose-Gelelektrophorese

Mittels Agarose-Gelelektrophorese können Nukleinsäuren spezifisch nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Dazu wird die negativ geladene DNA einem elektrischen Feld ausgesetzt und somit größenspezifisch aufgetrennt, da große DNA-Fragmente langsamer durch die Poren des Agarose-Gels wandern, als kleine DNA-Fragmente. Um die Größe eines DNA-Fragmentes abschätzen zu können, wird immer ein Größenstandard verwendet.

In dieser Arbeit wurden 0,8-3 %ige (w/v) Agarose-Gele verwendet, die mit 1x TAE-Puffer angesetzt wurden. Um die DNA sichtbar zu machen, wurde das Gel vor dem Erhitzen mit 0,005 % (v/v) Roti<sup>®</sup>-GelStain versetzt. Dieser Farbstoff ist ein Fluorophor, der bei Bindung von DNA sein Absorptionsspektrum ändert und somit DNA-Fragmente bei Anregung mit UV-Licht sichtbar macht. Zur Analyse wurden die DNA-Fragmente bei einer Spannung von 90 V für ca. 50 min aufgetrennt. Zusätzlich zu den Proben wurde ein Standard-DNA-Marker (GeneRuler<sup>™</sup> 1 kb oder 100 bp Plus DNA-Ladder, Thermo Fischer Scientific) aufgetragen, um die Größe der DNA-Fragmente abschätzen zu können. Die Ergebnisse wurden entweder mit der GelDoc-Station (Gelcam Phase 312 nm, Polaroid) dokumentiert oder die DNA-Fragmente wurden direkt auf dem UV-Tisch ausgeschnitten, aufgereinigt (siehe Abschnitt 2.15.7) und für weitere Arbeiten verwendet.

### **2.15.7 Aufreinigung von DNA aus Agarose-Gelen und anderen Reaktionen**

Für die weitere Verwendung von DNA in z.B. Klonierungen muss die DNA zunächst aufgereinigt werden, um Puffer- und Enzymreste zu entfernen und eine Inhibierung folgender Reaktionen zu vermeiden. Zur Aufreinigung von DNA aus Agarose-Gelen, sowie aus anderen Reaktionen wurde das NucleoSpin<sup>®</sup> Gel and PCR Clean-up Kit von Macherey-Nagel verwendet und gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

### **2.15.8 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten**

Um eine Religation eines durch Restriktionsendonukleasen linearisierten Vektors zu verhindern, wurden geschnittene und aufgereinigte Plasmide für die Klonierung mittels einer Phosphatase dephosphoryliert. Dazu wurde die aus dem Gel aufgereinigte Vektor-DNA (Abschnitt 2.15.6 und 2.15.7) mit 1 µL Phosphatase (Roche Diagnostics) im mitgelieferten Puffersystem für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Vektor-DNA erneut aufgereinigt (Abschnitt 2.15.7) und die DNA-Konzentration mittels NanoDrop 2000 (PeqLab, Erlangen) bestimmt.

### 2.15.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von doppelsträngigen DNA-Fragmenten wurde in dieser Arbeit das Quick Ligation<sup>TM</sup> Kit (Invitrogen) verwendet. Dieses Kit beinhaltet eine besonderen Variante der T4 DNA Ligase, die Quick-Ligase, welche eine Phosphodiester-Bindung zwischen der 3'-Hydroxyl-Gruppe und der 5'-Phosphat-Gruppe zwei benachbarter DNA-Stränge innerhalb kürzester Zeit bildet. Auf diese Weise können gezielt DNA-Fragmente miteinander verbunden werden, die durch einen Restriktionsverdau zueinander komplementäre einzelsträngige Überhänge ("sticky ends") oder stumpfe Enden ("blunt ends") besitzen.

Standardmäßig wurden für eine Klonierung 1-100 ng aufgereinigte Vektor-DNA (geschnitten und dephosphoryliert) und 10-500 ng amplifiziertes Insert im Verhältnis 1:3, 1:5 und 1:10 (Vektor:Insert) eingesetzt. Diese wurden mit 10 µL 2x Quick-Ligase Puffer und 1 µL Quick-Ligase versetzt und mit dH<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 20 µL aufgefüllt. Um die Religation des geschnittenen Vektors auszuschließen, wurde zudem ein Ligationsansatz mit H<sub>2</sub>O statt Insert-DNA angesetzt. Der Ligationsansatz wurde für max. 10 min bei RT inkubiert und anschließend durch Zugabe von 100 µL *E.coli Top 10* oder *BL21STAR* direkt transformiert (Abschnitt 2.15.1) und im Anschluss auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Selektionsmedium ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C im Inkubator gelagert und am nächsten Tag wurden aus den gewachsenen Kolonien Kulturen für die analytische Plasmidaufreinigung angeimpft (Abschnitt 2.15.3). Zur Überprüfung der Insertion der DNA-Fragmente wurde die isolierte Plasmid-DNA anschließend durch die Firma Microsynth (Seqlab, Göttingen) mittels Sanger-Sequenzierung überprüft.

## 2.16 RNA-Techniken

Für alle Experimente wurde RNase-freie Reaktionsgefäße und gestopfte Pipettenspitzen verwendet, sowie Nuklease-freies DEPC-Wasser. Oberflächen und Pipetten wurden vor Beginn für mind. 20 min mit UV bestrahlt und mit RNase-Away (Molecular Bio-Products, San Diego) behandelt.

### 2.16.1 RNA-Isolation mit TRIzol

Für die anschließende Umschreibung der RNA in cDNA und Analyse mittels RT-qPCR wurde die RNA mittels TRIzol isoliert. Die RNA-Isolation mit dem TRIzol Reagenz beruht auf einer sauren Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion. Mit dieser einphasigen Lösung aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat können separate Fragmente von RNA, DNA und Proteinen aus Zell- und Gewebeproben unterschiedlichen Ursprungs isoliert und sequenziert aus einzelnen Proben gefällt werden. Nach dem Ernten der Zellpellets (5 min, 2500 xg) wurden die Proben auf Eis gelagert und mit 500 µL TRIzol pro  $5 \cdot 10^6$  Zellen lysiert. Die Zellpellets wurden entweder direkt isoliert oder bis zur Verwendung bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zur RNA-Isolation wurden 100 µL Chloroform hinzugegeben, ca. 20 s gevortext und die Zellen 10 min auf Eis inkubiert. Nach dem Zentrifugieren (15 min, 12000 xg,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) hat sich das Homogenat in eine klare wässrige obere Schicht, welche die RNA enthält, eine Grenzschicht und eine rote organische untere Schicht (DNA und Proteinen) aufgetrennt. Die wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Im nächsten Schritt wird die RNA aus der wässrigen Schicht durch Zugabe von 250 µL Isopropanol (Inkubation 10 min, RT) ausgefällt und erneut zentrifugiert (max. Geschwindigkeit, 5 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal mit 75 % Ethanol gewaschen und erneut abzentrifugiert (max. Geschwindigkeit, 5 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), um Verunreinigungen zu entfernen. Die restlichen Ethanol-Rückstände wurden vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und die RNA für 10 min bei RT getrocknet. Die ausgefällte RNA wurde anschließend für die cDNA-Synthese in 20 µL  $\text{H}_2\text{O}$  resuspendiert. Die Konzentration der RNA wurde mittels Qubit Fluorometer (Life Technologies, Carlsbad (USA)) bestimmt. Alle RNA-Proben wurden direkt zur cDNA-Synthese eingesetzt.

### 2.16.2 RNA-Isolation mit RNaseasy Mini Kit

Für sensitivere Anwendungen, die eine höhere Qualität der Proben erfordern, wie zum Beispiel die Transkriptomanalyse, wurde die RNA mit Hilfe des RNaseasy mini Kit (Macherey-Nagel, Düren) gemäß Herstellerangaben isoliert.

### 2.16.3 RNA-Sequenzierung (RNA-Seq)

Um zu bestimmen, ob durch den sT-Knockdown die Genexpression in WaGa-Zellen differentiell verändert wird, wurde eine RNA-Seq-Analyse durchgeführt. Dazu wurden die WaGa-shRNA sT-Zellen wie in Abschnitt 2.18.1 beschrieben mit Dox (bzw. DMSO) induziert, nach drei Tagen geerntet und die RNA mit Hilfe des RNaseasy Mini Kits isoliert. Anschließend wurde die Qualität der RNA am Bioanalyzer mittels RNA Nano Kit (Agilent, Santa Clara (USA)) überprüft. Nur Proben mit einer RIN (engl. *RNA Integrity Number*) von über 9 wurden zur Herstellung der RNA-Libraries verwendet. Die RNA-Libraries wurden mit Hilfe des NEBNext® Ultra RNA Library Prep Kit (Illumina, San Diego (USA)) und dem NEBNext® Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module nach Herstellerangaben präpariert. Nachfolgend wurde 1 µg RNA für die magnetische Aufreinigung mittels Agencourt® AMPure XP Beads (NEB, Frankfurt a.M.) eingesetzt.

Nach der Aufreinigung wurde die RNA-Libraries mit dem Illumina HiSeq2500 sequenziert. Für die Auswertung wurden die erhaltenen *Reads* auf das humane Genom (refseq Genome hg19) gemappt (Star v2.5 [221]) und differentiell exprimierte Gene mittels DEseq2 [222] identifiziert.

Als Schwellenwert zur Analyse, ob ein Gen signifikant differentiell exprimiert wird, wurden ein  $\text{Log}_2\text{Fold Change}$  von  $\pm 1$  sowie ein p-Wert (p.adjust) von 0,05 festgelegt. *Gene Ontology* (GO)-, *Gene Set Enrichment* (GSEA)- und KEGG-Pathway-Analysen der erhaltenen Daten wurden mit Hilfe von webgestalt.org durchgeführt.

#### 2.16.4 cDNA-Synthese

Anhand der cDNA kann Aufschluss über die Genexpression gewonnen werden. Direkt im Anschluss an die RNA-Isolation wurde diese mittels random Hexamer-Oligonukleotiden oder Oligo(dT)-Primern und der reversen Transkriptase *Superscript IV* in cDNA umgeschrieben. Vorab wurde die RNA-Konzentration mittels Qubit bestimmt und ein DNaseI-Verdau (DNA-free™ DNA Removal Kit, Invitrogen) durchgeführt. Dazu wurden 1,5 µg RNA mit 2 µL 10x DNaseI Puffer und 3 µL DNaseI in einem Gesamtvolumen von 20 µL bei 37 °C für 30 min inkubiert. Anschließend wurde die DNaseI durch Zugabe von 3 µL Stop Buffer inaktiviert. Nach 2 min Inkubation wurde die Lösung bei maximaler Geschwindigkeit für 90 s zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gelagert.

Zu etwa 1 µg der DNase-verdauten RNA (13 µL) wurden 1 µL random Hexamer-Primer (bzw. 0,6 µL Oligo(dT)-Primer) und 1 µL dNTPs (10 mM) gegeben und bei 65 °C für 5 min inkubiert, um vorhandene Sekundärstrukturen aufzubrechen und die Anlagerung der Primer an die DNA zu erleichtern. Im Anschluss wurden die Proben für mind. 1 min auf Eis gelagert. Im nächsten Schritt wurde ein Mastermix angesetzt, der pro Probe 4 µL 5x SSIV Puffer, 1 µL DTT (0,1 M) und 1 µL muriner RNase-Inhibitor (NEB, Frankfurt a.M.) und 0,7 µL *SuperScript® IV* Reverse Transkriptase (200 U 1/µL, Invitrogen) enthält, und zum Reaktionsansatz pipettiert. Außerdem wurde immer eine Negativkontrolle ohne Reverse-Transkriptase (-RT-Kontrolle) mitgeführt, um falsch-positive Ergebnisse durch Kontamination mit genomischer DNA zu vermeiden. Die Proben wurden im Thermocycler mit folgendem Programm umgeschrieben: 10 min - 23 °C; 30 min - 55 °C; 10 min - 80 °C. Bei der Verwendung des Oligo(dT)-Primers wurde der erste Inkubationsschritt übersprungen und die Proben direkt bei 55 °C für 30 min inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurde zu jeder Probe 0,5 µL *RNase H* gegeben und bei 37 °C für 20 min inkubiert, um nicht umgeschriebene RNA zu verdauen. Die synthetisierte cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert und Transkripte konnten im Anschluss mittels Real-Time-PCR quantifiziert werden.

### 2.16.5 Quantitative-Real-Time-PCR mit SYBR-Green

Die quantitative Bestimmung der Transkripte erfolgte mittels quantitativer Real-Time-PCR (RT-qPCR) mit SYBR Green. SYBR Green ist ein Farbstoff, der an doppelsträngige DNA bindet und bei Bindung grünes Licht bei  $\lambda_{max} = 521$  nm emittiert. Die PCR-Reaktionsansätze sind in Tabelle 14 zu finden. Die RT-qPCR wurde mit dem Rotor-Gene Q Realtime Cycler (Qiagen) durchgeführt und mit der mitgelieferten Software analysiert. Die PCR-Bedingungen sind in Tabelle 15 zu finden. Um die Amplifikation genomischer DNA zu verhindern wurden alle Primerpaare über Exon/Exon-Splicingstellen designt, sowie eine -RT-Kontrolle mitgeführt (siehe Abschnitt 2.16.4). Zur Quantifizierung der Messergebnisse und da die Expressionslevel in unterschiedlichen Zelllinien stark schwanken, wurde für jedes Primerpaar individuell eine Standardkurve aufgenommen. Zur Auswertung wurden die sT-Transkripte auf die Expression des Housekeeping Gens TBP (TATA-Bindeprotein) normalisiert.

**Tabelle 14** Übersicht des RT-qPCR-Ansatzes mit SYBR Green

Reagenz	Menge	
	sT	TBP
Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2x	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L
qPCR Fw Primer (10 mM)	1 $\mu$ L	0,5 $\mu$ L
qPCR Rv Primer (10 mM)	1 $\mu$ L	0,5 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	2 $\mu$ L	3 $\mu$ L
cDNA	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L
Gesamtvolumen	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L

**Tabelle 15** Bedingungen für RT-qPCR mit SYBR Green

<b>Zyklusanzahl</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>
Hold	95 °C	10 min
	95 °C	10 s
Cycling 50x	62 °C sT (60 °C TBP)	15 s
	72 °C	20 s
Melt	60-95 °C	5 s jede Temperatur



## 2.17 Protein-Techniken

### 2.17.1 Herstellung von Proteinlysaten aus eukaryotischen Zellen

Für die Herstellung von Proteinlysaten wurden die Zellen bei 1000 xg für 5 min bei 4 °C pelletiert und auf Eis gelagert oder bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Zellen wurden in 40 µL RIPA-Puffer kräftig resuspendiert und für 30 min auf Eis gelagert. Zelltrümmer wurden bei max. Geschwindigkeit und 4 °C für 30 min abzentrifugiert und die Zellysate in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

### 2.17.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford Reagenz

Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des Bradford-Assays bestimmt. Dabei bildet der Farbstoff Coomassie Blue G-250 in saurer Lösung mit kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen Komplexe, wodurch sich dessen Absorptionsmaximum von 470 nm zu 595 nm verschiebt. Für den Bradford-Assay wurde das Bradford-Reagenz (Bio-Rad Protein Assay Kit) 1:5 mit Millipore-Wasser verdünnt und jeweils 1 mL in eine Küvette vorgelegt. Nach Zugabe des Proteinlysats wurde die Küvette gevortext und die Absorption bei 595 nm gemessen. Da sich die Absorption direkt proportional zur eingesetzten Proteinmenge verhält, wurde die absolute Proteinkonzentration der Proben mit Hilfe der Absorption einer BSA-Standardkurve aus 1 µg, 5 µg, 10 µg und 25 µg ermittelt. Aus den erhaltenen BSA-Absorptionswerten wurde mittels linearer Regression eine Eichkurve erstellt, welche die Berechnung der Konzentration einer unbekanntes Proteinprobe ermöglicht.

### 2.17.3 SDS-Page und Western Blot

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) trennt Proteine im elektrischen Feld unter denaturierenden Bedingungen nach ihrer Größe auf. 30-200 µg Protein wurden mit 4-fach SDS-Protein-Ladepuffer versetzt, für 10 min bei 95 °C aufgeköcht und mittels 10 % (LT-Ag) und 15 % (sT-Ag) SDS-Gelen aufgetrennt. Als Referenzgröße wurde ein Standard-Proteinmarker (Color Protein Marker, Broad Range (NEB)) verwendet. Die Gelkammern (Biorad, München) wurden mit 1x Laufpuffer befüllt und für 50 min bei 200 V angeschlossen.

Direkt im Anschluss an die SDS-PAGE wurden die aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran mittels Semi-Dry Western Blot übertragen. Dazu wurden zwei Filterpapiere in Puffer A, drei Filterpapiere in Puffer B und ein Filterpapier in Puffer C getränkt und die PVDF-Membran in Methanol aktiviert. Die Proteine wurde bei 400 mA für 35 min transferiert und anschließend für 30 min mit 5 %-Milchpulver in PBS-Tween (PBS-T) geblockt, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Im Anschluss wurde der Primärantikörper in 5 %-Milchpulver/PBS-T angesetzt und auf der Membran über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Am Folgetag wurde die PVDF-Membran dreimal für jeweils 5 min mit PBS-T gewaschen bevor die Membran mit dem Sekundärantikörper in 5 %-Milchpulver/PBS-T verdünnt und für 1 h bei RT auf dem Schüttler inkubiert wurde. Nach der Inkubation wurde die Membran dreimal für 5 min mit PBS-T gewaschen und die Membran mit Western Blotting Luminol Reagenz (Santa Cruz, Heidelberg) entwickelt.

**Tabelle 16** Übersicht der Reagenzien für die SDS-PAGE

Sammelgel	5 % (v/v) Acryl-Bisacrylamid
	125 mM Tris HCl, pH 6,8
	0,1 % (w/v) SDS
	0,1 % (w/v) Ammonium Persulfat
	0,1 % (v/v) TEMED
Trenngel	10 - 15 % (v/v) Acryl-Bisacrylamid
	375 mM Tris HCl, pH 8,8
	0,1 % (w/v) SDS
	0,1 % (w/v) Ammonium Persulfat
	0,04 % (v/v) TEMED
SDS-Gelelektrophorese-Puffer (1x)	25 mM Tris
	0,192 M Glycin
	3,5 mM SDS
4 x Protein Ladepuffer	12 % SDS
	40 % (v/v) Glycerol (86 %)
	0,2 M Tris HCl, pH 7,0
	0,004 % (w/v) Bromphenolblau
	5 % (v/v) Mercaptoethanol

#### 2.17.4 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz ist eine Methode, um Proteine und ihre Lokalisation in der Zelle sichtbar zu machen. In der indirekten Immunfluoreszenz wird ein Primärantikörper verwendet, der spezifisch an das zu untersuchende Protein bindet und im nächsten Schritt durch einen an einen Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörper erkannt und sichtbar gemacht wird. Die Auswertung erfolgt mittels Mikroskopie.

Die WaGa-shRNA Zelllinien wurden 3 Tage vor Versuchsbeginn mit Dox oder DMSO induziert, wie in Abschnitt 2.18.1 beschrieben. Für die Immunfluoreszenz der Suspensionszellen wurden die WaGa Zellen abzentrifugiert und in 1 mL RPMI-Medium aufgenommen. Davon wurden jeweils 200  $\mu$ L auf ein mit Poly-L-Lysin beschichtetes Glas-Deckgläschen in einer 24-Well-Mikrotiterplatte ausgesät. Nachdem sich nach ca. 30 min die Zellen auf dem Deckgläschen abgesetzt haben, wurde einmal vorsichtig mit PBS gewaschen und die Zellen für 30 min mit 4 % Paraformaldehyd fixiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal für 5 min mit PBS gewaschen, bevor die Zellmembranen für 10 min mit Permeabilisierungspuffer permeabilisiert wurden. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 30 min mit Blockierungspuffer inkubiert, um unspezifische Bindungen des Primär- und Sekundärantikörpers zu minimieren. Der Primärantikörper anti-MCPyV LT wurde im Verhältnis 1:500 mit Blockierungspuffer verdünnt und für 2-3 h auf den Deckgläschen inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS folgte die Inkubation mit dem Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper TRITC (1:1000 mit Blockierungspuffer verdünnt) für 1 h in einer Dunkelkammer. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Deckgläschen einmal mit PBS gewaschen und mit der Zell-Seite nach unten auf einem Objektträger mit VECTASHIELD 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) Mounting Medium (Vector Laboratories, Burlingame (USA)) eingedeckelt. Um die Deckgläschen auf dem Objektträger zu fixieren und ein Austrocknen der Zellen zu vermeiden, wurden die Ränder des Deckgläschens mit Nagellack verschlossen.

Die Auswertung der Immunfluoreszenz-Färbungen erfolgte am konfokalen Laser Scanning Mikroskop (Leica DMI 6000 mit einem Leica TCS SP5 Tandem Scanner) ausgestattet mit einem Öl-Immersion-Objektiv (63x HCX PL CS plan-*apo*). Dazu wurden von den Zellen Bilder mit einem 3D-Stack von 10-15 Ebenen aufgenommen und mit Hilfe der Velocity Demo Software analysiert.

## 2.18 *In-vitro*-Assays

### 2.18.1 Induktion der shRNA-Knockdown-Zelllinien

Für alle Experimente wurden die WaGa shRNA-Knockdown-Zelllinien drei Tage vor dem geplanten Versuch mit 1 µg/mL Dox induziert. Für die Induktion wurden die Zellen abzentrifugiert (700 xg, 3 min) und in 10 mL frischem RPMI-Medium aufgenommen. Die Zellen wurden 1:3 (DMSO) bzw. 2:3 (Dox) gesplittet und mit RPMI-Medium auf 20 mL aufgefüllt. Es wurden jeweils 20 µL Dox (1 µg/mL) hinzugegeben, geschwenkt und die Zellen bis zum Versuch im Brutschrank kultiviert. Als Kontrolle wurden die Zellen mit reinem DMSO versetzt, da das Dox in DMSO gelöst wurde. Zur Induktion der HCT116sT-Zellen wurde 1 µg/mL Dox (bzw. DMSO) direkt beim Aussäen der Zellen ins Medium gegeben.

### 2.18.2 Proliferationsassays

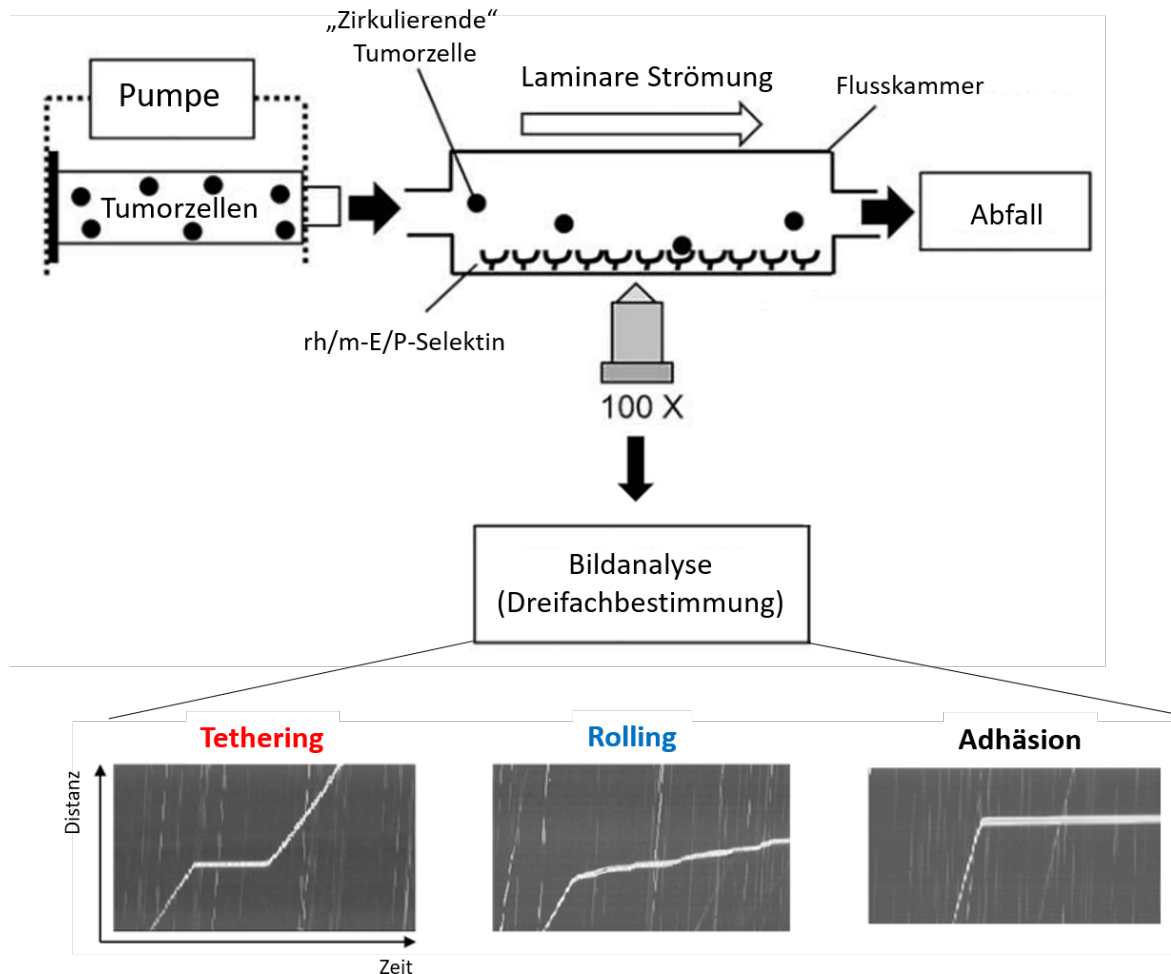
**MTT-Assay** Die Zellproliferation wurde mittels 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2Htetrazolium bromide (MTT) Assay (Merck Millipore, Billerica (USA)) bestimmt. MTT ist ein gelbes, wasserlösliches Tetrazoliumsalz, welches zu blau-violettem, wasserunlöslichen Formazan reduziert wird. Für den MTT-Assay wurden die Zellen, wie in Abschnitt 2.18.1 beschrieben, mit Doxycyclin bzw. DMSO induziert und pro Zelllinie sieben Platten -für jeden Messungs-Tag eine- mit jeweils 1000 Zellen pro 96-Well als Dreifachbestimmung in 100 µL RPMI-Medium ausgesät. Die Zellen wurden bei 37 °C für 10 Tage inkubiert und die metabolische Zellaktivität nach 1, 2, 3, 4, 5, 8 und 10 Tagen bestimmt. Dazu wurden 10 µL MTT-Reagenz (5 mg/mL) zu jedem 96-Well gegeben und die Zellen 4 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Formazan Salzkristalle durch Zugabe des Stopp-Reagenzes (100 µL Isopropanol; 40 mM HCl) aufgelöst. Die Menge des Farbstoff wurde durch colorimetrische Messung bei 570 nm mittels Multiwell-Spektrophotometer (Tecan, Crailsheim) bestimmt. Die Intensität der Färbung entspricht der totalen Glykolyserate und ist somit direkt proportional zur Zellproliferation.

**Wachstumskurven** Um den Einfluss der T-Ag auf die Zellproliferation zu analysieren, wurde die Zellproliferation zusätzlich über die Wachstumsrate der Zellen bestimmt. Dazu wurden  $2,5 \cdot 10^5$  WaGa-Zellen pro Zelllinie mit Dox bzw. DMSO induziert (Abschnitt 2.18.1) und als Duplikat in eine 12-Well-Mikrotiterplatte Platte ausgesät und bei 37 °C inkubiert. Jeden zweiten bzw. dritten Tag wurden die Zellen eines Wells mit Trypanblau 1:1 verdünnt und mittels Neubauer-Zählkammer gezählt und  $2,5 \cdot 10^5$  Zellen wieder in RPMI-Medium mit Dox bzw. DMSO ausgesät. Wenn bereits zu viele Zellen gestorben waren und die Zellzahl von  $2,5 \cdot 10^5$  Zellen nicht mehr erreicht werden konnte, wurden alle übrigen Zellen ausgesät und dies vermerkt.

### 2.18.3 Dynamische Adhäsionsversuche

Einer der ersten Schritte im Metastasierungsprozess ist die Anheftung der Tumorzelle an das Endothel. Um den Einfluss der MCPyV-T-Ag auf diesen Schritt zu untersuchen, wurden Adhäsionsversuche in Kooperation mit Prof. Udo Schumacher durchgeführt. Um die physiologischen Bedingungen des Blutkreislaufes zu imitieren, wurden verschiedene MCC-Zelllinien (WaGa, Mkl-1, Ms-1 und BroLi) mit einer kontinuierlichen Flussrate mittels einer Pumpe (kdScientific, Holliston, MA, USA, Model 100 Series) durch eine Flusskammer ( $\mu$ -slides VI 0.4 ibiTreat, ibidi GmbH, Gräfelfing) geleitet. Der schematische Versuchsaufbau ist in Abbildung 8 dargestellt. Da die Anheftung der Tumorzellen über verschiedene Selektine erfolgt, wurde die Flusskammer zuvor jeweils mit rekombinanten humanen und murinen P- und E-Selektinen (R&D Systems, Minneapolis, USA) beschichtet. Dazu wurden die entsprechenden Selektine auf 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (1:500) mit DPBS verdünnt, 50  $\mu\text{L}$  in die Flusskammer gegeben und diese für 30 min bei 37 °C getrocknet. Als Negativkontrolle wurde eine Fc-Kontrolle verwendet, da die Bindung der Antikörper an die Oberfläche über das Fc-Fragment erfolgt. Für die Versuche mit Endothelzellen (HUVECS) wurden diese bereits einige Tage zuvor aufgetaut und in T75-Flaschen bis ca. 80-90% Konfluenz kultiviert. Einen Tag vor dem Versuch wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit Trypsin abgelöst und  $1,5 \cdot 10^6$ -Zellen in 30  $\mu\text{L}$  pro Flusskammer ausgesät. Am Versuchstag wurde IL-1 $\alpha$  1:1000 mit Endothelzell-Medium verdünnt (10 ng/mL), das Medium in der Flusskammer ausgetauscht und diese für 4 h bei 37 °C inkubiert, um die Expression des E-Selektins zu stimulieren. Für den Adhäsionsversuch wurden die MCC-Zelllinien gezählt und mit RPMI-Medium etwa 12 mL Zellsuspension mit

einer Konzentration von  $1 \cdot 10^5$  Zellen/mL angesetzt, die für alle Versuche verwendet wurde. Im Falle der WaGa-shRNA-Zelllinien wurden diese drei Tage vor Versuchsbeginn mit Dox bzw. DMSO induziert (Abschnitt 2.18.1). Für die Versuche mit dem anti-CD44-Antikörper wurden  $1 \cdot 10^6$  WaGa-Zellen vor dem Versuch für 30 min in 200  $\mu$ L Antikörperlösung (bzw. Isotypkontrolle, 10  $\mu$ g/mL) auf Eis inkubiert und nachfolgend mit Medium ebenfalls auf eine Konzentration von  $1 \cdot 10^5$  Zellen/mL aufgefüllt. Anschließend wurde die Zellsuspension mit einer kontinuierlichen Flussrate von 8 mL/min und 0,25 dyn/1/cm<sup>2</sup> Scherstress durch die Flusskammer geleitet. Die Zelladhäsion wurde mit einem inversen Mikroskop (Zeiss, Jena, Germany, Axiovert 200) beobachtet und mit einer Kamera und Video-Rekorder (CCD-video camera, Sony, CX-77CE; DVD-video-recorder, Panasonic, LQ-MD800E) wurde jeweils ein 1-minütiges Video aufgezeichnet. Die Messung pro Selektin erfolgte jeweils als Dreifachbestimmung. Im Anschluss wurden die Daten mittels CapImage Software (Version 8.6., Dr. Heinrich Zeintl, Heidelberg) ausgewertet. In der Auswertung wurden die Bindungsereignisse aufgrund ihrer Stärke in *Tethering*, *Rolling* und feste Adhäsion unterschieden. Jede Messung erfolgte als Dreifachbestimmung drei biologischer Replikate und die statistische Signifikanz wurde mittels ungepaartem t-Test ermittelt.



**Abbildung 8** Schematischer Versuchsaufbau der dynamischen Adhäsionsversuche. Um die Anheftung der Tumorzellen an das Endothel zu simulieren, werden die Tumorzellen mit einer kontinuierlichen Geschwindigkeit durch eine Flusskammer (ibidi GmbH, Gräfelfing) gepumpt. Diese wurde zuvor mit verschiedenen Selektinen (humane/murine E-/P-Selektine) beschichtet. Mit einem Mikroskop und der CapImage Software (Version 8.6., Dr. Heinrich Zeintl, Heidelberg) wurden 1-minütige Videos aufgezeichnet und das Adhäsionsverhalten verschiedener MCC-Zelllinien analysiert. Bindungsereignisse wurden nach ihrer Stärke in *Tethering* (rot), *Rolling* (blau) und feste Adhäsion (schwarz) unterteilt. Entnommen und modifiziert aus [216].

#### 2.18.4 Statische Adhäsionsversuche

Die Anheftung der Tumorzellen an das Endothel kann im Blutgefäß nicht nur unter dynamischen Bedingungen, sondern auch unter statischen Bedingungen stattfinden. So können Tumorzellen z.B. durch eine mechanische Blockade im Blutstrom verlangsamt werden. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls die Adhäsion der WaGa-Zellen unter statischen Bedingungen mittels Durchflusszytometrie untersucht. Das Prinzip der Durchflusszytometrie wird im nächsten Abschnitt genauer erläutert.

Für die Analyse der statischen Adhäsion wurden im ersten Schritt die Selektine (bzw. Fc-Kontrolle) mit FACS-Puffer 1:100 (auf 10 µg/mL) verdünnt. Anschließend wurde der Biotin-Antikörper im Verhältnis 1:200 direkt zu den Selektinen gegeben und die Lösung für 10 min bei RT inkubiert. Zur Detektion des Biotins wurde im Anschluss ein Allophycocyanin (APC)-gekoppelter Streptavidin-Antikörper im Verhältnis 1:100 zur Lösung gegeben und für 15 min auf Eis inkubiert. Pro Bedingung wurden in etwa  $5 \cdot 10^5$ -Zellen in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt und bei 1000 rpm und 4 °C für 5 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 90 µL der angesetzten Selektin-Antikörper-Lösung resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Schließlich wurde ca. 1 mL FACS-Puffer in ein FACS-Röhrchen vorgelegt und die inkubierten Zellen sowie 0,5 µL Propidiumiodid für die Lebend-Tot-Färbung hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen mittels FACS (BD LSRFortessa<sup>TM</sup>, BD Biosciences, Heidelberg) analysiert und mittels FlowJo Software ausgewertet.

### 2.18.5 Zellinvasions-Assay

Der Einfluss der T-Ag auf die Zell-Invasion wurde mit Hilfe des Cultrex<sup>®</sup> BME Cell Invasion Assay Kits untersucht. In diesem Versuchsaufbau wird die extrazelluläre Matrix aus Laminin, Collagen IV, Entactin und Heparinsulfat Proteoglycan nachgebildet, um die Zellinvasion, einen wesentlichen Prozess der Metastasierung, zu imitieren. Alle Reagenzien des Kits wurden gemäß Herstellerangaben angesetzt und die Inserts der 96-Well-Mikrotiterplatte einen Tag vor dem Versuch mit 0,1x Basement membrane extract (BME) coat beschichtet und über Nacht bei 37 °C getrocknet. Die WaGa-shRNA-Zelllinien wurden drei Tage vor dem Experiment mit Dox bzw. DMSO induziert (Abschnitt 2.18.1), am Versuchstag abzentrifugiert (700 xg; 5 min) und mit Quenching-Medium (RPMI-Medium, 5 % BSA, 1 % P/S und 2 mM L-Glutamin) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in serumfreiem RPMI-Medium mit Dox bzw. DMSO aufgenommen und gezählt. Die Zellen wurden auf eine Konzentration von  $1 \cdot 10^6$  Zellen/mL verdünnt und 50 µL pro 96-Well (=  $5 \cdot 10^4$  Zellen) ausgesät. In die untere Kammer wurden durch die Öffnung vorsichtig 150 µL RPMI-Medium mit Zusätzen gegeben und der Assay für 24 h bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde sowohl das Insert, als auch das untere Well vorsichtig abgesaugt und einmal mit 100 µL 1x Waschpuffer bzw. zweimal mit 200 µL 1x Waschpuffer gewaschen. Für die Messungen mit dem Plate Reader wurden die Inserts in eine schwarze 96-Well-Mikrotiterplatte übersetzt. Die Calcein-AM Lösung



wurde frisch mit 1x Cell Dissociation Buffer angesetzt. 100  $\mu\text{L}$  von der Cell Dissociation Solution/Calcein-AM wurden in die untere Kammer gegeben und die Zellen für 1 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Inserts abgenommen, durch einen Deckel ersetzt und mit einem Multiwell-Spektrophotometer (Tecan) analysiert. Zur Quantifizierung der Messergebnisse wurde eine Standardkurve (50.000, 25.000, 10.000, 5.000, 2.500 Zellen) erstellt, die mit 1x Cell Dissociation Solution verdünnt wurde und die entsprechenden Zellzahlen in 50  $\mu\text{L}$  ausgesät. Es wurden 50  $\mu\text{L}$  der 1x Cell Dissociation Solution/Calcein-AM-Lösung hinzugegeben und die Zellen für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Bestimmung der Standardkurve erfolgte als Dreifachbestimmung und wurde ebenfalls mit dem Multiwell-Spektrophotometer gemessen. Alle Messergebnisse wurden anschließend mittels Eichkurve quantifiziert und das Experiment dreimal wiederholt. Die statistische Signifikanz wurde mittels ungepaartem t-Test berechnet.

### **2.18.6 Durchflusszytometrie (FACS)**

Die Durchflusszytometrie erlaubt die Analyse von Zellen, die einzeln hintereinander mit hoher Geschwindigkeit durch eine dünne Flusszelle geleitet werden. Dabei werden die Zellen mit einem Laserstrahl angeregt und ein für jeden Zelltyp spezifisches Streulicht (engl. *light scatter*) erzeugt. Durch die Analyse einer großen Anzahl von Zellen innerhalb eines sehr kurzen Zeitintervalls (>1000 Zellen/sec) können somit schnell repräsentative Informationen über eine Zell-Population gewonnen werden.

Eine spezielle Form der Durchflusszytometrie stellt die Messung Fluoreszenz-markierte Zellen dar, bei welcher Fluoreszenzfarbstoffe verwendet werden, die an bestimmte Bestandteile der Zelle binden (z.B. DAPI oder Propidiumiodid) oder bestimmte Oberflächenantigene der Zellen mit fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern markiert werden. Die durch das Laserlicht angeregte Fluoreszenz jedes Partikels kann auf diese Weise gemessen und somit Rückschluss auf bestimmte Eigenschaften der Zelle gezogen werden. Außerdem ist es möglich Zellen nach der Markierung zu sortieren, um eine reine Zellpopulation mit einer bestimmten Eigenschaft zu untersuchen. Diese Methode wird umgangssprachlich auch als FACS (engl. *fluorescence-activated cell sorting*) bezeichnet. Ein FACS-Gerät besitzt zusätzlich zu den Fluoreszenzdetektoren einen Vibrator, der den Flüssigkeitsstrom in einzelne, kleine Tröpfchen

unterteilt (hydrodynamische Fokussierung) sowie einen elektrostatischen Sortiermechanismus. An der Elektrode des Sortiermechanismus wird der Tropfen bei einer zu sortierenden Zelle umgekehrt polarisiert und fällt durch ein elektrisches Feld in ein anderes Auffanggefäß als nicht zu sortierende Zellen. Heutzutage sind moderne Geräte mit mehreren Lasern in verschiedenen Bereichen des Spektrums ausgestattet und durch den Einsatz unterschiedlicher Filter können über 10 verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig analysiert werden.

**MACS Marker Screen** Der MACS Marker Screen (Milteny Biotec, Bergisch Gladbach) bietet eine Möglichkeit ein Screening nach Molekülen auf der Zelloberfläche verschiedener Zelltypen mittels Durchflusszytometrie (FACS) durchzuführen. In dieser Arbeit wurde die Expression von Oberflächenmolekülen der MCPyV-positiven WaGa Zellen in Abhängigkeit von MCPyV sT-Ag analysiert. Zu diesem Zweck wurden die WaGa shRNA-Zelllinien (WaGa shRNA sT und WaGa shRNA scr) drei Tage vor dem Experiment mit Dox bzw. DMSO induziert (Abschnitt 2.18.1). Um die erhaltenen Ergebnisse mit den entsprechenden Kontrollzelllinien (WaGa shRNA sT + DMSO und WaGa shRNA scr + DMSO) zu vergleichen, wurde dieses Experiment als Multiplex-Experiment durchgeführt. Dazu wurden einen Tag vor Experimentbeginn die bereits induzierten Zelllinien (pro Zelllinie  $3 \cdot 10^7$  Zellen) mit unterschiedlichen Fluorophoren markiert (CellTrace<sup>TM</sup>, Invitrogen, Karlsruhe). Die Zelllinien wurden nach Herstellerangaben wie folgt markiert: WaGa shRNA sT + Dox in violett (0,25  $\mu$ M), WaGa shRNA scr + Dox in gelb (0,2  $\mu$ M) und WaGa shRNA scr + DMSO in gelb und violett (0,2 und 0,25  $\mu$ M). Die WaGa shRNA sT + DMSO Zelllinien blieb unmarkiert, da bereits alle Zellen GFP durch das shRNA-Plasmid exprimieren. Für die Einstellungen/Kompensation des FACS-Gerätes wurden zusätzlich jeweils  $1 \cdot 10^6$  WaGa wt Zellen mit gelb und violett markiert. Nach dem Labeling wurden alle Zellen bis zur Verwendung in RPMI-Medium + Dox bzw. DMSO weiterkultiviert. Eine Übersicht der Markierungen ist in Tabelle 17 dargestellt.

**Tabelle 17** Übersicht über die Markierung der Zellen mit verschiedenen Fluorophoren

<b>Zelllinie</b>	<b>Farbstoff</b>	<b>Farbe</b>
WaGa shRNA sT + DMSO	ohne	GFP
WaGa shRNA sT + Dox	CellTrace™ Violet	GFP + Violet
WaGa shRNA scr + DMSO	CellTrace™ Violet & Yellow	GFP + Violet + Gelb
WaGa shRNA scr + Dox	CellTrace™ Yellow	GFP + Gelb

Am nächsten Tag wurden Zellen für die Kontrolle des shRNA-Knockdowns entnommen und der MACS Marker Screen nach Herstellerangaben durchgeführt. Das MACS Marker Screen Kit enthält 371 humane, monoklonale APC-konjugierte Antikörper, aufgeteilt auf vier 96-Well-Mikrotiterplatten. Die MACS Marker Screen Platten wurden bei 300 xg für 5 min zentrifugiert, entsiegelt und die enthaltenen Antikörper mit 25 µL deionisiertem Wasser für 10 min im Kühlschrank rekonstituiert. Die vier verschiedenen Zelllinien (WaGa shRNA sT + DMSO und Dox, WaGa shRNA scr + DMSO und + Dox) wurden jeweils gezählt und zusammen in 10,5 mL eiskalten FACS-Puffer mit je 62.500 Zellen pro Zelllinie gegeben. Von dieser Zellsuspension wurden schließlich 25 µL pro 96-Well mit einer Multikanal-Pipette in die MACS-Marker Screen Platten pipettiert, durch auf- und ab pipettieren vorsichtig durchmischt und für 30 min in Dunkelheit im Kühlschrank gelagert. Die Zellen wurden zweimal mit je 200 µL FACS-Puffer gewaschen und bei 300 xg für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils verworfen und die Platten vorsichtig auf einem Papiertuch abgeklopft. Im Anschluss wurden die Zellen mit je 200 µL 1x Cellfix (BD Biosciences) für 20 min bei 4 °C fixiert, welches im letzten Schritt durch 100 µL FACS-Puffer ausgetauscht wurde. Die Proben wurden anschließend per FACS (BD LSRFortessa™, BD Biosciences) analysiert und mittels FlowJo Software und Excel ausgewertet.

**Auswertung MACS Marker Screen** Die Ergebnisse des Oberflächenscreenings der WaGa Zellen wurden mittels FlowJo Software und Excel ausgewertet. Im ersten Schritt erfolgte dafür die Differenzierung der vier verschiedenen Zellpopulationen anhand der unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierungen mit Hilfe der FlowJo Software. Des Weiteren wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) für jeden Oberflächenmarker in jeder der vier Zelllinien bestimmt. Diese Werte wurden im nächsten Schritt in Excel übertragen und der Leerwert, bei dem nur Zellen ohne Antikörper gemessen wurden, von allen Proben subtrahiert.

Zum Einen wurden anhand der erhobenen Daten Oberflächenmoleküle identifiziert, die im Allgemeinen auf der Oberfläche der WaGa-Zellen exprimiert werden. Für diesen Zweck wurde die Expression der Liganden in Kontrollzelllinien WaGa shRNA sT + DMSO und shRNA scr + DMSO genauer analysiert. Als Schwellenwert, um zu entscheiden, ob ein Oberflächenmolekül exprimiert wird, wurde eine MFI von 100 in mindestens einer der beiden Zelllinien festgelegt. Darüber hinausgehend wurden die Oberflächenmoleküle je nach Stärke ihrer Expression in drei verschiedene Gruppen aufgeteilt: Stark (MFI größer als 10.000), Mittel (MFI 1.000-10.000) und Schwach (MFI 100-1.000).

Zum Anderen war es durch das verwendete induzierbare sT KD-Systems in den WaGa-Zellen zusätzlich möglich zu bestimmen, welche Liganden auf der Zelloberfläche in Abhängigkeit vom sT-Ag spezifisch reguliert werden. Dazu wurden die MFIs der beiden Dox-induzierten Zelllinien WaGa shRNA sT und WaGa shRNA scr auf die MFIs der jeweiligen DMSO-induzierten Kontrollzelllinien normalisiert, indem sie durcheinander dividiert wurden. Die daraus resultierende Werte von WaGa shRNA sT und WaGa shRNA scr wurden im Weiteren verwendet um den Log<sub>2</sub>Fold Change zu berechnen. Im Folgenden wurden die Log<sub>2</sub>Fold-Werte der WaGa shRNA scr-Zelllinie von der WaGa shRNA sT-Zelllinie subtrahiert und auf diese Weise die Log<sub>2</sub>diff mittels folgender Formel bestimmt:

$$\text{Log}_2\text{diff} = \text{Log}_2\text{FC}\left(\frac{\text{WaGa shRNA sT +Dox}}{\text{WaGa shRNA sT +DMSO}}\right) - \text{Log}_2\text{FC}\left(\frac{\text{WaGa shRNA scr +Dox}}{\text{WaGa shRNA scr +DMSO}}\right)$$

Um zu entscheiden, ob ein Ligand spezifisch durch das MCPyV-sT-Ag reguliert wird, wurde ein Schwellenwert von Log<sub>2</sub>diff  $\pm 0,2$  festgelegt. Alle positiven Werte werden durch das sT-Ag herunterreguliert, alle negativen Werte hingegen durch sT hochreguliert. Für die Analyse wurden alle Marker berücksichtigt, die in einer der vier Zelllinien exprimiert werden (MFI  $\geq 100$ ).

**Bestätigung der Screening-Ergebnisse** Nach der Durchführung und Auswertung des MACS Marker Screens konnte eine Liste der Oberflächenmoleküle zusammengestellt werden, die durch das sT-Ag reguliert werden. Zur Bestätigung der Ergebnisse wurden die Top-Kandidaten CD44, CD47, CD156c und CD95 aus dem MACS Marker Screen ausgewählt, um diese im kleineren Maßstab mittels FACS-Analyse zu bestätigen. Dafür wurden dieselben Antikörper (Milteny Biotec), die bereits im Screen verwendet wurden, separat bestellt und gemäß Herstellerangaben eingesetzt. Die WaGa shRNA sT Zelllinie wurde mit Dox bzw. DMSO induziert (Abschnitt 2.18.1) und jeweils  $2 \cdot 10^5$  Zellen pro Well in eine 24-Well-Mikrotiterplatte ausgesät. Drei Tage nach Induktion wurden die Zellen abzentrifugiert (2500 xg; 5 min) und der Überstand abgenommen. Die FACS-Antikörper wurden 1:50 (CD44, CD47, CD95) oder 1:11 (CD156c) in FACS-Puffer verdünnt und die Zellen in jeweils 50  $\mu$ L Antikörper-Lösung resuspendiert. Die Zellen wurden für 20 min in Dunkelheit bei RT inkubiert bevor sie mit 1 mL FACS-Puffer gewaschen und abzentrifugiert (2500 xg; 5 min) wurden. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 200  $\mu$ L 1 %igem PFA für 10 min fixiert. Für die Analyse mit dem FACS Fortessa wurde das 1 %ige PFA durch 200  $\mu$ L FACS-Puffer ersetzt. Für die statistische Analyse mittels ANOVA (GraphPad Prism5) wurde das Experiment als Dreifachbestimmung pro Zelllinien und Marker durchgeführt und insgesamt dreimal wiederholt.

**Bestätigung des MACS-Marker Screens mittels sT-Überexpression** Darüber hinausgehend wurden die ausgewählten Top-Kandidaten des MACS Marker Screens durch Überexpression des sT-Ag in drei verschiedenen Zelllinien (WaGa, nHDFs, 293) bestätigt. Für diesen Zweck wurden lentivirale Überstände der Lenti-Vektoren LeGo-iC2 und LeGo-iC2-sT hergestellt (Abschnitt 2.14.1) und durch Titration deren Titer bestimmt (Abschnitt 2.14.2). Anschließend wurden für die sT-Überexpressions-Experimente HEK293, nHDFs (beide  $5 \cdot 10^4$  pro Well) and WaGa Zellen ( $2 \cdot 10^5$  pro Well) in einer 24-Well-Mikrotiterplatte ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurde Medium gewechselt und die Zellen mit Virusüberstand (p604-sT oder p601-mock, MOI 1) in Anwesenheit von 8  $\mu$ g/mL Polybren transduziert und die Zellen für 1 h (nHDFs 30 min) bei 1000 xg und 37 °C zentrifugiert. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel. Die Oberflächenmarker CD44, CD47, CD156c und CD95 wurden 48 h nach Transduktion mit den entsprechenden FACS-Antikörpern aus dem MACS Marker Screen gefärbt (siehe vorheriger Abschnitt). Im Anschluss wurden die gefärbten Zellen mit 200  $\mu$ L 1 %ige PFA für 10 min fixiert und mit dem FACS Fortessa analysiert. Für die statistische

Analyse mittels ANOVA (GraphPad Prism5) wurde das Experiment als Dreifachbestimmung pro Zelllinien und Marker durchgeführt und insgesamt dreimal wiederholt.

### **2.18.7 Phagozytose-Assay**

Für die Durchführung des Phagozytose-Assays wurden primäre, humane Makrophagen aus menschlichen Blutproben (Buffy-Coats) isoliert (Abschnitt 2.12.3). Nach ca. 10 Tagen sind die Monozyten vollständig zu Makrophagen ausdifferenziert. Die Makrophagen wurden einmal mit PBS gewaschen und abgelöst, indem sie für 30 min bei 37 °C mit Accutase (Invitrogen, Karlsruhe) behandelt wurden. Anschließend wurden für den Phagozytose-Assay  $1 \cdot 10^5$  primäre Makrophagen pro 24-Well auf Glas-Deckgläschen in Monozyten-Medium ausgesät. Am nächsten Tag wurden die mit Dox- bzw. DMSO-induzierten WaGa sT Zellen mittels Neubauer-Zählkammer gezählt und die primären Makrophagen mit einer MOI von 5 (entspricht  $5 \cdot 10^5$  Zellen) infiziert. Zusätzlich wurden die Versuche mit WaGa-Zellen wiederholt, die zuvor mit einer CD47 bzw. scr siRNAs transfiziert worden sind (Abschnitt 2.15.2), oder die WaGa, Mkl-1, und Ms-1 Zellen wurden für mind. 30 min vor der Infektion mit anti-CD47-Antikörper bzw. IgG1-Kontrolle behandelt. Da Mkl-1 und Ms-1 Zellen kein GFP exprimieren, wurden diese vor der Infektion für 30 min mit dem Fluoreszenzfarbstoff Calcein-AM inkubiert, um die Auswertung zu erleichtern. Für die Infektion wurde dann das Monozyten-Medium von den Makrophagen entfernt und die WaGa-Zellen in RPMI-Medium ohne Zusätze aufgenommen. Die Infektion wurde nach 0,5 h, 1 h, 2 h und 4 h abgestoppt, indem die Zellen einmal mit PBS gewaschen und für 10 min mit 4 %igen PFA fixiert wurden. Nach dem Fixieren wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und die Deckgläser auf Objektträgern mit VECTASHIELD DAPI-Mounting-Medium (Vector Laboratories, Burlingame (USA)) eingedeckelt. Um die Deckgläschen auf dem Objektträger zu fixieren und ein Austrocknen der Zellen zu vermeiden, wurden die Ränder des Deckgläschens mit Nagellack verschlossen.

Die Auswertung des Phagozytose-Assays erfolgte am konfokalen Laser Scanning Mikroskop (Leica DMI 6000 mit einem Leica TCS SP5 Tandem Scanner), welches mit einem Öl-Immersion-Objektiv (63x HCX PL CS plan-apo) ausgestattet ist. Dazu wurden von den Zellen Bilder mit einem 3D-Stack von 10-15 Ebenen aufgenommen und mit Hilfe der Volocity Demo Software analysiert. Zur quantitativen Auswertung wurde der Phagozytische Index (PI)

berechnet, indem die Anzahl der (phagozytierten) WaGa-Zellen pro Makrophage bestimmt wurde. Pro Messzeitpunkt wurden mindestens 100 Makrophagen gezählt und die Versuche mindestens dreimal mit verschiedenen Donoren wiederholt. Die statistische Signifikanz wurde mittels ungepaartem t-Test berechnet.

### **2.18.8 Apoptose-Assay**

Apoptose-Assays wurden in dieser Arbeit mit dem Pacific Blue<sup>TM</sup> Annexin V-Kit (Biolegend) durchgeführt, um den Einfluss von MCPyV sT-Ag auf die Zellproliferation und den Zelltod zu analysieren. Annexin V ist ein Apoptose-Marker, der in normalen Zellen intrazellulär vorliegt und bereits in der frühen Apoptose an die Zelloberfläche translokalisiert wird. Durch Annexin V-Färbung ist es somit möglich apoptotische Zellen z.B. mittels FACS zu identifizieren. Zusätzlich wurde eine Lebend-Tod-Zellfärbung mit Propidiumiodid durchgeführt, um in der Auswertung lebende von toten Zellen diskriminieren zu können.

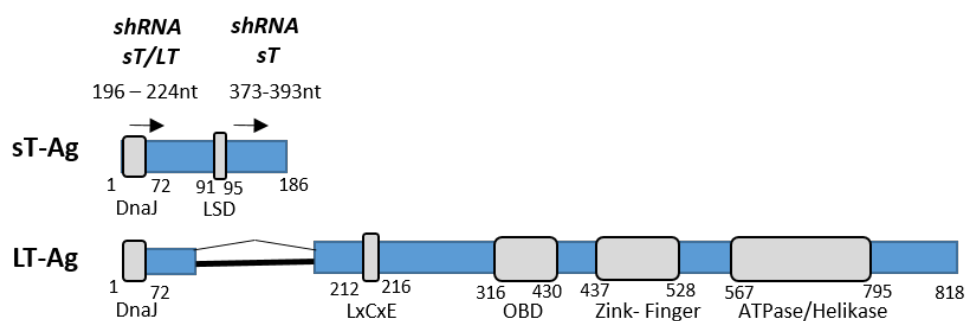
Für die Apoptose-Assays wurden die WaGa-shRNA-Zelllinien mit Dox oder DMSO induziert (Abschnitt 2.18.1) und jeweils  $2 \cdot 10^5$  Zellen pro 24-Well ausgesät. In den Experimenten mit Antikörper-Blockierung wurden 0,25  $\mu\text{L}$  des anti-FAS-Antikörpers (1 mg/mL) (bzw. der IgG1-Kontrolle) direkt beim Aussäen ins Medium dazu gegeben. Nach 1, 2, 3, 4, 5, und 8 Tagen wurden die Zellen jeweils abzentrifugiert und in 100  $\mu\text{L}$  Annexin V Binding Buffer resuspendiert. Es wurden 5  $\mu\text{L}$  Pacific Blue<sup>TM</sup> Annexin V und 10  $\mu\text{L}$  Propidium-Iodid-Lösung hinzugegeben, gevortext und die Zellen für 15 min bei RT in Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden 400  $\mu\text{L}$  Annexin V Binding Buffer hinzugegeben und die Zellen direkt im Anschluss mittels FACS analysiert. Für die Einstellungen des FACS-Gerätes wurden ungefärbte WaGa-Zellen verwendet, sowie als Positivkontrolle für den Zelltod WaGa-Zellen, die für 10 min bei 65 °C inkubiert wurden. Die Proben wurden mittels FlowJo Software ausgewertet. Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz wurde ein ungepaarter t-Test verwendet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Etablierung eines induzierbaren shRNA-Knockdown-Systems der T-Antigene in WaGa-Zellen

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle des sT-Ags in der Metastasierung des MCCs zu analysieren. Zu diesem Zweck wurden drei verschiedene konditionelle WaGa shRNA-Knockdown-Zelllinien hergestellt, in denen die T-Ag-Expression durch Zugabe von Dox und damit verbundenen shRNA-induziertem Transkriptabbau reguliert wird. Die Etablierung dieses Tet-On-Systems bildet die Grundlage für alle Versuche, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden.

Eine Übersicht über die Positionen der verwendeten shRNAs ist in Abbildung 9 dargestellt. Die shRNA sT/LT (Pos. 196-224 nt), für den simultanen Knockdown beider T-Ag, ist in ihrer Sequenz komplementär zur N-terminalen DnaJ-Domäne, die in beiden T-Ag, LT-Ag und sT-Ag, identisch ist. Im Gegensatz dazu richtet sich die shRNA sT (Pos. 373-393 nt) spezifisch gegen das Transkript, welches für das sT-Ag kodiert, da die Sequenz innerhalb der sT-eigenen Sequenz hinter der LSD-Domäne liegt. Weil diese Position im Intron des LT-Ags liegt, reguliert die shRNA sT spezifisch die Expression des sT-Ags. Zusätzlich wurde eine shRNA scrambled (shRNA scr) mit einer zufälligen Sequenz als Kontrolle verwendet, um unspezifische Effekte durch partielle Homologien der shRNA zu anderen Stellen im Genom auszuschließen (*Off-Target*-Effekte). Die genauen Sequenzen der verwendeten shRNAs sind in Tabelle 5 zu finden.

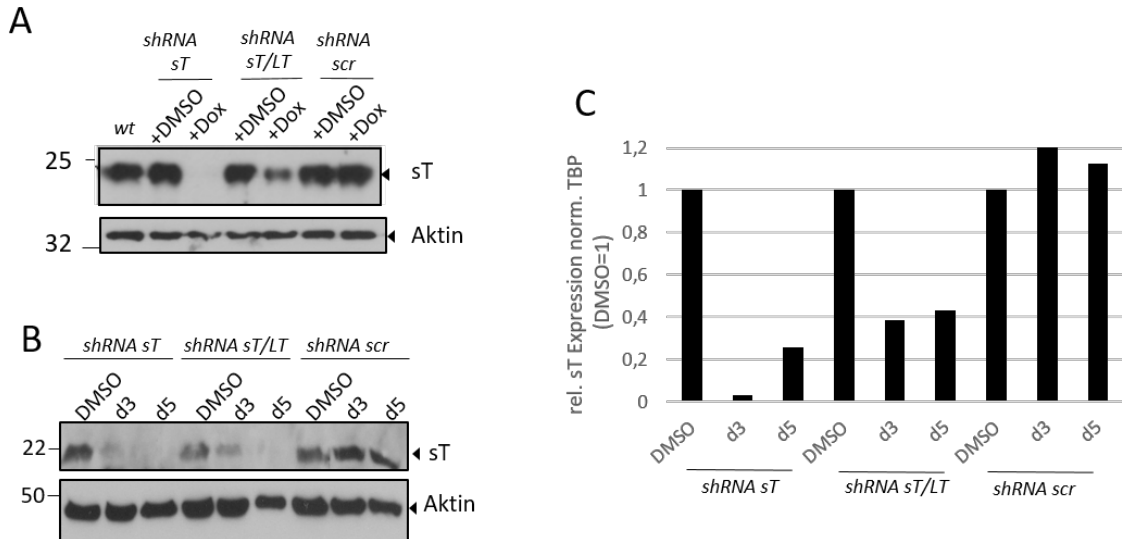


**Abbildung 9** Schematische Übersicht des shRNA-Lokus für den induzierbaren Knockdown der MCPyV-T-Ag, sT- und LT-Ag. Die Positionen der beiden shRNAs für den spezifischen Knockdown des sT-Ags (shRNA sT) und den Knockdown beider T-Ag (shRNA sT/LT) wurden gemäß GenBank Nr. JN707599.1 in Nukleotiden (nt) eingezeichnet. Die Positionen der bekannten funktionalen Domänen des sT-Ags und LT-Ags sind in Aminosäure angegeben. LSD: *Large-T stabilizing domain*; LxCxE: *Rb binding motif*; OBD: *origin binding domain*.



Zur Bestimmung der Funktionalität des shRNA-Knockdowns wurden im ersten Schritt HCT116-Zellen verwendet, in welchen das sT-Ag durch lentivirale Transduktion stabil überexprimiert wird [223], da die sT-Expressionslevel in den MCC-Zelllinien eher gering sind und der verwendete 2T2-Antikörper aus dem Hybridomzellüberstand nicht sehr sensitiv ist. Dazu wurden die Zellen mit den verschiedenen induzierbaren, lentiviralen shRNA-Vektoren transduziert und für einige Tage mittels 100 µg/mL Zeocin selektioniert. Beim Aussäen wurden die Zellen schließlich mit 1 µg/mL Dox (bzw. DMSO) induziert und sT-Proteinlevel drei Tage später mittels Western Blot detektiert. Abbildung 10 A zeigt, dass in den HCT116sT-Zellen, die zuvor mit der shRNA sT-behandelt wurden, die sT-Proteinlevel im Vergleich zur DMSO-Kontrolle vollständig herunterreguliert werden. Im Gegensatz dazu konnte in den HCT116sT-Zellen, die mit der shRNA sT/LT behandelt wurden, die sT-Proteinlevel in etwa um die Hälfte reduziert werden. Hinsichtlich der sT-Proteinexpression in den HCT116sT-Zellen, die mit der shRNA scr-Kontrolle transduziert wurden, konnte keine Veränderung festgestellt werden.

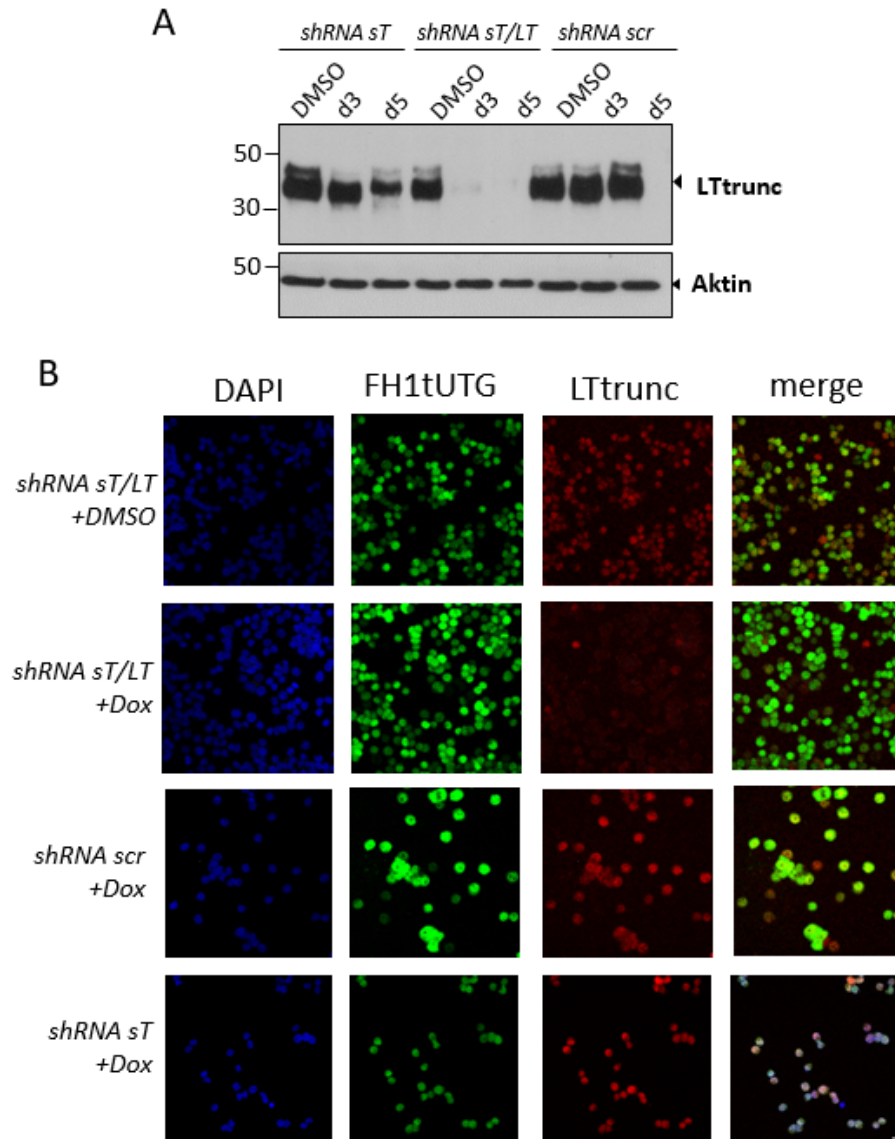
Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob die shRNAs die T-Ag in WaGa-Zellen, einer MCPyV-positiven Zelllinie, ebenso effizient herunterregulieren können. Dazu wurden die WaGa shRNA-Zelllinien mit 1 µg/mL Dox induziert und an Tag 3 (d3) und Tag 5 (d5) nach Induktion wurden die sT-Expressionslevel mittels Western Blot sowie die sT-Transkripte mittels RT-qPCR überprüft (Abbildung 10 B & C). Die Expression beider T-Ag shRNAs (sT und sT/LT) reduziert an beiden Tagen signifikant die Proteinexpression des sT-Ags, sowie auch die sT-Transkripte im Vergleich zu den Kontrollzellen, die mit DMSO behandelt wurden. In der Dox-(bzw. DMSO) behandelten Kontrollzelllinie WaGa shRNA scr kann hingegen keine Veränderung beobachtet werden. Wie bereits in den HCT116sT-Zellen ist hier ebenfalls zu erkennen, dass die individuelle sT-shRNA die sT-Transkripte ein wenig effizienter herunterreguliert als die sT/LT-shRNA. Aufgrund der niedrigen Sensitivität des 2T2-Antikörpers in den WaGa-Zellen wurde in allen Versuchen dieser Arbeit der T-Ag-Knockdown mittels RT-qPCR überprüft.



**Abbildung 10 Effizienz der induzierbaren shRNAs hinsichtlich sT-Expressionslevel.** Western Blotting bestätigt, dass sT-Proteinlevel in (A) HCT116sT-Zellen an Tag 3 und in (B) WaGa-Zellen an Tag 3 (d3) und Tag 5 (d5) nach Induktion der Zellen mit 1 µg/mL Dox effizient herunterreguliert werden. Zur Detektion der sT-Proteinlevel wurde entweder selbst hergestellter 2T2-Antikörper (1:1) für die HCT116sT-Zellen oder aufkonzentrierter 2T2-Antikörper (1:50, Patrick Moore) für die WaGa-Zellen verwendet, zur Kontrolle gleichmäßiger Proteinmengen wurden Aktin-Expressionslevel (Anti- $\alpha$ -Aktin C4) bestimmt. (C) Zusätzlich wurden die sT-Transkripte mittels RT-qPCR ermittelt und RNA-Expressionslevel im Vergleich zum Housekeeping-Gen TBP (*TATA-Binding Protein*) bestimmt.

Des Weiteren wurde die Funktionalität der induzierbaren shRNA sT/LT im Hinblick auf die LT-Proteinexpression überprüft. In Abbildung 11 zeigen sowohl Western Blotting als auch Immunfluoreszenz, dass durch die Induktion der shRNA sT/LT in WaGa-Zellen mit 1 µg/mL Dox die LT-Proteinlevel an Tag 3 und Tag 5 fast vollständig herunterreguliert werden können. In den DMSO-Kontrollzellen konnte hingegen kein Unterschied festgestellt werden. Zudem konnte ausgeschlossen werden, dass der individuelle shRNA-Knockdown des sT-Ags einen Einfluss auf die LT-Expressionslevel hat. In diesem Fall ist die minimale Reduktion der LT-Proteinlevel dadurch zu erklären, dass sT-Expression das LT-Protein stabilisieren kann [182].

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass beide verwendeten shRNAs (sT und sT/LT) nach Induktion mit Dox effizient die sT- und LT-Expressionslevel in den WaGa-Zellen herunterregulieren können.



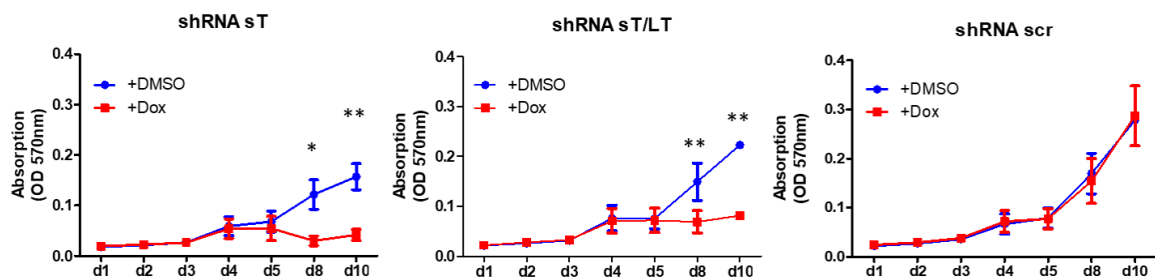
**Abbildung 11 Effizienz der induzierbaren shRNAs hinsichtlich LT-Expressionslevel.** (A) Western Blotting an Tag 3 und 5 nach Induktion mit 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Dox bestätigt die Reduktion der LT-Expressionslevel für die *shRNA sT/LT*. *LTtrunc*: verkürztes LT-Protein. Aktin wurde als Ladekontrolle für gleiche Proteinmengen verwendet. (B) Immunfluoreszenz-Färbung des *LTtrunc*-Proteins (Cm2B4 und anti-TRITC, rot) in WaGa-Zellen 3 Tage nach Induktion mit 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Dox oder DMSO. WaGa-Zellen wurden mit dem Dox-induzierbaren Vektor stabil transduziert, welcher konstitutiv GFP exprimiert (FH1tUTG, grün), zusätzlich wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt (blau). Die LT-Expression wird durch den Knockdown des sT-Ags nicht beeinflusst. Maßstabsbalken (Bild unten rechts) ist 20  $\mu\text{m}$ .

### 3.2 Proliferations-Assays der WaGa shRNA-Knockdown-Zelllinien

Um darüber hinaus die Funktionalität der shRNAs zu bestätigen, wurde der Effekt des T-Ag-Knockdowns auf die Zellproliferation bestimmt. Houben et al. [82] zeigten bereits, dass die MCC-Zelllinien die Expression der T-Ag zum Überleben benötigen und ein Knockdown der T-Ag die Zellen in Zellzyklus-Arrest und Apoptose führt. Im Folgenden wurde daher der Effekt des T-Ag-Knockdowns auf das Zellwachstum in den hergestellten WaGa shRNA-Knockdown-Zelllinien mittels MTT-Assays und Wachstumskurven untersucht.

#### 3.2.1 MTT-Assays

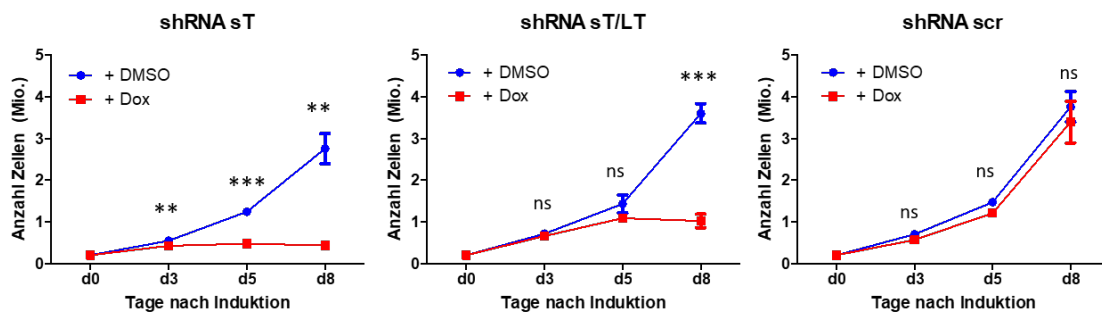
Die Proliferation bzw. metabolische Aktivität der Dox- (bzw. DMSO) induzierten WaGa shRNA-Zelllinien wurde über zehn Tage lang mit Hilfe eines MTT Assays (Merck Millipore, Billerica (USA)) untersucht (Abbildung 12). Ab Tag 4-5 wird sichtbar, dass die Proliferation der T-Ag-Knockdown Zelllinien sich verlangsamt, bis die Zellen ab Tag 8 nach Induktion signifikant langsamer im Vergleich zu den Kontrollzellen proliferieren. Im Vergleich dazu wurde in den WaGa-shRNA scr-Kontrollzellen keine Veränderung der Proliferation festgestellt.



**Abbildung 12** MTT-Assays der WaGa shRNA-Knockdown-Zelllinien. Die Zellproliferation der induzierten WaGa shRNA-Knockdown-Zelllinien wurde mittels MTT-Assay (Merck Millipore) über zehn Tage lang bestimmt. Sowohl der induzierbare shRNA-Knockdown des sT-Ags als auch beider T-Ag verlangsamt ab Tag 8 signifikant die Proliferation der WaGa-Zellen. Dargestellt ist das Wachstum der Zellen im Vergleich zu Tag 1. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe eines ungepaarten t-Tests ermittelt: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

### 3.2.2 Wachstumskurven

Zusätzlich zu den MTT-Assays wurden Wachstumskurven der induzierbaren WaGa shRNA-Knockdown Zelllinien aufgenommen (Abbildung 13). Dazu wurden die Zellen jeden zweiten bzw. dritten Tag manuell mittels Neubauer-Zählkammer gezählt. Auch hier wird zwischen Tag 3 und Tag 5 nach Induktion sichtbar, dass sich das Wachstum der T-Ag-Knockdown-Zelllinien im Vergleich zu den Kontrollzellen signifikant verlangsamt. Im Vergleich dazu wurde in den WaGa shRNA scr-Kontrollzellen kein Unterschied im Bezug auf das Zellwachstums festgestellt.



**Abbildung 13** Wachstumskurven der WaGa shRNA-Knockdown-Zelllinien. Die Wachstumskurven der induzierten WaGa-shRNA-Zelllinien wurde manuell mittels Neubauer-Zählkammer über acht Tage lang jeden zweiten (bzw. dritten) Tag bestimmt. Sowohl der induzierbare shRNA-Knockdown des sT-Ags als auch beider T-Ag verlangsamt signifikant das Wachstum der WaGa-Zellen. Dargestellt ist das Wachstum der Zellen im Vergleich zu Tag 1. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe eines ungepaarten t-Tests ermittelt: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . ns: nicht signifikant.

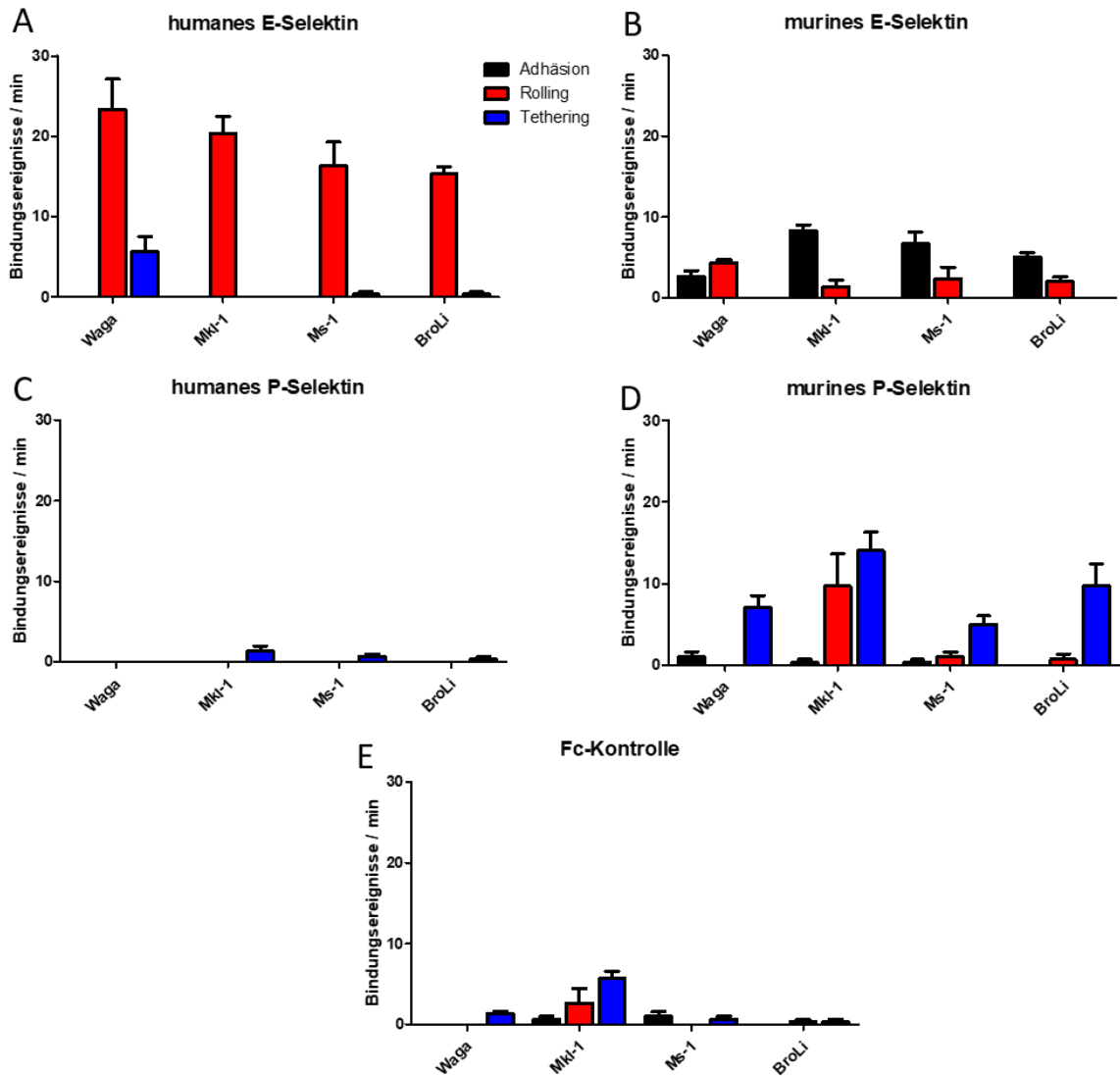
Die Beobachtungen von Houben et al. [82] konnten demnach für die hergestellten WaGa shRNA-Knockdown-Zelllinien bestätigt werden. Es konnte somit erfolgreich ein induzierbares shRNA-Knockdown-System für den individuellen Knockdown der T-Ag in den WaGa-Zellen etabliert werden. Aufgrund der Ergebnisse des MTT-Assays und der Wachstumskurven wurden alle Experimente in dieser Arbeit drei Tage nach Induktion mit Dox bzw. DMSO durchgeführt.

### 3.3 Analyse des Bindungsverhaltens von MCC-Zelllinien an Selektine

In den letzten Jahren fokussierte sich die Forschung zunehmend auf die Rolle der T-Ag in der MCC-Pathogenese. Daraus ergaben sich zahlreiche Hinweise, dass insbesondere das sT-Ag eine entscheidende Rolle in der Metastasierung einnimmt (Abschnitt 1.4.4). Um den Einfluss des sT-Ags auf den Metastasierungsprozess genauer zu analysieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit dynamische und statische Adhäsionsversuche durchgeführt. In diesem Versuchsaufbau wird die Anheftung der Tumorzellen an das Endothel nachgeahmt, welche durch verschiedene Selektine, die auf dem Endothel exprimiert werden, vermittelt wird. Dieser Prozess stellt einen der ersten und zentralen Schritte in der Metastasierung dar.

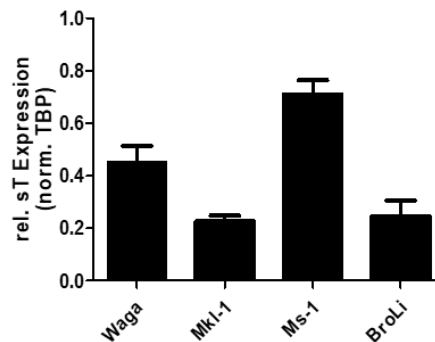
#### 3.3.1 Dynamische Adhäsion von MCC-Zelllinien an humane/murine E- & P-Selektine

In diesem Versuch wurde das Adhäsionsverhalten von vier MCC-Zelllinien WaGa, Mkl-1, Ms-1 und BroLi an verschiedene Selektine (humane & murine E- und P-Selektine) bestimmt (Abbildung 14). Da alle Selektine an ein Fc-Fragment (engl. *fragment crystallisable*) gekoppelt sind, mit dem sie an die Oberfläche der Flusskammer binden, wurde zusätzlich eine Fc-Kontrolle verwendet. Bei der Anlagerung einer Zelle an das Endothel wird in diesem Versuchsaufbau grundsätzlich je nach Stärke in *Tethering*, *Rolling* und feste Adhäsion unterschieden (vgl. Abbildung 8). Die meisten Bindungsereignisse - überwiegend *Rolling* - konnten bei allen Zelllinien für das humane E-Selektin beobachtet werden. Dabei zeigten die WaGa-Zellen die meisten Interaktionen mit bis zu 30 Adhäsionen pro Minute. Am humanen P-Selektin hingegen konnte keine Adhäsion unter dynamischen Bedingungen festgestellt werden. Bei den murinen Selektinen wurden im Vergleich zum humanen E-Selektin deutlich weniger Interaktionen für alle MCC-Zelllinien gezählt, wobei am murinen E-Selektin hauptsächlich feste Adhäsion ( $\leq 10$  Adhäsionen/Minute) und am murinen P-Selektin (ca. 10 Adhäsionen/Minute) überwiegend *Tethering* beobachtet wurde. Zudem verhielten sie sich in ihrem Bindungsverhalten sehr ähnlich zueinander, sodass kein großer Unterschied zwischen den einzelnen MCC-Zelllinien auszumachen war. Mit Ausnahme von einigen wenigen Bindungsereignissen (2-7) der Mkl-1 Zellen, wurde keine Bindung an die Fc-Kontrolle beobachtet.



**Abbildung 14** Dynamische Adhäsionsversuche auf humanen und murinen E- und P-Selektinen. Die Zelladhäsion von vier verschiedenen MCC-Zelllinien (WaGa, Mkl-1, Ms-1, BroLi) an humane und murine E- und P-Selektine wurde mittels dynamischer Flussversuche untersucht. Die Bindungsereignisse wurden je nach Stärke in *Tethering* (blau), *Rolling* (rot) und feste Adhäsion (schwarz) klassifiziert. Die meiste Adhäsion (hauptsächlich *Rolling*) der MCC-Zelllinien wurde am humanen E-Selektin (A) beobachtet, an dem vor allem die WaGa-Zellen gehäuft binden. Mit dem humanen P-Selektin (C) hingegen interagiert keine der untersuchten MCC-Zelllinien unter dynamischen Bedingungen. Auch Bindungen an die murinen Selektine wurden beobachtet, wobei schwache Bindungen an das murine P-Selektin (D, *Tethering*) und stärkere Adhäsion an das murine E-Selektin (B) festgestellt wurden. Die Mkl-1 Zellen zeigten 2-7 Adhäsionen/Minute (*Tethering* und *Rolling*) an die negative Fc-Kontrolle (E). Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von jeweils drei technischen Replikaten.

Zwar ist das sT-Ag nicht von den verkürzenden Mutationen der frühen Region betroffen, jedoch ist die Expressionsmenge beider T-Ag jeweils abhängig von der Zelllinie bzw. dem entsprechenden Gewebe. Da die verschiedenen MCC-Zelllinien unterschiedliche Mengen des sT-Ags exprimieren, wurde im nächsten Schritt die relative Menge des sT-Ags mittels RT-qPCR bestimmt (Abbildung 15). Daraus ergibt sich, dass die sT-Expression der WaGa-Zellen im mittleren Bereich liegt und die Ms-1 Zellen (1,5-fach) gemessen daran am meisten sT-Ag exprimieren. Die Mkl-1-Zellen und BroLi-Zellen (0,5-fach) exprimieren ungefähr gleich viel sT-Ag und im Vergleich am wenigsten.



**Abbildung 15** Expression des sT-Antigens in verschiedenen MCC-Zelllinien. Die MCC-Zelllinien exprimieren unterschiedliche Mengen des sT-Ags. Die sT-Transkripte wurden in vier verschiedenen MCC-Zelllinien (WaGa, Mkl-1, Ms-1 und BroLi) mittels RT-qPCR bestimmt. Alle Transkripte wurden auf die Expression des TBP Gens normalisiert und die Bestimmung dreimal wiederholt.

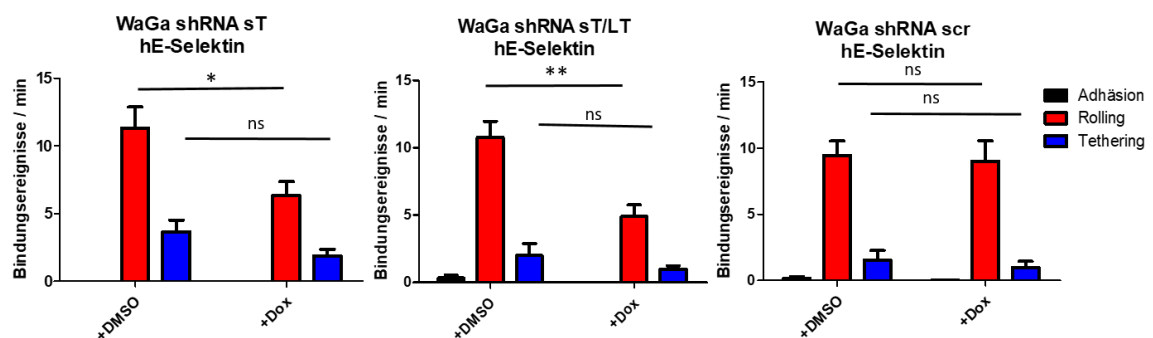
Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die WaGa-Zellen für nachfolgende Experimente ausgewählt, da sie am meisten Adhäsion auf dem humanen E-Selektin zeigten und durchschnittlich viel sT-Ag exprimieren.



### 3.3.2 Dynamische Adhäsion von WaGa-Zellen an das humane E-Selektin in Abhängigkeit der MCPyV-T-Antigene

Im Folgenden wurde das Adhäsionsverhalten unter Verwendung der in dieser Arbeit hergestellten induzierbaren WaGa-shRNA-Zelllinien auf dem humanen E-Selektin erneut untersucht. Abbildung 16 zeigt, dass der Dox-induzierte Knockdown der T-Ag im Vergleich zu den DMSO-behandelten Kontrollzellen zu signifikant weniger Anheftung am humanen E-Selektin führt (*Rolling*). Dabei nimmt der Effekt zu, wenn zusätzlich zum sT-Ag auch das verkürzte LT-Ag in den WaGa-Zellen herunterreguliert wird. In den WaGa shRNA scr-Kontrollzellen blieb die Anzahl der Bindungsereignisse nach Induktion mit Dox hingegen unverändert. Im Gegensatz dazu erfolgt die Adhäsion der WaGa-Zellen auf den murinen E- und P-Selektinen unabhängig von der Expression der MCPyV-T-Ag (Anhang Abbildung 35).

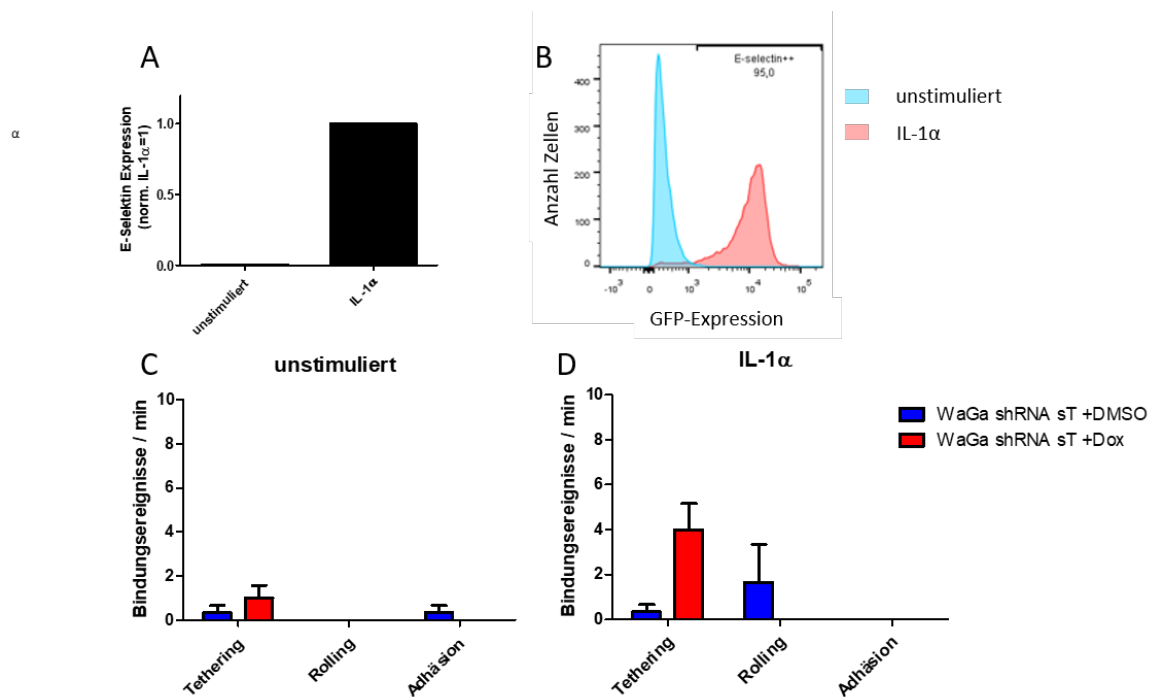
Aus diesen Versuchen geht hervor, dass die Anheftung der Tumorzellen an das humane E-Selektin im MCC insbesondere durch das MCPyV sT-Ag, mit Unterstützung des LT-Ags, vermittelt wird. Daraus resultiert eine wesentliche Rolle des sT-Ags vor allem in den ersten Schritten des Metastasierungsprozesses.



**Abbildung 16 Dynamische Adhäsion von WaGa-Zellen an das humane E-Selektin in Abhängigkeit der T-Antigene.** Die Anheftung der WaGa shRNA-Zelllinien wurde drei Tage nach Induktion mit Dox (bzw. DMSO) mittels dynamischer Flussversuche ermittelt. Sowohl der Knockdown des sT-Ags als auch der Knockdown beider T-Ag reduzieren signifikant die Adhäsion an das humane E-Selektin im Vergleich zu den mit DMSO-behandelten und WaGa shRNA scr-Kontrollzellen. Die Experimente wurden jeweils als technische Triplikate durchgeführt und in drei unabhängigen Experimenten wiederholt. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des ungepaarten t-Tests bestimmt: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . ns: nicht signifikant.

### 3.3.3 Dynamische Adhäsion von WaGa-Zellen an Endothelzellen

Um die Anheftung der Tumorzellen genauer zu untersuchen und den Prozess der Anheftung noch realistischer zu imitieren, wurden im nächsten Schritt statt der rekombinanten Selektine Endothelzellen (HUVECs) zum Beschichten der Flusskammer verwendet. Dazu war es notwendig, vor Beginn des Experiments die Expression des E-Selektins auf den Endothelzellen mittels  $IL-1\alpha$  zu induzieren (Abbildung 17 A & B). Nach Induktion der E-Selektin Expression konnten zwar einige Interaktionen der Dox (bzw. DMSO) behandelten WaGa shRNA sT-Zellen mit den Endothelzellen beobachtet werden, jedoch waren dies nur sehr wenige ( $\leq 4$  Adhäsionen/Minute) und überwiegend schwache Interaktionen (*Tethering*, Abbildung 17 C & D). Somit kann durch dieses Modell keine Aussage über die Abhängigkeit des sT-Ags in der Bindung von WaGa-Zellen an das Endothel getroffen werden.

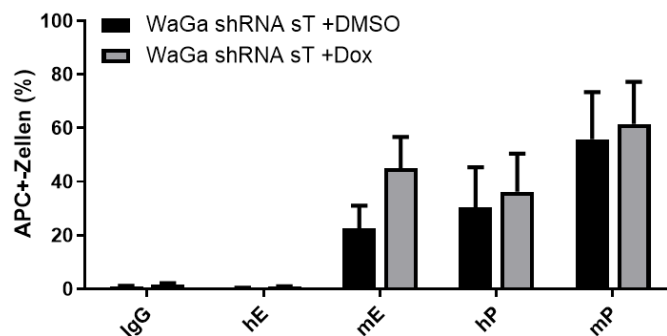


**Abbildung 17** Dynamische Adhäsion von WaGa-Zellen an Endothelzellen. WaGa-Zellen binden unter dynamischen Bedingungen nur schwach an Endothelzellen. Die Bindung der WaGa-shRNA-Zelllinien an Endothelzellen wurde drei Tage nach Induktion mit Dox (bzw. DMSO) mittels dynamischer Flussversuche ermittelt. 4 h vor Versuchsbeginn wurde die E-Selektin-Expression mittels  $IL-1\alpha$  induziert und per FACS überprüft (A & B). WaGa-Zellen binden nur wenig ( $\leq 4$  Adhäsionen/Minute) an die Endothelzellen und zeigen überwiegend schwache Interaktion (*Tethering*, C & D). Das Experiment wurde als technisches Triplikat durchgeführt.

### 3.3.4 Adhäsion unter statischen Bedingungen

Die Interaktion von Selektinen und ihren Liganden findet im Blutstrom jedoch nicht nur unter dynamischen Bedingungen, sondern auch unter statischen Bedingungen statt. Dies ist z.B. der Fall, wenn zirkulierende Tumorzellen durch mechanische Blockaden stark verlangsamt werden, was unabhängig vom Durchmesser der Blutgefäße beschrieben werden konnte.

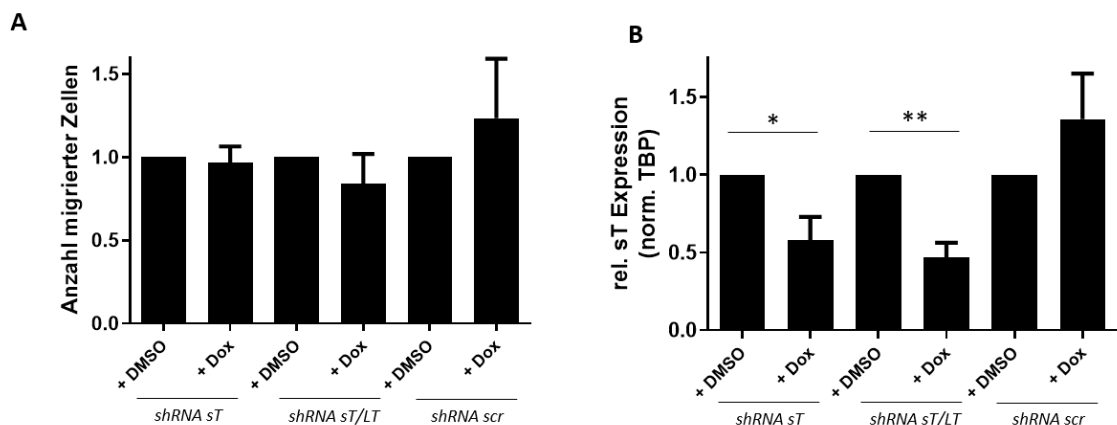
Um zusätzlich zur dynamischen Adhäsions die statische Adhäsion in Abhängigkeit des sT-Ags zu untersuchen, wurden FACS-Experimente mit den WaGa shRNA sT-Knockdown-Zelllinien durchgeführt. In diesen Experimenten binden die rekombinanten Selektine zunächst an einen spezifischen IgG-Biotin Antikörper, der wiederum durch einen Streptavidin-APC-gekoppelten Antikörper erkannt wird, um die Interaktion zwischen Tumorzellen und Selektinen im FACS detektieren zu können. Abbildung 18 zeigt das Adhäsionsverhalten der WaGa-Zellen unter statischen Bedingungen. Im Gegensatz zu den dynamischen Flussversuchen können WaGa-Zellen unter statischen Bedingungen nicht an das humane E-Selektin binden, interagieren jedoch mit dem humanen P-Selektin. Für die murinen P- und E-Selektine konnte ebenfalls eine Bindung beobachtet werden. Dabei scheint die Bindung des humanen und murinen P-Selektins unabhängig von der Expression des sT-Ags zu sein. Im Falle des murinen E-Selektins erhöht der Knockdown des sT-Ags leicht die Bindung, jedoch nicht signifikant. Die Stärke der Interaktion ist für alle Selektine ähnlich, am stärksten jedoch für das murine P-Selektin.



**Abbildung 18 Statische Adhäsion von WaGa-Zellen an Selektine.** Die statische Selektin-Bindung der WaGa-shRNA sT Zelllinie wurde drei Tage nach Induktion mit Dox (bzw. DMSO) durch FACS-Experimente ermittelt. Unter statischen Bedingungen binden WaGa-Zellen nicht an das humane E-Selektin (hE), jedoch an das humane P-Selektin (hP). Interaktionen mit den murinen E-(mE) und P-Selektinen (mP) konnten ebenfalls beobachtet werden. Alle Interaktionen zwischen Selektinen und WaGa-Zellen waren unabhängig von der sT-Expression. Die Experimente wurden drei Mal wiederholt. Die statistische Signifikanz wurde mittels ungepaarten t-Test bestimmt: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . APC: Allophycocyanin.

### 3.4 Analyse der Zellinvasion in Abhängigkeit der MCPyV-T-Antigene

Eine weitere Voraussetzung für die Metastasierung, die der Anheftung von Tumorzellen an das Endothel folgt, ist die Infiltration der Basalmembran sowie der ECM von Epithelzellen. Um zu untersuchen, ob die T-Ag einen Einfluss auf die Invasion der Tumorzellen durch die ECM haben, wurden Cultrex® BME Cell Invasion Assays (R&D Systems) mit den WaGa shRNA-Zelllinien durchgeführt (Abbildung 19, A). In diesem Zusammenhang konnte weder für den induzierten sT-Knockdown, noch für den Knockdown beider T-Ag in den WaGa-Zellen ein Effekt auf die Invasion der ECM festgestellt werden. Beide Zelllinien verhielten sich ähnlich wie die WaGa shRNA scr-Kontrollzelllinie. Um den T-Ag-Knockdown zu überprüfen und somit die Ergebnisse zu validieren, wurden die sT-Transkripte wie in allen Experimenten mittels RT-qPCR überprüft (Abbildung 19, B). Aufgrund dieser Ergebnisse spielt das sT-Ag zumindest in den WaGa-Zellen vermutlich keine entscheidende Rolle in der Invasion der ECM von Epithelzellen.



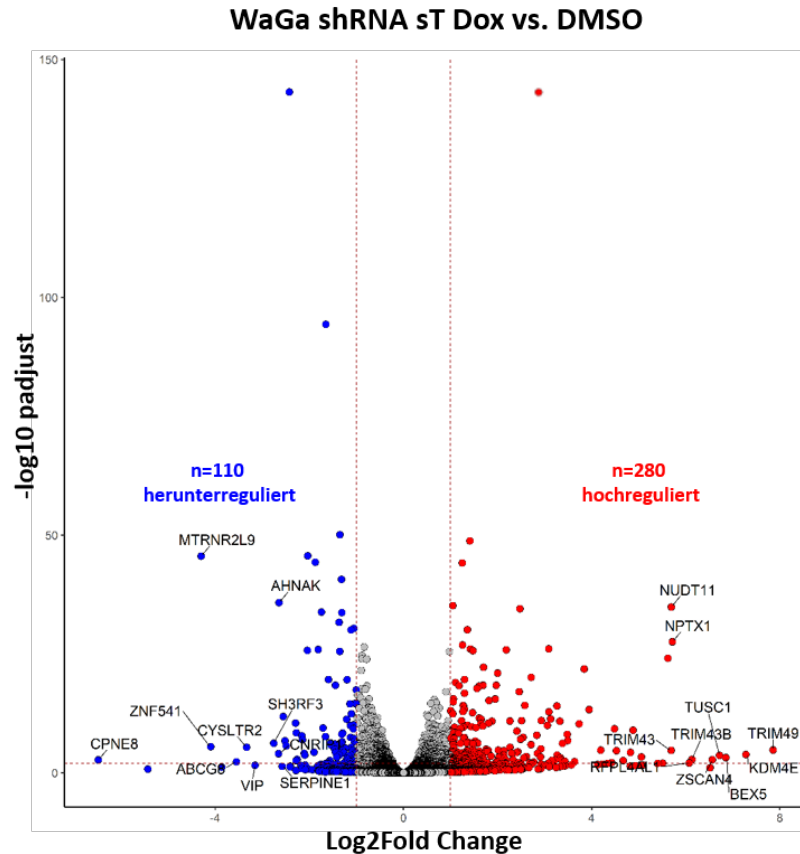
**Abbildung 19 Zellinvasion von WaGa-Zellen in Abhängigkeit der T-Antigene.** Die WaGa shRNA Zelllinien wurden mit 1 µg/mL Dox (bzw. DMSO) induziert und drei Tage nach Induktion wurden Zellinvasions-Assays (R&D Systems) durchgeführt. Der Knockdown der T-Ag zeigte keinen Effekt auf die Zellinvasion (A). In allen Experimenten wurden die Menge an sT-Transkripten mittels RT-qPCR überprüft (B). Die Experimente wurden jeweils als technische Triplikate durchgeführt und in drei unabhängigen Experimenten wiederholt. Alle sT-Transkripte wurden auf das Housekeeping Gen TBP normalisiert, DMSO-Proben wurden gleich 1 gesetzt. Die statistische Signifikanz wurde mittels ungepaarten t-Test bestimmt: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

### 3.5 Differentielle Genexpression in Abhängigkeit des MCPyV-sT-Antigens

Um zu verstehen, wie das sT-Ag die Adhäsion der WaGa-Zellen auf molekularer Ebene beeinflusst, wurde im Folgenden mittels RNA-seq-Analyse untersucht, ob durch das sT-Ag in WaGa-Zellen die Expression bestimmter Gene transkriptionell reguliert wird. Dazu wurde hier einerseits nach sT-induzierten Veränderungen von Genen gesucht, die generell das onkogene Potential des MCPyV erklären könnten, und andererseits wurde speziell nach Genen gesucht, die in der Adhäsion an das Endothel involviert sein könnten, um den Phänotyp aus Abschnitt 16 erklären zu können. Letzteres beinhaltet zum einen Gene, die direkt als Selektin-Liganden fungieren können (z.B. PSGL-1, CD44, CD24, etc.), zum anderen jedoch auch bestimmte Enzyme, wie z.B. Sialyl- und Fucosyltransferasen, die für die Prozessierung oder den Transport der verschiedenen Kohlenhydratstrukturen an die Zelloberfläche eine wichtige Rolle spielen könnten.

Zur Identifizierung von Genen, die durch das sT-Ag reguliert werden, wurde das Transkriptom der Dox-behandelten WaGa shRNA sT-Zellen mit dem der DMSO-behandelten WaGa shRNA sT-Kontrollzelllinien an Tag 3 nach Induktion verglichen. Die Sequenzierung der RNA-Libraries erfolgte mittels Illumina Hi-Seq 2500 und beide Datensätze wurden für eine bessere Vergleichbarkeit mittels DeSeq2 [222] normalisiert. Die RNA-Seq-Analyse beider Proben erfolgte als Doppelbestimmung von zwei biologischen Replikaten.

Einen Überblick über die erhaltenen Ergebnisse der RNA-seq-Analyse gibt der Volcano-Plot in Abbildung 20. Es ließen sich mit Hilfe des shRNA-Knockdown-Systems insgesamt 110 Gene identifizieren, die in Abwesenheit des sT-Ags signifikant herunterreguliert werden und 280 Gene, die in Abwesenheit des sT-Ags signifikant hochreguliert werden. Dementsprechend werden in WaGa-Zellen durch das sT-Ag 110 Gene transkriptionell hochreguliert und 280 Gene durch das sT-Ag herunterreguliert. Als signifikant differentiell exprimierte Gene gelten all diejenigen, die in diesem Experiment mindestens 2-fach erhöhte sequenzierte Reads gegenüber der Kontrollprobe aufweisen ( $\text{Log}_2\text{Fold Change} \geq 1$  oder  $\leq (-1)$ ). Der angepasste p-Wert (padjust) wurde in dieser Analyse auf  $\text{padjust} < 0,05$  gesetzt und gibt dabei das kleinste Signifikanzlevel an, für den ein Wert als statistisch signifikant angesehen wird.



**Abbildung 20** Transkriptomanalyse von WaGa-Zellen in Abhängigkeit des sT-Antigens. WaGa shRNA sT und shRNA scr-Kontrollzellen wurden drei Tage vor der Analyse mit 1 µg/mL Dox induziert und die Transkripte miteinander verglichen. Insgesamt werden in Abwesenheit des sT-Ags im shRNA-Knockdownsystem 280 Gene transkriptionell hochreguliert (rot) und 110 Gene transkriptionell herunterreguliert (blau). Dementsprechend werden diese durch das sT-Ag herunterreguliert (rot) bzw. hochreguliert (blau) ( $Cut-Off: -1 > \text{Log}_2\text{Fold Change} > 1$  und  $\text{padjust}$  (angepasster p-Wert)  $< 0,05$ ). Benannt wurden die Top 10 durch das sT-Ag hoch- bzw. herunterregulierte Gene, die in Tabelle 18 aufgelistet sind. Die vollständige Liste aller sT-regulierten Gene befindet sich im Anhang (Tabelle 19). Die Analyse wurde als Duplikat durchgeführt.

Die Top 10-Gene mit den höchsten bzw. niedrigsten  $\text{Log}_2\text{Fold Changes}$  sind in Tabelle 18 exemplarisch dargestellt. Durch das verwendete shRNA-Knockdownsystem stellen in der Tabelle positive  $\text{Log}_2\text{Fold Changes}$  die Gene dar, die durch das sT-Ag herunterreguliert werden und negative  $\text{Log}_2\text{Fold Changes}$  die Gene, die durch das sT-Ag hochreguliert werden. Die vollständige Tabelle mit allen sT-regulierten Genen ( $\text{Log}_2\text{Fold Change} \geq 1$  oder  $\leq (-1)$  und  $\text{padjust-Wert} < 0,05$ ) befindet sich im Anhang (Anhang Tabelle 19). Aus den erhaltenen Daten der Transkriptomanalyse wurden die Gene der Oberflächenmarker CD24, CD44, ADAM10, O<sub>x</sub>40, CD47 und CD95 ausgewählt und die Ergebnisse mittels RT-qPCR bestätigt (Anhang Abbildung 36).

**Tabelle 18 Top 10 der Gene, die transkriptionell durch das sT-Ag reguliert werden.** Durch das verwendete shRNA-Knockdown-System sind Gene mit positiven Log<sub>2</sub>Fold Changes in Abwesenheit des sT-Ags hochreguliert und werden somit durch das sT-Ag herunterreguliert. Umgekehrt sind Gene mit negativen Log<sub>2</sub>Fold Changes in Abwesenheit des sT-Ags herunterreguliert und werden somit durch das sT-Ag hochreguliert. Die vollständige Liste aller sT-regulierten Gene befindet sich im Anhang (Tabelle 19).

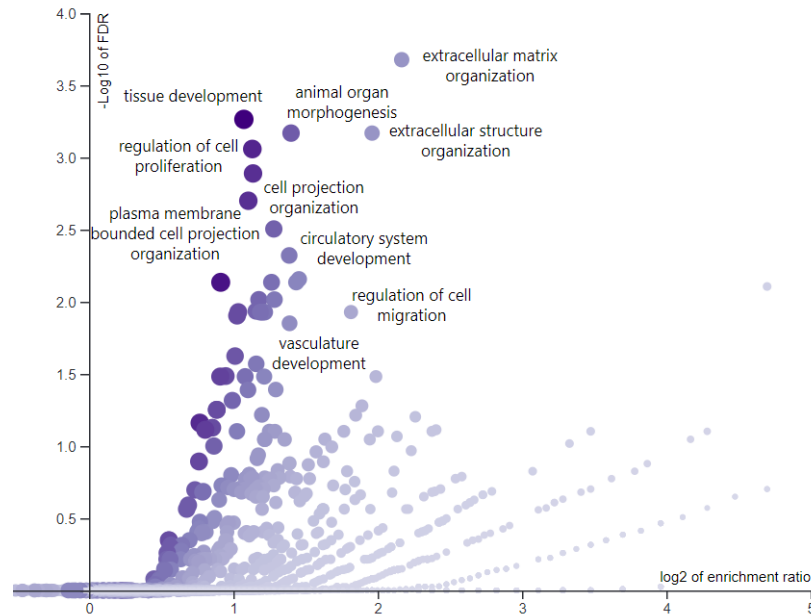
Gen- symbol	Name	Log <sub>2</sub> Fold	
		Change	padjust
TRIM49	tripartite motif containing 49	7,85	1,63E-05
KDM4E	lysine demethylase 4 E	7,28	1,46E-04
BEX5	brain expressed X-linked 5	6,85	6,46E-04
TUSC1	tumor suppressor candidate 1	6,72	2,20E-04
ZSCAN4	zinc finger and SCAN domain containing 4	6,56	1,73E-03
TRIM43B	tripartite motif containing 43B	6,13	1,55E-03
RFPL4AL1	ret finger protein like 4A like 1	6,07	9,00E-03
NPTX1	neuronal pentraxin 1	5,71	2,79E-28
NUDT11	nudix hydrolase 11	5,69	1,35E-35
TRIM43	tripartite motif containing 43	5,69	1,97E-05
SERPINE1	serpin family E member 1	-2,58	4,21E-02
AHNAK	AHNAK nucleoprotein	-2,65	1,70E-36
CNRIP1	cannabinoid receptor interacting protein 1	-2,65	9,26E-05
SH3RF3	SH3 domain containing ring finger 3	-2,76	6,25E-07
VIP	vasoactive intestinal peptide	-3,16	2,70E-02
CYSLTR2	cysteinyl leukotriene receptor 2	-3,34	4,34E-06
ABCG8	ATP binding cassette subfamily G member 8	-3,55	4,79E-03
ZNF541	zinc finger protein 541	-4,10	3,32E-06
MTRNR2L9	MT-RNR2 like 9	-4,30	2,73E-46
CPNE8	copine 8	-6,49	1,87E-03

Anschließend wurde untersucht, ob innerhalb der RNA-seq-Daten bestimmte Gruppen von Genen überdurchschnittlich häufig differentiell exprimiert werden. Dazu wurden mit Hilfe des Online-Tools WEB-based Gene SeT AnaLysis Toolkit (*webgestalt.org*, [224][225][226]) eine *Over-Representation Analysis* (ORA) und *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA) durchgeführt und Gene-Ontology(GO)-Analysen erstellt. Für die Auswertung der RNA-seq-Daten mittels ORA wurden die durch das sT-Ag signifikant hoch- und herunterregulierten Gene getrennt voneinander betrachtet. Im Gegensatz dazu wurden für die GSEA-Analyse alle Gene mit entsprechender Gewichtung der Regulation durch das sT-Ag analysiert. Im Folgenden werden die Ergebnisse ausgewählter GO-Analysen präsentiert. Eine Übersicht, welche Gene in ausgewählten GO-Terms durch das sT-Ag spezifisch reguliert werden, ist im Anhang zu finden (Tabelle 20). Alle weiteren GO-Analysen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, befinden sich ebenfalls im Anhang (Abbildungen 39, 40 und 41).

Dabei gibt die FDR (engl. *false discovery rate*) Auskunft über die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Fehlern 1. Art, d.h. in denen durch falsch-positive Ergebnisse die Nullhypothese – in diesem Fall, dass alle Proben gleich sind – fälschlicherweise zurückgewiesen wird. Die FDR berechnet sich dabei aus dem Verhältnis fälschlicherweise zurückgewiesenen Nullhypothesen zu den zurückgewiesenen Nullhypothesen insgesamt. Werden die zuvor genannten Bedingungen erfüllt, werden nachfolgend Prozesse bzw. Funktionen als signifikant reguliert bezeichnet.

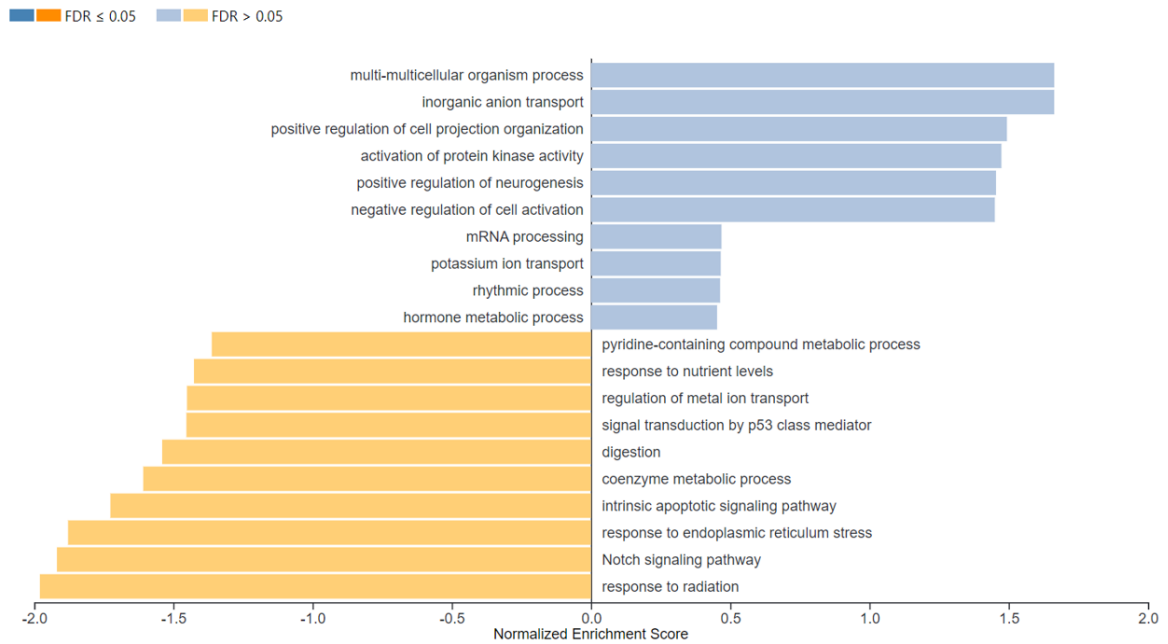
Abbildung 21 zeigt die GO-Analyse mittels ORA, in welcher die Anreicherung von sT-herunterregulierten Genen, die in biologischen Prozessen involviert sind, untersucht wurden. Auffällig ist, dass die Expression des sT-Ags häufig zu einer Dysregulation von regulatorischen sowie organisatorischen Prozessen in der Zelle führt, welche im engen Zusammenhang mit der Metastasierung stehen, wie z.B. „*extracellular matrix organization*“, „*extracellular structure organization*“, „*circulatory system development*“, „*regulation of cell migration*“ und „*regulation of cell proliferation*“. Zudem konnte beobachtet werden, dass Gene signifikant herunterreguliert sind, die auf zellulärer Ebene an der Organisation der Struktur der Zelloberfläche beteiligt sind („*cell projection organization*“ und „*plasma membrane bounded cell projection organization*“). Dass das sT-Ag sowohl Gene herunterreguliert, die in der Organisation der ECM und des Zytoskeletts von Bedeutung sind, als auch Veränderungen der Zelloberfläche vermittelt, unterstreicht die besondere Rolle des sT-Ags in der Metastasierung.





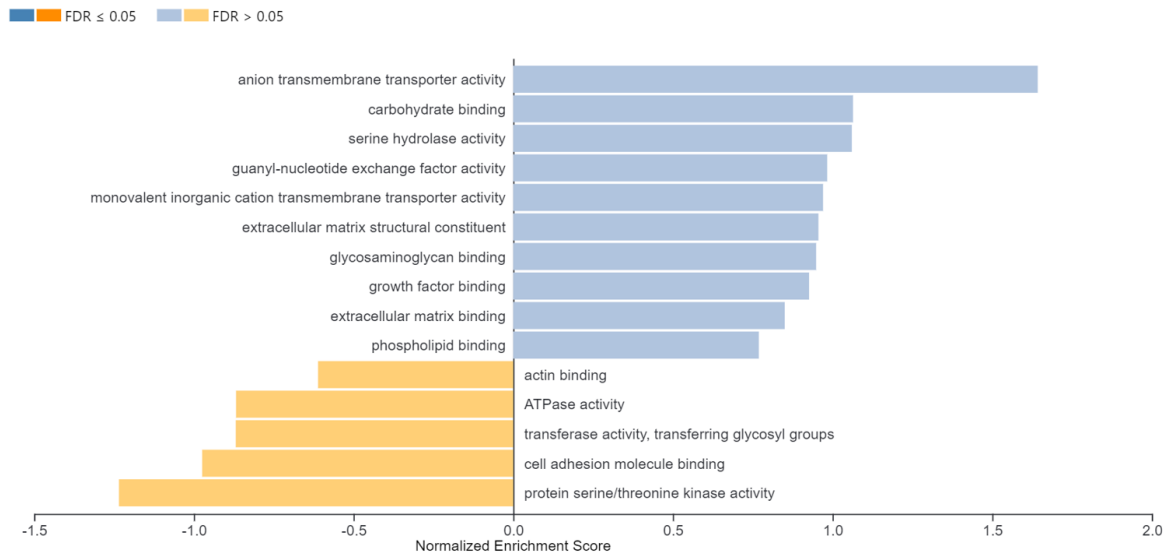
**Abbildung 21 Gene-Ontology-Analyse mittels ORA der durch das sT-Antigen herunterregulierten Gene nach biologischen Prozessen.** Dargestellt werden die zehn GO-Begriffe biologischer Prozesse mit dem niedrigsten FDR (bzw. höchstem  $\log_2$ Fold Change). Die Analyse wurde mit Hilfe des Online-Tools *webgestalt.org* [224][225][226] durchgeführt; analysiert wurden alle durch das sT-Ag herunterregulierten Gene ( $n=280$ ). FDR: *false discovery rate*.

Außerdem wurden mit demselben Datensatz ebenfalls eine GO-Analyse mittels GSEA durchgeführt und nach biologischen Prozessen gefiltert, um die entsprechende Gewichtung der Regulation durch das sT-Ag mit einzubeziehen. Übereinstimmend mit der GO-Analyse mittels ORA zeigt sich auch hier, neben der Regulation von Anionen- und Kaliumtransportern („*inorganic anion transport*“, „*potassium ion transport*“), dass das sT-Ag transkriptionell einen Einfluss auf die Organisation der Zelloberfläche nimmt („*positive regulation of cell projection organization*“). Ebenso reguliert das sT-Ag den Notch-Signalweg („*Notch signaling pathway*“), der von vielen viralen Onkoproteinen anderer humaner Tumorzellen modifiziert wird, und reguliert die Bildung von Nervenzellen („*positive regulation of neurogenesis*“). Des Weiteren scheint die Expression des sT-Ags zellulären Stress auszulösen, sodass ähnliche Signalwege, die durch Strahlung („*response to radiation*“) oder ER-Stress („*response to endoplasmatic reticulum stress*“) aktiviert werden, induziert werden und es infolgedessen zu einer sT-induzierten Aktivierung des intrinsischen Apoptose-Signalwegs kommt.



**Abbildung 22 Gene-Ontology-Analyse mittels GSEA der durch das sT-Ag transkriptionell regulierten Gene nach biologischen Prozessen.** Dargestellt werden jeweils die zehn am signifikantesten angereicherten biologischen Prozesse, in denen durch das sT-Ag hoch- bzw. herunterregulierte Gene zu finden sind. Die Analyse wurde mit Hilfe des Online-Tools *webgestalt.org* [224][225][226] durchgeführt; analysiert wurden alle durch das sT-Ag hochregulierten Gene (n=110) sowie durch sT-Ag herunterregulierten Gene (n=280). FDR: *false discovery rate*.

Zusätzlich zur allgemeinen Transkriptomanalyse wurde speziell nach Genen gesucht, welche die sT-vermittelte Interaktion mit den Selektinen regulieren könnten. Dazu wurde, ebenfalls mittels GSEA, eine GO-Analyse nach molekularer Funktion durchgeführt (Abbildung 23). Hier finden sich durch die Expression des sT-Ags überaus viele GO-Begriffe reguliert, welche für die Bindung von Tumorzellen an verschiedene Kohlenhydratstrukturen („*Carbohydrate binding*“, „*Glycosaminoglycan binding*“) sowie in der Organisation und Bindung an der ECM („*extracellular matrix structural constituent*“, „*extracellular matrix binding*“) eine wichtige Rolle spielen und somit die Metastasierung erleichtern könnten. Im Gegensatz dazu werden Gene, welche die Bindung von Zelladhäsionsmolekülen vermitteln und in der Prozessierung der Selektin-Liganden involviert sein könnten, durch das sT-Ag hochreguliert („*transferase activity*, *transferring glycosyl groups*“, „*cell adhesion molecule binding*“).



**Abbildung 23 Gene-Ontology-Analyse mittels GSEA der durch das sT-Ag transkriptionell herunterregulierten Gene nach molekularer Funktion.** Dargestellt werden jeweils die zehn signifikantesten GO-Begriffe, gefiltert nach molekularer Funktion, in denen durch das sT-Ag signifikant herunterregulierte Gene zu finden sind. Die Analyse wurde mit Hilfe des Online-Tools *webgestalt.org* [224][225][226] durchgeführt; analysiert wurden alle durch das sT-Ag herunterregulierten Gene (n=280). FDR: *false discovery rate*.

Zusammengefasst untermauern diese Ergebnisse, dass das sT-Ag eine bedeutende Rolle in der Metastasierung einnimmt, da viele Gene, die sowohl in der Metastasierung als auch in der Tumorgenese von Relevanz sind, auf transkriptioneller Ebene durch das sT-Ag reguliert werden. Besonders interessant ist hier, dass das sT-Ag ebenfalls Gene transkriptionell reguliert, welche die Bindung von verschiedenen Kohlenhydratstrukturen vermitteln, sowie Gene, welche für die Organisation der Struktur der Zelloberfläche relevant sind. Daher wird im nächsten Abschnitt genauer der Einfluss des sT-Ags auf die Expression von Molekülen auf der Zelloberfläche untersucht.

### 3.6 Zelloberflächen-Screening von WaGa-Zellen

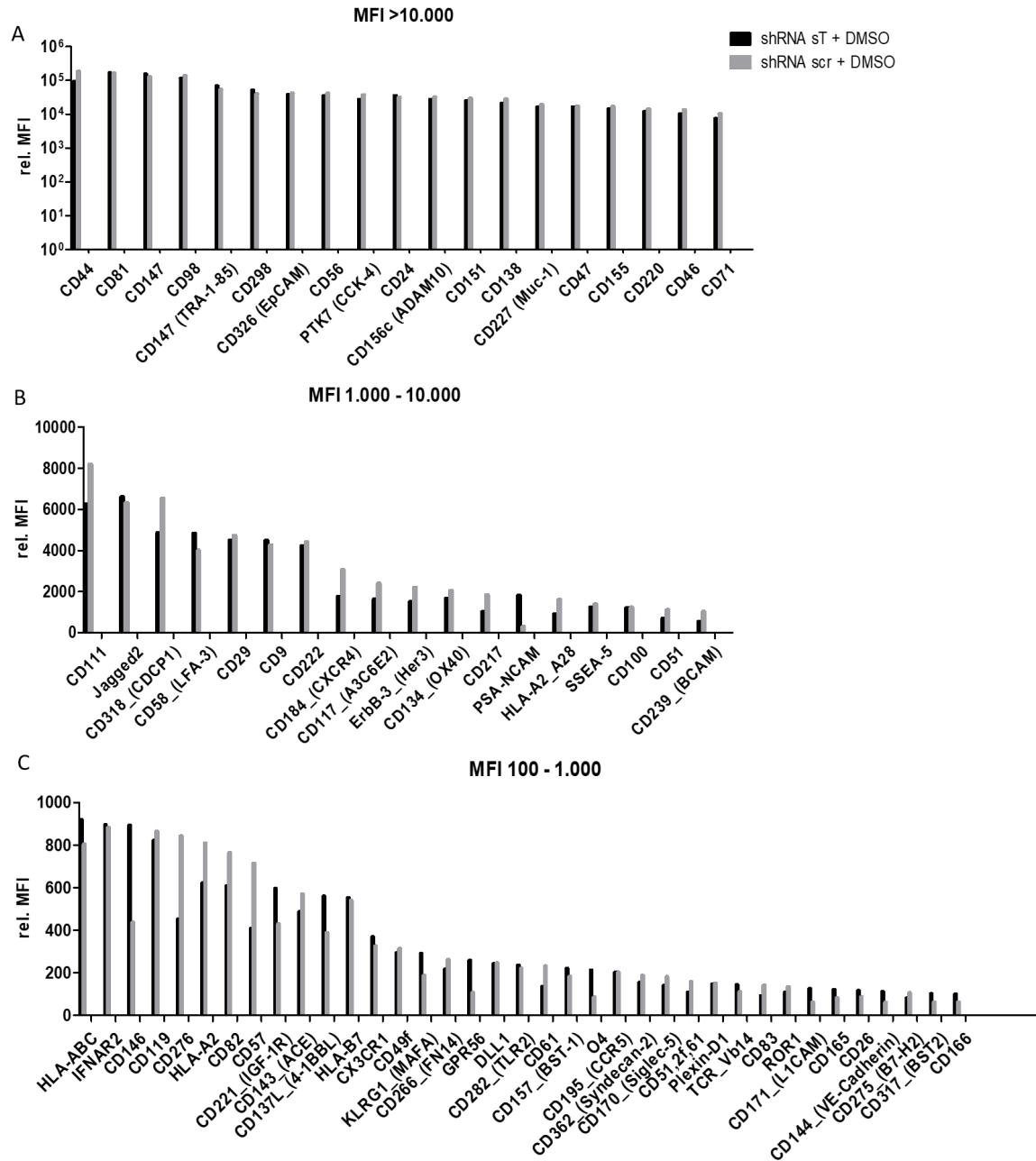
Für die Ausbreitung eines Tumors sind Oberflächenmoleküle, die auf den Tumorzellen exprimiert werden, von besonderer Bedeutung, da sie die Tumormikroumgebung verändern und die Metastasierung ermöglichen können. Um im Detail zu untersuchen, ob das sT-Ag einen Einfluss auf die Expression von Molekülen auf der Zelloberfläche nimmt und auf diese Weise die Ausbreitung eines Tumor beschleunigt wird, wurde ein Screening für Marker auf der Zelloberfläche der WaGa-Zellen mit Hilfe des MACS Marker Screens (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) durchgeführt. Für dieses Experiment wurden die WaGa shRNA sT Knockdown-Zelllinien verwendet und mit den WaGa shRNA scr-Kontrollzelllinien verglichen. Da dieses Experiment als Multiplex-Assay durchgeführt wurde, wurden die Zelllinien zur Differenzierung zwei Tage nach Induktion mit Dox (bzw. DMSO) mit Hilfe des CellTrace™ Cell Labeling Kits (Invitrogen) mit unterschiedlichen Fluorophoren markiert.

#### 3.6.1 Exprimierte Liganden auf der WaGa-Zelloberfläche

Zum einen konnten mittels dieses Screenings der Zelloberfläche Liganden identifiziert werden, die unter normalen Bedingungen auf den WaGa-Zellen exprimiert werden. Diesbezüglich wurde die MFI (engl. *Median Fluorescence Intensity*) der mit DMSO-behandelten Kontrollzelllinien WaGa shRNA sT und WaGa shRNA scr analysiert. Der Grenzwert, um zu entscheiden, ob ein Ligand als exprimiert gilt oder nicht, wurde bei einer MFI von 100, in einer der beiden mit DMSO-behandelten Zelllinien, gesetzt. Insgesamt konnten auf den WaGa-Zellen 90 von 371 untersuchten Liganden (24,3 %) identifiziert werden, die auf den WaGa-Zellen exprimiert werden. Je nach Expressionsstärke ihrer Liganden wurden diese in drei verschiedene Gruppen klassifiziert: MFI größer als 10.000 (Abbildung 24 A), MFI 1.000-10.000 (Abbildung 24 B) und MFI 100-1.000 (Abbildung 24 C). Eine vollständige Liste aller auf WaGa-Zellen exprimierten Liganden inklusive ihrer MFI ist im Anhang zu finden (Anhang Tabelle 21).

Hier wurden alle Oberflächenmoleküle, die in Bezug auf das MCC untersucht und in bisherigen Publikationen beschrieben worden sind, in der Gruppe der Liganden mit der höchsten Expression wiedergefunden und konnten somit bestätigt werden. Dazu zählt unter anderem das Zelloberflächen-Protein CD44, von welchem bereits 1994 Penneys & Shapiro vermuteten,

dass es wahrscheinlich die Ausbreitung der Metastasen in MCC vereinfacht [227]. Ein weiteres bereits beschriebenes Oberflächenmolekül ist CD227 (MUC1), ein Tumormarker, der in MCC veränderte Glykosylierungsmuster aufweist, sowie auch CD326 (EpCam), welches in bereits metastasierten Primärtumoren stärker exprimiert wird als in nicht metastasierenden Tumoren [228]. Außerdem ist hier die zelluläre Sheddase CD156c (ADAM10) hervorzuheben, für dessen Inhibierung zusammen mit ADAM17 bereits gezeigt werden konnte, dass sie zur Abnahme von sT-Ag induzierter Zelldissoziation und Bewegung führt [192].

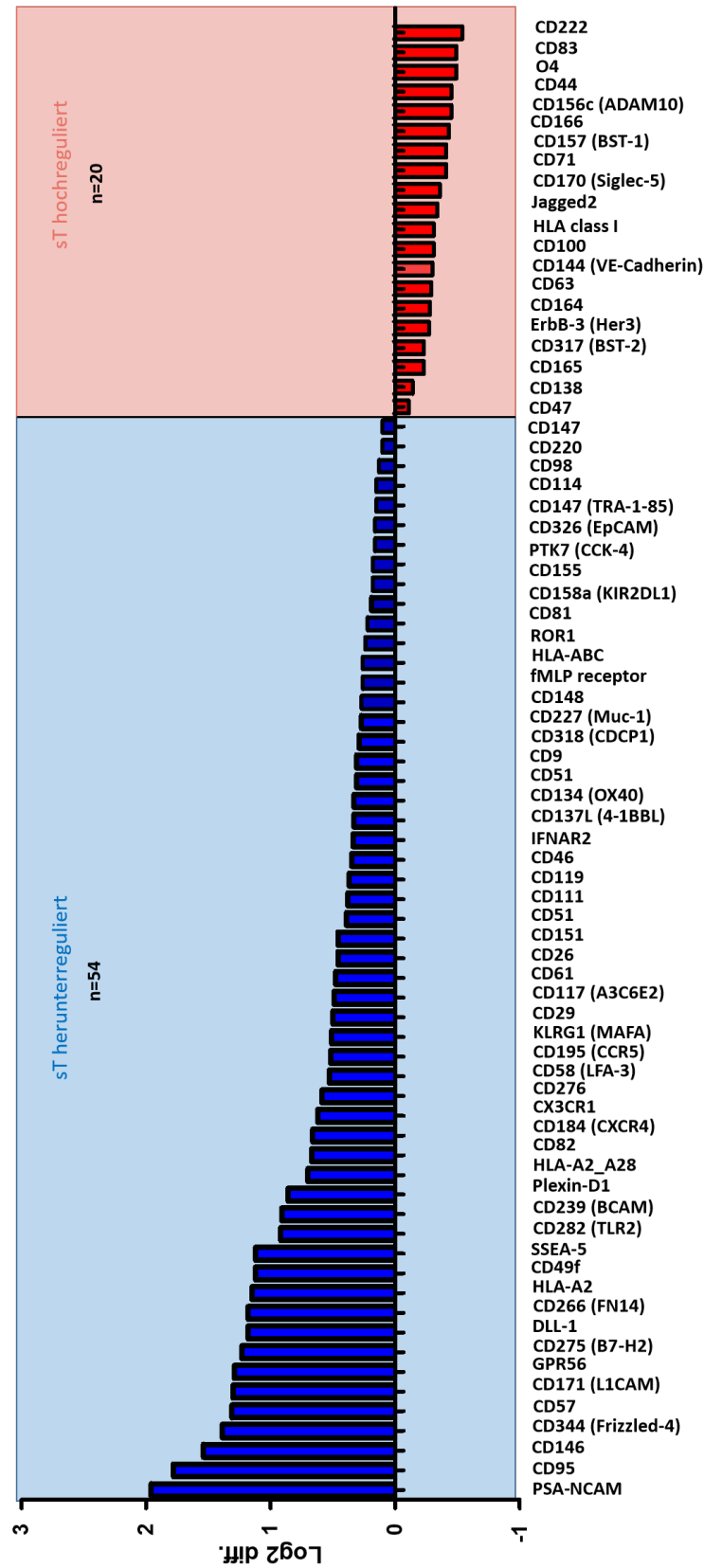


**Abbildung 24** Exprimierte Liganden auf der WaGa-Zelloberfläche. Die Expression der Moleküle auf der Zelloberfläche wurde durch ein Oberflächenscreening (MACS Marker Screen, Miltenyi Biotec) bestimmt. Für die allgemeine Expression wurden die DMSO-behandelten WaGa shRNA sT- und WaGa shRNA scr-Kontrollzelllinien analysiert und für jeden Marker die *Median Fluorescence Intensity* (MFI) bestimmt. Je nach ihrer Stärke wurden die Liganden in drei verschiedene Gruppen klassifiziert: MFI  $\geq 10.000$  (A), MFI 1.000-10.000 (B) und MFI 100-1.000 (C). Als Schwellenwert für die Expression eines Liganden wurde eine MFI von 100 in einer der beiden DMSO-behandelten Zelllinien festgelegt.

### 3.6.2 Differentielle Expression von Zelloberflächenmolekülen in Abhängigkeit des MCPyV-sT-Antigens

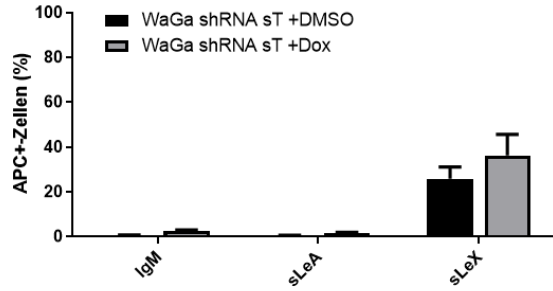
Darüber hinaus konnten zum anderen durch die Verwendung des induzierbaren WaGa sT-Knockdown-Systems Oberflächenmoleküle identifiziert werden, die spezifisch durch das sT-Ag reguliert werden (Abbildung 25). Für diesen Teil wurde die MFI der WaGa shRNA sT-Zelllinien und die WaGa shRNA scr-Kontrollzelllinien miteinander verglichen. Es wurden alle Marker berücksichtigt, die in einer der vier Zelllinien exprimiert werden ( $\text{MFI} \geq 100$ ). Für die Analyse wurden die MFIs beider Zelllinien auf ihre jeweilige DMSO-Kontrolle normalisiert und die Unterschiede der Zelllinien bestimmt, indem für jeden Oberflächenmarker der  $\text{Log}_2\text{Fold Change}$  berechnet wurde. Anschließend wurde der  $\text{Log}_2\text{Fold Change}$  der WaGa shRNA scr-Kontrollzelllinie von den WaGa shRNA sT-Kontrollzelllinie subtrahiert, um die  $\text{Log}_2\text{diff}$  zu erhalten. Als Grenzwert, um zu entscheiden ob ein Marker spezifisch durch das sT-Ag reguliert wird, wurde ein  $\text{Log}_2\text{diff}$  von  $\pm 0,1$  festgelegt. Insgesamt konnten auf diese Weise 74 Oberflächenmoleküle identifiziert werden, die spezifisch durch das sT-Ag reguliert werden. Von diesen Oberflächenmolekülen werden 54 Liganden (14,8 %) durch das sT-Ag herunterreguliert, sowie 20 Liganden (5,3 %) spezifisch hochreguliert. Eine vollständige Liste aller sT-regulierten Liganden auf WaGa-Zellen inklusive ihrer  $\text{Log}_2\text{diff}$  ist im Anhang zu finden (Anhang Tabelle 22).

Zusätzlich zu den 371 Oberflächenmolekülen, die im Screening untersucht wurden, wurde die Expression der zwei häufigsten Selektin-Liganden Sialyl-Lewis A (sLeA) und Sialyl-Lewis X (sLeX) auf den WaGa-Zellen untersucht (Abbildung 26). Diese waren nicht im Screening enthalten, zuvor konnte jedoch bereits die Interaktion von MCC-Zelllinien mit Selektinen nachgewiesen werden (Abschnitt 3.3). Dazu wurden die WaGa shRNA sT-Zellen mit Dox (bzw. DMSO) induziert, beide Zelllinien mit den entsprechenden APC-gekoppelten FACS-Antikörpern separat gefärbt und die Zellen mittels FACS analysiert. Als Iso-Kontrolle wurde hier ein IgM-Antikörper verwendet. Die Ergebnisse zeigen, dass die Expression von sLeX durch sT-Knockdown leicht erhöht wird, jedoch nicht signifikant, wohingegen sLeA nicht auf den WaGa-Zellen exprimiert wird.



**Abbildung 25** Differentielle Expression von Zelloberflächenmolekülen auf WaGa-Zellen in Abhängigkeit des sT-Antigens. Die Expression der Moleküle auf der WaGa-Zelloberfläche wurde durch ein Oberflächenenscreening (MACS Marker Screen, Miltenyi Biotec) bestimmt. Um die Unterschiede in der Expression zu bestimmen, die durch das sT-Ag ausgelöst werden, wurde die Log<sub>2</sub>diff aus der MFI jeden Markers in allen vier analysierten Zelllinien berechnet. Dazu wurden die MFIs der Dox-behandelten WaGa shRNA sT-Zellen und WaGa shRNA scr-Kontrollzelllinien auf ihre DMSO-Kontrollen normalisiert, der Log<sub>2</sub>Fold Change beider Zelllinien berechnet und diese voneinander subtrahiert, um die Log<sub>2</sub>diff zu erhalten. Als Schwellenwert für die Veränderung der Expression eines Liganden durch das sT-Ag wurde  $\pm 0,1$  festgelegt. Für die Analyse wurden alle Marker berücksichtigt, die in einer der vier Zelllinien exprimiert werden ( $MFI \geq 100$ ). Insgesamt werden 74 von 371 untersuchten Liganden durch das sT-Ag auf der Oberfläche der WaGa-Zellen reguliert. Davon werden 54 Liganden vom sT-Ag herunterreguliert (blau) und 20 Liganden durch das sT-Ag hochreguliert (rot).



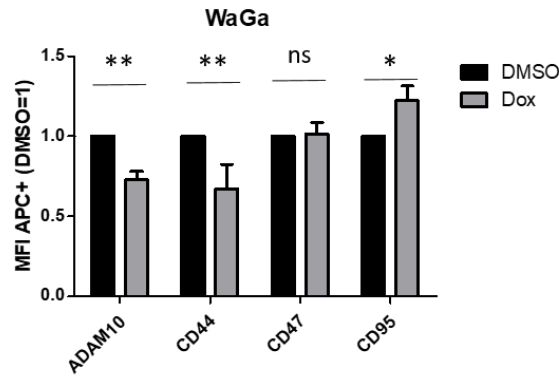


**Abbildung 26 Expression von Sialyl-Lewis A und X auf WaGa-Zellen.** Zusätzlich zu den 371 Antikörpern im Screening wurden die Expressionslevel der bekannten Selektin-Liganden Sialyl-Lewis A (sLeA) und Sialyl-Lewis X (sLeX) mittels FACS bestimmt. sT-Knockdown erhöht geringfügig die Expression von sLeX auf der Zelloberfläche, sLeA wird nicht exprimiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. APC: Allophycocyanin.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die Oberflächenmoleküle ADAM10, CD44, CD47 und CD95 ausgewählt, um sie in nachfolgenden Experimenten zu bestätigen.

### 3.6.3 Bestätigungsexperimente des Zelloberflächen-Screenings

Um die Ergebnisse des Zelloberflächen-Screenings in weiteren Experimenten zu bestätigen, wurden die vier Marker ADAM10, CD44, CD47 und CD95 ausgewählt. Zur Bestätigung des Oberflächen-Screenings wurde das Experiment in kleinerem Maßstab wiederholt. Dafür wurden die WaGa shRNA sT-Zelllinien mit Dox (bzw. DMSO) induziert, die Marker separat mit den entsprechenden FACS-Antikörpern (Miltenyi Biotec) gefärbt und die MFI mittels FACS bestimmt (Abbildung 27). Durch diese Versuche konnte bestätigt werden, dass in Abwesenheit des sT-Ags die Marker ADAM10 und CD44 signifikant herunterreguliert sind, was für eine Hochregulation durch das sT-Ag spricht. Der Marker CD95 hingegen ist – wie auch im Screening – in Abwesenheit des sT-Ags signifikant hochreguliert und wird somit durch das sT-Ag auf der Zelloberfläche herunterreguliert (t-Test). Die Expression von CD47 konnte indessen nicht bestätigt werden und wird durch den sT-Knockdown nicht signifikant verändert.

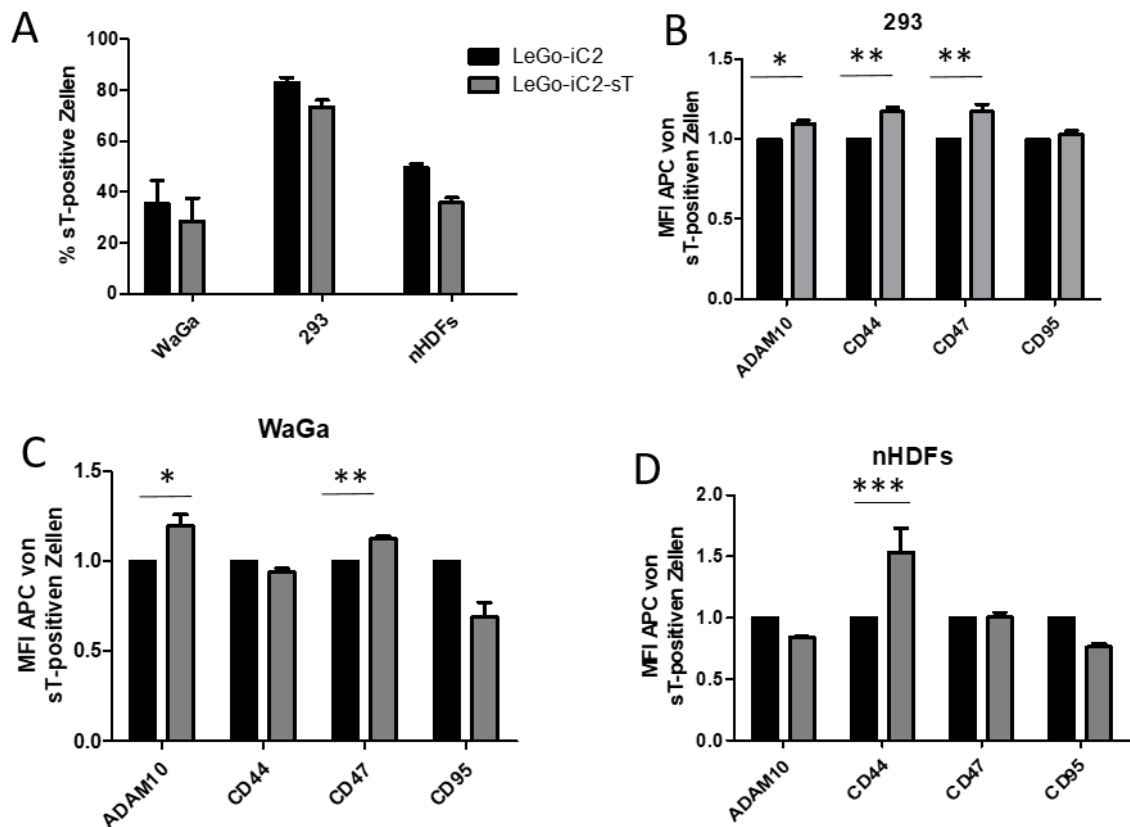


**Abbildung 27 Expression ausgewählter Oberflächenmarker in Abhängigkeit des sT-Antigens.** Zur Bestätigung der Ergebnisse des Oberflächenmarker-Screenings wurde die WaGa shRNA sT-Zelllinie mit Dox bzw. DMSO induziert und drei Tage später die Expression der Zelloberflächenmoleküle individuell mittels FACS bestimmt. Dargestellt ist jeweils die MFI der Dox-induzierten Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, welche gleich 1 gesetzt wurde. Fast alle durch das Screening identifizierte und für die Bestätigung ausgewählten Oberflächenmarker werden durch sT-Knockdown signifikant verändert, nur CD47 nicht. Das Experiment wurde als technisches Triplikat durchgeführt und drei Mal wiederholt. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe eines ANOVA-Tests ermittelt: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . APC: Allophycocyanin. ns: nicht signifikant.

Zusätzlich zur Wiederholung des Oberflächen-Screenings in kleinem Maßstab wurde das sT-Ag in verschiedenen Zelllinien (WaGa, HEK293 und nHDFs) überexprimiert (Abbildung 28). Dieses Experiment wurde gewählt, um einerseits die Ergebnisse des Screenings weiter zu bestätigen und andererseits um den Effekt des sT-Ags auf die Oberflächenmoleküle in anderen Zelllinien zu charakterisieren. Zur Kontrolle der sT-Expression wurden die Transduktionseffizienzen der verschiedenen Zelllinien dargestellt (Abbildung 28 A). Die kommerziellen Zelllinien HEK293 und nHDF, die als putative Ursprungszelle des MCC gelten, exprimieren von Natur aus kein sT-Ag, weshalb in diesem Fall der individuelle Effekt des sT-Ags analysiert werden kann. In HEK293 Zellen konnte beobachtet werden, dass die sT-Überexpression die Expression der Oberflächenmoleküle ADAM10, CD44 und CD47 signifikant erhöht (Abbildung 28 B). In nHDFs hingegen konnte durch sT-Expression nur die Expression von CD44 auf der Zelloberfläche signifikant hochreguliert werden, jedoch für keinen der anderen untersuchten Marker (Abbildung 28 D). WaGa-Zellen exprimieren von Natur aus das sT-Ag, weshalb hier untersucht wurde, ob größere sT-Mengen eventuell einen zusätzlichen Effekt auf die Expression von Molekülen auf der Zelloberfläche haben könnten. Durch Überexpression des sT-Ags in den WaGa-Zellen konnte an dieser Stelle die Expression von ADAM10 und CD47 auf der Zelloberfläche signifikant erhöht werden (Abbildung 28 C). In allen drei Zelllinien

konnte durch sT-Überexpression zwar eine leichte Reduktion der CD95-Expression beobachtet werden, jedoch war diese nicht signifikant.

Zusammenfassend konnten die Ergebnisse des Oberflächen-Screenings für die ausgewählten Zelloberflächenmoleküle sowohl durch Wiederholung des Experimentes in kleinerem Maßstab (außer CD47), als auch durch sT-Überexpressions-Experimente bestätigt werden. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass höhere sT-Proteinmengen die Expression von CD47 auf der Zelloberfläche von WaGa- und 293-Zellen signifikant erhöhen.



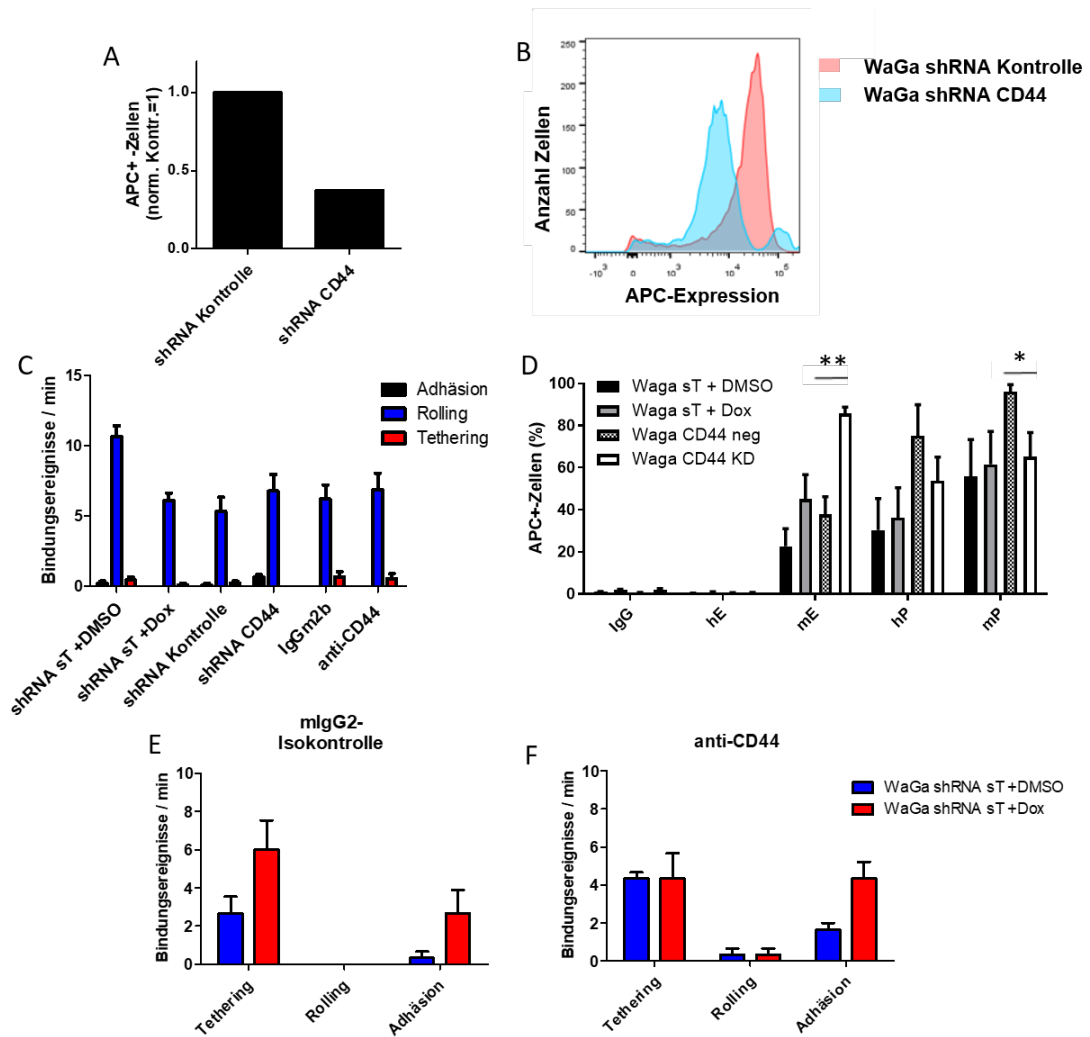
**Abbildung 28** Expression ausgewählter Oberflächenmarker durch sT-Überexpression in verschiedenen Zelllinien. Zur weiteren Bestätigung der Screening-Ergebnisse wurden verschiedene Zelllinien mit dem sT-Ag (LeGo-iC2-sT) oder dem leeren Kontrollvektor (LeGo-iC2) transduziert. (A) zeigt die Transduktionseffizienz der verschiedenen Zelllinien. sT-Expression reguliert die Expression fast aller ausgewählten Marker in HEK293-Zellen (B), in nHDFs (D) hingegen nur im Falle von CD44. In WaGa-Zellen (C) führen zusätzliche sT-Proteinmengen zu erhöhter Expression von ADAM10 und CD47. Die Expression von CD95 ist in allen drei Zelllinien nur leicht verändert und nicht signifikant. Das Experiment wurde als technisches Triplikat durchgeführt und drei Mal wiederholt. DMSO-Proben wurden gleich 1 gesetzt. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe eines ANOVA-Tests ermittelt: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . APC: Allophycocyanin.

### 3.7 Der Einfluss von CD44 auf die dynamische Adhäsion von WaGa-Zellen

Die Ergebnisse des Zelloberflächen-Screenings zeigen, dass in Anwesenheit des sT-Ags die Expressionslevel von CD44 auf der Zelloberfläche spezifisch hochreguliert werden. CD44 ist ein wichtiges Adhäsionsmolekül, welches in vielen Tumor-assoziierten Prozessen von Bedeutung ist. Unter anderem ist auch bekannt, dass Leukozyten bzw. auch Tumorzellen über CD44 an das E-Selektin binden können (Abschnitt 1.5.1). Aus diesem Grund wird im Folgenden genauer die Rolle von CD44 in der Adhäsion von WaGa-Zellen untersucht.

Zur Untersuchung wurden WaGa shRNA CD44-Zellen (bzw. Kontrolle) von der Arbeitsgruppe von Udo Schumacher zur Verfügung gestellt, in denen der Knockdown von CD44 mittels FACS überprüft wurde (Abbildung 29 A & B). Mit diesen, sowie unter der Verwendung eines CD44-blockierenden Antikörpers (bzw. Isotyp-Kontrolle), wurden die dynamischen Adhäsionsversuche auf dem humanen E-Selektin wiederholt. Abbildung 29 C zeigt, dass jedoch weder die WaGa shRNA CD44-Zellen noch die Behandlung mit dem blockierenden Antikörper im Vergleich zu ihren Kontrollen einen Effekt auf die Adhäsion an das humane E-Selektin in dynamischen Adhäsionsversuchen haben. Im Vergleich dazu wurden in jedem Versuch behandelte WaGa shRNA sT-Zellen als technische Kontrolle verwendet, in denen eine Reduktion der Adhäsion in den Dox-behandelten Zellen beobachtet werden konnte. Zusätzlich wurden mit den WaGa shRNA CD44-Zellen ebenfalls statische Adhäsionsversuche durchgeführt (Abbildung 29 D). Übereinstimmend mit vorherigen Ergebnissen konnte auch hier unter statischen Bedingungen keine Adhäsion an das humane E-Selektin beobachtet werden. Die Adhäsion an das murine E-Selektin wurde in WaGa shRNA CD44-Zellen signifikant erhöht, ähnlich wie es beim Knockdown des sT-Ags der Fall ist. Für die humanen und murinen P-Selektine hingegen reduziert sich die Adhäsion, wenn CD44 herunterreguliert wird, jedoch nicht signifikant. Des Weiteren wurden ebenfalls dynamische Adhäsionsversuche auf Endothelzellen durchgeführt, um den Effekt von CD44 auf die Bindung der WaGa-Zellen genauer zu charakterisieren. Dazu wurde die E-Selektin-Expression der Endothelzellen mittels IL-1 $\alpha$  induziert und die WaGa-shRNA sT-Zellen einerseits mit Dox (bzw. DMSO) behandelt sowie andererseits mit dem CD44-blockierenden Antikörper (bzw. Isotyp-Kontrolle). Auch hier waren nur wenige Bindungsereignisse zu beobachten und es konnte keine Abhängigkeit von CD44 festgestellt werden (Abbildung 29 E & F).

Zusammenfassend konnte in dynamischen Adhäsionsversuchen auf dem E-Selektin und Endothelzellen keine Abhängigkeit von CD44 im Bindungsverhalten der WaGa-Zellen festgestellt werden. Unter statischen Bedingungen konnte beobachtet werden, dass der Knockdown von CD44 die Bindung an die humanen und murinen P-Selektine leicht reduziert, die Bindung an das murine E-Selektin jedoch signifikant verstärkt wird (ähnlich wie beim sT-Knockdown).



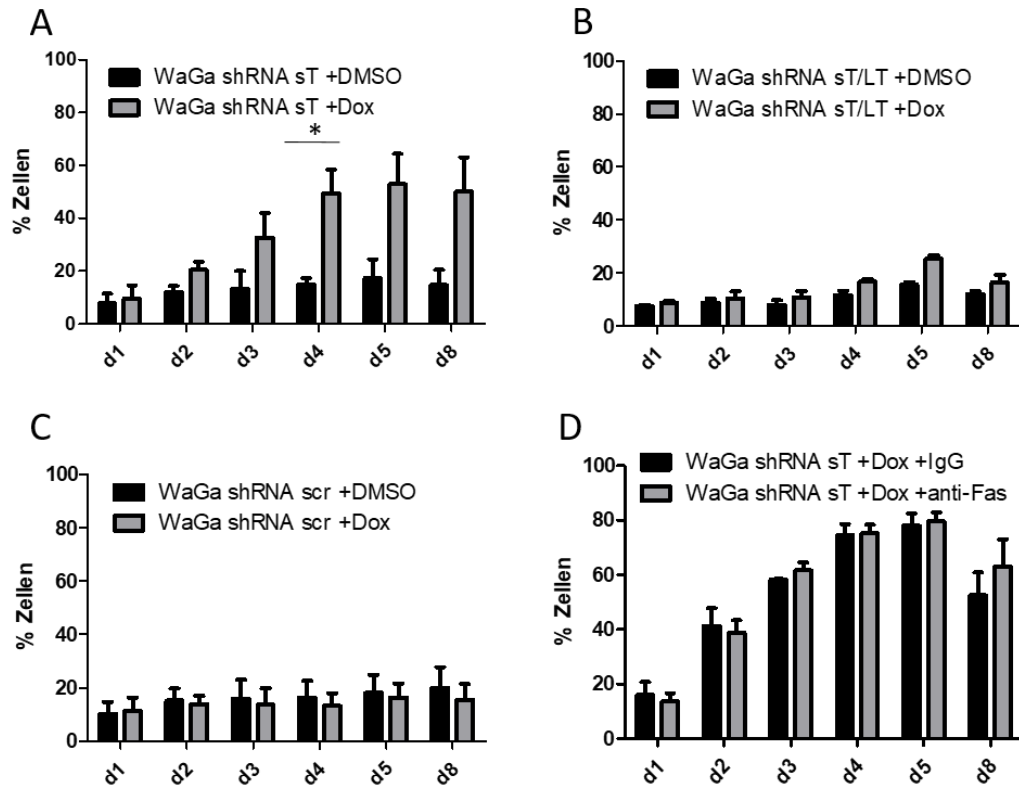
**Abbildung 29** Dynamische Adhäsion von WaGa-Zellen in Abhängigkeit von CD44. Zur Untersuchung der Rolle von CD44 wurden die Adhäsionsversuche mit einer WaGa shRNA CD44-Zelllinie (bzw. Kontrolle) sowie einem CD44-blockierenden Antikörper wiederholt. Die CD44-Expression wurde mittels FACS überprüft (A und B). In dynamischen Adhäsionsversuchen auf dem humanen E-Selektin (C), sowie auf stimulierten Endothelzellen (E und F) konnte keine Abhängigkeit von CD44 im Bindungsverhalten festgestellt werden. Unter statischen Bedingungen wird kein humanes E-Selektin (hE) gebunden, die Bindung an das murine E-Selektin (mE) wird signifikant erhöht (D). Im Gegensatz dazu verringert CD44-Knockdown leicht die Bindung an die humanen (hP) und murinen P-Selektine (mP). Die dynamischen Adhäsionsversuche wurden jeweils als technische Triplikate durchgeführt und auf dem humanen E-Selektin dreimal wiederholt. Die statischen Adhäsionsversuche wurden dreimal wiederholt. Die statistische Signifikanz wurde mittels ANOVA (statisch) bzw. ungepaarten t-Tests (dynamisch) bestimmt: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . APC: Allophycocyanin

### 3.8 Die Funktion von CD95 in der durch T-Antigen-Knockdown induzierten Apoptose

Die Ergebnisse des Zelloberflächen-Screenings zeigen, dass in Anwesenheit des sT-Ags die Expressionslevel von CD95 auf der Zelloberfläche herunterreguliert werden. CD95 ist ein wichtiger Faktor für die Regulation vieler zellulärer Prozesse und spielt insbesondere für das Immunsystem eine entscheidende Rolle, da er unter anderem die Apoptose induziert. Im Folgenden wurde daher mit Hilfe von Apoptose-Assays (Pacific Blue Annexin V Kit, Biolegend) die Apoptose in Abhängigkeit der T-Ag und der Effekt von CD95 genauer untersucht.

Wie bereits Houben et al. [82] beschreiben konnten, löst der Knockdown der T-Ag Apoptose in MCC-Zelllinien aus. Um dies zu bestätigen, wurden die WaGa shRNA Knockdown-Zelllinien mit Dox (bzw. DMSO) induziert und acht Tage lang der Anteil apoptotischer Zellen mittels Annexin V-Färbung im FACS bestimmt. Früh-apoptotische Zellen exprimieren Annexin V, spät-apoptotische (bzw. nekrotische) Zellen hingegen sind doppelt positiv für Annexin V und Propidiumiodid. Abbildung 30 zeigt, dass der Anteil spät-apoptotischer Zellen sowohl für den individuellen Knockdown des sT-Ags als auch für den simultanen Knockdown beider T-Ag nach Induktion mit Dox zunehmend wächst. Dabei war der Effekt für den Knockdown des sT-Ags deutlich prominenter als für den Knockdown beider T-Ag zusammen und an Tag 5 sogar bis zu 60 % der Zellen nekrotisch. Im Vergleich geht der Anteil spät-apoptotischer Zellen an Tag 8 leicht zurück. Damit übereinstimmend nimmt der Anteil an normalen/gesunden Zellen deutlich ab (Anhang Abbildung 38). In den mit DMSO-behandelten jeweiligen Kontrollzellen sowie den behandelten WaGa shRNA scr-Kontrollzelllinien hingegen konnte keine Induktion der Apoptose beobachtet werden. Der Anteil pro-apoptotischer Zellen hingegen bleibt über die ganze Zeit relativ konstant (Anhang Abbildung 37). Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob in der T-Ag-abhängigen Induktion der Apoptose die Expression von CD95 relevant ist. Dazu wurden die Apoptose-Assays mit dem spezifischen anti-Fas Antikörper (bzw. IgG1-Kontrolle) durchgeführt, durch welchen der CD95-Ligand CD95L blockiert und somit die CD95-abhängige Apoptose verhindert wird. In Dox-behandelten WaGa shRNA sT-Knockdown-Zellen mit CD95L-Blockade konnte jedoch kein Unterschied im Anteil spät-apoptotischer Zellen im Vergleich zur IgG1-Kontrolle und den unbehandelten, induzierten WaGa-Zellen beobachtet werden und die Zellen wurden durch Knockdown des sT-Ags apoptotisch (Abbildung 30).

Zusammengefasst konnte bestätigt werden, dass die Expression der T-Age notwendig für das Überleben der MCC-Zelllinien ist und Knockdown des sT-Ags als auch beider T-Ag zusammen die Zellen in Apoptose führt. Durch die Blockade von CD95 auf der WaGa-Zelloberfläche konnte die Apoptose nicht reduziert werden, was für einen Prozess unabhängig von CD95 und dessen Veränderungen durch das sT-Ag auf der Zelloberfläche spricht.

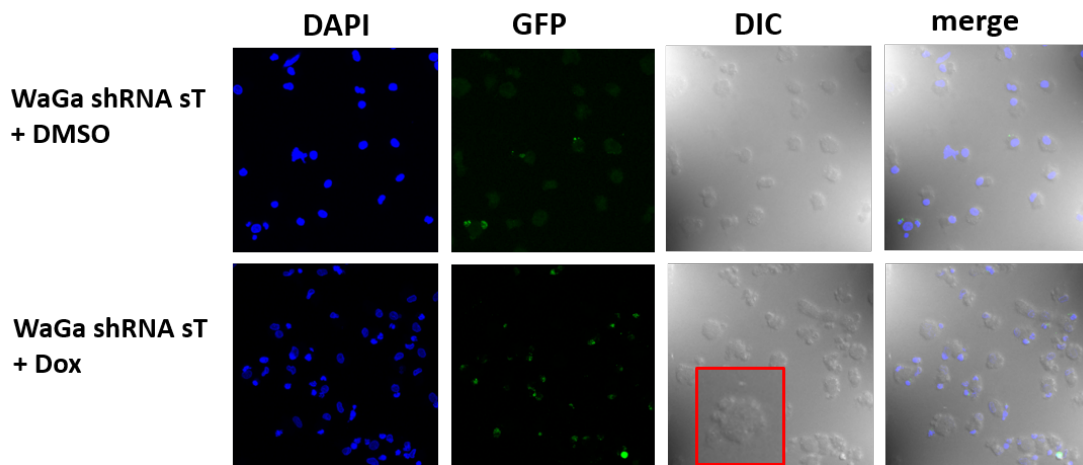


**Abbildung 30 Apoptose-Assays in Abhängigkeit der T-Antigene und CD95.** (A-C) Die WaGa shRNA-Zelllinien wurden mit Dox (bzw. DMSO) induziert und acht Tage lang der Anteil apoptotischer Zellen mittels Annexin-V-Färbung im FACS bestimmt. Es konnte bestätigt werden, dass der Knockdown der T-Ag die Zellen in Apoptose führt. (D) Durch die Blockade der CD95-abhängigen Apoptose in Dox-induzierten WaGa shRNA sT-Zellen mit einem spezifischen anti-Fas-Antikörper wurde zusätzlich nachgewiesen, dass die Apoptose unabhängig von CD95 induziert wird. Das Experiment wurde drei Mal wiederholt. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe eines ungepaarten t-Tests ermittelt: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

### 3.9 Der Einfluss von CD47 auf die MCC-Immunantwort

Obwohl in individuellen Experimenten nicht bestätigt werden konnte, dass die CD47-Expression in WaGa-Zellen abhängig von der sT-Expression ist (Abbildung 27), konnte dennoch nachgewiesen werden, dass CD47 einerseits auf WaGa-Zellen stark exprimiert wird (Abbildung 24), und andererseits durch Überexpression des sT-Proteins die CD47-Expressionslevel auf der Zelloberfläche von HEK293-Zellen sowie WaGa-Zellen signifikant erhöht werden (Abschnitt 3.6.3). Da CD47 als „*don't eat me*“-Signal für Makrophagen ein vielversprechendes Ziel für neue Immuntherapien darstellt und die CD47-Blockade mittels therapeutischer Antikörper in anderen Tumorarten positive Effekte zeigt (Abschnitt 1.3.3), wurden im Folgenden die funktionellen Eigenschaften des sT-Ags und CD47 in Bezug auf die Immunantwort genauer untersucht. Zu diesem Zweck wurden Makrophagen-Assays durchgeführt.

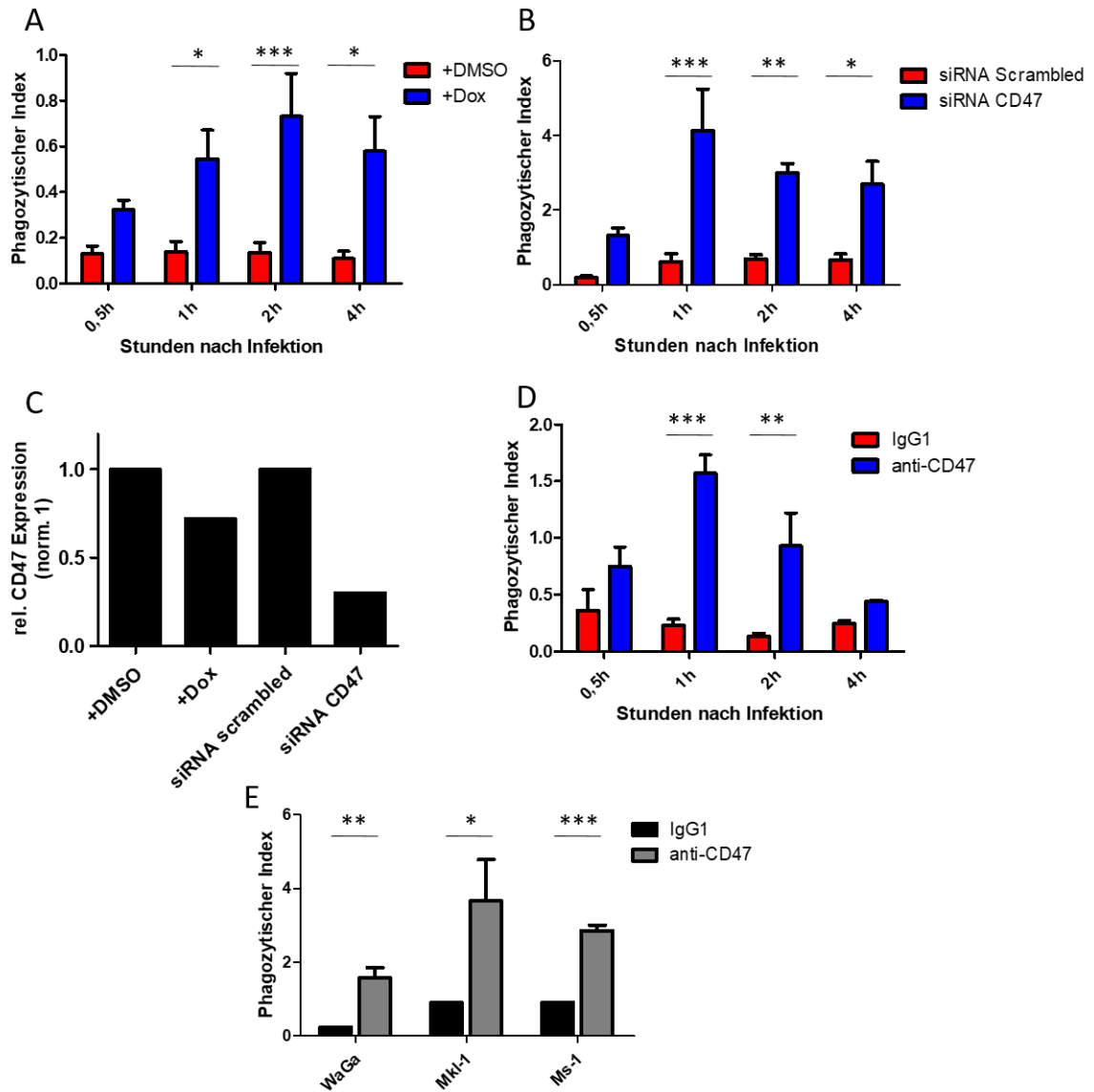
Für dieses Experiment wurden primäre humane Makrophagen aus verschiedenen Donoren isoliert und mit den MCC-Zelllinien infiziert. Nach 0,5 h, 1 h, 2 h und 4 h wurde die Infektion gestoppt und jeweils der Phagozytische Index (Anzahl (phagozytierter) MCC-Zellen pro Makrophage) bestimmt. Es konnte beobachtet werden, dass der Knockdown des sT-Ags in WaGa-Zellen zu einer erhöhten Anlagerung der Tumorzellen an die Makrophagen führt. Ein Beispiel dafür ist in Abbildung 31 2 h nach Infektion zu sehen.



**Abbildung 31** Beispielaufnahme des Phagozytose-Assays. Beispielaufnahme von primären humanen Makrophagen 2 h nach Infektion mit Dox- bzw. DMSO-behandelten WaGa shRNA sT-Zellen. Der Knockdown des sT-Ags erhöht deutlich die Anlagerung von WaGa-Zellen (rote Box) im Vergleich zu den DMSO-behandelten Kontrollzellen. Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt, WaGa shRNA sT-Zellen exprimieren GFP (grün). GFP: *green fluorescent protein*; DIC: *differential interference contrast*.



Somit ist die phagozytische Aktivität der Makrophagen vermutlich abhängig von der sT-Expression der WaGa-Zellen und Knockdown des sT-Ags in den WaGa-Zellen shRNA sT-KD-Zelllinien erhöht signifikant die Phagozytose (Abbildung 32 A). Dabei liegt der Höhepunkt der phagozytischen Aktivität der Makrophagen bei 1-2 h nach Infektion (Phagozytischer Index 0,6-0,8) und nimmt dann hin zu 4 h langsam wieder ab. Zur Bestimmung des spezifischen Effekts von CD47 auf die Phagozytose der WaGa-Zellen wurde CD47 mittels siRNA herunterreguliert und die Expression von CD47 in den WaGa sT-KD-Zellen überprüft (Abbildung 32 C). Wird CD47 in WaGa-Zellen herunterreguliert, bestätigt sich diese Beobachtung im Vergleich zur scrambled siRNA-Kontrolle und der Effekt ist sogar noch deutlich prominenter als beim Knockdown des sT-Ags (Abbildung 32 B). Hier wird das Maximum der Phagozytose allerdings schon nach etwa 1 h erreicht und der phagozytische Index liegt sogar bei 2-4. Um den Effekt von CD47 in WaGa-Zellen weiter zu spezifizieren, wurde ein therapeutischer Antikörper für die Blockade von CD47 *in-vitro* verwendet. Wird CD47 mit diesem Antikörper (Klon B6.H12.2) auf der Oberfläche der WaGa-Zellen blockiert, erhöht sich ebenfalls signifikant die phagozytische Aktivität der Makrophagen im Vergleich zur IgG1-Kontrolle (Abbildung 32 D). Der phagozytische Index liegt hier mit 1-1,5 im mittleren Bereich zwischen sT-Knockdown und CD47-siRNA-Knockdown. Darüber hinaus ist die Phagozytose nicht nur in WaGa-Zellen abhängig vom sT-Ag und CD47, sondern auch in den MCC-Zelllinien Mkl-1 und Ms-1, in denen die Blockade von CD47 ebenfalls die phagozytische Aktivität steigerte (Abbildung 32 E).



**Abbildung 32** Phagozytose-Assays in Abhängigkeit des sT-Antigens und CD47. Primäre humane Makrophagen wurden für 0,5 h, 1 h, 2 h und 4 h mit (A) Dox bzw. DMSO behandelten WaGa shRNA sT-Zellen, (B) unbehandelte WaGa shRNA sT-Zellen mit CD47-siRNA Knockdown (bzw. siRNA scrambled) oder (D) WaGa shRNA sT Zellen behandelt mit einem CD47-blockierenden therapeutischen Antikörper (bzw. IgG1-Kontrolle) infiziert. Dargestellt ist jeweils der phagozytische Index, der die Anzahl der (phagozytierten) WaGa-Zellen pro Makrophage abbildet. Die Effizienz des CD47 siRNA-Knockdowns wurde mittels FACS überprüft (C). Auch in den MCPyV-positiven Mkl-1 und Ms-1 Zelllinien steigert die Blockade von CD47 1 h nach Infektion signifikant die Phagozytose der Tumorzellen (E). Pro Messzeitpunkt wurden mind. 100 Makrophagen gezählt. Das Experiment wurde jeweils mit mind. drei verschiedenen Donoren wiederholt. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe eines ungepaarten t-Tests ermittelt: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

## 4 Diskussion

Das MCPyV ist das einzige humane Polyomavirus, welches bisher mit Tumorgenese im eigenen Wirt assoziiert werden konnte [20][21][25][81]. Wie andere Polyomaviren persistiert es nach der Infektion im frühen Kindheitsalter lebenslang im Wirt, sodass die Seroprävalenz in der Bevölkerung mit 60-70 % relativ hoch ist [90][91][143][144]. Zur MCPyV-induzierten Ausbildung eines MCC, einem hoch aggressiven Tumor der Dermis, von dem vor allem ältere und immunsupprimierte Patienten betroffen sind [1][26], kommt es jedoch eher selten. Eine besondere Herausforderung stellt vor allem das hohe Metastasierungspotential des MCCs dar. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate für Patienten liegt nur bei etwa 20 %, wobei Metastasen sich vorwiegend in der Lunge, der Leber und den Knochen bilden [30][32].

Da nur 10-20 % aller MCC-Tumore MCPyV-negativ sind und diese eine bis zu 100-fach höhere Gesamtmutationslast vorweisen als MCPyV-positive Tumore, werden seit einigen Jahren vor allem die T-Ag, LT- und sT-Ag, genauer untersucht, um das onkogene Potential des MCPyV zu verstehen [20][21][25][28]. So konnten in zahlreichen *in-vitro*-Studien und in einigen *in-vivo*-Mausmodellen bereits die tumorigenen Eigenschaften der beiden T-Ag nachgewiesen werden [229][230]. Im Gegensatz zu anderen Polyomaviren, in welchen das LT-Ag von entscheidender Bedeutung für die Transformation ist, gibt es für das MCPyV hingegen zahlreiche Hinweise, dass vor allem dem sT-Ag eine besondere Rolle in der Transformation und insbesondere in der Metastasierung zukommt. So zeigen beispielsweise Soft-Agar und Foci Formation Assays, dass speziell die Expression des sT-Ags, und nicht die des LT-Ags, zur Transformation von Rattenfibroblasten führt [125]. Darüber hinaus konnte durch *in-vivo*-Experimente ebenfalls nachgewiesen werden, dass das sT-Ag Epithelzellen von transgenen Mäusen transformiert, sowie, dass sT-Expression zusammen mit der Expression des Transkriptionsfaktors Atoh1 in einen MCC-ähnlichen-Phänotypen resultiert [187][160]. Zusätzlich zum Beitrag des sT-Ags an der Tumorentstehung konnte von unserer Arbeitsgruppe erstmalig ein Xenograft-Mausmodell für die MCC-Metastasierung etabliert werden. In diesem konnte beobachtet werden, dass die Expression des sT-Ags in den Metastasen signifikant erhöht ist, was daraufhin deutet, dass die sT-Expression mit der Tumorprogression im MCC korreliert [39]. Diese Ergebnisse untermauern, dass das sT-Ag einen entscheidenden Faktor für die Metastasierung darstellt. Das Fehlen eines vollständig permissiven Replikationssystems sowie von *in-vitro* und *in-vivo*

Transformationsmodellen limitieren allerdings weiterhin stark die Möglichkeiten, die Biologie des MCPyV besser zu verstehen. So kommt es, dass bislang noch viele Fragen beispielsweise hinsichtlich der Transformation, Metastasierung und des viralen Lebenszyklus unbeantwortet bleiben.

Um die Rolle des sT-Ags in der Metastasierung genauer zu charakterisieren wurde daher in dieser Arbeit ein Dox-induzierbares shRNA-Knockdown-System für den individuellen Knockdown des sT-Ags, sowie für den simultanen Knockdown beider T-Ag etabliert. Mit Hilfe dieses Systems wurden anschließend verschiedene *in-vitro*-Assays durchgeführt und der Effekt des sT-Ags in der Metastasierung analysiert. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse werden in den folgenden Abschnitten diskutiert.

#### **4.1 Das Dox-induzierbare shRNA-System reguliert effizient die Expression des sT- und LT-Antigens herunter**

Wie im vorigen Abschnitt beschrieben, deuten zahlreiche Hinweise auf eine entscheidende Rolle des sT-Ags in der Transformation und Metastasierung des MCCs hin. Weiterhin erschwert jedoch das Fehlen eines vollständig permissiven Replikationssystems sowie von *in-vitro* und *in-vivo* Transformationsmodellen die Biologie des MCPyV besser zu erforschen. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit ein Dox-induzierbares shRNA-Knockdownsystem für den temporären Knockdown der T-Ag in WaGa-Zellen, einer MCPyV-positiven Zelllinie, etabliert, um die Rolle des sT-Ags in der Metastasierung genauer zu charakterisieren. Für dieses konnte gezeigt werden, dass sowohl Transkript- als auch Proteinlevel des sT- und LT-Ags in den hergestellten WaGa-shRNA-Zelllinien durch die Zugabe von Dox effizient herunterreguliert werden (Abschnitt 3.1). Somit ermöglicht es dieses System, im Gegensatz zu anderen Expressionssystemen, welche das sT-Ag in anderen Krebszelllinien (HEK293, Rat-1, usw.) überexprimieren oder ein getaggetes sT-Ag verwenden, die Metastasierung in einer bereits transformierten MCC-Tumorzelle unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen.

Für die Etablierung des shRNA-Knockdowns wurden die bereits publizierten shRNAs für den Knockdown beider T-Ag [82][84], sowie für den individuellen Knockdown des sT-Ags [125] verwendet (siehe Abschnitt 2.13). Übereinstimmend mit den veröffentlichten Daten von Houben et al. [82][84] und Shuda et al. [125] konnte mittels MTT-Assays und Wachstumskurven

ebenfalls bestätigt werden, dass der Knockdown der T-Ag in WaGa-Zellen die Zellproliferation und das Zellwachstum ab Tag 4-5 nach Induktion der shRNAs mit Dox signifikant verlangsamt und die Zellen in Apoptose übergehen. Dieser Effekt ist zwar ausgeprägter, wenn nur das sT-Ag allein herunterreguliert wird, dies begründet sich jedoch höchstwahrscheinlich durch die geringere Effizienz des Knockdowns (40 %), wenn beide T-Ag herunterreguliert werden (Abbildung 10). Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden alle Versuche mit dem induzierbaren Knockdown-System an Tag 3 nach Induktion mit Dox (bzw. DMSO) durchgeführt.

Ein individueller Knockdown des LT-Ags konnte in dieser Arbeit nicht etabliert werden, obwohl ebenfalls eine bereits publizierte LT-shRNA-Sequenz von Houben et al. [84] verwendet wurde. Durch die Verwendung unterschiedlicher Expressionsvektoren, sowie die Anpassung der Restriktionsschnittstellen für die Klonierung der shRNA in den Tet-On-Vektor, ist es jedoch möglich, dass z.B. die Faltung der stem-loop Struktur der shRNA beeinträchtigt wird und die shRNA somit nicht exprimiert werden kann. Ebenso konnte in dieser Arbeit kein induzierbarer shRNA-Knockdown für die T-Ag in den MCC-Zelllinien Mkl-1 und Ms-1 etabliert werden, da es nicht möglich war eine homogene Zellpopulation mit dem transduzierten Tet-On-Vektor zu generieren. Dies begründet sich vermutlich durch die unterschiedliche Morphologie der Zellen, da Mkl-1- und Ms-1-Zellen im Vergleich zu WaGa-Zellen stark dazu tendieren, große Spheroide zu bilden, wodurch sowohl die Transduktion, als auch die Selektion einzelner Zellen mittels FACS erheblich erschwert wird.

## 4.2 Die Interaktion von MCC-Zelllinien mit Selektinen

Einen der ersten und wichtigsten Schritte im Metastasierungsprozess stellt die Adhäsion von Tumorzellen an das Endothel dar, welche durch Selektine vermittelt wird. Zwar konnten Whitehouse et al. zeigen, dass das sT-Ag durch die Destabilisierung der Mikrotubuli und die Ausbildung von Filopodien einen wesentlichen Einfluss auf die Migration und Invasion nimmt [190][191][192], im Rahmen dieser Arbeit wurde jedoch erstmalig die Selektin-vermittelte Adhäsion von MCC-Tumorzellen an das Endothel untersucht. In den folgenden Abschnitten wird daher die Interaktion von verschiedenen MCC-Zelllinien, insbesondere der WaGa-Zellen, mit humanen sowie murinen E- und P-Selektinen unter dynamischen und statischen Bedingungen diskutiert.

#### 4.2.1 Selektin-Bindung in dynamischen Adhäsionsversuchen

In dieser Arbeit wurden die physiologischen Bedingungen des Blutstroms durch dynamische Adhäsionsversuche imitiert. Es konnte gezeigt werden, dass unter dynamischen Bedingungen alle vier untersuchten MCPyV-positiven MCC-Zelllinien (WaGa, Mkl-1, Ms-1 und BroLi) an das humane E-Selektin binden (Abbildung 14), wobei die WaGa-Zellen die meisten Bindungsereignisse aufwiesen. Bindung an das humane P-Selektin hingegen konnte unter dynamischen Bedingungen für keine der untersuchten MCC-Zelllinien beobachtet werden. Für die murinen E- und P-Selektine wurden deutlich weniger Bindungsereignisse beobachtet. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass WaGa-Zellen über verschiedene, artspezifische Liganden an humane und murine Selektine binden. Dies könnte auch erklären, weshalb im Xenograft-Metastasierungsmodell – im Gegensatz zur sehr schnellen und aggressiven Metastasierung des MCCs im Menschen – die Tumor- bzw. Metastasenbildung relativ langsam (bis zu 120 Tage) stattfindet. Unterschiede im Adhäsionsverhalten der MCC-Zelllinien lassen sich dabei vermutlich durch unterschiedliche Mengen an sT-Ag erklären, die von den verschiedenen MCC-Zelllinien exprimiert werden (Abbildung 15), da außerdem mit Hilfe des konditionellen shRNA-Knockdown-Systems für die T-Ag gezeigt werden konnte, dass die Adhäsion von WaGa-Zellen an das humane E-Selektin abhängig von der Expression des sT-Ags ist (Abbildung 16). Dem LT-Ag kommt in diesem Prozess vermutlich eine unterstützende Rolle zu, da trotz geringerer sT-Knockdown-Effizienz beim Knockdown beider T-Ag die Adhäsion stärker reduziert wird, als wenn das sT-Ag allein herunterreguliert wird. Dieselbe Tendenz konnte auch für das murine E-Selektin festgestellt werden, wenn auch nicht signifikant (Anhang Abbildung 35).

In dynamischen Adhäsionsversuchen auf primären humanen Endothelzellen (HUVECs) konnten auch nach Induktion des E-Selektins mit  $Il-1\alpha$  nur sehr wenige Interaktionen von WaGa-Zellen beobachtet werden (Abbildung 17). Einerseits könnte dies an der geringeren Menge des humanen E-Selektins liegen, welches im Vergleich zu den artifiziell beschichteten Flusskammern in den Endothelzellen deutlich weniger exprimiert wird. Andererseits könnte die Bindung in diesem Fall auch Donor-abhängig sein, da das Experiment mit nur einem Donor durchgeführt wurde. So ist zu vermuten, dass die von den Endothelzellen exprimierte Menge an E-Selektin in diesem Fall nicht ausreichend ist, um die Adhäsion der WaGa-Zellen

mit diesem System zu untersuchen, sodass keine Aussage über das Bindungsverhalten an Endothelzellen getroffen werden kann.

Nichtsdestotrotz zeigen diese Ergebnisse, dass das sT-Ag die Adhäsion an die Selektine des Endothels vermittelt und die Adhäsion unter dynamischen Bedingungen in allen untersuchten MCC-Zelllinien größtenteils über das humane E-Selektin erfolgt. Die Expression des sT-Ags leistet somit einen entscheidenden Beitrag die Metastasierung im MCC voranzutreiben.

#### 4.2.2 Selektin-Bindung in der statischen Adhäsion

Gleichwohl ist bekannt, dass Selektin-Liganden-Interaktionen nicht nur unter dynamischen Bedingungen im Blutstrom stattfinden können, sondern auch unter statischen Bedingungen. Hierbei werden die Zellen innerhalb des Blutstroms z.B. durch sterische Hinderungen oder unterschiedliche Durchmesser der Blutgefäße verlangsamt, sodass ein geringerer Scherstress vorliegt [209][214][215]. Interessanterweise konnte unter statischen Bedingungen, im Gegensatz zu den Versuchen unter dynamischen Bedingungen, keine Bindung der WaGa-Zellen an das humane E-Selektin festgestellt werden, jedoch Interaktionen mit dem humanen P-Selektin (Abbildung 18). Diese Beobachtungen stimmen mit den veröffentlichten Daten von Starzonek et al. [216] überein, welche zeigen, dass Tumorzellen unter statischen Bedingungen ausschließlich über den Liganden sLeA an das humane E-Selektin binden, der auf WaGa-Zellen nicht exprimiert wird (Abbildung 26). Des Weiteren ist es wahrscheinlich, dass unter statischen und dynamischen Bedingungen verschiedene Liganden für E- und P-Selektine funktionell sind [216][231][232][233]. Wenig bekannt ist bisher darüber, ob artspezifische Unterschiede in den Tumorzell-Liganden bestehen. So weist jedoch die Tatsache, dass WaGa-Zellen unter dynamischen und statischen Bedingungen an murine E- und P-Selektine binden darauf hin, dass die Bindung in den verschiedenen Spezies durch unterschiedliche Liganden vermittelt wird. Darüber hinaus sind Selektine dafür bekannt sogenannte „*catch-bonds*“ auszubilden [216][234]. Dies sind nicht-kovalente Bindungen zwischen Selektinen und ihren Liganden auf der Leukozyten- (bzw. Tumorzell-) Oberfläche, welche durch mechanische Kräfte, wie hier die Scherkräfte innerhalb der Kapillaren, verstärkt und somit langlebiger werden und eine Bindung unterstützen. Dass in diesem Experiment unter statischen Bedingungen keine Adhäsion an das humane E-Selektin beobachtet wurde, jedoch in dynamischen Flussversuchen,

unterstreicht, dass in diesem Fall „*catch-bonds*“ die Interaktion zwischen dem humanen E-Selektin und seinen Liganden wahrscheinlich deutlich fördern. Im Gegensatz dazu scheinen „*catch-bonds*“ die Bindung von MCC-Zelllinien an das humane P-Selektin eher zu erschweren. Diese Beobachtungen stimmen mit dem Adhäsionsverhalten der WaGa-Zellen an murine Selektine überein, für die ebenfalls beobachtet werden konnte, dass die „*catch-bonds*“ unter dynamischen Bedingungen die Bindung an das murine E-Selektin stärken und überwiegend zur festen Adhäsion führt. Die Bindung an das murine P-Selektin hingegen wird, wie auch beim humanen E-Selektin, unter dynamischen Bedingungen eher geschwächt (überwiegend *Tethering*).

Insgesamt konnte durch diese Versuche somit gezeigt werden, dass das sT-Ag unter statischen Bedingungen, im Gegensatz zur dynamischen Adhäsion, keinen signifikanten Einfluss auf die Selektin-Bindung hat (Abbildung 18).

#### 4.2.3 Die Bindung von WaGa-Zellen erfolgt unabhängig von CD44

Wie zuvor beschrieben, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die dynamische Bindung von WaGa-Zellen an das humane E-Selektin in Abhängigkeit des sT-Ags erfolgt. So stellte sich im Folgenden die Frage, über welche(n) Liganden die WaGa-Zellen an die Selektine binden. Ein in der Literatur sehr häufig beschriebener Ligand für das humane E-Selektin ist das Zelladhäsionsmolekül CD44 [235][236][237], welches auf WaGa-Zellen ebenfalls stark exprimiert wird (Abbildung 24) und durch das sT-Ag auf der Zelloberfläche hochreguliert wird (Abbildung 25). CD44 ist einer der vielen Liganden des humanen E-Selektins, von welchem bereits 1994 Penneys & Shapiro vermuteten, dass es möglicherweise die Ausbreitung der Metastasen in MCCs unterstützt [227]. Dynamische Adhäsionsversuche in dieser Arbeit mit einer WaGa shRNA CD44-Knockdownzelllinie und einem CD44-blockierenden Antikörper zeigten jedoch, dass CD44 keinen Einfluss auf die Bindung an das humane E-Selektin hat (Abbildung 29). Unter statischen Bedingungen wird jedoch durch CD44-Knockdown die Adhäsion an das murine (signifikant) und das humane P-Selektin reduziert. Für den Knockdown des sT-Ags konnte hier jedoch keine Veränderung des Adhäsionsverhaltens festgestellt werden, da vermutlich die sT-vermittelten Veränderungen von CD44 zu gering sind, um sie in diesem Experiment zu detektieren. Somit ist es durchaus möglich, dass die



statische Adhäsion unter anderem durch CD44 vermittelt wird, die sT-vermittelte Adhäsion an das humane E-Selektin unter dynamischen Bedingungen jedoch unabhängig von CD44 erfolgt. Ein weiterer potentieller Ligand für das humane E-Selektin ist CD24, welches wie CD44 ebenfalls stark auf WaGa-Zellen exprimiert wird, und für die Adhäsion ebenfalls von Relevanz sein könnte. Dabei wird CD24 ( $\text{Log}_2\text{diff } -0,06$ ) jedoch, ebenso wie die potentiellen E-Selektin-Liganden, DR3 ( $\text{Log}_2\text{diff } -0,06$ ) und CD107a ( $\text{Log}_2\text{diff } -0,08$ ), die nur schwach auf WaGa-Zellen exprimiert werden, im verwendeten shRNA-Knockdown-System nur leicht durch das sT-Ag auf der WaGa-Zelloberfläche hochreguliert (alle nicht signifikant, Anhang Tabelle 21).

Insgesamt unterstreichen diese Ergebnisse die Vermutung, dass WaGa-Zellen mittels verschiedener Liganden an E- und P-Selektin unter statischen und dynamischen Bedingungen binden.

#### **4.2.4 Die statische Bindung des murinen E-Selektins erfolgt (teilweise) über Sialyl-Lewis X**

Neben CD44 konnte eine große Anzahl verschiedener Selektin-Liganden beschrieben werden, welche die sT-vermittelte Adhäsion an das humane E-Selektin vermitteln könnten. Generell binden Selektine Kohlenhydratstrukturen, die mit Proteinen oder Lipiden verknüpft sind. So ist bekannt, dass neben CD44 unter anderem häufig die Glykoproteine Sialyl-Lewis X (sLeX) oder sein Isomer Sialyl-Lewis A (sLeA) an die Selektine binden und diese somit eine wesentliche Rolle in der Metastasierung spielen könnten. Da kürzlich gezeigt werden konnte, dass das humane E-Selektin unter statischen Bedingungen ausschließlich über das Glykoprotein sLeA bindet [216], welches jedoch auf WaGa-Zellen nicht exprimiert wird (Abbildung 26), erklärt sich, dass unter statischen Bedingungen keine Bindung am humanen E-Selektin stattfinden kann. Anders sieht es hingegen für die statische Bindung an das murine E-Selektin aus, welches die Glykanliganden sLeA, sLeX, Lewis A (LeA) und Lewis B (LeB) bindet [216]. Im Gegensatz zu sLeA konnte in dieser Arbeit die Expression von sLeX auf WaGa-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 26). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der Knockdown des sT-Ags die Expression von sLeX auf der WaGa-Zelloberfläche leicht erhöht (nicht signifikant). Demnach ist es wahrscheinlich, dass die statische Bindung an das

murinen E-Selektin, neben sLeX und CD44, zumindest teilweise über die Glykane LeA und LeB erfolgt. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht genauer untersucht und bisher ist nicht bekannt, ob LeA und LeB auf WaGa-Zellen exprimiert werden. Entsprechende Daten für die Bindung unter dynamischen Bedingungen zu generieren, ist sehr aufwändig. Daher sind diese Daten, ebenso wie für das P-Selektin, momentan noch nicht verfügbar und wurden an dieser Stelle nicht weiter analysiert. Mit diesen Ergebnissen übereinstimmend zeigt auch die Transkriptomanalyse in dieser Arbeit, dass das sT-Ag die Zelloberfläche von WaGa-Zellen, sowie auch Glykosyltransferasen, die für die Prozessierung von Selektin-Liganden auf der Zelloberfläche verantwortlich sind, verändert, was eine Veränderung des Bindungsverhaltens zur Folge haben könnte (Abbildung 21 und Abbildung 23).

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit erstmalig nachgewiesen werden, dass MCPyV-positive MCC-Zelllinien an Selektine binden und die dynamische Bindung von WaGa-Zellen an das humane E-Selektin in Abhängigkeit des sT-Ags erfolgt. Dabei verwenden die WaGa-Zellen unter statischen und dynamischen Bedingungen voraussichtlich verschiedene Mechanismen, um an humane und murine E-/P-Selektine zu adhären. Diese konnten bisher im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht genau identifiziert werden, sollten aber in Zukunft adressiert werden, um effiziente Therapiemöglichkeiten zu finden, welche die Metastasierung des MCC verhindern können.

### **4.3 Die MCPyV-T-Antigene haben keinen Einfluss auf die Zellinvasion**

Ein weiterer entscheidender Schritt in der Metastasierung, welcher der Adhäsion von Tumorzellen an das Endothel folgt, ist die Zellinvasion durch die ECM. Im Gegensatz zu Kwun et al. [177], die kürzlich nachweisen konnten, dass die Zellinvasion abhängig von der LSD-Domäne des sT-Ags ist, konnte in dieser Arbeit jedoch kein Einfluss der T-Ag auf die Zellinvasion festgestellt werden (Abbildung 19).

Einerseits liegt die Vermutung nahe, dass die Unterschiede in den sT-Proteinmengen der WaGa-Zellen durch das in dieser Arbeit verwendete Knockdown-System zu gering sein könnten, um einen eventuellen Effekt mit diesem System festzustellen. Da in diesem Fall im induzierten T-Ag-shRNA-Knockdown der WaGa-Zellen noch jeweils ca. 50 % des sT-Proteins vorhanden war, könnte der sT-Knockdown an dieser Stelle nicht effizient genug gewesen sein,

um einen Unterschied zur DMSO-Kontrolle festzustellen. Bestärkt wird diese Vermutung dadurch, dass für die Versuche von Kwun et al. [177] das sT-Ag in U2OS-Zellen und in der MCPyV-negative MCC-Zelllinie MCC13 überexprimiert wurde. Andererseits könnten die unterschiedlichen Ergebnisse auch an den verschiedenen kommerziellen Systemen liegen, welche für die Untersuchungen verwendet wurden. Während von Kwun et al. Kollagen-Zellinvasions-Assays (Chemicon ECM551) genutzt wurden, die mit 85 % Kollagen I und 15 % Kollagen III beschichtet sind, wurden in dieser Arbeit ein mit Basement Membrane Extract beschichteter Zell-Invasions-Assay (BME, R&D Systems) verwendet, welcher überwiegend Kollagen Typ IV, sowie noch die weiteren Bestandteile Laminin, Entactin und Heparansulfat-Proteoglykane enthält.

Die Tatsache, dass in unserem Xenograft-Mausmodell die Expression des sT-Ags in den Metastasen im Vergleich zum Primärtumor signifikant erhöht ist, deutet jedoch ebenfalls auf einen Einfluss des sT-Ags auf die Zellinvasion hin [39]. So zeigen auch die Ergebnisse der Transkriptomanalyse dieser Arbeit, dass das sT-Ag Gene, die in der Organisation, Struktur und Bindung der ECM involviert sind, transkriptionell reguliert (Abbildung 21). Übereinstimmend mit den Daten von Whitehouse et al. [193], die zeigen konnten, dass die intrazellulären Chlorid-Ionen-Kanal-Proteine CLIC1 und CLIC4 entscheidend für die Zellmigration und Zellinvasion in WaGa-Zellen sind und durch das sT-Ag hochreguliert werden, finden sich in den Transkriptomdaten ebenfalls Anionen- und Kationentransport durch das sT-Ag reguliert. Für eine Beteiligung des sT-Ags in der Zellinvasion spricht des Weiteren, dass neben der Matrixmetalloprotease MMP-9, welche durch die Bindung des sT-Ags an Fbw7 induziert wird [177], ebenfalls die zelluläre Sheddase ADAM10 durch das sT-Ag signifikant auf der WaGa-Zelloberfläche hochreguliert wird (Abbildung 25). Übereinstimmend mit den Daten von Whitehouse et al. [192] und der Transkriptomanalyse in dieser Arbeit (Anhang Abbildung 36) wird ADAM10 auf transkriptioneller Ebene durch das sT-Ag hochreguliert ( $\text{Log}_2\text{Fold Change } -0,713$ ). Darüber hinaus konnte kürzlich gezeigt werden, dass sowohl durch siRNA-Knockdown von ADAM10 als auch durch die Verwendung von ADAM10-Inhibitoren die Zellinvasion in den MCPyV-positiven MCC-Zelllinien WaGa und PeTa deutlich reduziert wird [192]. Auf diese Weise könnte die durch sT-vermittelte erhöhte Expression von ADAM10 und auch MMP-9 die Zellinvasion begünstigen.

Insgesamt konnte unter der Verwendung des konditionellen shRNA-Knockdown-Systems in dieser Arbeit kein Einfluss der T-Ag auf die Zellinvasion festgestellt werden. Es ist jedoch zu vermuten, dass durch die verbleibende Menge des sT-Ags im shRNA-Knockdown kein Unterschied in der Zellinvasion von WaGa-Zellen detektiert werden konnte. So deuten die Ergebnisse der Transkriptomanalyse und des Zelloberflächen-Screenings dieser Arbeit sowie auch die Beobachtungen von Whitehouse et al. [192] und Kwun et al. [177] durchaus auf eine Beteiligung des sT-Ags in der Zellinvasion hin.

#### 4.4 Der Einfluss des sT-Antigens auf die differentielle Genexpression

In der Tumorgenese und Metastasierung spielen Veränderungen in der Aktivität von Genen eine wesentliche Rolle. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit eine Transkriptomanalyse durchgeführt, mit dem Ziel einerseits grundlegende biologische Prozesse, molekulare Funktionen und Signalwege zu identifizieren, die durch das sT-Ag transkriptionell reguliert werden und für die Metastasierung relevant sein könnten, und andererseits zu analysieren, ob die sT-vermittelte Adhäsion von WaGa-Zellen an das humane E-Selektin transkriptionell reguliert wird.

Durch die Verwendung des konditionellen sT-shRNA-Knockdown-Systems konnten insgesamt 110 Gene identifiziert werden, die durch das sT-Ag hochreguliert, sowie 280 Gene, die durch das sT-Ag transkriptionell herunterreguliert werden (Cut-Off:  $\text{Log}_2\text{Fold Change} \geq 1$  oder  $\leq (-1)$  und  $\text{padj-Wert} < 0,05$ ; Abbildung 20). Besonders auffällig ist hier, dass unter den durch das sT-Ag am stärksten regulierten Genen außerordentlich viele TRIM-Proteine und Zink-Finger Proteine auftauchen (Tabelle 18 und Anhang Tabelle 19). Dabei sind die Funktionen der verschiedenen TRIM-Proteine sehr vielseitig, sodass sie an der Zellzyklus-Regulation, Differenzierung, Entwicklung, Tumorgenese und der angeborenen Immunantwort beteiligt sein können. Nachgewiesen werden konnte auch, dass TRIM-Proteine durch Typ I und II-Interferone induziert werden und diese die Genexpression durch Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie z.B. TIF1 (transcriptional intermediary factor 1), PML (promyelocytic leukemia protein) und RFP (RET finger protein), regulieren [238][239]. Auch die Funktionen von Zinkfinger-Proteinen gehen weit über ihre Funktion als Transkriptionsfaktoren hinaus, sodass sie vor allem auch in der Tumorgenese, der Tumorprogression und der Metastasierung

von Bedeutung sind. Dabei können Zinkfinger-Proteine sowohl als Tumorsuppressor, aber auch als Onkogene fungieren und sind spezifisch für bestimmte Tumorarten. So wird z.B. das Zinkfinger-Protein ZNF750 durch das sT-Ag in WaGa-Zellen herunterreguliert (Log<sub>2</sub>Fold Change 1,08; Anhang Tabelle 19), welches bereits im Plattenepithelkarzinome (engl. *squamous cell carcinoma* (SSC)) als Tumorsuppressor-Gen beschrieben werden konnte und die Migration, Proliferation und Adhäsion von Zellen vermittelt [240]. Nichtsdestotrotz konnten die exakten Funktionen vieler Zinkfinger- und TRIM-Proteine jedoch bisher noch nicht genau aufgeklärt werden.

Mittels GO-Analyse wurde außerdem nach biologischen Prozessen und molekularen Funktionen gesucht, welche durch die Expression des sT-Ags differentiell verändert werden. Die erhaltenen Ergebnisse bestätigen, dass das sT-Ag in vielen regulatorischen Prozessen (z.B. Zellproliferation, Zellmigration, ECM-Struktur und Vaskulogenese), die eng mit der Tumorgenese und Metastasierung verknüpft sind, involviert ist (Abbildung 21). Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Whitehouse et al. [190], welche sT-induzierte Filopodien-Bildung beobachten konnten, bestätigen diese Ergebnisse auch, dass das sT-Ag die Organisation von extrazellulären Strukturen auf der Zelloberfläche beeinflusst. Zudem deuten die GO-Analysen darauf hin, dass die sT-vermittelten Veränderungen der Expression von Zelloberflächenmolekülen aus Abbildung 25 zumindest teilweise auf transkriptioneller Ebene reguliert werden. So konnte zusätzlich für die ausgewählten Zelloberflächenmoleküle CD44 (signifikant), ADAM10, CD24, Ox-40 und CD95 (alle nicht signifikant) bestätigt werden, dass diese zum Teil transkriptionell durch das sT-Ag reguliert werden.

Des Weiteren bestätigt die GO-Analyse mittels GSEA, dass auch durch das MCPyV-sT-Ag, wie durch einige virale Onkoproteine aller anderen humanen Tumoviren [241], der NOTCH-Signalweg moduliert wird (Abbildung 22). Zwar ist bisher nicht bekannt, wie der Notch-Signalweg genau durch das MCPyV modifiziert wird, es wird jedoch vermutet, dass durch die Interaktion des sT-Ags mit der Ubiquitin-Ligase Fbw7 der proteosomalen Abbau von NICD (engl. *Notch intracellular domain*) inhibiert wird. Daraus könnte eine verlängerte NOTCH-Aktivität resultieren, welche die Differenzierung forciert und somit den viralen Zellzyklus vorantreibt [241]. Für eine wichtige Rolle des NOTCH-Signalwegs spricht außerdem, dass die Expression der Tumorsuppressorgene Notch 3 und Jagged 1 mit einem positiven Krankheitsverlauf im MCC assoziiert werden konnten [49]. Übereinstimmend mit

den Beobachtungen von Shuda et al. [242], welche zeigen, dass das MCC aus einer neuronalen Vorläuferzelle entstehen könnte, finden sich interessanterweise auch Gene transkriptionell durch das sT-Ag reguliert, welche in der Bildung von Nervenzellen involviert sind. Außerdem deutet die Tatsache, dass das sT-Ag Gene des intrinsischen Apoptose-Signalwegs induziert, darauf hin, dass das sT-Ag zellulären Stress auslöst. Damit übereinstimmend finden sich ebenfalls Gene durch das sT-Ag transkriptionell reguliert, die normalerweise in der ER-Stressantwort und durch UV-Bestrahlung aktiviert werden. Dies untermauert die Vermutung, dass das sT-Ag nicht über den extrinsischen Signalweg über CD95 Apoptose verhindert, sondern über den intrinsischen Signalweg agiert (Abbildung 30).

Die Beobachtung, dass das sT-Ag die Expression von Genen verändert, die in der Bindung von Kohlenhydratstrukturen an der ECM, sowie in der Zusammensetzung der ECM involviert sind, unterstreicht die einzigartige Rolle des sT-Ags im Metastasierungsprozess (Abbildung 23). Darüber hinaus konnte durch die Transkriptomanalyse gezeigt werden, dass das sT-Ag die Expression von Glykosyl-Transferasen hochreguliert, die für die post-translationale Prozessierung der Glykan-Selektin-Liganden im Golgi-Apparat eine entscheidende Rolle spielen könnten. Nachfolgend könnte dies zu einer vermehrten Präsentation von Selektin-Liganden auf der Zelloberfläche führen, wodurch die Bindung von Tumorzellen an der Endotheloberfläche erhöht wird und die Ausbreitung der Tumorzellen in entfernte Gewebe begünstigt werden könnte [243].

Zusammenfassend untermauern die Ergebnisse der Transkriptomanalyse, dass das sT-Ag auf transkriptioneller Ebene viele regulatorische Prozesse modifiziert, wie die Zellproliferation, -migration, -adhäsion und -invasion, die vor allem für die Metastasierung eine entscheidende Rolle spielen. Darüber hinaus konnten einige Signalwege identifiziert werden, die in der Regulation von Selektin-Liganden auf der Zelloberfläche von entscheidender Bedeutung sein könnten. Auffällig ist jedoch, dass im Vergleich zu anderen Transkriptomanalysen insgesamt eher wenige Gene durch das sT-Ag verändert werden. Wie bereits im vorherigen Abschnitt erläutert, begründet sich diese Tatsache vermutlich dadurch, dass die Unterschiede in der Expression des sT-Ags – zumindest im Vergleich mit Überexpressions-Experimenten – im verwendeten shRNA-Knockdown-System eher gering sind.

#### 4.5 Der Einfluss des sT-Antigens auf die Expression von Zelloberflächenmolekülen

Die Zelloberfläche stellt die Schnittstelle zwischen einer (Tumor-)Zelle und ihrer extrazellulären Umgebung dar. So ist seit langer Zeit bekannt, dass Modifizierungen der Zelloberfläche von wesentlicher Bedeutung in der malignen Transformation sowie in der Metastasierung sind [201][244]. Die Analyse der Expression von Molekülen auf der (Tumor-)Zelloberfläche ist daher essentiell, um zum einen grundlegende biologische Prozesse der Tumorgenese und Metastasierung zu verstehen, und zum anderen, um neue Zielmoleküle für Krebsimmuntherapien zu identifizieren. In der Literatur ist bisher allerdings nur sehr wenig über die Veränderungen bekannt, die durch Tumorzellen auf der Zelloberfläche induziert werden, so auch im Falle von MCC-Tumorzellen.

Um zu untersuchen, welchen Einfluss das sT-Ag auf die Expression von Zelloberflächenmolekülen im MCC hat, und damit auch auf potentielle Selektin-Liganden, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Oberfläche der WaGa-Zellen durch ein Zelloberflächen-Screening analysiert. Auf diese Weise konnte die Expression von insgesamt 90 der 371 untersuchten Liganden auf der WaGa-Zelloberfläche nachgewiesen werden (Abbildung 24). Umso beeindruckender ist, dass alle Moleküle, über die bisher Informationen in der Literatur im MCC-Kontext verfügbar ist, in diesem Screening bestätigt werden konnten und auf WaGa-Zellen stark exprimiert werden ( $\text{MFI} \geq 10.000$ ). So konnte beispielsweise CD227 (Mucin-1), ein Tumormarker, der in 82 % der MCCs veränderte Glykosylierungsmuster aufweist [228], hochexprimiert auf der WaGa-Zelloberfläche nachgewiesen werden. Ebenso findet sich das epitheliale Zelladhäsionsmolekül CD326 (Ep-CAM) auf WaGa-Zellen stark exprimiert, welches in 70 % der MCCs exprimiert wird. Dabei konnte die Expression dieser beiden Oberflächenmarker interessanterweise auch in 66 % der metastasierten MCCs nachgewiesen werden [228]. Des Weiteren ist an dieser Stelle die zelluläre Sheddase CD156c (ADAM10) hervorzuheben, für dessen Inhibierung zusammen mit ADAM17 bereits gezeigt werden konnte, dass sie zur Abnahme von MCPyV sT-Ag induzierter Zelldissoziation und -migration führt [192]. Auf die Rolle von ADAM10 in der Zellinvasion wird ausführlicher in Abschnitt 4.3 eingegangen. Außerdem konnten Penneys & Shapiro bereits 1994 beschreiben, dass das Zelladhäsionsmolekül CD44 vermutlich die Metastasierung im MCC vereinfacht [227]. Dadurch, dass CD44 außerdem durch das sT-Ag

auf der WaGa-Zelloberfläche hochreguliert wird (Abbildung 25), wurde darüber hinaus seine Rolle als Selektin-Ligand für das humane E-Selektin in dieser Arbeit genauer untersucht und wird in Abschnitt 4.2.3 diskutiert.

Des Weiteren konnten durch die Verwendung des konditionellen sT-shRNA-Knockdown-Systems im Zelloberflächen-Screening 20 Liganden identifiziert werden, welche in WaGa-Zellen durch das sT-Ag hochreguliert und 54 Liganden, welche durch das sT-Ag herunterreguliert werden (Abbildung 25). Interessanterweise beinhalteten die sT-regulierten Liganden überwiegend Oberflächenmoleküle, die bereits mit dem Metastasierungsprozess assoziiert werden konnten, wie z.B. die Tetraspanine CD9, CD63, CD81, CD82 und CD151, deren Expression im MCC ebenfalls bereits nachgewiesen werden konnte [245]. Aus Kostengründen wurde das Oberflächen-Screening nur einmal durchgeführt und die Ergebnisse für die ausgewählten Liganden ADAM10, CD44, CD47 und CD95 in separaten Experimenten wiederholt, in denen für alle Liganden, außer für CD47, eine signifikante Veränderung durch den sT-Knockdown bestätigt werden konnte (Abbildung 27). Übereinstimmend mit den Ergebnissen des Zelloberflächen-Screenings reguliert das sT-Ag im verwendeten shRNA-Knockdown-System die Expression von CD47 auf der WaGa-Zelloberfläche jedoch nur leicht ( $\text{Log}_2\text{diff} -0,11$ ), weshalb mittels FACS vermutlich nur eine leichte und keine signifikante Veränderung festgestellt werden konnte. Daher wurden zusätzlich zur Bestätigung der Screening-Ergebnisse sT-Überexpressions-Experimenten in verschiedenen Zelllinien durchgeführt (Abbildung 28). Auf diese Weise konnte bestätigt werden, dass durch die Überexpression des sT-Ags in HEK293-Zellen, die von Natur aus kein sT-Ag exprimieren, und in WaGa-Zellen, die bereits sT-Ag exprimieren, die Expression von CD47 auf der Zelloberfläche signifikant erhöht wird. Da CD47 außerdem auf WaGa-Zellen stark exprimiert wird ( $\text{MFI} \geq 10.000$ ) und aufgrund seiner essentiellen Funktion als „*don't eat me*“-Signal für das Immunsystem eine vielversprechenden Rolle für neue Therapieansätzen darstellt, wurde CD47 für weitere funktionelle Untersuchungen ausgewählt. Die Bedeutung und Funktion von CD47 wird ausführlich in Abschnitt 4.6.2 diskutiert.

Zusammengefasst liefern die Ergebnisse des Zelloberflächenmarker-Screenings viele vielversprechende Zielproteine, die lohnenswert für weitere Untersuchungen sind, um neue MCC-Therapieansätze zu finden.



## 4.6 Die Rolle des sT-Antigens im MCC

In dieser Arbeit wurde die Funktion der sT-regulierten Liganden CD95 und CD47 im MCC genauer untersucht und wird in den folgenden Abschnitten ausführlich diskutiert. Basierend auf den Ergebnissen dieser Untersuchungen wird anschließend die Rolle des sT-Ags in der Immunevasion diskutiert.

### 4.6.1 Das sT-Antigen verhindert Apoptose unabhängig von CD95

Apoptose spielt eine wichtige Rolle für die Kontrolle der Zellproliferation und Erhaltung der Homöostase im Gewebe, indem schädliche sowie nicht benötigte Zellen vom Immunsystem beseitigt werden. Defekte im Apoptose-Mechanismus sind häufig mit dem Auftreten verschiedener Krankheiten wie Tumoren assoziiert. Auch im MCC scheint die Apoptose von besonderer Bedeutung zu sein, da die MCPyV-positiven MCC-Zelllinien die Expression der T-Ag benötigen und durch Knockdown der T-Ag Apoptose induziert wird [82][246]. Damit übereinstimmend konnte durch MTT-Assays, Wachstumskurven und Apoptose-Assays in dieser Arbeit gezeigt werden, dass in WaGa-Zellen die Apoptose allein durch die Expression des sT-Ags verhindert wird und der Knockdown des sT-Ags zum Zelltod führt (Abbildungen 12, 13 und 30). Dabei löst der Knockdown beider T-Ag im verwendeten shRNA-Knockdown-System im Vergleich zum sT-Ag individuell in deutlich weniger Zellen Apoptose aus. Dies kann vermutlich jedoch auf die unterschiedliche Effizienz des sT-Knockdowns zurückgeführt werden, bei dem die sT-Expressionslevel in WaGa- und HCT116sT-Zellen mit der sT/LT-shRNA nur etwa um die Hälfte herunterreguliert werden, im Gegensatz zur sT-shRNA, welche die sT-Expression an Tag 3 so gut wie vollständig herunterreguliert (Abbildung 10).

Für die extrinsische Induktion der Apoptose ist die Expression des CD95-Rezeptors auf der Zelloberfläche und Interaktion mit seinem Liganden CD95L insbesondere in Virus-infizierten Zellen sowie Tumorzellen von entscheidender Bedeutung [247]. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass CD95 in WaGa-Zellen auf der Zelloberfläche durch das sT-Ag herunterreguliert wird (Abbildung 25), welches auf einen Mechanismus zur Umgehung der Immunantwort hindeutet. Die Blockade des CD95-Liganden mit einem monoklonalen Antikörper zeigte jedoch keinen Effekt und induzierte Apoptose gleichermaßen wie in den

unbehandelten sT-Knockdown-Zellen (Abbildung 30). Aufgrund dieser Ergebnisse liegt die Vermutung nahe, dass die durch den Knockdown der T-Ag induzierte Apoptose in MCPyV-positiven MCC-Zellen nicht extrinsisch über den CD95-Rezeptor, sondern wahrscheinlich durch einen intrinsischen Signalweg, wie z.B. durch zellulären Stress oder DNA-Schäden, ausgelöst wird. Dafür sprechen auch die Ergebnisse der Transkriptomanalyse, welche ebenfalls zeigen, dass das sT-Ag die Expression von Genen des intrinsischen Apoptose-Signalwegs modifiziert (Abbildung 22), sowie damit übereinstimmend Gene, die normalerweise in der ER-Stressantwort und durch UV-Bestrahlung aktiviert werden. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht genauer adressiert und experimentell bestätigt.

Nichtsdestotrotz bleibt die Frage nach der Funktion von CD95 im MCC offen. Obwohl CD95 in WaGa-Zellen nicht entscheidend für die extrinsische Induktion der Apoptose ist, könnte CD95 eine Schlüsselrolle in der Metastasierung zukommen. Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass CD95 als Tumorsuppressor fungiert und sich seine Rolle einzig und allein auf die Induktion des programmierten Zelltods beschränkt. Damit einhergehend findet sich CD95 in vielen Tumoren herunterreguliert, da Tumorzellen während ihrer Ausbreitung das Risiko minimieren vom Immunsystem erkannt zu werden. So wird CD95 auch im MCC unter normalen Bedingungen auf WaGa-Zellen nicht exprimiert ( $\text{MFI} \leq 100$ ) und wird erst durch den Knockdown des sT-Ags auf der Zelloberfläche exprimiert ( $\text{MFI} 248$ ). Zunehmende Hinweise deuten jedoch auch darauf hin, dass CD95 neben seiner Funktion in der Immunantwort ebenfalls in der Metastasierung von wesentlicher Bedeutung ist. Abhängig von der Form seines Liganden CD95L induziert CD95 nicht nur apoptotische, sondern auch nicht-apoptotische Signalwege. So löst die Bindung von membrangebundendem m-CD95L die Aktivierung des extrinsischen Apoptose-Signalwegs aus. Infolgedessen formiert sich der DISC-Komplex (engl. *death-inducing signaling complex*) und aktiviert die Caspase-Signalkaskade, die letztendlich den Zelltod auslöst. Wird hingegen das membrangebundene m-CD95L von einer MMP (z.B. MMP-3, MMP-7, MMP-9 oder ADAM10) gespalten, entsteht eine lösliche Form des Liganden (s-CD95L), die in den Blutstrom freigesetzt wird. Interessanterweise kann Akkumulation von s-CD95L im Blutstrom in Patienten mit verschiedenen Tumorerkrankungen beobachtet werden, wobei eine hohe s-CD95L-Expression mit einer hohen Rezidivrate einhergeht [248]. Zwar ist s-CD95L noch in der Lage mit CD95 zu interagieren, induziert aber im Gegensatz zu m-CD95L nicht den Zelltod. Die CD95/s-CD95L Interaktion induziert alternativ einen nicht-

apoptotischen Signalweg, durch welchen Signalwege wie  $\text{NF}\kappa\text{B}$ , MAP-Kinase (p38, c-Jun und Erk1/2) und PI3K aktiviert werden und die Differenzierung sowie das Überleben, Proliferation und Migration der Zellen beeinflusst wird [249]. Ebenfalls wird durch diese Signalwege die Immunantwort stimuliert, wodurch die Zytokin-Produktion gesteigert und die Sekretion von Typ-I-Interferonen induziert wird. Der durch CD95 ausgelöste, nicht-apoptotische Signalweg reguliert somit eine Vielzahl an biologischen Prozessen, von denen viele das Tumorstadium sowie auch die Invasion von Tumorzellen begünstigen [200][250].

Allerdings konnte beobachtet werden, dass die *in-vivo*-Blockade von CD95 im Mausmodell starke Leberschäden verursacht und lethal ist [251]. Aufgrund dieser starken Nebenwirkungen liegt der Fokus in den meisten Therapieansätzen mittlerweile eher auf einer Blockade von s-CD95L oder den MMPs, die diesen prozessieren. Zwar wird CD95 auf der WaGa-Zelloberfläche durch das sT-Ag herunterreguliert, dennoch könnte dessen Freisetzung durch die Hochregulation der MMPs ADAM10 (Abbildung 25 und [192]) oder auch MMP-9 [177], welche durch das sT-Ag hochreguliert werden, gefördert werden. Auf diese Weise könnten sowohl die Zytokin- und Typ-I-Interferon-Produktion angeregt werden, als auch zahlreiche nicht-apoptotische Signalwege, welche das Tumorstadium sowie die Migration und Invasion der Zellen begünstigen könnten [200][249][250].

Da gezeigt werden konnte, dass die sT-vermittelte Induktion der Apoptose nicht über den extrinsischen Signalweg erfolgt, könnte es für zukünftige Fragestellungen vielversprechend sein, sowohl die Rolle von s-CD95 weiter zu analysieren, als auch herauszufinden, durch welchen intrinsischen Mechanismus das sT-Ag die Apoptose verhindert, um die Immunantwort zu umgehen. So bildet die spezifische Regulation von CD95 in Tumorzellen kombiniert mit der Behandlung mit CPIs einen vielversprechenden Ansatz, um die bereits vorhandene Anti-Tumorantwort des Immunsystems zu reaktivieren und somit die Metastasierung möglicherweise zu verhindern [200][247].

#### 4.6.2 Das sT-Antigen verhindert die Phagozytose primärer humaner Makrophagen durch das „*don't eat me*“-Signal CD47

Die zentrale Rolle des „*don't eat me*“-Signals CD47 im Zusammenspiel mit dem auf Makrophagen exprimierten SIRP $\alpha$ -Rezeptor für das angeborene und adaptive Immunsystem konnte bereits ausführlich in der Literatur beschrieben werden. Demzufolge exprimieren gesunde Zellen CD47 auf der Zelloberfläche, durch welches Zellen durch die Interaktion von CD47 mit SIRP $\alpha$ -Rezeptor vor der Phagozytose geschützt werden. Tumorzellen hingegen überexprimieren häufig CD47, um der Beseitigung durch das angeborene Immunsystem zu entgehen, weshalb die CD47-SIRP $\alpha$ -Interaktion ein vielversprechendes Zielmolekül für Anti-Tumor-Therapien darstellt [252][253]. Damit einhergehend konnten zahlreiche klinische Studien bereits Erfolge in der Behandlung verschiedener Tumorarten mit CD47-Inhibitoren verbuchen. So führt die Blockade von CD47 nicht nur zur Aktivierung der Makrophagen des angeborenen Immunsystems, sondern aktiviert auch dendritische Zellen, welche die adaptive Immunantwort durch Induktion der T-Zell-Expansion verstärken [254]. Zwar sind einige klinische Studien zu CD47-Inhibitoren auch in der Behandlung des MCC vielversprechend [29][138][139][255], welche Funktion CD47 im MCC jedoch genau zukommt konnte bisher noch nicht aufgeklärt werden.

Durch das Zelloberflächen-Screening konnte gezeigt werden, dass CD47 auf WaGa-Zellen stark exprimiert wird und durch das sT-Ag auf der Zelloberfläche hochreguliert wird (Abbildung 25). Nachfolgend konnte durch funktionelle Untersuchungen mittels *in-vitro* Phagozytose-Assays in dieser Arbeit erstmalig eine Beteiligung von CD47 in der MCC-Immunantwort nachgewiesen werden. So führt der Knockdown des sT-Ags in WaGa-Zellen zu einer erhöhten phagozytischen Aktivität von primären humanen Makrophagen, welche durch CD47-siRNA-Knockdown und Versuche mit einem CD47-blockierenden therapeutischen Antikörper (B6H12.2), der in präklinischen Studien vielversprechende Ergebnisse zeigt, auf CD47 zurückgeführt werden konnte (Abbildung 31). Die starke Expression von CD47 auf WaGa-Zellen bestärkt dabei die bedeutende Rolle für CD47 in der Immunantwort. Da CD47 ein sogenanntes Integrin-assoziiertes Protein (IAP) ist, konnten neben seiner zentralen Rolle in der Immunevasion weitreichende Effekte auf Prozesse der Metastasierung, wie Adhäsion, Migration und Invasion, beschrieben werden. So korreliert eine starke Expression von CD47 häufig mit einer stärkeren Metastasie-

rung und einer weniger aktiven Immunantwort, was mit einer schlechteren Prognose für den Krankheitsverlauf einhergeht. Im Gegensatz dazu werden niedrigere CD47-Expressionslevel eher mit einer besseren Prognose assoziiert [256][252].

Wie jedoch das MCPyV sT-Ag CD47 auf der WaGa-Zelloberfläche reguliert, ist bislang ungewiss. Bekannt ist, dass CD47 in verschiedener Tumorarten entscheidend für die Immunevasion ist und dessen Expression auf vielfältige Art und Weise gesteuert werden kann [257]. So konnte in Mausmodellen mit soliden Tumoren durch Behandlung mit monoklonalen CD47-Antikörpern die Phagozytose reaktiviert werden, was in Abhängigkeit der Makrophagen zur Verkleinerung der Tumore führte [257][258]. Die Regulation der CD47-Expression wird dabei durch Zytokine, Onkogene, microRNAs und Enzyme vermittelt, was darauf hindeutet, dass CD47 sowohl auf transkriptioneller als auch post-transkriptioneller Ebene, sowie auch post-translational reguliert werden kann [259]. Die Ergebnisse der Transkriptomanalyse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass CD47 in WaGa-Zellen zumindest teilweise auf transkriptioneller Ebene durch das sT-Ag hochreguliert wird ( $\text{Log}_2\text{Fold Change } -0,393$ , Abbildung 36). Über die Rolle und Regulation von CD47 in der viralen Infektion gibt es hingegen nur wenige Informationen. So konnte lediglich für das EBV nachgewiesen werden, dass CD47 in EBV-assoziiertem Magenkarzinomen höher exprimiert und mit einer schlechteren Prognose verbunden ist, als in nicht EBV-assoziiertem Magenkarzinomen [260].

Einerseits ist es möglich, dass CD47 durch die Erkennung von Tumorzellen durch Makrophagen, welche daraufhin pro-inflammatorische Zytokine wie  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IL-1}\beta$  sezernieren, transkriptionell reguliert wird.  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IL-1}\beta$  aktivieren den  $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Signalweg, aktivieren  $\text{NF}\kappa\text{B}$  und erhöhen die CD47-Expressionslevel durch direkte Bindung von  $\text{NF}\kappa\text{B}$  an den CD47-Promotor [261]. Gleichermäßen kann unter hypoxischen Bedingungen, wie es in der Tumormikroumgebung durch unkontrolliertes Zellwachstum häufig der Fall ist, der Transkriptionsfaktor HIF1 durch Bindung an den CD47-Promotor dessen Expression induzieren und somit ebenfalls erhöhen [259][262][263]. Andererseits könnten CD47-Expressionslevel im MCC möglicherweise auch indirekt durch die Bindung des sT-Ags an die E3-Ubiquitin-Ligase Fbw7 reguliert werden, welche unter anderem den Abbau des Onkogens MYC inhibiert [182]. Bezüglich MYC konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass es direkt an den CD47-Promotor bindet und somit in der Lage ist CD47-Expressionslevel transkriptionell zu steuern [259][264]. Außerdem kann die Expression von CD47 in Tumorzellen durch verschiedene microRNAs

und Enzyme reguliert werden. Ebenso ist es möglich, dass weitere Signalwege, die durch das sT-Ag modifiziert werden (wie z.B. PI3K-Akt), die Expression von CD47 beeinflussen oder dieses epigenetisch, z.B. durch sogenannte Super-Enhancer, reguliert wird [259][261].

Zusammengefasst konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal nachgewiesen werden, dass CD47 an der MCC-Immunantwort beteiligt ist. Da CD47 in einer Vielzahl biologischer Prozesse involviert ist, insbesondere in der Immunevasion und in der Metastasierung, wird die Expression von CD47 vermutlich durch ein Zusammenspiel vieler verschiedener Faktoren bestimmt. Aufzuklären, durch welche Mechanismen MCC-Tumorzellen die Immunantwort umgehen, ist daher essentiell, um neue Therapiemöglichkeiten im Bezug auf die CD47-SIRP $\alpha$ -Achse zu finden.

### 4.6.3 Die Rolle des sT-Antigens in der Immunevasion

Die Immunevasion ist in allen sieben bekannten Tumoviren für die Etablierung der viralen Persistenz, aber auch für die Ausbreitung des Tumors von besonderer Bedeutung. Zu diesem Zweck nutzen Tumoviren spezielle Mechanismen, um der Immunantwort des angeborenen und adaptiven Immunsystems zu entgehen, damit sowohl endogene Tumorzellen als auch exogene Viruspartikel nicht vom Immunsystem beseitigt werden und dauerhaft im Körper bzw. der Zelle verweilen können [265]. Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben konnte in dieser Arbeit erstmals eine Beteiligung des „*don't eat me*“-Signals CD47 in Abhängigkeit des sT-Ags in der MCC-Immunantwort nachgewiesen werden (Abbildung 31). Durch die Expression des sT-Ags kann demnach die Phagozytose von MCC-Tumorzellen verhindert und die Immunantwort des angeborenen Immunsystems umgangen werden. Dies geht einher mit anderen bisher bekannten Mechanismen, die das sT-Ag zur Immunevasion nutzt, welche im Folgenden genauer diskutiert werden.

Neben CD47 scheint in diesem Zusammenhang dem  $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Signalweg eine zentrale Rolle in der Immunevasion zuzukommen. Darauf deutet vor allem die für das MCPyV einzigartige, indirekte Interaktion des sT-Ags mit NEMO via PP4C hin, welche zur Inhibierung des  $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Signalwegs führt [122][188]. Zum einen vermindert diese die Typ-I-Interferon-Antwort sowie die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine – und somit die Aktivierung des Immunsystems – und erhöht zum anderen die Migration durch Destabilisierung des Zytoskeletts und Bildung von Filopodien [190]. Damit einhergehend findet sich im MCC häufig das STING-Protein herunterreguliert, welches ebenfalls in einer Inhibierung des  $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Signalwegs resultiert und somit auch zu einer Verminderung der Typ-I-Interferon-Antwort und Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine beiträgt [115]. Diese Beobachtungen stimmen mit den publizierten Daten anderer Tumoviren, wie KSHV, EBV, HPV, HBV und HCV überein, von denen ebenfalls bekannt ist, dass sie die cGas-STING-Achse auf verschiedene Art und Weise modulieren [265]. Welchen Mechanismus das MCPyV jedoch genau nutzt, um STING herunterzuregulieren, konnte bisher nicht aufgeklärt werden. Darüber hinaus modifizieren die meisten Tumoviren (HCV, HPV, HTLV-1, KSHV, EBV) die Immunantwort über den Interferon- $\alpha/\beta$ -Rezeptor(IFNAR)-Signalweg und Interferon-stimulierte-Gene (ISGs). So konnte beispielsweise für das HPV gezeigt werden, dass das E7-Onkogen den Transkriptionsfaktor

IRF9 bindet und somit die ISGF3-Komplexbildung verhindert [265]. Für das MCPyV ist ein ähnlicher Mechanismus denkbar, da unpublizierte Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass sT-Überexpression in nHDFs dazu führt, dass alle Mitglieder des ISGF3-Komplexes (STAT1, STAT2 und IRF9), sowie eine große Anzahl verschiedener ISGs, auf transkriptioneller Ebene herunterreguliert werden (Denise Ohnezeit, unpubliziert).

Im Gegensatz zu den kutanen Polyomaviren HPV6 und HPV7 konnte für das MCPyV-sT-Ag ebenfalls gezeigt werden, dass es nicht nur den kanonischen NF $\kappa$ B-Signalweg inhibiert, sondern auch mittels seiner LSD-Domäne und epigenetischer Regulation von H3K4me3 über EZH2 den nicht-kanonischen NF $\kappa$ B-Signalweg induziert, um die p53-vermittelte Seneszenz zu umgehen und in einen Seneszenz-assoziierten Phänotyp resultiert [189]. Neben der Förderung entzündlicher Prozesse und Regulation der Immunzellentwicklung steigert die Aktivierung des nicht-kanonischen NF $\kappa$ B-Signalwegs zusätzlich die Zellproliferation sowie das Zellüberleben. Diese beiden Signalwege finden sich gleichermaßen durch andere Tumoviren, wie HTLV-1, EBV und KSHV-1, durch ihre Onkogene strikt reguliert [189]. Auf diese Weise unterstreicht die bedeutende Funktion des sT-Ags in der Aktivierung des kanonischen und nicht-kanonischen NF $\kappa$ B-Signalwegs die besondere Rolle des sT-Ags in der Immunevasion.

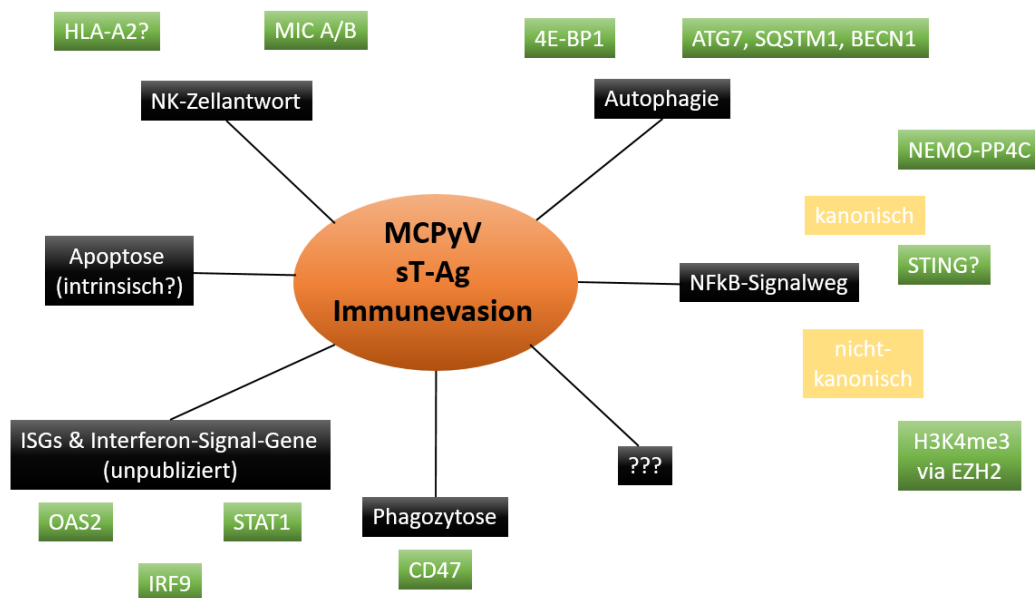
Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass das sT-Ag den Akt-mTor-Signalweg moduliert, indem es die Dephosphorylierung von 4E-BP1 blockiert und somit zu einer Deregulation der Cap-abhängigen Translation führt [125]. Einerseits unterstützt dies die zelluläre Transformation, inhibiert andererseits jedoch auch die Autophagie zum Abbau beschädigter Zellstrukturen. Gleichermaßen fördert die Expression der MCPyV-T-Ag die Induktion der Wirts-microRNAs miR-375, miR-30a-3p und miR-30a-5p, welche die Autophagie-Gene ATG7, SQSTM1 und BECN1 im MCC herunterregulieren, und auf diese Weise das Überleben von Tumorzellen fördern [124]. Damit einhergehend reguliert die MCV-miR-M1-5p das AMBRA1-Gen [154], einen entscheidenden Faktor für Autophagie und Zelltod, durch welchen Autophagie mit Zellproliferation und Tumorgenese u.a. durch die Stabilisierung von c-Myc über PP2A [185] und Fbw7 [182] miteinander verknüpft werden könnte [266][267]. Auch in KSHV, EBV, HBV, HCV und HPV konnte eine Inhibierung der Autophagie beobachtet werden, weshalb diese ebenfalls eine Schlüsselrolle für die Ausbildung von Tumoren durch Onkoviren darstellt [267].



Einen weiteren klassischen Mechanismus zur Immunevasion in Tumorzellen stellt das Herunterregulieren von MHC-Klasse I Rezeptoren auf der Zelloberfläche dar, um die Erkennung und Eliminierung durch  $CD8^+$  T-Zellen zu verhindern (HTLV-1, KSHV, HBV, HCV)[265]. Auffällig ist, dass sowohl in MCPyV-positiven als auch MCPyV-negativen MCC alle HLA-Allele herunterreguliert zu finden sind [108]. Interessanterweise wird auf der Zelloberfläche von WaGa-Zellen ebenfalls die Expression von HLA-A2 durch das sT-Ag herunterreguliert (Abbildung 25), der genaue Mechanismus wurde jedoch nicht weiter adressiert. Da der Verlust eines speziellen  $CD8^+$  T-Zellen erkennenden HLA-Allels in Verbindung mit dem Auftreten von Chemoresistenz gegenüber zellulären Immuntherapien steht [109], könnte das sT-Ag auch hier von Bedeutung sein. Gleichermaßen finden sich MIC A/B, welche für die Erkennung durch NK-Zellen mittels ihres NKG2D-Rezeptors essentiell sind, nur in wenigen MCC-Tumoren und in MCC-Zelllinien überhaupt nicht exprimiert [116]. Hier ist es denkbar, dass zusätzlich zur Regulation durch epigenetische Mechanismen, MIC A/B auf der Zelloberfläche durch die Sheddase ADAM10 reguliert werden. Einerseits induziert das sT-Ag die Expression von ADAM10 (Abbildung 25, [192]), andererseits wird unter hypoxischen Bedingungen durch HIF1 $\alpha$  die Expression von ADAM10 auf der Zelloberfläche erhöht, was die vermehrte Abspaltung von MIC A/B in seine lösliche Form zur Folge haben könnte [268]. Somit können NKG2D-Rezeptoren kein MIC A/B auf der Zelloberfläche erkennen und werden abgebaut, wodurch die Tumorzellen der Beseitigung durch NK-Zellen entfliehen können. Ein ähnlicher Mechanismus, der durch ULB3 reguliert wird, konnte ebenfalls für die Polyomaviren SV40, JC und BK Virus beschrieben werden [116].

Obwohl in dieser Arbeit nicht bestätigt werden konnte, dass das sT-Ag durch Herunterregulieren von CD95 die Apoptose inhibiert (Abbildung 30), sondern Apoptose vermutlich über einen intrinsischen Mechanismus induziert wird, ist es wahrscheinlich, dass CD95 durch verschiedene Mechanismen die Zellproliferation, -migration und -invasion fördert (Abschnitt 4.6.1). Darüber hinaus gibt es vermutlich einige weitere Rezeptoren, die durch das sT-Ag auf der Zelloberfläche verändert werden und nicht im Screening untersucht wurden. Ein Beispiel stellt der CLA-Rezeptor dar, welcher in einigen MCCs komplett fehlt und zu einer schlechteren Immunantwort durch eine geringere Anzahl an Tumor-infiltrierenden T-Zellen führt [107]. Wie der CLA-Rezeptor jedoch reguliert wird ist bisher nicht bekannt.

Fest steht, dass die Immunantwort im MCC sehr komplex ist und auf viele verschiedene Art und Weisen unterdrückt wird. Zwar sind ebenfalls einige wenige Studien über die Funktion des LT-Ags, wie das Herunterregulieren des TLR9 [121], und der microRNA, welche die Expression von CXCL-8 durch Interaktion mit SP100 erhöht [126], in der Immunevasion bekannt, jedoch scheint diese im MCC hauptsächlich durch das sT-Ag vermittelt zu werden. Demzufolge konnte bisher nachgewiesen werden, dass das sT-Ag die Immunantwort durch Modulation des NF $\kappa$ B-Signalwegs, NK-Zelliganden, Autophagie und in dieser Arbeit durch das „*don't eat me*“-Signals CD47 umgeht (Abbildung 33). Da angeborene und adaptive Immunantwort Hand in Hand arbeiten, wirkt sich die sT-vermittelte Modulation des angeborenen Immunsystems dementsprechend vermutlich ebenfalls auf die adaptive Immunantwort aus. Damit legt die Expression des sT-Ags und die damit verbundene Umgehung der Immunantwort höchstwahrscheinlich auch einen Grundstein für die Akkumulation von Tumorzellen und die nachfolgende Metastasierung des MCCs.



**Abbildung 33** Übersicht über die Rolle des sT-Antigens in der Immunevasion. Das MCPyV-sT-Ag reguliert nachweislich verschiedene Mechanismen, wie die NK-Zellantwort, die Autophagie und den NF $\kappa$ B-Signalweg, die zur Umgehung der Immunantwort beitragen. Gleichmaßen verhindert das sT-Ag möglicherweise Apoptose über den intrinsischen Signalweg und verhindert die Phagozytose über das „*don't eat me*“-Signals CD47 (diese Arbeit). Auch unpublizierte Daten unserer Arbeitsgruppe deuten auf eine transkriptionelle Regulation von verschiedenen ISGs und Interferon-Signal-Genen durch das sT-Ag hin (Denise Ohnzeit, unpubliziert).

## 5 Fazit & Ausblick

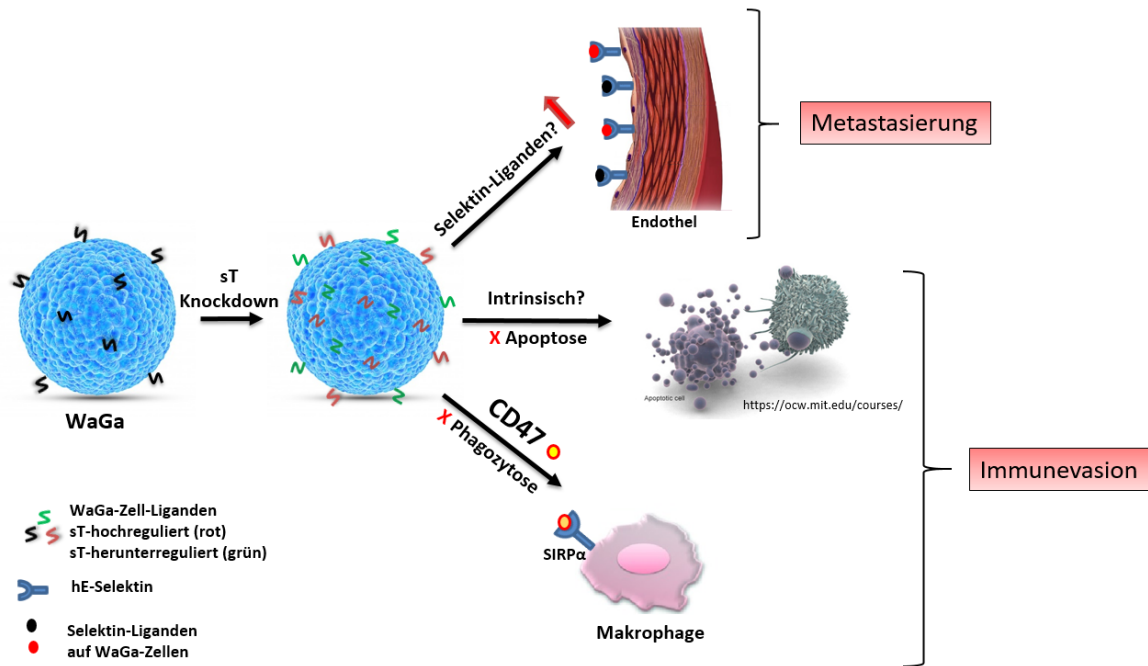
Da zahlreiche Studien auf eine essentielle Beteiligung des sT-Ags an der Tumorprogression hindeuten, wurde in dieser Arbeit die Rolle des sT-Ags in der Metastasierung untersucht. Dazu wurde aufgrund von Limitierungen in Tiermodellen und in *in-vitro*-Transformationsassays, *in-vitro*-Experimente ausgewählt, die auf der Manipulation einer MCPyV-positiven MCC-Zelllinie beruhen, die aus einem Patienten isoliert wurde. So konnte im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich ein Dox-induzierbares shRNA-Knockdown-System für die T-Ag in WaGa-Zellen etabliert werden, mit welchem die Rolle des sT-Ags in der Metastasierung des MCCs analysiert wurde.

Zu diesem Zweck wurde in dieser Arbeit zum einen die Interaktion des sT-Ags mit der Tumormikroumgebung untersucht. Um dies zu adressieren, wurde das Adhäsionsverhalten von verschiedenen MCC-Zelllinien an das Endothel untersucht, welches durch Selektine vermittelt wird und einen der ersten und essentiellen Schritte im Metastasierungsprozess darstellt. Auf diese Weise konnte erstmalig nachgewiesen werden, dass alle untersuchten MCC-Zelllinien unter dynamischen Bedingungen vorwiegend mit dem humanen E-Selektin, aber in geringerem Ausmaß auch mit den murinen E- und P-Selektinen, interagieren. Dabei deutet die Tatsache, dass WaGa-Zellen – im Gegensatz zur Bindung am humanen P-Selektin – nur unter dynamischen Bedingungen an das humane E-Selektin binden, darauf hin, dass sogenannte „*catch-bonds*“ eine wichtige Rolle in der Adhäsion spielen. Zudem binden die MCC-Zelllinien vermutlich über unterschiedliche Liganden an E- und P-Selektine und es bestehen vermutlich artspezifische Unterschiede bei den Liganden. Mit Hilfe des konditionellen shRNA-Knockdownsystems konnte außerdem gezeigt werden, dass die Adhäsion von WaGa-Zellen an das humane E-Selektin in Abhängigkeit des sT-Ags erfolgt. Weitere Experimente konnten zeigen, dass diese Bindung unabhängig von CD44, einem der häufigsten Liganden des humanen E-Selektins, stattfindet. Obwohl zahlreiche Studien bereits einen Einfluss des sT-Ags auf die Zellinvasion belegen konnten, konnte mit dem in dieser Arbeit verwendeten konditionellen shRNA-Knockdown-System hingegen kein Effekt der T-Ag auf die Zellinvasion von WaGa-Zellen beobachtet werden.

Zum anderen wurden außerdem molekulare Mechanismen untersucht, um zu verstehen, wie das sT-Ag die Adhäsion der Tumorzellen beeinflusst. So konnte mittels Transkriptomanalyse

einerseits bestätigt werden, dass das sT-Ag essentielle Prozesse der Metastasierung (z.B. die Zellproliferation, -migration, -invasion und Organisation/Struktur der ECM) transkriptionell reguliert, und andererseits konnte beobachtet werden, dass das sT-Ag ebenfalls Gene transkriptionell reguliert, welche in der Bindung und Prozessierung von Selektin-Liganden relevant sein könnten. Um im Folgenden genauer zu adressieren, welche Veränderungen das sT-Ag auf der Zelloberfläche induziert, wurde ein Screening der WaGa-Zelloberfläche durchgeführt. Auf diese Weise konnte insgesamt die Expression von 90 der 371 analysierten Oberflächenmarker nachgewiesen werden, von denen 20 hoch- und 54 durch das sT-Ag herunterreguliert werden. Nach Bestätigung der Ergebnisse für einige ausgewählte Oberflächenmoleküle, wurden CD95 und CD47 für weitere funktionelle Untersuchungen ausgewählt.

Übereinstimmend mit MTT-Assays und Wachstumskurven dieser Arbeit, konnte gezeigt werden, dass die Expression des sT-Ags die Apoptose verhindert. Nichtsdestotrotz scheint die Induktion der Apoptose in Abwesenheit der T-Ag in MCC-Zelllinien unabhängig vom CD95-Rezeptor zu geschehen, welcher durch das sT-Ag auf der WaGa-Zelloberfläche herunterreguliert wird, sodass die Apoptose vermutlich über intrinsische Mechanismen induziert wird. Des Weiteren konnte, obwohl CD47-Inhibitoren bereits vielversprechend in der Behandlung von anderen soliden Tumoren und auch des MCCs sind, in dieser Arbeit erstmalig eine Beteiligung des „*don't eat me*“-Signals CD47 in der MCC-Immunantwort *in-vitro* nachgewiesen werden. So konnte durch *in-vitro*-Phagozytose-Assays gezeigt werden, dass die Expression des sT-Ags die Phagozytose primärer humaner Makrophagen inhibiert und der Knockdown des sT-Ags in WaGa-Zellen zu einer erhöhten Phagozytose-Aktivität führt. Dieser Effekt konnte mittels CD47-siRNA-Knockdown und durch einen CD47-blockierenden therapeutischen Antikörper (B6.H12.2) auf CD47 spezifiziert werden, welches (teilweise) transkriptionell auf der WaGa-Zelloberfläche durch das sT-Ag hochreguliert wird. Abbildung 34 fasst die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit zusammen.



**Abbildung 34** Übersicht über die Ergebnisse dieser Arbeit und die Rolle des MCPyV-sT-Antigens in der Metastasierung. Das sT-Ag verändert die Expression von Oberflächenmolekülen auf MCPyV-positiven WaGa-Zellen und trägt auf verschiedene Art und Weisen zur Metastasierung bei. Zum einen vermittelt das sT-Ag die Bindung an das humane E-Selektin, welches auf dem Endothel exprimiert wird und begünstigt somit die Metastasierung. Durch welche Liganden WaGa-Zellen an das humane E-Selektin binden, bleibt jedoch noch unklar. Zum anderen verhindert das sT-Ag die Apoptose vermutlich über einen intrinsischen Mechanismus und verhindert die Phagozytose von MCC-Zellen durch Makrophagen via CD47 und trägt auf diese Weise zur Immunevasion bei. Dabei treibt die daraus resultierende Akkumulation von Tumorzellen vermutlich ebenfalls die Metastasierung voran. hE-Selektin: humanes E-Selektin.

Trotz der vielen Vorteile des etablierten konditionellen shRNA-Knockdown-Systems gegenüber anderen Expressionssystemen (z.B. Überexpression, getagtes sT-Ag, andere Zelllinien), eignet sich dieses System jedoch vermutlich nicht optimal, um den Einfluss des sT-Ags in der Metastasierung zu untersuchen. So zeigt sich im Zellinvasions-Assay, der Transkriptomanalyse und dem Zelloberflächen-Screening, dass vermutlich die Effizienz des sT-Knockdowns zu gering ist, um einen ausgeprägteren Effekt, wie z.B. durch Überexpressions-Experimente, festzustellen. Um die Funktion des sT-Ag unter physiologischen Bedingungen zu analysieren, würde sich daher möglicherweise ein konditionelles Degron-System, durch welches die T-Ag spezifisch abgebaut werden, oder eventuell auch eine permanente sT-Ag-Knockout-Zelllinien mittels CRISPR-Cas9-Technologie besser eignen, um eine optimale Effizienz des sT-Ag-Knockdowns zu erreichen. Problematisch bleibt jedoch ohnehin, die Anwendung dieser Systeme für Langzeit-Experimente, da die MCC-Zelllinien die Expression der T-Ag zum Überleben benötigen und der T-Ag-Knockdown die Zellen in Apoptose führt. Das Fehlen

eines geeigneten Transformationsmodells ist somit weiterhin eine Herausforderung, um die Tumorgenese und Metastasierung des MCCs besser zu erforschen.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass das sT-Ag einen initialen Schritt der Metastasierung, die Adhäsion von WaGa-Zellen an das humane E-Selektin, vermittelt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das MCPyV-sT-Ag das „*don't eat me*“-Signal CD47 auf der Zelloberfläche nutzt, um die Immunantwort des Wirts zu umgehen. Die daraus resultierende Akkumulation von Tumorzellen könnte ebenfalls die Metastasierung vorantreiben. Die Ergebnisse dieser Arbeit untermauern somit, übereinstimmend mit anderen publizierten Daten, die besondere Rolle des sT-Ags in der Metastasierung.

Auf diesen Ergebnissen aufbauend, sind zukünftige Untersuchungen in *in-vivo*-Modellen mit SIRP $\alpha$ - oder E-Selektin-Knockout-Mäusen interessant, um sowohl das E-Selektin als auch CD47 in der Metastasierung und Immunantwort als mögliche therapeutische Zielmoleküle im MCC weiter zu charakterisieren. Außerdem konnten durch das WaGa-Zelloberflächen-Screening neben CD95 und CD47 noch einige weitere vielversprechende Moleküle, die sowohl in der Metastasierung, wie z.B. die Tetraspanine CD9, CD63, CD81, CD82 und CD151, als auch in der Immunevasion, wie z.B. HLA-A2 und CD134 (Ox-40), von entscheidender Bedeutung sein könnten, identifiziert werden. Für diese gilt es zukünftig die funktionellen Konsequenzen der Regulation durch das sT-Ag zu analysieren. Ebenso bleibt zu adressieren, durch welche Liganden die MCC-Zelllinien an die verschiedenen Selektine binden und aufzuschlüsseln, durch welche Mechanismen das sT-Ag diese Moleküle auf der Zelloberfläche reguliert, um diese als potentielle Zielmoleküle für neue MCC-Therapien testen zu können.

**Literaturverzeichnis**

1. Imperiale, M. J. & Major, E. D. *Fields Virology, 7th Edition* Kap. 61 Polyomaviruses (Lippincott Willinams et Wilkins, 2013).
2. Gross, L. A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **83**, 414–421 (1953).
3. Stewart, S. E., Eddy, B. E. & Borgese, N. Neoplasms in mice inoculated with a tumor agent carried in tissue culture. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **20**, 1223–1243 (1958).
4. Sweet, B. H. & Hilleman, M. R. The vacuolating virus, SV 40. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **105**, 420–427 (1960).
5. Mortimer Jr, E. A., Lepow, M. L., Gold, E., Robbins, F. C., Burton, G. J. & Fraumeni Jr, J. F. Long-term follow-up of persons inadvertently inoculated with SV40 as neonates. *New England Journal of Medicine* **305**, 1517–1518 (1981).
6. Engels, E. A., Rodman, L. H., Frisch, M., Goedert, J. J. & Biggar, R. J. Childhood exposure to simian virus 40-contaminated poliovirus vaccine and risk of AIDS-associated non-Hodgkin's lymphoma. *International Journal of Cancer* **106**, 283–287 (2003).
7. Engels, E. A., Katki, H. A., Nielsen, N. M., Winther, J. F., Hjalgrim, H., Gjerris, F., Rosenberg, P. S. & Frisch, M. Cancer incidence in Denmark following exposure to poliovirus vaccine contaminated with simian virus 40. *Journal of the National Cancer Institute* **95**, 532–539 (2003).
8. Padgett, B., Zurhein, G., Walker, D., Eckroade, R. & Dessel, B. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *The Lancet* **297**, 1257–1260 (1971).
9. Gardner, S., Field, A., Coleman, D. & Hulme, B. New human papovavirus (BK) isolated from urine after renal transplantation. *The Lancet* **297**, 1253–1257 (1971).
10. Schowalter, R. M., Pastrana, D. V., Pumphrey, K. A., Moyer, A. L. & Buck, C. B. Merkel cell polyomavirus and two previously unknown polyomaviruses are chronically shed from human skin. *Cell host & microbe* **7**, 509–515 (2010).

11. Scuda, N., Hofmann, J., Calvignac-Spencer, S., Ruprecht, K., Liman, P., Kühn, J., Hengel, H. & Ehlers, B. A novel human polyomavirus closely related to the african green monkey-derived lymphotropic polyomavirus. *Journal of virology* **85**, 4586–4590 (2011).
12. Buck, C. B., Phan, G. Q., Raiji, M. T., Murphy, P. M., McDermott, D. H. & McBride, A. A. *Complete genome sequence of a tenth human polyomavirus* 2012.
13. Korup, S., Rietscher, J., Calvignac-Spencer, S., Trusch, F., Hofmann, J., Moens, U., Sauer, I., Voigt, S., Schmuck, R. & Ehlers, B. Identification of a novel human polyomavirus in organs of the gastrointestinal tract. *PloS one* **8**, e58021 (2013).
14. Allander, T., Andreasson, K., Gupta, S., Bjerkner, A., Bogdanovic, G., Persson, M. A., Dalianis, T., Ramqvist, T. & Andersson, B. Identification of a third human polyomavirus. *Journal of virology* **81**, 4130–4136 (2007).
15. Gaynor, A. M., Nissen, M. D., Whiley, D. M., Mackay, I. M., Lambert, S. B., Wu, G., Brennan, D. C., Storch, G. A., Sloots, T. P. & Wang, D. Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PLoS pathogens* **3**, e64 (2007).
16. Siebrasse, E. A., Reyes, A., Lim, E. S., Zhao, G., Mkakosya, R. S., Manary, M. J., Gordon, J. I. & Wang, D. Identification of MW polyomavirus, a novel polyomavirus in human stool. *Journal of virology* **86**, 10321–10326 (2012).
17. Lim, E. S., Reyes, A., Antonio, M., Saha, D., Ikumapayi, U. N., Adeyemi, M., Stine, O. C., Skelton, R., Brennan, D. C., Mkakosya, R. S. *et al.* Discovery of STL polyomavirus, a polyomavirus of ancestral recombinant origin that encodes a unique T antigen by alternative splicing. *Virology* **436**, 295–303 (2013).
18. Mishra, N., Pereira, M., Rhodes, R. H., An, P., Pipas, J. M., Jain, K., Kapoor, A., Briese, T., Faust, P. L. & Lipkin, W. I. Identification of a novel polyomavirus in a pancreatic transplant recipient with retinal blindness and vasculitic myopathy. *The Journal of infectious diseases* **210**, 1595–1599 (2014).
19. Van der Meijden, E., Janssens, R. W., Lauber, C., Bavinck, J. N. B., Gorbalenya, A. E. & Feltkamp, M. C. Discovery of a new human polyomavirus associated with



- trichodysplasia spinulosa in an immunocompromized patient. *PLoS Pathogens* **6**, e1001024 (2010).
20. Feng, H., Shuda, M., Chang, Y. & Moore, P. S. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science* **319**, 1096–1100 (2008).
  21. Grundhoff, A. & Fischer, N. Merkel cell polyomavirus, a highly prevalent virus with tumorigenic potential. *Current opinion in virology* **14**, 129–137 (2015).
  22. Cruz Jr, F. N. D., Giannitti, F., Li, L., Woods, L. W., Del Valle, L., Delwart, E. & Pesavento, P. A. Novel polyomavirus associated with brain tumors in free-ranging raccoons, western United States. *Emerging infectious diseases* **19**, 77 (2013).
  23. Hatakeyama, M. Malignant Helicobacter pylori-associated diseases: gastric cancer and MALT lymphoma. *Helicobacter pylori in Human Diseases*, 135–149 (2019).
  24. Luo, G. G. & Ou, J.-h. J. Oncogenic viruses and cancer. *Virologica Sinica* (2015).
  25. Chang, Y. & Moore, P. S. Merkel cell carcinoma: a virus-induced human cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* **7**, 123–144 (2012).
  26. Hughes, M. P., Hardee, M. E., Cornelius, L. A., Hutchins, L. F., Becker, J. C. & Gao, L. Merkel cell carcinoma: epidemiology, target, and therapy. *Current dermatology reports* **3**, 46–53 (2014).
  27. *Website der Skin Cancer Foundation (Dez. 2020: <https://www.skincancer.org/skin-cancer-information/merkel-cell-carcinoma/mcc-warning-signs/>).*
  28. Harms, P. W., Vats, P., Verhaegen, M. E., Robinson, D. R., Wu, Y.-M., Dhanasekaran, S. M., Palanisamy, N., Siddiqui, J., Cao, X., Su, F. *et al.* The distinctive mutational spectra of polyomavirus-negative Merkel cell carcinoma. *Cancer research* **75**, 3720–3727 (2015).
  29. Samimi, M. Immune checkpoint inhibitors and beyond: an overview of immune-based therapies in merkel cell carcinoma. *American Journal of Clinical Dermatology* **20**, 391–407 (2019).
  30. Harms, K. L., Healy, M. A., Nghiem, P., Sober, A. J., Johnson, T. M., Bichakjian, C. K. & Wong, S. L. Analysis of prognostic factors from 9387 Merkel cell carcinoma cases forms the basis for the new 8th edition AJCC staging system. *Annals of surgical oncology* **23**, 3564–3571 (2016).

31. Grandhaye, M., Teixeira, P. G., Henrot, P., Morel, O., Sirveaux, F., Verhaeghe, J.-L. & Blum, A. Focus on Merkel cell carcinoma: diagnosis and staging. *Skeletal Radiology* **44**, 777–786 (2015).
32. Xia, Y.-J., Cao, D.-S., Zhao, J., Zhu, B.-Z. & Xie, J. Frequency and prognosis of metastasis to liver, lung, bone and brain from Merkel cell carcinoma. *Future Oncology* **16**, 1101–1113 (2020).
33. Eisemann, N., Jansen, L., Castro, F., Chen, T., Eberle, A., Nennecke, A., Zeissig, S., Brenner, H., Katalinic, A. & Group, G. C. S. W. Survival with nonmelanoma skin cancer in Germany. *British Journal of Dermatology* **174**, 778–785 (2016).
34. Becker, J. C., Stang, A., zur Hausen, A., Fischer, N., DeCaprio, J. A., Tothill, R. W., Lyngaa, R., Hansen, U. K., Ritter, C., Nghiem, P. *et al.* Epidemiology, biology and therapy of Merkel cell carcinoma: conclusions from the EU project IMMOMECC. *Cancer Immunology, Immunotherapy* **67**, 341–351 (2018).
35. Ring, A., Smith, I. E. & Dowsett, M. Circulating tumour cells in breast cancer. *The lancet oncology* **5**, 79–88 (2004).
36. Wu, C., Lin, S., Hsieh, J., Chen, F., Lu, C., Yu, F., Cheng, T., Huang, T., Huang, S. & Wang, J. Molecular detection of disseminated tumor cells in the peripheral blood of patients with gastric cancer: evaluation of their prognostic significance. *Disease markers* **22**, 103–109 (2006).
37. Gröbe, A., Blessmann, M., Hanken, H., Friedrich, R. E., Schön, G., Wikner, J., Effenberger, K. E., Kluwe, L., Heiland, M., Pantel, K. *et al.* Prognostic relevance of circulating tumor cells in blood and disseminated tumor cells in bone marrow of patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Clinical Cancer Research* **20**, 425–433 (2014).
38. Blom, A., Bhatia, S., Pietromonaco, S., Koehler, K., Iyer, J. G., Nagase, K., Paulson, K., Sabath, D. E. & Nghiem, P. Clinical utility of a circulating tumor cell assay in Merkel cell carcinoma. *Journal of the American Academy of Dermatology* **70**, 449–455 (2014).
39. Knips, J., Czech-Sioli, M., Spohn, M., Heiland, M., Moll, I., Grundhoff, A., Schumacher, U. & Fischer, N. Spontaneous lung metastasis formation of human Merkel cell carcinoma

- cell lines transplanted into scid mice. *International Journal of Cancer* **141**, 160–171 (2017).
40. Gaiser, M. R., Daily, K., Hoffmann, J., Brune, M., Enk, A. & Brownell, I. Evaluating blood levels of neuron specific enolase, chromogranin A, and circulating tumor cells as Merkel cell carcinoma biomarkers. *Oncotarget* **6**, 26472 (2015).
41. Koljonen, V., Jahkola, T., Tukiainen, E., Granroth, G., Haglund, C. & Böhling, T. Tenascin-C in primary Merkel cell carcinoma. *Journal of clinical pathology* **58**, 297–300 (2005).
42. Koljonen, V., Böhling, T., Tukiainen, E., Haglund, C. & Jahkola, T. Tenascin-C expression in Merkel cell carcinoma lymph node metastasis. *Apmis* **114**, 39–42 (2006).
43. Fochtman-Frana, A., Haymerle, G., Schachner, H., Pammer, J., Loewe, R., Kerjaschki, D., Perisanidis, C. & Erovic, B. M. Expression of 15-lipoxygenase-1 in Merkel cell carcinoma is linked to advanced disease. *Clinical Otolaryngology* **43**, 1335–1344 (2018).
44. Al-Rohil, R. N., Milton, D. R., Nagarajan, P., Curry, J. L., Feldmeyer, L., Torres-Cabala, C. A., Ivan, D., Prieto, V. G., Tetzlaff, M. T. & Aung, P. P. Intratumoral and peritumoral lymphovascular invasion detected by D2-40 immunohistochemistry correlates with metastasis in primary cutaneous Merkel cell carcinoma. *Human pathology* **77**, 98–107 (2018).
45. Swick, B. L., Srikantha, R. & Messingham, K. N. Specific analysis of KIT and PDGFR-alpha expression and mutational status in Merkel cell carcinoma. *Journal of cutaneous pathology* **40**, 623–630 (2013).
46. Andea, A. A., Patel, R., Ponnazhagan, S., Kumar, S., DeVilliers, P., Jhala, D., Eltoun, I. E. & Siegal, G. P. Merkel cell carcinoma: correlation of KIT expression with survival and evaluation of KIT gene mutational status. *Human pathology* **41**, 1405–1412 (2010).
47. Nardi, V., Song, Y., Santamaria-Barria, J. A., Cospes, A. K., Lam, Q., Faber, A. C., Boland, G. M., Yeap, B. Y., Bergethon, K., Scialabba, V. L. *et al.* Activation of PI3K signaling in Merkel cell carcinoma. *Clinical Cancer Research* **18**, 1227–1236 (2012).
48. Schadendorf, D., Lebbé, C., Zur Hausen, A., Avril, M.-F., Hariharan, S., Bharmal, M. & Becker, J. C. Merkel cell carcinoma: epidemiology, prognosis, therapy and unmet medical needs. *European Journal of Cancer* **71**, 53–69 (2017).

49. Wardhani, L. O., Matsushita, M., Kuwamoto, S., Nonaka, D., Nagata, K., Kato, M., Kitamura, Y. & Hayashi, K. Expression of Notch 3 and Jagged 1 is associated with merkel cell polyomavirus status and prognosis in merkel cell carcinoma. *Anticancer research* **39**, 319–329 (2019).
50. Fujimura, T., Furudate, S., Kambayahsi, Y., Kakizaki, A., Yamamoto, Y., Okuhira, H., Fujimoto, N. & Aiba, S. Phospho-STAT5B expression is a prognostic marker for Merkel cell carcinoma. *Anticancer research* **37**, 2335–2341 (2017).
51. Nakamura, M., Magara, T., Nojiri, Y., Nishihara, H., Kato, H., Teramoto, Y., Yasuda, M., Wada, H., Ozawa, T., Umemori, Y. *et al.* Increased programmed death ligand-1 expression in metastatic Merkel cell carcinoma associates with better prognosis. *Journal of dermatological science* **97**, 165–167 (2020).
52. Fan, K., Ritter, C., Nghiem, P., Blom, A., Verhaegen, M. E., Dlugosz, A., Ødum, N., Woetmann, A., Tothill, R. W., Hicks, R. J. *et al.* Circulating cell-free miR-375 as surrogate marker of tumor burden in Merkel cell carcinoma. *Clinical Cancer Research* **24**, 5873–5882 (2018).
53. Van Veenendaal, L. M., Bertolli, E., Korse, C. M., Klop, W. M. C., Tesselaar, M. E. & van Akkooi, A. C. The Clinical Utility of Neuron-Specific Enolase (NSE) Serum Levels as a Biomarker for Merkel Cell Carcinoma (MCC). *Annals of Surgical Oncology*, 1–10 (2020).
54. Shuda, M., Arora, R., Kwun, H. J., Feng, H., Sarid, R., Fernández-Figueras, M.-T., Tolstov, Y., Gjoerup, O., Mansukhani, M. M., Swerdlow, S. H. *et al.* Human Merkel cell polyomavirus infection I. MCV T antigen expression in Merkel cell carcinoma, lymphoid tissues and lymphoid tumors. *International Journal of Cancer* **125**, 1243–1249 (2009).
55. Fischer, N., Brandner, J., Fuchs, F., Moll, I. & Grundhoff, A. Detection of Merkel cell polyomavirus (MCPyV) in Merkel cell carcinoma cell lines: cell morphology and growth phenotype do not reflect presence of the virus. *International Journal of Cancer* **126**, 2133–2142 (2010).
56. Kassem, A., Schöpflin, A., Diaz, C., Weyers, W., Stickeler, E., Werner, M. & zur Hausen, A. Frequent detection of Merkel cell polyomavirus in human Merkel cell carcinomas

- and identification of a unique deletion in the VP1 gene. *Cancer research* **68**, 5009–5013 (2008).
57. Feng, H., Kwun, H. J., Liu, X., Gjoerup, O., Stolz, D. B., Chang, Y. & Moore, P. S. Cellular and viral factors regulating Merkel cell polyomavirus replication. *PLoS one* **6**, e22468 (2011).
58. Wong, S. Q., Waldeck, K., Vergara, I. A., Schröder, J., Madore, J., Wilmott, J. S., Colebatch, A. J., De Paoli-Iseppi, R., Li, J., Lupat, R. *et al.* UV-associated mutations underlie the etiology of MCV-negative Merkel cell carcinomas. *Cancer research* **75**, 5228–5234 (2015).
59. Goh, G., Walradt, T., Markarov, V., Blom, A., Riaz, N., Doumani, R., Stafstrom, K., Moshiri, A., Yelistratova, L., Levinsohn, J. *et al.* Mutational landscape of MCPyV-positive and MCPyV-negative Merkel cell carcinomas with implications for immunotherapy. *Oncotarget* **7**, 3403 (2016).
60. Del Carmen González-Vela, M., Curiel-Olmo, S., Derdak, S., Beltran, S., Santibañez, M., Martíñez, N., Castillo-Trujillo, A., Gut, M., Sánchez-Pacheco, R., Almaraz, C. *et al.* Shared oncogenic pathways implicated in both virus-positive and UV-induced Merkel cell carcinomas. *Journal of Investigative Dermatology* **137**, 197–206 (2017).
61. Cimino, P. J., Robirds, D. H., Tripp, S. R., Pfeifer, J. D., Abel, H. J. & Duncavage, E. J. Retinoblastoma gene mutations detected by whole exome sequencing of Merkel cell carcinoma. *Modern pathology* **27**, 1073–1087 (2014).
62. Erstad, D. J. & Cusack, J. C. Mutational analysis of Merkel cell carcinoma. *Cancers* **6**, 2116–2136 (2014).
63. Harms, P. W., Collie, A. M., Hovelson, D. H., Cani, A. K., Verhaegen, M. E., Patel, R. M., Fullen, D. R., Omata, K., Dlugosz, A. A., Tomlins, S. A. *et al.* Next generation sequencing of Cytokeratin 20-negative Merkel cell carcinoma reveals ultraviolet-signature mutations and recurrent TP53 and RB1 inactivation. *Modern Pathology* **29**, 240–248 (2016).
64. Veija, T., Sarhadi, V. K., Koljonen, V., Bohling, T. & Knuutila, S. Hotspot mutations in polyomavirus positive and negative Merkel cell carcinomas. *Cancer genetics* **209**, 30–35 (2016).

65. Sahi, H., Savola, S., Sihto, H., Koljonen, V., Bohling, T. & Knuutila, S. RB1 gene in Merkel cell carcinoma: hypermethylation in all tumors and concurrent heterozygous deletions in the polyomavirus-negative subgroup. *Apmis* **122**, 1157–1166 (2014).
66. Youlden, D. R., Soyer, H. P., Youl, P. H., Fritschi, L. & Baade, P. D. Incidence and survival for Merkel cell carcinoma in Queensland, Australia, 1993-2010. *JAMA dermatology* **150**, 864–872 (2014).
67. Paulson, K. G., Park, S. Y., Vandeven, N. A., Lachance, K., Thomas, H., Chapuis, A. G., Harms, K. L., Thompson, J. A., Bhatia, S., Stang, A. *et al.* Merkel cell carcinoma: current US incidence and projected increases based on changing demographics. *Journal of the American Academy of Dermatology* **78**, 457–463 (2018).
68. Garneski, K. M., Warcola, A. H., Feng, Q., Kiviat, N., Leonard, J. H. & Nghiem, P. Merkel cell polyomavirus is more frequently present in North American than Australian Merkel cell carcinoma tumors. *The Journal of Investigative Dermatology* **129**, 246 (2009).
69. Fondain, M., Dereure, O., Uhry, Z., Guizard, A., Woronoff, A., Colonna, M., Molinie, F., Bara, S., Velten, M., Marrer, E. *et al.* Merkel cell carcinoma in France: a registries-based, comprehensive epidemiological survey. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* **32**, 1292–1296 (2018).
70. Becker, J. C., Stang, A., DeCaprio, J. A., Cerroni, L., Lebbé, C., Veness, M. & Nghiem, P. Merkel cell carcinoma. *Nature reviews Disease primers* **3**, 1–17 (2017).
71. Tilling, T. & Moll, I. Which are the cells of origin in merkel cell carcinoma? *Journal of skin cancer* (2012).
72. Tilling, T., Wladykowski, E., Failla, A. V., Houdek, P., Brandner, J. M. & Moll, I. Immunohistochemical analyses point to epidermal origin of human Merkel cells. *Histochemistry and cell biology* **141**, 407–421 (2014).
73. Sunshine, J., Jahchan, N., Sage, J. & Choi, J. Are there multiple cells of origin of Merkel cell carcinoma? *Oncogene* **37**, 1409–1416 (2018).
74. Liu, W., Yang, R., Payne, A. S., Schowalter, R. M., Spurgeon, M. E., Lambert, P. F., Xu, X., Buck, C. B. & You, J. Identifying the target cells and mechanisms of Merkel cell polyomavirus infection. *Cell host & microbe* **19**, 775–787 (2016).

- 
75. Theiß, J. *Characterization of the Merkel cell polyomavirus encoded miRNA mcv-miR-M1* Diss. (Universität Hamburg, 2015).
76. Czech-Sioli, M., Günther, T., Therre, M., Spohn, M., Indenbirken, D., Theiss, J., Riethdorf, S., Qi, M., Alawi, M., Wülbeck, C. *et al.* High-resolution analysis of Merkel Cell Polyomavirus in Merkel Cell Carcinoma reveals distinct integration patterns and suggests NHEJ and MMBIR as underlying mechanisms. *bioRxiv* (2020).
77. Rodig, S. J., Cheng, J., Wardzala, J., DoRosario, A., Scanlon, J. J., Laga, A. C., Martinez-Fernandez, A., Barletta, J. A., Bellizzi, A. M., Sadasivam, S. *et al.* Improved detection suggests all Merkel cell carcinomas harbor Merkel polyomavirus. *The Journal of clinical investigation* **122**, 4645–4653 (2012).
78. Becker, J. C. MC polyomavirus is frequently present in Merkel cell carcinoma of European patients. *Journal of Investigative Dermatology* **129**, 248–250 (2009).
79. Busam, K. J., Jungbluth, A. A., Rektman, N., Coit, D., Pulitzer, M., Bini, J., Arora, R., Hanson, N. C., Tassello, J. A., Frosina, D. *et al.* Merkel cell polyomavirus expression in merkel cell carcinomas and its absence in combined tumors and pulmonary neuroendocrine carcinomas. *The American journal of surgical pathology* **33**, 1378 (2009).
80. Foulongne, V., Kluger, N., Dereure, O., Brieu, N., Guillot, B. & Segondy, M. Merkel cell polyomavirus and Merkel cell carcinoma, France. *Emerging infectious diseases* **14**, 1491 (2008).
81. Shuda, M., Feng, H., Kwun, H. J., Rosen, S. T., Gjoerup, O., Moore, P. S. & Chang, Y. T antigen mutations are a human tumor-specific signature for Merkel cell polyomavirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 16272–16277 (2008).
82. Houben, R., Shuda, M., Weinkam, R., Schrama, D., Feng, H., Chang, Y., Moore, P. S. & Becker, J. C. Merkel cell polyomavirus-infected Merkel cell carcinoma cells require expression of viral T antigens. *Journal of Virology* **84**, 7064–72 (2010).
83. Shuda, M., Chang, Y. & Moore, P. S. Merkel cell polyomavirus positive Merkel cell carcinoma requires viral small T antigen for cell proliferation. *The Journal of Investigative Dermatology* **134**, 1479 (2014).

84. Houben, R., Adam, C., Baeurle, A., Hesbacher, S., Grimm, J., Angermeyer, S., Henzel, K., Hauser, S., Elling, R., Brocker, E. B., Gaubatz, S., Becker, J. C. & Schrama, D. An intact retinoblastoma protein-binding site in Merkel cell polyomavirus large T antigen is required for promoting growth of Merkel cell carcinoma cells. *International Journal of Cancer* **130**, 847–56 (2012).
85. Borchert, S., Czech-Sioli, M., Neumann, F., Schmidt, C., Wimmer, P., Dobner, T., Grundhoff, A. & Fischer, N. High-affinity Rb binding, p53 inhibition, subcellular localization, and transformation by wild-type or tumor-derived shortened Merkel cell polyomavirus large T antigens. *Journal of virology* **88**, 3144–3160 (2014).
86. Pipas, J. M. SV40: Cell transformation and tumorigenesis. *Virology* **384**, 294–303 (2009).
87. Moore, P. S. & Chang, Y. Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology. *Nature reviews cancer* **10**, 878–889 (2010).
88. Oliveira, M., Brochado, S. & Sogayar, M. Mechanisms of cell transformation induced by polyomavirus. *Brazilian journal of medical and biological research* **32**, 861–865 (1999).
89. Imperiale, M. J. Oncogenic transformation by the human polyomaviruses. *Oncogene* **20**, 7917–7923 (2001).
90. Carter, J. J., Paulson, K. G., Wipf, G. C., Miranda, D., Madeleine, M. M., Johnson, L. G., Lemos, B. D., Lee, S., Warcola, A. H., Iyer, J. G. *et al.* Association of Merkel cell polyomavirus-specific antibodies with Merkel cell carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* **101**, 1510–1522 (2009).
91. Pastrana, D. V., Tolstov, Y. L., Becker, J. C., Moore, P. S., Chang, Y. & Buck, C. B. Quantitation of human seroresponsiveness to Merkel cell polyomavirus. *PLoS Pathogens* **5**, e1000578 (2009).
92. Afanasiev, O. K., Yelistratova, L., Miller, N., Nagase, K., Paulson, K., Iyer, J. G., Ibrani, D., Koelle, D. M. & Nghiem, P. Merkel polyomavirus-specific T cells fluctuate with merkel cell carcinoma burden and express therapeutically targetable PD-1 and Tim-3 exhaustion markers. *Clinical Cancer Research* **19**, 5351–5360 (2013).



93. Paulson, K. G., Carter, J. J., Johnson, L. G., Cahill, K. W., Iyer, J. G., Schrama, D., Becker, J. C., Madeleine, M. M., Nghiem, P. & Galloway, D. A. Antibodies to merkel cell polyomavirus T antigen oncoproteins reflect tumor burden in merkel cell carcinoma patients. *Cancer research* **70**, 8388–8397 (2010).
94. Samimi, M., Molet, L., Fleury, M., Laude, H., Carlotti, A., Gardair, C., Baudin, M., Gouguet, L., Maubec, E., Avenel-Audran, M. *et al.* Prognostic value of antibodies to Merkel cell polyomavirus T antigens and VP 1 protein in patients with Merkel cell carcinoma. *British Journal of Dermatology* **174**, 813–822 (2016).
95. Mittal, D., Gubin, M. M., Schreiber, R. D. & Smyth, M. J. New insights into cancer immunoediting and its three component phases—elimination, equilibrium and escape. *Current opinion in immunology* **27**, 16–25 (2014).
96. Engels, E. A., Frisch, M., Goedert, J. J., Biggar, R. J. & Miller, R. W. Merkel cell carcinoma and HIV infection. *The Lancet* **359**, 497–498 (2002).
97. Lanoy, E. & Engels, E. A. Skin cancers associated with autoimmune conditions among elderly adults. *British Journal of Cancer* **103**, 112–114 (2010).
98. Clarke, C. A., Robbins, H. A., Tatalovich, Z., Lynch, C. F., Pawlish, K. S., Finch, J. L., Hernandez, B. Y., Fraumeni Jr, J. F., Madeleine, M. M. & Engels, E. A. Risk of merkel cell carcinoma after solid organ transplantation. *Journal of the National Cancer Institute* **107**, dju382 (2015).
99. Paulson, K. G., Iyer, J. G., Blom, A., Warton, E. M., Sokil, M., Yelistratova, L., Schuman, L., Nagase, K., Bhatia, S., Asgari, M. M. *et al.* Systemic immune suppression predicts diminished Merkel cell carcinoma-specific survival independent of stage. *Journal of Investigative Dermatology* **133**, 642–646 (2013).
100. Samimi, M., Touzé, A., Laude, H., Le Bidre, E., Arnold, F., Carpentier, A., Gardair, C., Carlotti, A., Maubec, E., Dupin, N. *et al.* Vitamin D deficiency is associated with greater tumor size and poorer outcome in Merkel cell carcinoma patients. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* **28**, 298–308 (2014).
101. Tarantola, T. I., Vallow, L. A., Halyard, M. Y., Weenig, R. H., Warschaw, K. E., Weaver, A. L., Roenigk, R. K., Brewer, J. D. & Otley, C. C. Unknown primary Merkel

- cell carcinoma: 23 new cases and a review. *Journal of the American Academy of Dermatology* **68**, 433–440 (2013).
102. Paulson, K. G., Iyer, J. G., Tegeder, A. R., Thibodeau, R., Schelter, J., Koba, S., Schrama, D., Simonson, W. T., Lemos, B. D., Byrd, D. R. *et al.* Transcriptome-wide studies of merkel cell carcinoma and validation of intratumoral CD8+ lymphocyte invasion as an independent predictor of survival. *Journal of Clinical Oncology* **29**, 1539 (2011).
103. Paulson, K. G., Iyer, J. G., Simonson, W. T., Blom, A., Thibodeau, R. M., Schmidt, M., Pietromonaco, S., Sokil, M., Warton, E. M., Asgari, M. M. *et al.* CD8+ lymphocyte intratumoral infiltration as a stage-independent predictor of Merkel cell carcinoma survival: a population-based study. *American journal of clinical pathology* **142**, 452–458 (2014).
104. Sihto, H., Böhling, T., Kavola, H., Koljonen, V., Salmi, M., Jalkanen, S. & Joensuu, H. Tumor infiltrating immune cells and outcome of Merkel cell carcinoma: a population-based study. *Clinical cancer research* **18**, 2872–2881 (2012).
105. Clark, R. A., Huang, S. J., Murphy, G. F., Mollet, I. G., Hijnen, D., Muthukuru, M., Schanbacher, C. F., Edwards, V., Miller, D. M., Kim, J. E. *et al.* Human squamous cell carcinomas evade the immune response by down-regulation of vascular E-selectin and recruitment of regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine* **205**, 2221–2234 (2008).
106. Afanasiev, O. K., Nagase, K., Simonson, W., Vandeven, N., Blom, A., Koelle, D. M., Clark, R. & Nghiem, P. Vascular E-selectin expression correlates with CD8 lymphocyte infiltration and improved outcome in Merkel cell carcinoma. *Journal of Investigative Dermatology* **133**, 2065–2073 (2013).
107. Dowlathshahi, M., Huang, V., Gehad, A. E., Jiang, Y., Calarese, A., Teague, J. E., Dorosario, A. A., Cheng, J., Nghiem, P., Schanbacher, C. F. *et al.* Tumor-specific T cells in human Merkel cell carcinomas: a possible role for Tregs and T-cell exhaustion in reducing T-cell responses. *Journal of Investigative Dermatology* **133**, 1879–1889 (2013).

108. Paulson, K. G., Tegeder, A., Willmes, C., Iyer, J. G., Afanasiev, O. K., Schrama, D., Koba, S., Thibodeau, R., Nagase, K., Simonson, W. T. *et al.* Downregulation of MHC-I expression is prevalent but reversible in Merkel cell carcinoma. *Cancer immunology research* **2**, 1071–1079 (2014).
109. Paulson, K., Voillet, V., McAfee, M., Hunter, D., Wagener, F., Perdicchio, M., Valente, W., Koelle, S., Church, C., Vandeven, N. *et al.* Acquired cancer resistance to combination immunotherapy from transcriptional loss of class I HLA. *Nature communications* **9**, 1–10 (2018).
110. Lipson, E. J., Vincent, J. G., Loyo, M., Kagohara, L. T., Lubber, B. S., Wang, H., Xu, H., Nayar, S. K., Wang, T. S., Sidransky, D. *et al.* PD-L1 expression in the Merkel cell carcinoma microenvironment: association with inflammation, Merkel cell polyomavirus, and overall survival. *Cancer immunology research* **1**, 54–63 (2013).
111. Dong, H., Strome, S. E., Salomao, D. R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D. B., Roche, P. C., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K. *et al.* Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nature medicine* **8**, 793–800 (2002).
112. Garcia-Diaz, A., Shin, D. S., Moreno, B. H., Saco, J., Escuin-Ordinas, H., Rodriguez, G. A., Zaretsky, J. M., Sun, L., Hugo, W., Wang, X. *et al.* Interferon receptor signaling pathways regulating PD-L1 and PD-L2 expression. *Cell reports* **19**, 1189–1201 (2017).
113. Latchman, Y., Wood, C. R., Chernova, T., Chaudhary, D., Borde, M., Chernova, I., Iwai, Y., Long, A. J., Brown, J. A., Nunes, R. *et al.* PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nature immunology* **2**, 261–268 (2001).
114. Schadendorf, D., Nghiem, P., Bhatia, S., Hauschild, A., Saiag, P., Mahnke, L., Hariharan, S. & Kaufman, H. L. Immune evasion mechanisms and immune checkpoint inhibition in advanced merkel cell carcinoma. *Oncoimmunology* **6**, e1338237 (2017).
115. Liu, W., Kim, G. B., Krump, N. A., Zhou, Y., Riley, J. L. & You, J. Selective reactivation of STING signaling to target Merkel cell carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2020).

116. Ritter, C., Fan, K., Paulson, K. G., Nghiem, P., Schrama, D. & Becker, J. C. Reversal of epigenetic silencing of MHC class I chain-related protein A and B improves immune recognition of Merkel cell carcinoma. *Scientific reports* **6**, 1–14 (2016).
117. Sica, A., Bronte, V. *et al.* Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *The Journal of clinical investigation* **117**, 1155–1166 (2007).
118. Paulson, K. G., Lewis, C. W., Redman, M. W., Simonson, W. T., Lisberg, A., Ritter, D., Morishima, C., Hutchinson, K., Mudgistratova, L., Blom, A. *et al.* Viral oncoprotein antibodies as a marker for recurrence of Merkel cell carcinoma: a prospective validation study. *Cancer* **123**, 1464–1474 (2017).
119. Iyer, J. G., Afanasiev, O. K., McClurkan, C., Paulson, K., Nagase, K., Jing, L., Marshak, J. O., Dong, L., Carter, J., Lai, I. *et al.* Merkel cell polyomavirus-specific CD8+ and CD4+ T-cell responses identified in Merkel cell carcinomas and blood. *Clinical Cancer Research* **17**, 6671–6680 (2011).
120. Lyngaa, R., Pedersen, N. W., Schrama, D., Thruue, C. A., Ibrani, D., Met, Ö., thor Straten, P., Nghiem, P., Becker, J. C. & Hadrup, S. R. T-cell responses to oncogenic merkel cell polyomavirus proteins distinguish patients with merkel cell carcinoma from healthy donors. *Clinical cancer research* **20**, 1768–1778 (2014).
121. Shahzad, N., Shuda, M., Gheit, T., Kwun, H. J., Cornet, I., Saidj, D., Zannetti, C., Hasan, U., Chang, Y., Moore, P. S. *et al.* The T antigen locus of Merkel cell polyomavirus downregulates human Toll-like receptor 9 expression. *Journal of virology* **87**, 13009–13019 (2013).
122. Griffiths, D. A., Abdul-Sada, H., Knight, L. M., Jackson, B. R., Richards, K., Prescott, E. L., Peach, A. H. S., Blair, G. E., Macdonald, A. & Whitehouse, A. Merkel cell polyomavirus small T antigen targets the NEMO adaptor protein to disrupt inflammatory signaling. *Journal of virology* **87**, 13853–13867 (2013).
123. Abdul-Sada, H. K. *Modulation of Innate Immune signaling by the small T antigen of Merkel cell polyomavirus—the causative agent of Merkel cell skin cancer* Diss. (University of Leeds, 2016).
124. Kumar, S., Xie, H., Shi, H., Gao, J., Juhlin, C. C., Björnhagen, V., Höög, A., Lee, L., Larsson, C. & Lui, W.-O. Merkel cell polyomavirus oncoproteins induce microRNAs

- that suppress multiple autophagy genes. *International Journal of Cancer* **146**, 1652–1666 (2020).
125. Shuda, M., Kwun, H. J., Feng, H., Chang, Y. & Moore, P. S. Human Merkel cell polyomavirus small T antigen is an oncoprotein targeting the 4E-BP1 translation regulator. *The Journal of clinical investigation* **121**, 3623–34 (2011).
126. Akhbari, P., Tobin, D., Poterlowicz, K., Roberts, W. & Boyne, J. R. MCV-miR-M1 targets the host-cell immune response resulting in the attenuation of neutrophil chemotaxis. *Journal of Investigative Dermatology* **138**, 2343–2354 (2018).
127. Colunga, A., Pulliam, T. & Nghiem, P. Merkel cell carcinoma in the age of immunotherapy: facts and hopes. *Clinical Cancer Research* **24**, 2035–2043 (2018).
128. Schrama, D., Peitsch, W. K., Zapatka, M., Kneitz, H., Houben, R., Eib, S., Haferkamp, S., Moore, P. S., Shuda, M., Thompson, J. F. *et al.* Merkel cell polyomavirus status is not associated with clinical course of Merkel cell carcinoma. *Journal of Investigative Dermatology* **131**, 1631–1638 (2011).
129. Handschel, J., Müller, D., Depprich, R., Ommerborn, M., Kübler, N., Naujoks, C., Reifenberger, J., Schäfer, K.-L. & Braunstein, S. The new polyomavirus (MCPyV) does not affect the clinical course in MCCs. *International journal of oral and maxillofacial surgery* **39**, 1086–1090 (2010).
130. Nghiem, P., Kaufman, H. L., Bharmal, M., Mahnke, L., Phatak, H. & Becker, J. C. Systematic literature review of efficacy, safety and tolerability outcomes of chemotherapy regimens in patients with metastatic Merkel cell carcinoma. *Future Oncology* **13**, 1263–1279 (2017).
131. Cowey, C. L., Mahnke, L., Espirito, J., Helwig, C., Oksen, D. & Bharmal, M. Real-world treatment outcomes in patients with metastatic Merkel cell carcinoma treated with chemotherapy in the USA. *Future oncology* **13**, 1699–1710 (2017).
132. Iyer, J. G., Blom, A., Doumani, R., Lewis, C., Tarabdkar, E. S., Anderson, A., Ma, C., Bestick, A., Parvathaneni, U., Bhatia, S. *et al.* Response rates and durability of chemotherapy among 62 patients with metastatic Merkel cell carcinoma. *Cancer medicine* **5**, 2294–2301 (2016).

133. Tai, P. T., Yu, E., Winkquist, E., Hammond, A., Stitt, L., Tonita, J. & Gilchrist, J. Chemotherapy in neuroendocrine/Merkel cell carcinoma of the skin: case series and review of 204 cases. *Journal of clinical oncology* **18**, 2493–2499 (2000).
134. Allen, P. J., Bowne, W. B., Jaques, D. P., Brennan, M. F., Busam, K., Coit, D. G. *et al.* Merkel cell carcinoma: prognosis and treatment of patients from a single institution. *Journal of Clinical Oncology* **23**, 2300–2309 (2005).
135. Van Veenendaal, L. M., van Akkooi, A. C., Verhoef, C., Grünhagen, D. J., Klop, W. M. C., Valk, G. D. & Tessler, M. E. Merkel cell carcinoma: clinical outcome and prognostic factors in 351 patients. *Journal of surgical oncology* **117**, 1768–1775 (2018).
136. Walker, J., Kasturi, V., Lebbe, C., Sandhu, S. K., Grignani, G., Hennessy, M. G., Hildemann, S., Reed, J. & Hariharan, S. Second-line avelumab treatment of patients (pts) with metastatic Merkel cell carcinoma (mMCC): Experience from a global expanded access program (EAP). *Journal of Clinical Oncology* (2018).
137. Anderson, A. C., Joller, N. & Kuchroo, V. K. Lag-3, Tim-3, and TIGIT: co-inhibitory receptors with specialized functions in immune regulation. *Immunity* **44**, 989–1004 (2016).
138. Russ, A., Hua, A. B., Montfort, W. R., Rahman, B., Riaz, I. B., Khalid, M. U., Carew, J. S., Nawrocki, S. T., Persky, D. & Anwer, F. Blocking “don’t eat me” signal of CD47-SIRP $\alpha$  in hematological malignancies, an in-depth review. *Blood reviews* **32**, 480–489 (2018).
139. Folkes, A. S., Feng, M., Zain, J. M., Abdulla, F., Rosen, S. T. & Querfeld, C. Targeting CD47 as a cancer therapeutic strategy—the cutaneous T cell lymphoma experience. *Current opinion in oncology* **30**, 332 (2018).
140. Chapuis, A. G., Afanasiev, O. K., Iyer, J. G., Paulson, K. G., Parvathaneni, U., Hwang, J. H., Lai, I., Roberts, I. M., Sloan, H. L., Bhatia, S. *et al.* Regression of metastatic Merkel cell carcinoma following transfer of polyomavirus-specific T cells and therapies capable of reinducing HLA class-I. *Cancer immunology research* **2**, 27–36 (2014).
141. Imperiale, M. J. & Jiang, M. Polyomavirus persistence. *Annual review of virology* **3**, 517–532 (2016).

142. Pastrana, D. V., Wieland, U., Silling, S., Buck, C. B. & Pfister, H. Positive correlation between Merkel cell polyomavirus viral load and capsid-specific antibody titer. *Medical microbiology and immunology* **201**, 17–23 (2012).
143. Tolstov, Y. L., Pastrana, D. V., Feng, H., Becker, J. C., Jenkins, F. J., Moschos, S., Chang, Y., Buck, C. B. & Moore, P. S. Human Merkel cell polyomavirus infection II. MCV is a common human infection that can be detected by conformational capsid epitope immunoassays. *International Journal of Cancer* **125**, 1250–1256 (2009).
144. Kean, J. M., Rao, S., Wang, M. & Garcea, R. L. Seroepidemiology of human polyomaviruses. *PLoS Pathogens* **5**, e1000363 (2009).
145. Gustafsson, B., Honkaniemi, E., Goh, S., Giraud, G., Forestier, E., von Döbeln, U., Allander, T., Dalianis, T. & Bogdanovic, G. KI, WU, and Merkel cell polyomavirus DNA was not detected in Guthrie cards of children who later developed acute lymphoblastic leukemia. *Journal of pediatric hematology/oncology* **34**, 364–367 (2012).
146. Chen, T., Hedman, L., Mattila, P. S., Jartti, T., Ruuskanen, O., Söderlund-Venermo, M. & Hedman, K. Serological evidence of Merkel cell polyomavirus primary infections in childhood. *Journal of Clinical Virology* **50**, 125–129 (2011).
147. Tolstov, Y. L., Knauer, A., Chen, J. G., Kensler, T. W., Kingsley, L. A., Moore, P. S. & Chang, Y. Asymptomatic primary Merkel cell polyomavirus infection among adults. *Emerging infectious diseases* **17**, 1371 (2011).
148. Spurgeon, M. E. & Lambert, P. F. Merkel cell polyomavirus: a newly discovered human virus with oncogenic potential. *Virology* **435**, 118–130 (2013).
149. Bofill-Mas, S., Rodriguez-Manzano, J., Calgua, B., Carratala, A. & Girones, R. Newly described human polyomaviruses Merkel cell, KI and WU are present in urban sewage and may represent potential environmental contaminants. *Virology journal* **7**, 141 (2010).
150. Foulongne, V., Courgnaud, V., Champeau, W. & Segondy, M. Detection of Merkel cell polyomavirus on environmental surfaces. *Journal of medical virology* **83**, 1435–1439 (2011).
151. DeCaprio, J. A. & Garcea, R. L. A cornucopia of human polyomaviruses. *Nature reviews Microbiology* **11**, 264–276 (2013).

152. Carter, J. J., Daugherty, M. D., Qi, X., Bheda-Malge, A., Wipf, G. C., Robinson, K., Roman, A., Malik, H. S. & Galloway, D. A. Identification of an overprinting gene in Merkel cell polyomavirus provides evolutionary insight into the birth of viral genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 12744–12749 (2013).
153. Schowalter, R. M. & Buck, C. B. The Merkel cell polyomavirus minor capsid protein. *PLoS Pathogens* **9**, e1003558 (2013).
154. Lee, S., Paulson, K. G., Murchison, E. P., Afanasiev, O. K., Alkan, C., Leonard, J. H., Byrd, D. R., Hannon, G. J. & Nghiem, P. Identification and validation of a novel mature microRNA encoded by the Merkel cell polyomavirus in human Merkel cell carcinomas. *Journal of Clinical Virology* **52**, 272–275 (2011).
155. Seo, G., Fink, L., O'Hara, B., Atwood, W. & Sullivan, C. Evolutionarily conserved function of a viral microRNA. *Journal of virology* **82**, 9823–9828 (2008).
156. Theiss, J. M., Günther, T., Alawi, M., Neumann, F., Tessmer, U., Fischer, N. & Grundhoff, A. A comprehensive analysis of replicating Merkel cell polyomavirus genomes delineates the viral transcription program and suggests a role for mcv-miR-M1 in episomal persistence. *PLoS Pathogens* **11**, e1004974 (2015).
157. Neumann, F., Borchert, S., Schmidt, C., Reimer, R., Hohenberg, H., Fischer, N. & Grundhoff, A. Replication, gene expression and particle production by a consensus Merkel Cell Polyomavirus (MCPyV) genome. *PloS one* **6**, e29112 (2011).
158. Rosen, S. T., Gould, V. E., Salwen, H. R., Herst, C. V., Le Beau, M. M., Lee, I., Bauer, K., Marder, R. J., Andersen, R., Kies, M. S. & et al. Establishment and characterization of a neuroendocrine skin carcinoma cell line. *Laboratory Investigation* **56**, 302–12 (1987).
159. Guastafierro, A., Feng, H., Thant, M., Kirkwood, J. M., Chang, Y., Moore, P. S. & Shuda, M. Characterization of an early passage Merkel cell polyomavirus-positive Merkel cell carcinoma cell line, MS-1, and its growth in NOD scid gamma mice. *Journal of Virological Methods* **187**, 6–14 (2013).
160. Verhaegen, M. E., Mangelberger, D., Harms, P. W., Vozheiko, T. D., Weick, J. W., Wilbert, D. M., Saunders, T. L., Ermilov, A. N., Bichakjian, C. K., Johnson, T. M.



- et al.* Merkel cell polyomavirus small T antigen is oncogenic in transgenic mice. *Journal of Investigative Dermatology* **135**, 1415–1424 (2015).
161. Schowalter, R. M., Pastrana, D. V. & Buck, C. B. Glycosaminoglycans and sialylated glycans sequentially facilitate Merkel cell polyomavirus infectious entry. *PLoS Pathogens* **7**, e1002161 (2011).
162. Neu, U., Bauer, J. & Stehle, T. Viruses and sialic acids: rules of engagement. *Current opinion in structural biology* **21**, 610–618 (2011).
163. Kwun, H. J., Guastafierro, A., Shuda, M., Meinke, G., Bohm, A., Moore, P. S. & Chang, Y. The minimum replication origin of merkel cell polyomavirus has a unique large T-antigen loading architecture and requires small T-antigen expression for optimal replication. *Journal of virology* **83**, 12118–12128 (2009).
164. Harrison, C. J., Meinke, G., Kwun, H. J., Rogalin, H., Phelan, P. J., Bullock, P. A., Chang, Y., Moore, P. S. & Bohm, A. Asymmetric assembly of Merkel cell polyomavirus large T-antigen origin binding domains at the viral origin. *Journal of molecular biology* **409**, 529–542 (2011).
165. Cheng, J., DeCaprio, J. A., Fluck, M. M. & Schaffhausen, B. S. *Cellular transformation by simian virus 40 and murine polyoma virus T antigens* in *Seminars in cancer biology* **19** (2009), 218–228.
166. Atkin, S. J., Griffin, B. E. & Dilworth, S. M. *Polyoma virus and simian virus 40 as cancer models: history and perspectives* in *Seminars in cancer biology* **19** (2009), 211–217.
167. Borchert, S. *Strukturelle und biochemische Analyse der Funktion des Merkelzellpolyomavirus Large Tumor Antigens* Diss. (Universität Hamburg, 2013).
168. Fanning, E., Zhao, X. & Jiang, X. in *DNA Tumor Viruses* 1–24 (Springer, 2009).
169. White, M. K., Safak, M. & Khalili, K. Regulation of gene expression in primate polyomaviruses. *Journal of virology* **83**, 10846–10856 (2009).
170. Hyde-DeRuyscher, R. P. & Carmichael, G. G. Polyomavirus late pre-mRNA processing: DNA replication-associated changes in leader exon multiplicity suggest a role for leader-to-leader splicing in the early-late switch. *Journal of virology* **64**, 5823–5832 (1990).

171. Hyde-DeRuyscher, R. & Carmichael, G. G. Polyomavirus early-late switch is not regulated at the level of transcription initiation and is associated with changes in RNA processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **85**, 8993–8997 (1988).
172. Adami, G., Marlor, C., Barrett, N. & Carmichael, G. G. Leader-to-leader splicing is required for efficient production and accumulation of polyomavirus late mRNAs. *Journal of virology* **63**, 85–93 (1989).
173. Bethge, T., Hachemi, H. A., Manzetti, J., Gosert, R., Schaffner, W. & Hirsch, H. H. Sp1 sites in the noncoding control region of BK polyomavirus are key regulators of bidirectional viral early and late gene expression. *Journal of virology* **89**, 3396–3411 (2015).
174. Prado, J. C. M., Monezi, T. A., Amorim, A. T., Lino, V., Paladino, A. & Boccardo, E. Human polyomaviruses and cancer: an overview. *Clinics* **73** (2018).
175. Sullivan, C. S. & Pipas, J. M. T antigens of simian virus 40: molecular chaperones for viral replication and tumorigenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **66**, 179–202 (2002).
176. Houben, R., Angermeyer, S., Haferkamp, S., Aue, A., Goebeler, M., Schrama, D. & Hesbacher, S. Characterization of functional domains in the M erkel cell polyoma virus L arge T antigen. *International Journal of Cancer* **136**, E290–E300 (2015).
177. Nwogu, N., Ortiz, L. E., Whitehouse, A. & Kwun, H. J. Merkel Cell Polyomavirus Small Tumor Antigen Activates Matrix Metalloproteinase-9 Gene Expression for Cell Migration and Invasion. *bioRxiv* (2020).
178. Wang, X., Li, J., Schowalter, R. M., Jiao, J., Buck, C. B. & You, J. Bromodomain protein Brd4 plays a key role in Merkel cell polyomavirus DNA replication. *PLoS pathogens* **8**, e1003021 (2012).
179. Liu, X., Hein, J., Richardson, S. C., Basse, P. H., Toptan, T., Moore, P. S., Gjoerup, O. V. & Chang, Y. Merkel cell polyomavirus large T antigen disrupts lysosome clustering by translocating human Vam6p from the cytoplasm to the nucleus. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 17079–17090 (2011).
180. Czech-Sioli, M., Siebels, S., Radau, S., Zahedi, R. P., Schmidt, C., Dobner, T., Grundhoff, A. & Fischer, N. The Ubiquitin-Specific Protease Usp7, a Novel Merkel Cell

- Polyomavirus Large T-Antigen Interaction Partner, Modulates Viral DNA Replication. *Journal of Virology* **94** (2020).
181. Park, D. E., Cheng, J., Berrios, C., Montero, J., Cortés-Cros, M., Ferretti, S., Arora, R., Tillgren, M. L., Gokhale, P. C. & DeCaprio, J. A. Dual inhibition of MDM2 and MDM4 in virus-positive Merkel cell carcinoma enhances the p53 response. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **116**, 1027–1032 (2019).
182. Kwun, H. J., Shuda, M., Feng, H., Camacho, C. J., Moore, P. S. & Chang, Y. Merkel cell polyomavirus small T antigen controls viral replication and oncoprotein expression by targeting the cellular ubiquitin ligase SCFFbw7. *Cell host & microbe* **14**, 125–135 (2013).
183. Dye, K. N., Welcker, M., Clurman, B. E., Roman, A. & Galloway, D. A. Merkel cell polyomavirus Tumor antigens expressed in Merkel cell carcinoma function independently of the ubiquitin ligases Fbw7 and  $\beta$ -TrCP. *PLoS pathogens* **15**, e1007543 (2019).
184. Nwogu, N., Ortiz, L. E. & Kwun, H. J. Surface charge of Merkel cell polyomavirus small T antigen determines cell transformation through allosteric FBW7 WD40 domain targeting. *Oncogenesis* **9**, 1–12 (2020).
185. Kwun, H. J., Shuda, M., Camacho, C. J., Gamper, A. M., Thant, M., Chang, Y. & Moore, P. S. Restricted protein phosphatase 2A targeting by Merkel cell polyomavirus small T antigen. *Journal of virology* **89**, 4191–4200 (2015).
186. Arroyo, J. D. & Hahn, W. C. Involvement of PP2A in viral and cellular transformation. *Oncogene* **24**, 7746–7755 (2005).
187. Verhaegen, M. E., Mangelberger, D., Harms, P. W., Eberl, M., Wilbert, D. M., Meireles, J., Bichakjian, C. K., Saunders, T. L., Wong, S. Y. & Dlugosz, A. A. Merkel cell polyomavirus small T antigen initiates Merkel cell carcinoma-like tumor development in mice. *Cancer research* **77**, 3151–3157 (2017).
188. Abdul-Sada, H., Müller, M., Mehta, R., Toth, R., Arthur, J. S. C., Whitehouse, A. & Macdonald, A. The PP4R1 sub-unit of protein phosphatase PP4 is essential for inhibition of NF- $\kappa$ B by merkel polyomavirus small tumour antigen. *Oncotarget* **8**, 25418 (2017).

189. Zhao, J., Jia, Y., Shen, S., Kim, J., Wang, X., Lee, E., Brownell, I., Cho-Vega, J. H., Lewis, C., Homsí, J. *et al.* Merkel Cell Polyomavirus Small T Antigen Activates Noncanonical NF- $\kappa$ B Signaling to Promote Tumorigenesis. *Molecular Cancer Research* **18**, 1623–1637 (2020).
190. Stakaitytė, G., Nwogu, N., Dobson, S. J., Knight, L. M., Wasson, C. W., Salguero, F. J., Blackbourn, D. J., Blair, G. E., Mankouri, J., Macdonald, A. *et al.* Merkel cell polyomavirus small T antigen drives cell motility via Rho-GTPase-induced filopodium formation. *Journal of virology* **92** (2018).
191. Knight, L. M., Stakaityte, G., Jennifer, J. W., Abdul-Sada, H., Griffiths, D. A., Howell, G. J., Wheat, R., Blair, G. E., Steven, N. M., Macdonald, A. *et al.* Merkel cell polyomavirus small T antigen mediates microtubule destabilization to promote cell motility and migration. *Journal of virology* **89**, 35–47 (2015).
192. Nwogu, N., Boyne, J. R., Dobson, S. J., Poterlowicz, K., Blair, G. E., Macdonald, A., Mankouri, J. & Whitehouse, A. Cellular sheddases are induced by Merkel cell polyomavirus small tumour antigen to mediate cell dissociation and invasiveness. *PLoS pathogens* **14**, e1007276 (2018).
193. Stakaitytė, G., Nwogu, N., Lippiat, J. D., Blair, G. E., Poterlowicz, K., Boyne, J. R., Macdonald, A., Mankouri, J. & Whitehouse, A. The cellular chloride channels CLIC1 and CLIC4 contribute to virus-mediated cell motility. *Journal of Biological Chemistry* **293**, 4582–4590 (2018).
194. Dobson, S. J., Anene, A., Boyne, J. R., Mankouri, J., Macdonald, A. & Whitehouse, A. Merkel cell polyomavirus small tumour antigen activates the p38 MAPK pathway to enhance cellular motility. *Biochemical Journal* **477**, 2721–2733 (2020).
195. Park, D. E., Cheng, J., Berrios, C., Montero, J., Cortés-Cros, M., Ferretti, S., Arora, R., Tillgren, M. L., Gokhale, P. C. & DeCaprio, J. A. Dual inhibition of MDM2 and MDM4 in virus-positive Merkel cell carcinoma enhances the p53 response. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **116**, 1027–1032 (2019).
196. Cheng, J., Park, D. E., Berrios, C., White, E. A., Arora, R., Yoon, R., Branigan, T., Xiao, T., Westerling, T., Federation, A. *et al.* Merkel cell polyomavirus recruits MYCL to the EP400 complex to promote oncogenesis. *PLoS pathogens* **13**, e1006668 (2017).

197. Park, D. E., Cheng, J., McGrath, J. P., Lim, M. Y., Cushman, C., Swanson, S. K., Tillgren, M. L., Paulo, J. A., Gokhale, P. C., Florens, L. *et al.* Merkel cell polyomavirus activates LSD1-mediated blockade of non-canonical BAF to regulate transformation and tumorigenesis. *Nature Cell Biology* **22**, 603–615 (2020).
198. Wu, J. H., Narayanan, D., Limmer, A. L., Simonette, R. A., Rady, P. L. & Tying, S. K. Merkel Cell Polyomavirus Small T Antigen Induces DNA Damage Response. *Intervirology* **62**, 96–100 (2019).
199. Lambert, A. W., Pattabiraman, D. R. & Weinberg, R. A. Emerging biological principles of metastasis. *Cell* **168**, 670–691 (2017).
200. Guégan, J. P., Ginestier, C., Charafe-Jauffret, E., Ducret, T., Quignard, J.-F., Vacher, P. & Legembre, P. CD95/Fas and metastatic disease: What does not kill you makes you stronger. *Seminars in cancer biology* **60**, 121–131 (2020).
201. Nicolson, G. L. Cell surface molecules and tumor metastasis: regulation of metastatic phenotypic diversity. *Experimental Cell Research* **150**, 3–22 (1984).
202. Samatov, T. R., Galatenko, V. V., Block, A., Shkurnikov, M. Y., Tonevitsky, A. G. & Schumacher, U. *Novel biomarkers in cancer: The whole is greater than the sum of its parts* in *Seminars in Cancer Biology* **45** (2017), 50–57.
203. Reymond, N., d'Água, B. B. & Ridley, A. J. Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nature Reviews Cancer* **13**, 858–870 (2013).
204. Miles, F. L., Pruitt, F. L., van Golen, K. L. & Cooper, C. R. Stepping out of the flow: capillary extravasation in cancer metastasis. *Clinical & experimental metastasis* **25**, 305–324 (2008).
205. Saxena, M. & Christofori, G. Rebuilding cancer metastasis in the mouse. *Molecular oncology* **7**, 283–296 (2013).
206. Strell, C. & Entschladen, F. Extravasation of leukocytes in comparison to tumor cells. *Cell Communication and Signaling* **6**, 10 (2008).
207. Vestweber, D. & Blanks, J. E. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiological reviews* **79**, 181–213 (1999).

- 
208. Barthel, S. R., Gavino, J. D., Descheny, L. & Dimitroff, C. J. Targeting selectins and selectin ligands in inflammation and cancer. *Expert opinion on therapeutic targets* **11**, 1473–1491 (2007).
209. Varki, A., Kannagi, R. & Toole, B. P. Glycosylation changes in cancer. *Essentials of Glycobiology. 2nd edition* (2009).
210. Lange, T., Samatov, T. R., Tonevitsky, A. G. & Schumacher, U. Importance of altered glycoprotein-bound N- and O-glycans for epithelial-to-mesenchymal transition and adhesion of cancer cells. *Carbohydrate research* **389**, 39–45 (2014).
211. St, C. H. Interactions between endothelial selectins and cancer cells regulate metastasis. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* **16**, 3233–3251 (2011).
212. Köhler, S., Ullrich, S., Richter, U. & Schumacher, U. E-/P-selectins and colon carcinoma metastasis: first in vivo evidence for their crucial role in a clinically relevant model of spontaneous metastasis formation in the lung. *British Journal of Cancer* **102**, 602–609 (2010).
213. Stübke, K., Wicklein, D., Herich, L., Schumacher, U. & Nehmann, N. Selectin-deficiency reduces the number of spontaneous metastases in a xenograft model of human breast cancer. *Cancer letters* **321**, 89–99 (2012).
214. Sahai, E. Illuminating the metastatic process. *Nature Reviews Cancer* **7**, 737–749 (2007).
215. Chaffer, C. L. & Weinberg, R. A. A perspective on cancer cell metastasis. *Science* **331**, 1559–1564 (2011).
216. Starzonek, S., Maar, H., Labitzky, V., Wicklein, D., Rossdam, C., Buettner, F. F., Wolters-Eisfeld, G., Guengoer, C., Wagener, C., Schumacher, U. *et al.* Systematic analysis of the human tumor cell binding to human vs. murine E- and P-selectin under static vs. dynamic conditions. *Glycobiology* (2020).
217. Leppert, D., Waubant, E., Galardy, R., Bunnett, N. W. & Hauser, S. L. T cell gelatinases mediate basement membrane transmigration in vitro. *The Journal of Immunology* **154**, 4379–4389 (1995).
218. Herold, M. J., van den Brandt, J., Seibler, J. & Reichardt, H. M. Inducible and reversible gene silencing by stable integration of an shRNA-encoding lentivirus in

- transgenic rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 18507–18512 (2008).
219. Weber, K., Bartsch, U., Stocking, C. & Fehse, B. A multicolor panel of novel lentiviral “gene ontology”(LeGO) vectors for functional gene analysis. *Molecular therapy* **16**, 698–706 (2008).
220. Website von Addgene <https://www.addgene.org/collections/tetracycline/>.
221. Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M. & Gingeras, T. R. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **29**, 15–21 (2013).
222. Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology* **15**, 550 (2014).
223. Czech-Sioli, M. *Einfluss der Ubiquitin spezifischen Protease 7 auf den Lebenszyklus des Merkel Zell Polyomavirus* Diss. (Universtität Hamburg, 2016).
224. Zhang, B., Kirov, S. & Snoddy, J. WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. *Nucleic acids research* **33**, W741–W748 (2005).
225. Wang, J., Duncan, D., Shi, Z. & Zhang, B. WEB-based gene set analysis toolkit (WebGestalt): update 2013. *Nucleic acids research* **41**, W77–W83 (2013).
226. Wang, J., Vasaikar, S., Shi, Z., Greer, M. & Zhang, B. WebGestalt 2017: a more comprehensive, powerful, flexible and interactive gene set enrichment analysis toolkit. *Nucleic acids research* **45**, W130–W137 (2017).
227. Penneys, N. S. & Shapiro, S. CD44 expression in Merkel cell carcinoma may correlate with risk of metastasis. *Journal of cutaneous pathology* **21**, 22–26 (1994).
228. Kurzen, H., Kaul, S., Egner, U., Deichmann, M. & Hartschuh, W. Expression of MUC 1 and Ep-CAM in Merkel cell carcinomas: implications for immunotherapy. *Archives of dermatological research* **295**, 146–154 (2003).
229. Wendzicki, J. A., Moore, P. S. & Chang, Y. Large T and small T antigens of Merkel cell polyomavirus. *Current opinion in virology* **11**, 38–43 (2015).

- 
230. Spurgeon, M. E., Cheng, J., Bronson, R. T., Lambert, P. F. & DeCaprio, J. A. Tumorigenic activity of merkel cell polyomavirus T antigens expressed in the stratified epithelium of mice. *Cancer research* **75**, 1068–1079 (2015).
231. Tiemeyer, M., Swiedler, S. J., Ishihara, M., Moreland, M., Schweingruber, H., Hirtzer, P. & Brandley, B. K. Carbohydrate ligands for endothelial-leukocyte adhesion molecule 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **88**, 1138–1142 (1991).
232. Stroud, M. R., Handa, K., Salyan, M. E. K., Ito, K., Lavery, S. B., Hakomori, S.-i., Reinhold, B. B. & Reinhold, V. N. Monosialogangliosides of human myelogenous leukemia HL60 cells and normal human leukocytes. 2. Characterization of E-selectin binding fractions, and structural requirements for physiological binding to E-selectin. *Biochemistry* **35**, 770–778 (1996).
233. Handa, K., Stroud, M. R. & Hakomori, S.-i. Sialosyl-fucosyl Poly-LacNAc without the sialosyl-Lex epitope as the physiological myeloid cell ligand in E-selectin-dependent adhesion: studies under static and dynamic flow conditions. *Biochemistry* **36**, 12412–12420 (1997).
234. Thomas, W. Catch bonds in adhesion. *Annual Review of Biomedical Engineering* **10**, 39–57 (2008).
235. Katayama, Y., Hidalgo, A., Chang, J., Peired, A. & Frenette, P. S. CD44 is a physiological E-selectin ligand on neutrophils. *The Journal of experimental medicine* **201**, 1183–1189 (2005).
236. Dimitroff, C. J., Lee, J. Y., Rafii, S., Fuhlbrigge, R. C. & Sackstein, R. CD44 is a major E-selectin ligand on human hematopoietic progenitor cells. *The Journal of cell biology* **153**, 1277–1286 (2001).
237. Náchér, M., Blázquez, A. B., Shao, B., Matesanz, A., Prophete, C., Berin, M. C., Frenette, P. S. & Hidalgo, A. Physiological contribution of CD44 as a ligand for E-Selectin during inflammatory T-cell recruitment. *The American journal of pathology* **178**, 2437–2446 (2011).
238. Cammas, F., Khetchoumian, K., Chambon, P. & Losson, R. in *TRIM/RBCC Proteins* 59–76 (Advances in Experimental Medicine und Biology, Springer, 2012).



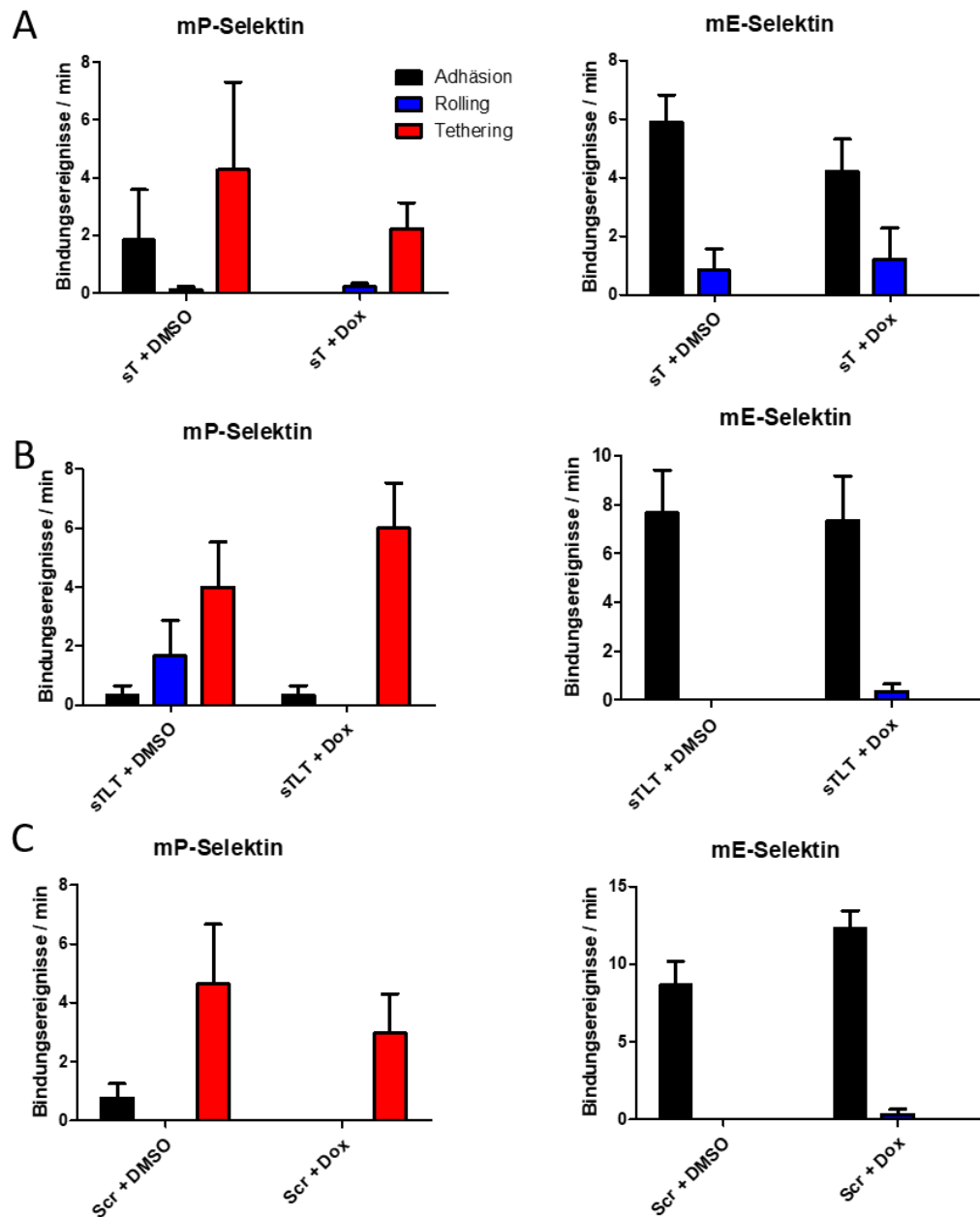
239. Ozato, K., Shin, D.-M., Chang, T.-H. & Morse, H. C. TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity. *Nature reviews immunology* **8**, 849–860 (2008).
240. Cassandri, M., Smirnov, A., Novelli, F., Pitolli, C., Agostini, M., Malewicz, M., Melino, G. & Raschellà, G. Zinc-finger proteins in health and disease. *Cell death discovery* **3**, 1–12 (2017).
241. Vázquez-Ulloa, E., Lizano, M., Sjöqvist, M., Olmedo-Nieva, L. & Contreras-Paredes, A. Dereglulation of the Notch pathway as a common road in viral carcinogenesis. *Reviews in medical virology* **28**, e1988 (2018).
242. Harold, A., Amako, Y., Hachisuka, J., Bai, Y., Li, M. Y., Kubat, L., Gravemeyer, J., Franks, J., Gibbs, J. R., Park, H. J. *et al.* Conversion of Sox2-dependent Merkel cell carcinoma to a differentiated neuron-like phenotype by T antigen inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **116**, 20104–20114 (2019).
243. Mondal, N., Buffone Jr, A. & Neelamegham, S. Distinct glycosyltransferases synthesize E-selectin ligands in human vs. mouse leukocytes. *Cell adhesion & migration* **7**, 288–292 (2013).
244. Abercrombie, M. & Ambrose, E. The surface properties of cancer cells: a review. *Cancer research* **22**, 525–548 (1962).
245. Woegerbauer, M., Thurnher, D., Houben, R., Pammer, J., Kloimstein, P., Heiduschka, G., Petzelbauer, P. & Erovic, B. M. Expression of the tetraspanins CD9, CD37, CD63, and CD151 in Merkel cell carcinoma: strong evidence for a posttranscriptional fine-tuning of CD9 gene expression. *Modern pathology* **23**, 751–762 (2010).
246. Temblador, A., Topalis, D., Andrei, G. & Snoeck, R. CRISPR/Cas9 editing of the polyomavirus tumor antigens inhibits Merkel cell carcinoma growth in vitro. *Cancers* **11**, 1260 (2019).
247. Peter, M., Hadji, A., Murmann, A., Brockway, S., Putzbach, W., Pattanayak, A. & Ceppi, P. The role of CD95 and CD95 ligand in cancer. *Cell death & differentiation* **22**, 549–559 (2015).
248. Tanaka, M., Suda, T., Haze, K., Nakamura, N., Sato, K., Kimura, F., Motoyoshi, K., Mizuki, M., Tagawa, S., Ohga, S. *et al.* Fas ligand in human serum. *Nature medicine* **2**, 317–322 (1996).

- 
249. Barnhart, B. C., Legembre, P., Pietras, E., Bubici, C., Franzoso, G. & Peter, M. E. CD95 ligand induces motility and invasiveness of apoptosis-resistant tumor cells. *The EMBO journal* **23**, 3175–3185 (2004).
250. Guégan, J.-P. & Legembre, P. Nonapoptotic functions of fas/CD 95 in the immune response. *The FEBS Journal* **285**, 809–827 (2018).
251. Ogasawara, J., Watanabe-Fukunaga, R., Adachi, M., Matsuzawa, A., Kasugai, T., Kitamura, Y., Itoh, N., Suda, T. & Nagata, S. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* **364**, 806–809 (1993).
252. Lian, S., Xie, X., Lu, Y. & Jia, L. Checkpoint CD47 Function On Tumor Metastasis And Immune Therapy. *OncoTargets and therapy* **12**, 9105 (2019).
253. Veillette, A. & Chen, J. SIRP $\alpha$ -CD47 immune checkpoint blockade in anticancer therapy. *Trends in immunology* **39**, 173–184 (2018).
254. Cham, L. B., Dulgeroff, L. B. T., Tal, M. C., Adomati, T., Li, F., Bhat, H., Huang, A., Lang, P. A., Moreno, M. E., Rivera, J. M. *et al.* Immunotherapeutic Blockade of CD47 Inhibitory Signaling Enhances Innate and Adaptive Immune Responses to Viral Infection. *Cell Reports* **31**, 107494 (2020).
255. Gordon, S. R., Maute, R. L., Dulken, B. W., Hutter, G., George, B. M., McCracken, M. N., Gupta, R., Tsai, J. M., Sinha, R., Corey, D. *et al.* PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity. *Nature* **545**, 495–499 (2017).
256. Li, C.-W., Lai, Y.-J., Hsu, J. L. & Hung, M.-C. Activation of phagocytosis by immune checkpoint blockade. *Frontiers of medicine* **12**, 473–480 (2018).
257. Majeti, R., Chao, M. P., Alizadeh, A. A., Pang, W. W., Jaiswal, S., Gibbs Jr, K. D., van Rooijen, N. & Weissman, I. L. CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. *Cell* **138**, 286–299 (2009).
258. Willingham, S. B., Volkmer, J.-P., Gentles, A. J., Sahoo, D., Dalerba, P., Mitra, S. S., Wang, J., Contreras-Trujillo, H., Martin, R., Cohen, J. D. *et al.* The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRP $\alpha$ ) interaction is a therapeutic target for human solid tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 6662–6667 (2012).

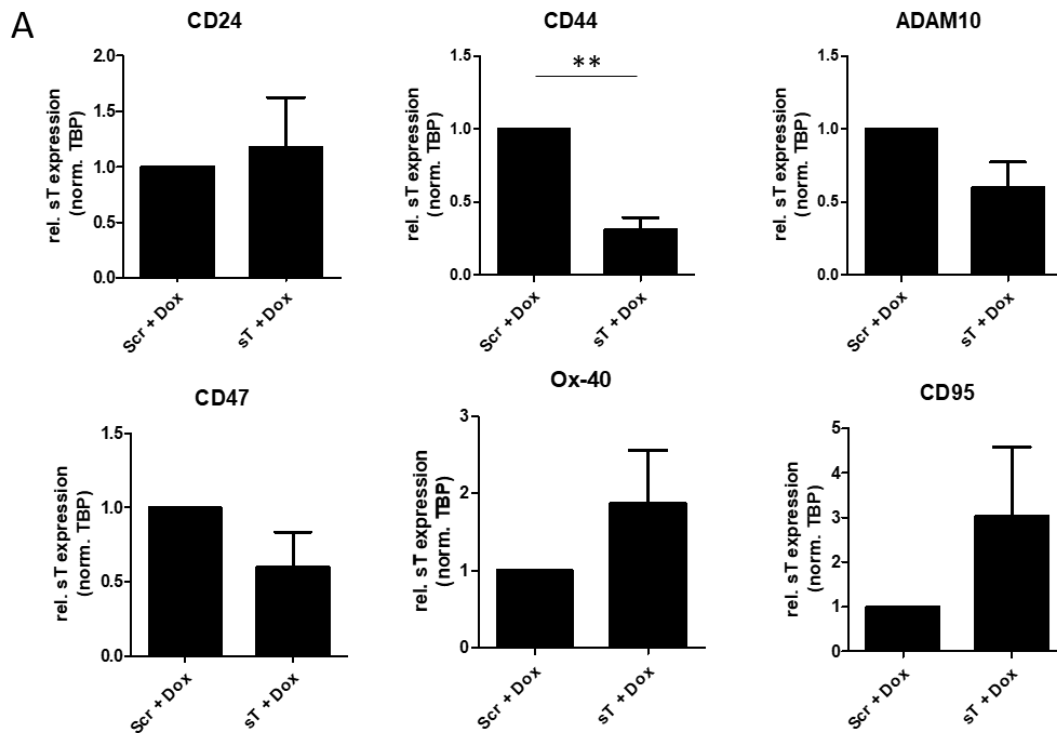
259. Huang, C.-Y., Ye, Z.-H., Huang, M.-Y. & Lu, J.-J. Regulation of CD47 expression in cancer cells. *Translational Oncology* **13**, 100862 (2020).
260. Abe, H., Saito, R., Ichimura, T., Iwasaki, A., Yamazawa, S., Shinozaki-Ushiku, A., Morikawa, T., Ushiku, T., Yamashita, H., Seto, Y. *et al.* CD47 expression in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma: coexistence with tumor immunity lowering the ratio of CD8<sup>+</sup>/Foxp3<sup>+</sup> T cells. *Virchows Archiv* **472**, 643–651 (2018).
261. Betancur, P. A., Abraham, B. J., Yiu, Y. Y., Willingham, S. B., Khameneh, F., Zarnegar, M., Kuo, A. H., McKenna, K., Kojima, Y., Leeper, N. J. *et al.* A CD47-associated super-enhancer links pro-inflammatory signalling to CD47 upregulation in breast cancer. *Nature communications* **8**, 1–14 (2017).
262. Barsoum, I. B., Smallwood, C. A., Siemens, D. R. & Graham, C. H. A mechanism of hypoxia-mediated escape from adaptive immunity in cancer cells. *Cancer research* **74**, 665–674 (2014).
263. Zhang, H., Lu, H., Xiang, L., Bullen, J. W., Zhang, C., Samanta, D., Gilkes, D. M., He, J. & Semenza, G. L. HIF-1 regulates CD47 expression in breast cancer cells to promote evasion of phagocytosis and maintenance of cancer stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**, E6215–E6223 (2015).
264. Casey, S. C., Tong, L., Li, Y., Do, R., Walz, S., Fitzgerald, K. N., Gouw, A. M., Baylot, V., Gütgemann, I., Eilers, M. *et al.* MYC regulates the antitumor immune response through CD47 and PD-L1. *Science* **352**, 227–231 (2016).
265. Bussey, K. A. & Brinkmann, M. M. Strategies for immune evasion by human tumor viruses. *Current opinion in virology* **32**, 30–39 (2018).
266. Cianfanelli, V., Fuoco, C., Lorente, M., Salazar, M., Quondamatteo, F., Gherardini, P. F., De Zio, D., Nazio, F., Antonioli, M., D’Orazio, M. *et al.* AMBRA1 links autophagy to cell proliferation and tumorigenesis by promoting c-Myc dephosphorylation and degradation. *Nature cell biology* **17**, 20–30 (2015).
267. Vescovo, T., Pagni, B., Piacentini, M., Fimia, G. M. & Antonioli, M. Regulation of Autophagy in Cells Infected With Oncogenic Human Viruses and Its Impact on Cancer Development. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **8**, 47 (2020).

268. Chitadze, G., Lettau, M., Bhat, J., Wesch, D., Steinle, A., Fürst, D., Mytilineos, J., Kalthoff, H., Janssen, O., Oberg, H.-H. *et al.* Shedding of endogenous MHC class I-related chain molecules A and B from different human tumor entities: heterogeneous involvement of the “a disintegrin and metalloproteases” 10 and 17. *International Journal of Cancer* **133**, 1557–1566 (2013).

## Anhang

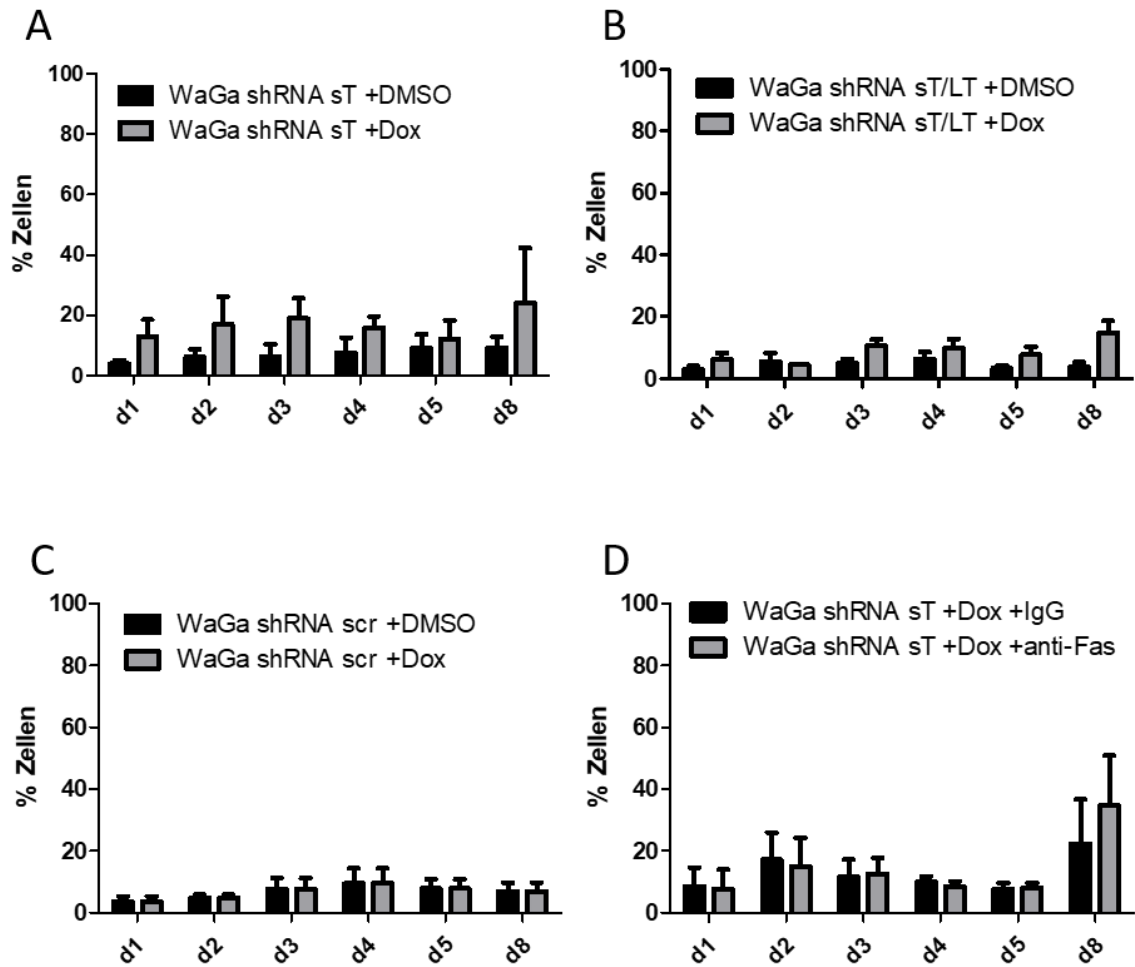


**Abbildung 35** Dynamische Adhäsion der WaGa-Zellen an das murine E- und P-Selektin. Die Adhäsion an die murinen E-/P-Selektine der WaGa shRNA-Zelllinien wurde drei Tage nach Induktion mit Dox (bzw. DMSO) mittels dynamischer Flussversuche ermittelt. Der Knockdown des sT-Ags reduziert im Vergleich zur DMSO-Kontrolle leicht die Adhäsion am murinen P- (links) und E-Selektin (rechts), jedoch nicht signifikant (A). Der Knockdown beider T-Ag hingegen zeigt keine Auswirkungen (B), ähnlich wie die WaGa shRNA scr-Kontrollzelllinien (C). Adhäsionsereignisse wurden je nach ihrer Stärke in *Tethering* (blau), *Rolling* (rot) und feste Adhäsion (schwarz) klassifiziert. Gezeigt werden die Mittelwerte und die Standardabweichung von jeweils drei technischen Replikaten. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe eines ungepaarten t-Tests ermittelt: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

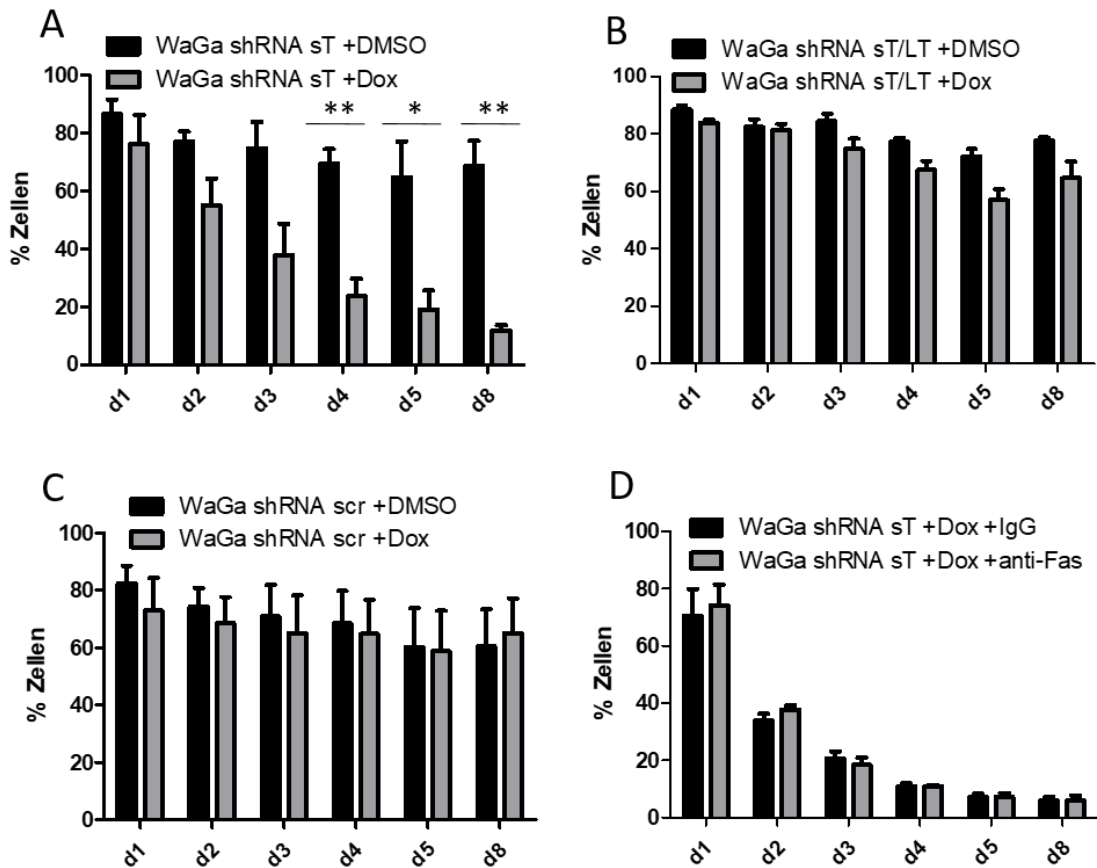
**B**

RNA-Seq data	Log2fold change
CD24	-0,104
CD44	-1,051
ADAM10	-0,713
CD47	-0,393
Ox40	1,607
CD95	1,983

**Abbildung 36 Bestätigung der RNA-Seq-Daten mittels RT-qPCR.** Zur Bestätigung der RNA-seq-Daten wurden RT-qPCRs für die Gene CD24, CD44, ADAM10, CD47, Ox-40 und CD95 etabliert und durchgeführt (A). Alle ausgewählten Gene spiegeln die Ergebnisse der RNA-seq-Analyse wider (B). CD44 wird in Abwesenheit des sT-Ags auf Transkriptionsebene signifikant herunterreguliert. Die RT-qPCR wurde als technisches Triplikat durchgeführt und in unabhängigen Experimenten dreimal wiederholt. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe eines ungepaarten t-Tests ermittelt: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .



**Abbildung 37 Anteil früh-apoptotischer Zellen in WaGa-T-Antigen-Knockdown-Zellen.** Die WaGa shRNA-Zelllinien wurden mit Dox (bzw. DMSO) induziert und acht Tage lang der Anteil apoptotischer Zellen mittels Annexin-V-Färbung im FACS bestimmt. Das Experiment wurde drei Mal wiederholt. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe eines ungepaarten t-Tests ermittelt: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .



**Abbildung 38 Anteil normaler (nicht-apoptischer) Zellen in WaGa-T-Antigen-Knockdown-Zellen.** Die WaGa shRNA-Zelllinien wurden mit Dox (bzw. DMSO) induziert und acht Tage lang der Anteil apoptotischer Zellen mittels Annexin-V-Färbung im FACS bestimmt. Das Experiment wurde drei Mal wiederholt. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe eines ungepaarten t-Tests ermittelt: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .



**Tabelle 19 Vollständige Daten der Transkriptomanalyse von WaGa-Zellen in Abhängigkeit des sT-Antigens.** WaGa shRNA sT und shRNA scr-Kontrollzellen wurden drei Tage vor der Analyse mit 1 µg/mL Dox induziert und die Transkripte miteinander verglichen. Insgesamt werden durch das sT-Ag 280 Gene transkriptionell herunterreguliert (linke Spalte) und 110 Gene transkriptionell hochreguliert (rechte Spalte). Durch das verwendete shRNA-Knockdown-System sind Gene mit positiven Log<sub>2</sub>Fold Changes (Log<sub>2</sub>FC) in Abwesenheit des sT-Ags hochreguliert und werden somit durch das sT-Ag herunterreguliert. Umgekehrt sind Gene mit negativen Log<sub>2</sub>Fold Changes in Abwesenheit des sT-Ags herunterreguliert und werden somit durch das sT-Ag hochreguliert (*Cut-Off*:-1>Log<sub>2</sub>Fold Change >1 und padjust <0,05). Die Transkriptomanalyse wurde als Duplikat durchgeführt.

durch sT herunterreguliert (280)			durch sT hochreguliert (110)		
Gensymbol	Log <sub>2</sub> FC	padjust	Gensymbol	Log <sub>2</sub> FC	padjust
TRIM49	7,85	1,63E-05	CPNE8	-6,49	1,87E-03
KDM4E	7,28	1,46E-04	MTRNR2L9	-4,30	2,73E-46
BEX5	6,85	6,46E-04	ZNF541	-4,10	3,32E-06
TUSC1	6,72	2,20E-04	ABCG8	-3,55	4,79E-03
ZSCAN4	6,56	1,73E-03	CYSLTR2	-3,34	4,34E-06
TRIM43B	6,13	1,55E-03	VIP	-3,16	2,70E-02
RFPL4AL1	6,07	9,00E-03	SH3RF3	-2,76	6,25E-07
NPTX1	5,71	2,79E-28	CNRIP1	-2,65	9,26E-05
NUDT11	5,69	1,35E-35	AHNAK	-2,65	1,70E-36
TRIM43	5,69	1,97E-05	SERPINE1	-2,58	4,21E-02
SH2D3C	5,62	7,90E-25	CA9	-2,56	1,41E-12
SLCO4C1	5,51	9,64E-03	SGPP2	-2,52	1,91E-07
TRIM49C	5,40	1,04E-02	HENMT1	-2,49	2,07E-06
PRAMEF2	5,09	2,31E-02	BPIFB1	-2,43	6,56E-144
TRIM49B	5,06	4,76E-04	SLC2A7	-2,41	4,08E-02
PRAMEF1	5,06	2,51E-02	SLC2A5	-2,29	3,47E-11
FAM90A1	5,04	2,52E-02	LOC100507144	-2,28	2,60E-03
PRNP	4,92	3,19E-02	PTPRO	-2,28	3,81E-09
LEUTX	4,88	1,13E-09	C3orf70	-2,27	1,56E-03
NGFR	4,82	5,06E-05	COL6A3	-2,18	2,88E-02
MAOB	4,82	4,01E-02	MCTS2P	-2,16	1,59E-08
MUC19	4,67	2,69E-03	PARM1	-2,15	1,12E-07
ZIC3	4,52	2,24E-05	HP09025	-2,11	7,97E-05
KHDC1L	4,48	5,81E-10	CARD11	-2,10	1,88E-04
LOC441178	4,42	7,34E-03	STAMBPL1	-2,09	2,41E-02
ARHGAP25	4,34	9,96E-03	TEX15	-2,04	1,88E-26
STMN2	4,23	1,47E-02	MEST	-2,03	2,26E-46
TCEAL5	4,19	1,72E-05	IRX6	-1,90	4,66E-05
RFPL4B	4,12	1,79E-02	UTRN	-1,88	5,21E-45

(fortgesetzt)			(fortgesetzt)		
durch sT herunterreguliert (280)			durch sT hochreguliert (110)		
Gensymbol	Log <sub>2</sub> FC	padjust	Gensymbol	Log <sub>2</sub> FC	padjust
SLC6A10P	3,94	5,09E-14	GATM	-1,82	3,47E-02
GNG3	3,84	1,45E-22	PADI2	-1,81	1,23E-26
DRAM1	3,73	4,83E-11	ABCG5	-1,78	3,76E-02
SYTL4	3,64	4,28E-03	TMEM45A	-1,76	1,67E-02
CLCA2	3,57	2,25E-02	SF3B6	-1,74	1,51E-34
CACNG4	3,49	1,71E-07	ZNF30	-1,73	2,84E-02
SLC34A2	3,48	8,26E-09	FRG1B	-1,72	2,00E-02
PCDH11X	3,44	3,36E-02	CDS1	-1,71	3,61E-10
PRAMEF12	3,43	3,72E-03	CHP1	-1,66	2,38E-08
FOXF2	3,39	4,30E-02	TPTE2	-1,66	1,25E-02
SLC4A8	3,38	6,75E-07	PCNA	-1,65	5,05E-95
AR	3,36	2,16E-03	JAKMIP2	-1,65	9,21E-03
VILL	3,33	6,87E-04	NKAIN2	-1,60	1,19E-02
FEZ1	3,32	1,40E-11	GPD1L	-1,59	2,38E-20
PSG4	3,26	1,80E-04	C6orf132	-1,59	6,00E-03
PKD1L2	3,26	8,43E-15	IFIH1	-1,56	2,75E-03
ALPPL2	3,22	2,16E-03	PARK2	-1,55	6,64E-07
RMRP	3,18	3,10E-02	AMMECR1	-1,54	1,51E-06
TSHZ3	3,15	2,39E-03	FOXA1	-1,46	1,11E-05
L1CAM	3,13	4,65E-12	BMP2	-1,46	9,23E-07
LOC80078	3,09	1,46E-13	ALPK3	-1,45	1,79E-02
TCEAL2	3,09	8,52E-27	LBH	-1,45	3,76E-19
SLC52A1	3,08	9,26E-03	BOK	-1,45	5,24E-05
COL1A2	3,06	1,04E-10	ADRA2A	-1,42	5,07E-04
RET	3,00	2,51E-02	AK5	-1,42	1,11E-02
KLK4	2,93	9,71E-12	ACSS1	-1,39	9,03E-06
MIR662	2,93	1,63E-02	HIPK3	-1,37	2,20E-32
ARAP3	2,92	9,84E-06	SV2C	-1,37	2,00E-04
FLRT2	2,91	4,67E-04	SLC23A2	-1,36	2,97E-26
NID1	2,91	6,34E-144	FAM210B	-1,35	8,29E-51
SCN3A	2,84	8,35E-05	PRDM13	-1,32	6,92E-07
PVRL4	2,83	1,30E-08	GFPT1	-1,32	2,09E-41
RBP1	2,77	5,71E-03	HIPK1	-1,31	1,94E-34
PRSS12	2,73	1,21E-02	FAM159B	-1,31	5,70E-05
LGALS3	2,71	8,04E-21	ST14	-1,31	7,69E-09
KCNF1	2,71	1,21E-06	DMRTA1	-1,31	2,06E-05

(fortgesetzt)			(fortgesetzt)		
durch sT herunterreguliert (280)			durch sT hochreguliert (110)		
Gensymbol	Log <sub>2</sub> FC	padjust	Gensymbol	Log <sub>2</sub> FC	padjust
CHRM3	2,68	8,59E-03	BRI3	-1,31	2,99E-07
CCDC74A	2,61	3,80E-04	SV2B	-1,29	4,10E-09
INPP5D	2,58	6,44E-15	PRR15L	-1,27	4,64E-06
ZYX	2,56	7,41E-04	ZNF662	-1,27	8,78E-03
PLAU	2,54	3,33E-08	ZNF415	-1,27	6,00E-05
KRTAP17-1	2,51	1,05E-11	FAM171B	-1,27	4,21E-05
NOS2	2,51	2,29E-02	RBP7	-1,24	6,17E-06
MMP2	2,50	2,97E-02	SORBS2	-1,23	7,31E-06
MAGEH1	2,49	9,04E-08	SLC38A5	-1,22	1,57E-02
NCAN	2,47	3,04E-35	MPZL3	-1,22	3,63E-02
SAMD14	2,46	8,85E-18	LMBRD1	-1,21	5,68E-12
CFAP47	2,45	2,70E-02	AMIGO1	-1,20	9,65E-04
PRDM1	2,44	8,12E-03	LRRC16A	-1,20	2,72E-20
LIF	2,43	3,73E-05	MCF2L-AS1	-1,18	1,76E-03
SYNGR3	2,41	1,73E-09	MICB	-1,17	2,70E-04
SYT17	2,40	5,70E-05	ANKRD36BP1	-1,14	4,39E-03
DNAH3	2,33	4,94E-02	RBFOX3	-1,14	2,10E-02
GPRC5C	2,33	1,71E-03	FAM8A1	-1,14	3,15E-15
DNAJC22	2,31	2,93E-02	DDN	-1,13	1,16E-10
EBF4	2,30	7,09E-05	BHLHE40	-1,13	1,56E-02
COL18A1	2,26	1,28E-11	CSTF2T	-1,13	3,45E-08
LPPR3	2,26	4,13E-06	LINC00341	-1,12	1,91E-04
SYT11	2,18	1,46E-26	ZNF702P	-1,12	1,38E-02
FSTL5	2,18	2,33E-03	NFIX	-1,12	8,75E-31
LRRIQ1	2,18	8,69E-03	KIF16B	-1,11	1,56E-02
NRK	2,16	1,18E-02	SLAIN1	-1,11	3,72E-13
LOC284454	2,14	8,55E-04	NCALD	-1,10	4,31E-06
B4GALNT1	2,13	2,18E-05	KLRG2	-1,09	1,42E-05
CDH13	2,13	2,01E-04	AP1M2	-1,07	9,08E-11
TMEM229B	2,09	1,30E-02	CABLES1	-1,07	5,57E-10
PELI1	2,04	1,97E-02	MFAP4	-1,07	1,99E-05
FGFR1	2,04	3,76E-04	GGT7	-1,06	3,37E-03
ZMYND10	2,02	6,13E-04	DOK6	-1,06	6,04E-08
COL6A1	2,01	1,79E-05	LOC100996579	-1,06	1,48E-02
XKR4	2,00	1,10E-21	CD44	-1,05	4,22E-31
ATCAY	1,98	3,97E-03	CHAC1	-1,05	2,12E-02

(fortgesetzt)			(fortgesetzt)		
durch sT herunterreguliert (280)			durch sT hochreguliert (110)		
Gensymbol	Log <sub>2</sub> FC	padjust	Gensymbol	Log <sub>2</sub> FC	padjust
CRIP2	1,97	3,76E-19	ADM	-1,05	2,50E-07
DYNC1I1	1,97	9,27E-03	FBXO32	-1,03	1,85E-02
MCAM	1,95	3,02E-16	TMEM170B	-1,03	2,61E-15
AHR	1,91	1,93E-02	RPIA	-1,03	4,72E-05
CPEB1	1,91	3,65E-02	NRIP2	-1,02	1,01E-06
LYNX1	1,88	1,38E-11	TNS1	-1,02	1,79E-02
S100A6	1,86	3,14E-04	CTNND2	-1,01	7,58E-05
ZNF135	1,81	6,46E-16	UBE2Z	-1,01	2,61E-15
ALG10B	1,81	3,59E-11	CLCN5	-1,01	3,78E-18
TNNI3	1,80	2,12E-05			
COL17A1	1,80	2,16E-02			
SULF2	1,78	8,36E-03			
CYSRT1	1,78	3,43E-05			
NR5A2	1,76	4,91E-02			
KIAA1211	1,76	1,15E-05			
LINC01315	1,75	4,75E-02			
RHOC	1,75	3,36E-05			
VASN	1,71	2,74E-02			
KRT15	1,70	6,20E-23			
LRCH2	1,69	7,71E-04			
EPPK1	1,69	3,80E-19			
SCN4B	1,69	1,41E-10			
ITM2C	1,68	1,51E-03			
PAQR9	1,66	1,54E-02			
NLRP1	1,65	5,53E-12			
VIPR1	1,65	4,22E-11			
ARMCX2	1,64	2,60E-02			
USP51	1,64	2,06E-02			
ATP2A1-AS1	1,64	1,17E-02			
PLK2	1,63	2,67E-03			
PNMAL1	1,61	1,80E-04			
ID3	1,61	5,84E-19			
LOC100130417	1,61	2,84E-05			
EPS8L2	1,61	3,01E-12			
CTNNA2	1,60	1,03E-04			
ART5	1,60	3,36E-03			

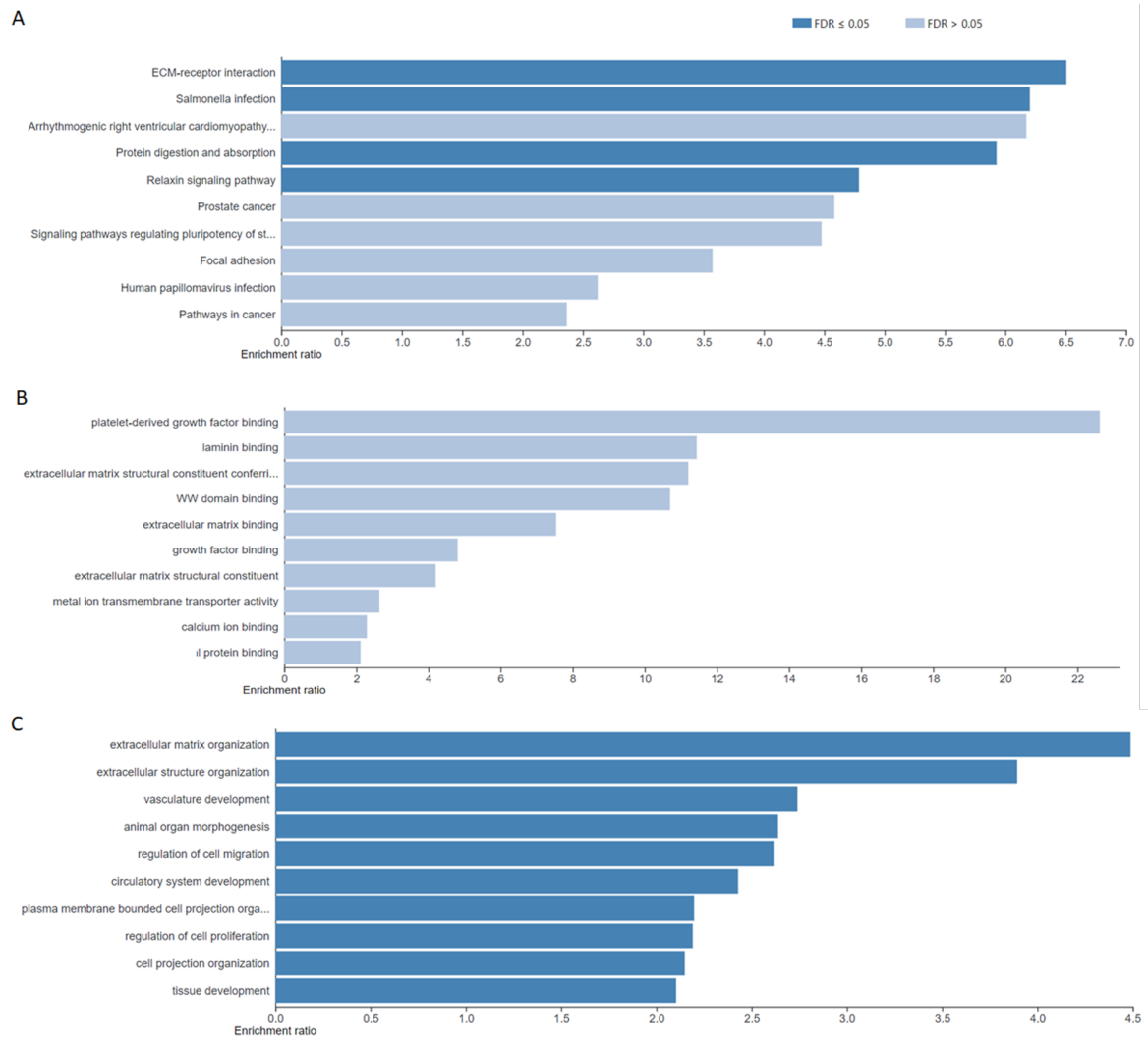
(fortgesetzt)			(fortgesetzt)		
durch sT herunterreguliert (280)			durch sT hochreguliert (110)		
Gensymbol	Log <sub>2</sub> FC	padjust	Gensymbol	Log <sub>2</sub> FC	padjust
PALM2	1,59	5,30E-03			
CACNA1I	1,59	1,85E-02			
OSCP1	1,58	5,77E-07			
GLIS2	1,57	9,65E-04			
CCNA1	1,56	1,71E-18			
IGSF3	1,54	3,07E-10			
ITGA7	1,54	8,41E-03			
TINCR	1,53	2,28E-07			
ANO3	1,51	1,80E-04			
SAMD15	1,50	1,74E-03			
SERPINB5	1,50	4,57E-05			
EMX1	1,50	8,99E-03			
WNK3	1,48	1,51E-05			
SEZ6L	1,48	2,11E-26			
LDB3	1,47	8,35E-07			
ZMAT3	1,47	2,20E-13			
PDE3A	1,47	3,68E-04			
BZRAP1	1,46	5,09E-07			
TMEM159	1,45	1,38E-02			
SLC44A2	1,45	1,44E-03			
CPT1A	1,45	2,05E-10			
DAPL1	1,44	4,11E-02			
FBXL7	1,43	1,92E-05			
SDK2	1,43	2,32E-02			
KLK5	1,42	3,41E-02			
PTPRU	1,42	9,33E-27			
FAM13C	1,42	2,46E-04			
RAB26	1,41	1,78E-49			
DCLK3	1,41	4,80E-04			
CORO1A	1,36	3,54E-07			
LRRC49	1,36	1,94E-04			
SHISA7	1,36	3,31E-03			
CRISPLD2	1,36	8,45E-31			
DUSP15	1,36	9,39E-11			
P3H3	1,35	2,17E-05			
IGLON5	1,35	9,09E-03			

(fortgesetzt)			(fortgesetzt)		
durch sT herunterreguliert (280)			durch sT hochreguliert (110)		
Gensymbol	Log <sub>2</sub> FC	padjust	Gensymbol	Log <sub>2</sub> FC	padjust
DYNC2H1	1,35	5,35E-07			
LRRC43	1,33	8,58E-04			
CEMP1	1,33	2,24E-02			
PCDHB16	1,33	7,57E-05			
PNPLA4	1,32	8,65E-04			
KLK11	1,31	9,10E-04			
ITGA6	1,31	1,14E-04			
KCNH3	1,31	1,34E-03			
USH1G	1,30	1,80E-04			
SMAD9	1,30	2,52E-20			
ID1	1,30	1,81E-17			
STX1B	1,30	2,20E-04			
TMEM59L	1,29	4,11E-14			
MAMDC4	1,29	3,88E-08			
FCN2	1,28	1,74E-02			
ABCC8	1,28	5,14E-08			
DST	1,28	3,87E-03			
CRIP1	1,28	9,11E-15			
LITAF	1,27	2,41E-10			
BCL6B	1,27	6,62E-15			
SPATA18	1,27	1,24E-13			
SLC6A7	1,26	6,84E-05			
SYNPO	1,26	9,36E-03			
CMTM3	1,26	6,88E-03			
FNDC3B	1,26	3,16E-03			
NDRG4	1,25	1,34E-27			
CDKN1A	1,25	7,33E-45			
TCF7	1,24	8,87E-03			
METRN	1,23	4,34E-03			
MAP1A	1,23	1,18E-11			
LOC102723927	1,23	3,34E-03			
HHAT	1,22	1,21E-02			
CXorf57	1,22	1,58E-02			
SEC31B	1,21	4,34E-10			
GLT1D1	1,21	2,25E-02			
PTRF	1,20	6,61E-07			

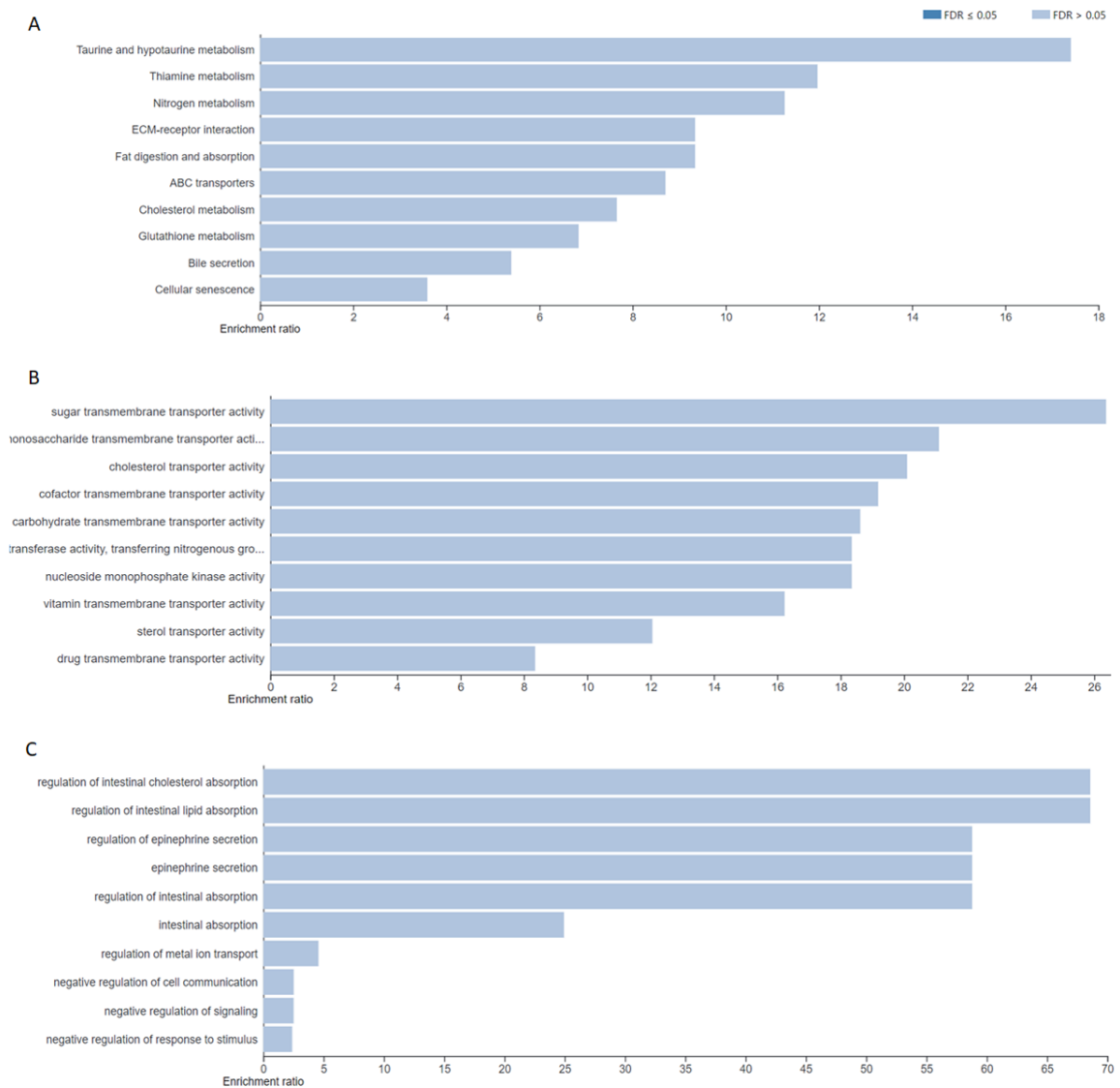
(fortgesetzt)			(fortgesetzt)		
durch sT herunterreguliert (280)			durch sT hochreguliert (110)		
Gensymbol	Log <sub>2</sub> FC	padjust	Gensymbol	Log <sub>2</sub> FC	padjust
C6orf165	1,20	1,63E-02			
TCEA3	1,20	5,87E-04			
MDH1B	1,19	9,24E-03			
ADAMTS9	1,18	1,50E-03			
CDIP1	1,18	4,83E-19			
TGFB1I1	1,17	4,62E-03			
KDM7A	1,17	4,57E-09			
DGKA	1,17	5,19E-05			
B9D1	1,15	1,43E-03			
REEP2	1,15	2,33E-02			
SLC9A3	1,14	4,91E-02			
SLC26A2	1,14	7,32E-03			
MXRA7	1,14	4,39E-02			
ODF3L2	1,13	4,80E-02			
MAPK11	1,13	1,08E-04			
FARP1	1,12	4,85E-04			
GRIP2	1,12	2,87E-02			
MPP2	1,12	9,67E-03			
AMER2	1,12	1,94E-04			
COL1A1	1,12	6,80E-03			
TRANK1	1,11	2,07E-02			
LAMB3	1,11	4,00E-03			
NOTCH1	1,11	1,02E-19			
HTR1D	1,10	2,76E-02			
NSUN5P1	1,10	1,12E-02			
PAQR7	1,10	1,59E-02			
TBC1D9	1,10	3,35E-09			
DUSP3	1,10	3,11E-05			
SRXN1	1,09	4,38E-02			
AJAP1	1,09	8,78E-04			
H1FX-AS1	1,09	1,57E-02			
CADPS	1,09	2,76E-10			
ZMAT1	1,08	1,50E-02			
ZNF750	1,08	3,32E-02			
SEMA3B	1,08	2,42E-03			
ECM1	1,08	3,68E-02			

(fortgesetzt)			(fortgesetzt)		
durch sT herunterreguliert (280)			durch sT hochreguliert (110)		
Gensymbol	Log <sub>2</sub> FC	padjust	Gensymbol	Log <sub>2</sub> FC	padjust
ADGRB2	1,08	6,05E-08			
PRSS27	1,07	4,64E-03			
ADGRB1	1,07	4,75E-06			
PFN2	1,06	4,59E-08			
PCBP4	1,06	2,79E-16			
GPR3	1,06	1,38E-02			
CORO2B	1,06	1,34E-06			
NRBP2	1,06	1,15E-15			
ADGRG1	1,06	4,43E-09			
ATP2A1	1,05	4,84E-02			
EME2	1,05	1,93E-03			
CLUAP1	1,05	1,01E-06			
KCNA6	1,05	4,27E-07			
KRT19	1,05	7,07E-36			
CELF3	1,05	3,84E-13			
MPPED1	1,05	4,20E-02			
QPRT	1,04	9,66E-04			
PDIA2	1,04	1,10E-02			
CDC42EP3	1,04	5,28E-03			
TCTN1	1,03	4,66E-05			
LTBP1	1,03	1,63E-03			
MBOAT1	1,03	1,39E-03			
PLK3	1,03	3,22E-03			
MOK	1,02	3,12E-03			
PGAM2	1,02	1,86E-03			
AMDHD2	1,01	2,62E-03			
KRTAP5-1	1,01	2,05E-02			
PLEKHA1	1,01	2,36E-09			
EDA2R	1,01	3,18E-05			
S100A16	1,01	1,87E-04			
TMEM2	1,01	5,14E-08			
SAMD11	1,01	1,43E-03			
BICC1	1,00	5,77E-04			
JUN	1,00	8,91E-14			
LHX4-AS1	1,00	1,24E-02			

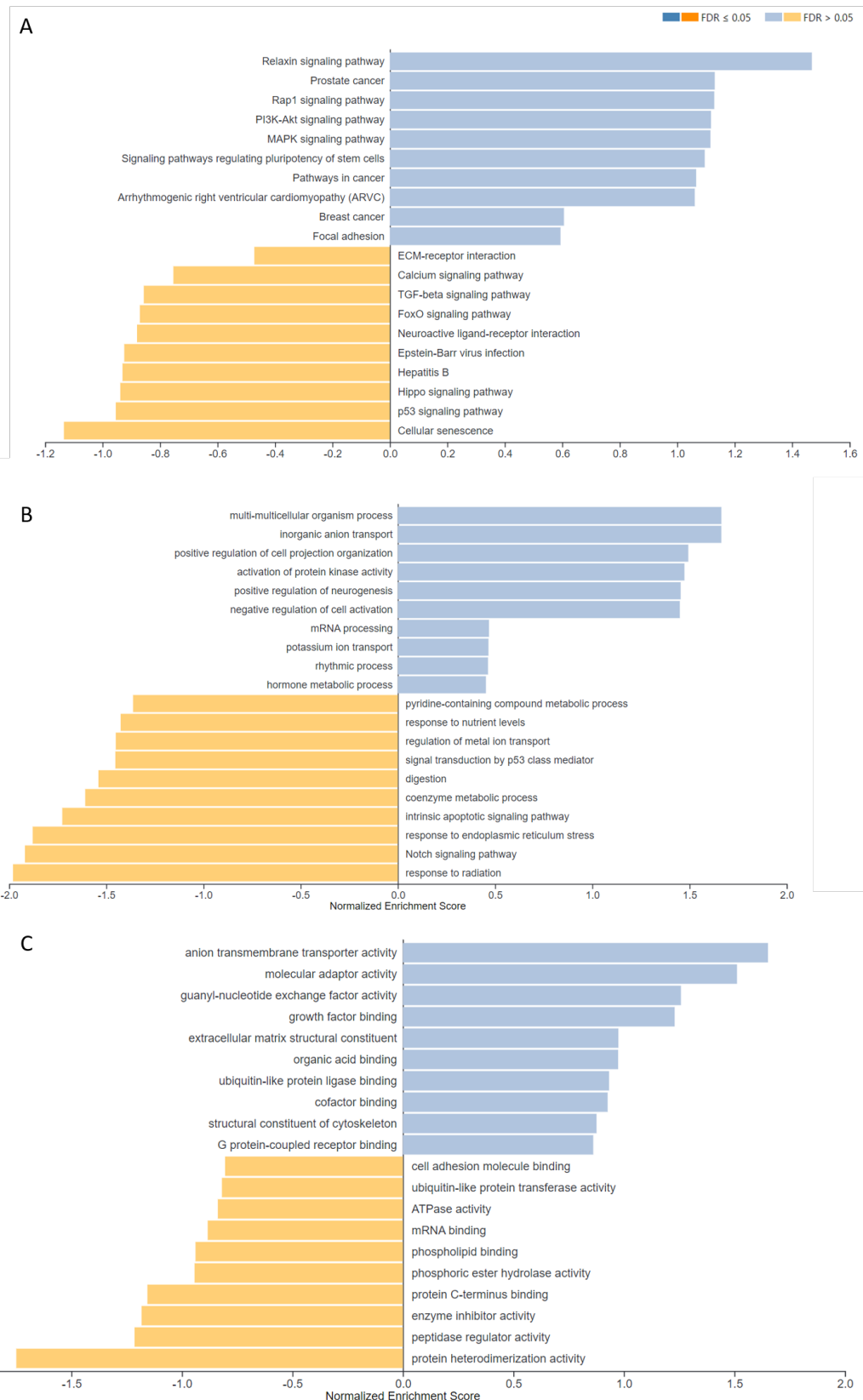




**Abbildung 39** Alle durchgeführten GO-Analysen der durch sT-herunterregulierten Gene. A) KEGG-Pathway-Analyse, B) GSEA-GO nach molekularer Funktion, C) GSEA-GO nach biologischen Prozessen. Analysiert wurden alle durch das sT-Ag herunterregulierten Gene (n=280) mit Hilfe von *webgestalt.org*.



**Abbildung 40** Alle durchgeführten GO-Analysen der durch sT-hochregulierten Gene. A) KEGG-Pathway-Analyse, B) GSEA-GO nach molekularer Funktion, C) GSEA-GO nach biologischen Prozessen. Analysiert wurden alle durch das sT-Ag hochregulierten Gene (n=110) mit Hilfe von *webgestalt.org*.



**Abbildung 41** Alle durchgeführten GSEA-Analysen aller sT-regulierten Gene A) KEGG-Pathway-Analyse, B) GSEA-GO nach molekularer Funktion, C) GSEA-GO nach biologischen Prozessen. Analysiert wurden alle durch das sT-Ag hochregulierten Gene (n=110) sowie durch sT-Ag herunterregulierten Gene (n=280) mit Hilfe von *webgestalt.org*.

**Tabelle 20** Liste sT-regulierter Gene in ausgewählten biologischen Prozessen und molekularen Funktionen („GO-Terms“) der RNA-seq-Daten aus den Abbildungen 21, 22 und 23. Die Analyse wurde mittels *webgestalt.org* durchgeführt.

GO-Term (ORA)	p-Wert
<i>Regulation of cell proliferation</i>	<i>4,8E-07</i>
	<b>Gensymbol Genname</b>
	ABCC8 ATP binding cassette subfamily C member 8
	ADGRB1 adhesion G protein-coupled receptor B1
	ADGRG1 adhesion G protein-coupled receptor G1
	AHR aryl hydrocarbon receptor
	AR androgen receptor
	CCNA1 cyclin A1
	CDH13 cadherin 13
	CDKN1A cyclin dependent kinase inhibitor 1A
	COL18A1 collagen type XVIII alpha 1 chain
	CORO1A coronin 1A
	CRIP2 cysteine rich protein 2
	DUSP15 dual specificity phosphatase 15
	ECM1 extracellular matrix protein 1
	EMX1 empty spiracles homeobox 1
	EPPK1 epiplakin 1
	FGFR1 fibroblast growth factor receptor 1
	ID1 inhibitor of DNA binding 1, HLH protein
	INPP5D inositol polyphosphate-5-phosphatase D
	JUN Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit
	LGALS3 galectin 3
	LIF LIF, interleukin 6 family cytokine
	MAPK11 mitogen-activated protein kinase 11
	MMP2 matrix metalloproteinase 2
	NDRG4 NDRG family member 4
	NGFR nerve growth factor receptor
	NOS2 nitric oxide synthase 2
	NOTCH1 notch receptor 1
	NR5A2 nuclear receptor subfamily 5 group A member 2
	NRK Nik related kinase
	P3H3 prolyl 3-hydroxylase 3
	PELI1 pellino E3 ubiquitin protein ligase 1
	PLAU plasminogen activator, urokinase

PRAMEF1	PRAME family member 1
PRAMEF12	PRAME family member 12
PRAMEF2	PRAME family member 2
PRDM1	PR/SET domain 1
PRNP	prion protein
PTPRU	protein tyrosine phosphatase, receptor type U
S100A6	S100 calcium binding protein A6
SERPINB5	serpin family B member 5
SULF2	sulfatase 2
TCF7	transcription factor 7
TGFB1I1	transforming growth factor beta 1 induced transcript 1
VIPR1	vasoactive intestinal peptide receptor 1

*Regulation of cell migration* 4,7E-06

#### **Gensymbol Gename**

ABCC8	ATP binding cassette subfamily C member 8
ADAMTS9	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif 9
ADGRB1	adhesion G protein-coupled receptor B1
ADGRG1	adhesion G protein-coupled receptor G1
ARAP3	ArfGAP with RhoGAP domain, ankyrin repeat and PH domain 3
CDH13	cadherin 13
COL18A1	collagen type XVIII alpha 1 chain
COL1A1	collagen type I alpha 1 chain
CORO1A	coronin 1A
DUSP3	dual specificity phosphatase 3
ECM1	extracellular matrix protein 1
EPPK1	epiplakin 1
FGFR1	fibroblast growth factor receptor 1
FLRT2	fibronectin leucine rich transmembrane protein 2
ITGA6	integrin subunit alpha 6
JUN	Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit
LGALS3	galectin 3
MCAM	melanoma cell adhesion molecule
NDRG4	NDRG family member 4
NOTCH1	notch receptor 1
PFN2	profilin 2
PLAU	plasminogen activator, urokinase

PLK2	polo like kinase 2
PTPRU	protein tyrosine phosphatase, receptor type U
RET	ret proto-oncogene
RHOC	ras homolog family member C
SEMA3B	semaphorin 3B

*ECM organization & extracellular structure organization* 2,3E-08

**Gensymbol Gename**

ADAMTS9	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 9
COL17A1	collagen type XVII alpha 1 chain
COL18A1	collagen type XVIII alpha 1 chain
COL1A1	collagen type I alpha 1 chain
COL1A2	collagen type I alpha 2 chain
COL6A1	collagen type VI alpha 1 chain
CRISPLD2	cysteine rich secretory protein LCCL domain containing 2
FLRT2	fibronectin leucine rich transmembrane protein 2
FOXF2	forkhead box F2
ITGA6	integrin subunit alpha 6
ITGA7	integrin subunit alpha 7
KLK4	kallikrein related peptidase 4
KLK5	kallikrein related peptidase 5
LAMB3	laminin subunit beta 3
MMP2	matrix metalloproteinase 2
NCAN	neurocan
NID1	nidogen 1
NOTCH1	notch receptor 1
SERPINB5	serpin family B member 5
SULF2	sulfatase 2

*Plasma membrane bounded cell projection organization & cell projection organization* 8,5E-07

**Gensymbol Gename**

ADGRB1	adhesion G protein-coupled receptor B1
ATCAY	ATCAY, caytaxin
B9D1	B9 domain containing 1
CDC42EP3	CDC42 effector protein 3
CDH13	cadherin 13
CLUAP1	clusterin associated protein 1

---

CORO1A	coronin 1A
CTNNA2	catenin alpha 2
DYNC2H1	dynein cytoplasmic 2 heavy chain 1
EMX1	empty spiracles homeobox 1
EPS8L2	EPS8 like 2
FARP1	FERM, ARH/RhoGEF and pleckstrin domain protein 1
FEZ1	fasciculation and elongation protein zeta 1
FGFR1	fibroblast growth factor receptor 1
FLRT2	fibronectin leucine rich transmembrane protein 2
ID1	inhibitor of DNA binding 1, HLH protein
ITGA6	integrin subunit alpha 6
ITM2C	integral membrane protein 2C
JUN	Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit
L1CAM	L1 cell adhesion molecule
LRRC49	leucine rich repeat containing 49
MAP1A	microtubule associated protein 1A
METRN	meteorin, glial cell differentiation regulator
NDRG4	NDRG family member 4
NGFR	nerve growth factor receptor
NOTCH1	notch receptor 1
NPTX1	neuronal pentraxin 1
NRK	Nik related kinase
PFN2	profilin 2
PLEKHA1	pleckstrin homology domain containing A1
PLK2	polo like kinase 2
PRNP	prion protein
RET	ret proto-oncogene
S100A6	S100 calcium binding protein A6
SAMD14	sterile alpha motif domain containing 14
SEMA3B	semaphorin 3B
STMN2	stathmin 2
STX1B	syntaxin 1B
SYT17	synaptotagmin 17
TCTN1	tectonic family member 1
USH1G	USH1 protein network component sans
ZMYND10	zinc finger MYND-type containing 10

GO-Term (GSEA)	p-Wert
<i>Intrinsic apoptotic signaling</i>	<i>1,2E-02</i>
	<b>Gensymbol Genname</b>
	BOK BCL2 family apoptosis regulator BOK
	HIPK1 homeodomain interacting protein kinase 1
	CRIP1 cysteine rich protein 1
	CDKN1A cyclin dependent kinase inhibitor 1A
	CDIP1 cell death inducing p53 target 1
	ATP2A1 ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca <sup>2+</sup> transporting 1
	CD44 CD44 molecule (Indian blood group)
	CHAC1 ChaC glutathione specific gamma-glutamylcyclotransferase 1
	PDIA2 protein disulfide isomerase family A member 2
	EDA2R ectodysplasin A2 receptor
<i>Positive regulation of cell projection organization</i>	<i>5,9E-02</i>
	<b>Gensymbol Genname</b>
	NGFR nerve growth factor receptor
	STMN2 stathmin 2
	L1CAM L1 cell adhesion molecule
	RET ret proto-oncogene
	SYT17 synaptotagmin 17
	FGFR1 fibroblast growth factor receptor 1
	ZMYND10 zinc finger MYND-type containing 10
<i>Notch signaling pathway</i>	<i>7,3E-03</i>
	<b>Gensymbol Genname</b>
	FOXA1 forkhead box A1
	BMP2 bone morphogenetic protein 2
	SORBS2 sorbin and SH3 domain containing 2
	BHLHE40 basic helix-loop-helix family member e40
	NOTCH1 notch receptor 1
	CHAC1 ChaC glutathione specific gamma-glutamylcyclotransferase 1
	KRT19 keratin 19
	PGAM2 phosphoglycerate mutase 2



<i>Response to radiation</i>	<i>4,4E-03</i>
<b>Gensymbol Genname</b>	
JUN	Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit
PLK3	polo like kinase 3
MFAP4	microfibril associated protein 4
BHLHE40	basic helix-loop-helix family member e40
CDKN1A	cyclin dependent kinase inhibitor 1A
NDRG4	NDRG family member 4
SYNPO	synaptopodin
CRIP1	cysteine rich protein 1
ABCC8	ATP binding cassette subfamily C member 8
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
CDS1	CDP-diacylglycerol synthase 1
ABCG5	ATP binding cassette subfamily G member 5
<i>Response to ER stress</i>	<i>1,8E-02</i>
<b>Gensymbol Genname</b>	
JUN	Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit
PDIA2	protein disulfide isomerase family A member 2
CHAC1	ChaC glutathione specific gamma-glutamylcyclotransferase 1
ATP2A1	ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca <sup>2+</sup> transporting 1
GFPT1	glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 1
BOK	BCL2 family apoptosis regulator BOK
<i>Positive regulation of neurogenesis</i>	<i>5,9E-02</i>
<b>Gensymbol Genname</b>	
NGFR	nerve growth factor receptor
STMN2	stathmin 2
L1CAM	L1 cell adhesion molecule
RET	ret proto-oncogene
LIF	LIF, interleukin 6 family cytokine
SYT17	synaptotagmin 17
FGFR1	fibroblast growth factor receptor 1
<i>Carbohydrate binding</i>	<i>0,4346</i>
<b>Gensymbol Genname</b>	
PKD1L2	polycystin 1 like 2 (gene/pseudogene)

	LGALS3	galectin 3
	NCAN	neurocan
<i>Glycosyl transferases</i>	<i>0.6495</i>	
	<b>Gensymbol</b>	<b>Genname</b>
	B4GALNT1	beta-1,4-N-acetyl-galactosaminyltransferase 1
	ALG10B	ALG10B, alpha-1,2-glucosyltransferase
	ART5	ADP-ribosyltransferase 5
	GLT1D1	glycosyltransferase 1 domain containing 1
	QPRT	quinolinate phosphoribosyltransferase
<i>Cell adhesion molecule binding</i>	<i>0.4783</i>	
	<b>Gensymbol</b>	<b>Genname</b>
	CDH13	cadherin 13
	VASN	vasorin
	EPS8L2	EPS8 like 2
	CTNNA2	catenin alpha 2
	ITGA6	integrin subunit alpha 6
	DST	dystonin
<i>Glycosaminoglycan binding</i>	<i>0.5597</i>	
	<b>Gensymbol</b>	<b>Genname</b>
	PRNP	prion protein
	NCAN	neurocan
	FGFR1	fibroblast growth factor receptor 1
	SULF2	sulfatase 2
<i>ECM binding &amp; structurell consituent</i>	<i>0.4918</i>	
	<b>Gensymbol</b>	<b>Genname</b>
	COL1A2	collagen type I alpha 2 chain
	NID1	nidogen 1
	COL18A1	collagen type XVIII alpha 1 chain
	COL6A1	collagen type VI alpha 1 chain
	COL17A1	collagen type XVII alpha 1 chain
	NID1	nidogen 1
	LGALS3	galectin 3

**Tabelle 21 Vollständige Liste aller auf WaGa-Zellen exprimierten Liganden.** Die Expression der Moleküle auf der Zelloberfläche wurde durch ein Oberflächenscreening (MACS Marker Screen, Miltenyi Biotec) bestimmt. Für die allgemeine Expression wurden die DMSO-behandelten WaGa shRNA sT- und WaGa shRNA scr-Kontrollzelllinien analysiert und für jeden Marker die *Median Fluorescence Intensity* (MFI) bestimmt. Je nach Expressionsstärke wurden die Liganden in drei verschiedene Gruppen eingeteilt:  $MFI \geq 10.000$ ,  $MFI 1.000-10.000$ , und  $MFI 100-1.000$ . Als Schwellenwert für die Expression eines Liganden wurde eine MFI von 100 in einer der beiden DMSO-behandelten Zelllinien festgelegt.

Gruppe	Marker	WaGa shRNA sT +DMSO	WaGa shRNA scr +DMSO
$MFI \geq 10.000$	CD44	93177,4	185240,5
	CD81	168188,4	163209,5
	CD147	155320,3	127306,5
	CD98	116462,3	138520,5
	TRA-1-85	69959,5	54260,5
	CD298	51962	39815
	CD326	38202	41842
	CD56	35886,4	41282,5
	PTK7	27923,5	37191,5
	CD24	35975,4	31902,5
	CD156c	27581,3	32437,5
	CD151	25230,3	29375,5
	CD138	21324,3	28233,5
	CD227	16405	19432
	CD47	16598,4	17437,5
	CD155	14360,3	17073,5
	CD220	12128	14249
	CD46	10269,4	13517,5
	CD71	7538,4	10251,5
$MFI 1.000 - 10.000$	CD200	8472	6519
	CD111	6264,3	8188,5
	CD99	7930,3	5938,5
	CD63	6835,4	7313,5
	Jagged2	6622,5	6332,5
	CD318	4870	6535
	CD58	4833,4	4004,5
	CD29	4514,4	4731,5
	CD9	4503,4	4268,5
	CD222	4241	4423
	CD184	1783,3	3064,5
	CD49c	2961,4	2918,5
	CD117	1638,3	2399,5

(fortgesetzt)

Gruppe	Marker	WaGa shRNA sT +DMSO	WaGa shRNA scr +DMSO
MFI 1.000 - 10.000 (fortgesetzt)	ErbB3	1516,5	2205,5
	CD134	1678,3	2038,5
	CD217	1030	1837
	PSA-NCAM	1828,5	302,5
	HLA-A2	917,5	1613,5
	SSEA-5	1246,5	1389,5
	CD172a	1314,3	1352,5
	CD100	1221,3	1236,5
	CD164	1147,3	899,5
	CD51	708,4	1116,5
	CD239	562	1024
MFI $\geq$ 100 - 1.000	HLA-ABC	920,5	804,5
	CD304	822	920
	IFNAR2	896,5	882,5
	CD146	894,3	437,5
	CD119	823,3	863,5
	CD276	453	843
	HLA-A2	622,5	809,5
	CD82	608,4	763,5
	CD57	408,4	714,5
	HLA_class_I	600,5	586,5
	CD221	597	430
	CD143	488,3	570,5
	CD137L	560,3	389,5
	HLA-B7	553,5	540,5
	CD148	384,3	349,5
	CX3CR1	369,5	325,5
	CD49f	295,4	313,5
	KLRG1	291,5	187,5
	fMLP_receptor	273,5	265,5
	CD107a	210,3	264,5
	CD266	218	262
GPR56	258,5	108,5	
DLL1	243,5	246,5	
CD282	236	220	
CD61	135,4	231,5	

(fortgesetzt)

Gruppe	Marker	WaGa shRNA sT +DMSO	WaGa shRNA scr +DMSO
MFI $\geq$ 100 - 1.000 (fortgesetzt)	CD157	222,3	183,5
	O4	212,5	85,5
	CD79b	211,4	119,5
	CD195	203	203
	CD362	155	187
	CD170	141,3	181,5
	CD234	160	103
	CD51	109,4	157,5
	Plexin-D1	147,5	151,5
	TCR	144,5	111,5
	CD83	92,4	141,5
	CD199	137	95
	ROR1	109,5	133,5
	CD158a	131,3	93,5
	CD171	126,3	62,5
	CD165	122,3	82,5
	CD266	117,4	86,5
	CD144	112,3	61,5
	CD114	111,3	84,5
	CD275	82	105
CD317	102	63	
CD166	100,3	62,5	

**Tabelle 22 Vollständige Liste aller durch sT-regulierten Oberflächenmarker auf WaGa-Zellen.**

Die Expression der Moleküle auf der Zelloberfläche wurde durch ein Oberflächenscreening (MACS Marker Screen, Miltenyi Biotec) bestimmt. Der  $\text{Log}_2\text{diff}$  gibt die Unterschiede durch die Anwesenheit des sT-Ags an. Dazu wurden die MFIs aller Marker der Dox-behandelten WaGa shRNA sT-Zellen und WaGa shRNA scr-Kontrollzelllinien jeweils auf ihre DMSO-Kontrollen normalisiert, der  $\text{Log}_2\text{Fold Change}$  beider Zelllinien berechnet und diese voneinander subtrahiert, um die  $\text{Log}_2\text{diff}$  zu erhalten. Als Schwellenwert für die Veränderung der Expression eines Liganden durch das sT-Ag wurde  $\pm 0,1$  festgelegt. Für die Analyse wurden alle Marker berücksichtigt, die in einer der vier Zelllinien exprimiert werden ( $\text{MFI} \geq 100$ ). Insgesamt werden 74 von 371 untersuchten Liganden durch das sT-Ag auf der Oberfläche der WaGa-Zellen reguliert, wovon 54 Liganden durch das sT-Ag herunterreguliert (linke Spalte) und 20 Liganden durch das sT-Ag hochreguliert werden (rechte Spalte).

<b>durch sT herunterreguliert (54)</b>		<b>durch sT hochreguliert (20)</b>	
<b>Name</b>	<b><math>\text{Log}_2\text{diff}</math></b>	<b>Name</b>	<b><math>\text{Log}_2\text{diff}</math></b>
PSA-NCAM	1,96	CD222	-0,54
CD95	1,78	CD83	-0,49
CD146	1,54	O4	-0,49
CD344	1,39	CD44	-0,45
CD57	1,31	CD156c	-0,45
CD171	1,30	CD166	-0,43
GPR56	1,29	CD157	-0,41
CD275	1,23	CD71	-0,41
DLL1	1,18	CD170	-0,36
CD266	1,18	Jagged2	-0,34
HLA-A2	1,15	HLA class I	-0,31
CD49f	1,12	CD100	-0,31
SSEA-5	1,12	CD144	-0,30
CD282	0,92	CD63	-0,29
CD239	0,91	CD164	-0,28
Plexin-D1	0,86	ErbB-3	-0,27
HLA-A2	0,70	CD317	-0,23
CD82	0,67	CD165	-0,23
CD184	0,66	CD138	-0,14
CXCR1	0,62	CD47	-0,11
CD276	0,59		
CD58	0,53		
CD195	0,52		
KLRG1	0,51		
CD29	0,50		
CD117	0,49		
CD61	0,48		
CD266	0,46		

---

(fortgesetzt)

durch sT herunterreguliert (54)

Name	Log <sub>2</sub> diff
CD151	0,46
CD49c	0,39
CD51	0,38
CD111	0,37
CD119	0,35
CD46	0,34
IFNAR2	0,33
CD137L	0,33
CD134	0,31
CD51	0,31
CD9	0,29
CD318	0,27
CD227	0,27
CD148	0,26
fMLP receptor	0,26
HLA-ABC	0,24
ROR1	0,22
CD81	0,19
CD158a	0,18
CD155	0,18
PTK7	0,16
CD326	0,16
TRA-1-85	0,15
CD114	0,15
CD98	0,13
CD220	0,10

---

## Indizes

### Abbildungsverzeichnis

1	Phylogenetische Analyse des LT-Antigens in verschiedenen Polyomaviren . . .	3
2	Merkelzellkarzinom . . . . .	4
3	Schematisches Modell der MCPyV-induzierten Tumorgenese . . . . .	9
4	Schematische Darstellung des MCPyV-Genoms . . . . .	19
5	Schematische Darstellung des MCPyV-T-Antigen Lokus . . . . .	23
6	Schematisches Modell des Metastasierungsprozesses . . . . .	29
7	Das Prinzip des Tet-ON-Systems . . . . .	54
8	Schematischer Versuchsaufbau der dynamischen Adhäsionsversuche . . . . .	74
9	Schematische Übersicht des shRNA-Lokus . . . . .	83
10	Effizienz der induzierbaren shRNAs hinsichtlich sT-Expressionslevel . . . . .	85
11	Effizienz der induzierbaren shRNAs hinsichtlich LT-Expressionslevel. . . . .	86
12	MTT-Assays der WaGa shRNA-Knockdown-Zelllinien. . . . .	87
13	Wachstumskurven der WaGa shRNA-Knockdown-Zelllinien . . . . .	88
14	Dynamische Adhäsionsversuche auf humanen und murinen E- und P-Selektinen	90
15	Expression des sT-Ags in verschiedenen MCC-Zelllinien . . . . .	91
16	Dynamische Adhäsion von WaGa-Zellen an das humane E-Selektin in Abhän- gigkeit der T-Antigene . . . . .	92
17	Dynamische Adhäsion von WaGa-Zellen an Endothelzellen . . . . .	93
18	Statische Adhäsion von WaGa-Zellen an Selektine . . . . .	94
19	Zellinvasion von WaGa-Zellen in Abhängigkeit der T-Antigene . . . . .	95
20	Transkriptomanalyse von WaGa-Zellen in Abhängigkeit des sT-Antigens . . .	97
21	Gene-Ontology-Analyse mittels ORA nach biologischen Prozessen . . . . .	100
22	Gene-Ontology-Analyse mittels GSEA nach biologischen Prozessen . . . . .	101
23	Gene-Ontology-Analyse mittels GSEA nach molekularer Funktion. . . . .	102
24	Exprimierte Liganden auf der WaGa-Zelloberfläche . . . . .	105
25	Differentielle Expression von Zelloberflächenmolekülen auf WaGa-Zellen in Abhängigkeit des sT-Antigens . . . . .	107
26	Expression von Sialyl-Lewis A und X auf WaGa-Zellen . . . . .	108



---

27	Expression ausgewählter Oberflächenmarker in Abhängigkeit des sT-Ags . . .	109
28	Expression ausgewählter Oberflächenmarker bei sT-Überexpression . . . . .	110
29	Dynamische Adhäsion von WaGa-Zellen in Abhängigkeit von CD44 . . . . .	112
30	Apoptose-Assays in Abhängigkeit der T-Antigene und CD95 . . . . .	114
31	Beispielaufnahme des Phagozytose-Assays . . . . .	115
32	Phagozytose-Assays in Abhängigkeit des sT-Antigens und CD47 . . . . .	117
33	Übersicht über die Rolle des MCPyV-sT-Antigens in der Immunevasion . . .	141
34	Übersicht über die Ergebnisse dieser Arbeit und die Rolle des MCPyV-sT- Antigens in der Metastasierung . . . . .	144
35	Dynamische Adhäsion der WaGa-Zellen an das murine E- und P-Selektin . .	176
36	Bestätigung der RNA-seq-Daten mittels RT-qPCR . . . . .	177
37	Anteil früh-apoptotischer Zellen in WaGa-T-Ag-Knockdown-Zellen . . . . .	178
38	Anteil normaler (nicht-apoptotischer) Zellen in WaGa-T-Ag-Knockdown-Zellen	179
39	Alle GO-Analysen der durch sT-herunterregulierten Gene. . . . .	188
40	Alle GO-Analysen der durch sT-hochregulierten Gene . . . . .	189
41	Alle GSEA-Analysen aller sT-regulierten Gene . . . . .	190

## Tabellenverzeichnis

1	Kommerzielle Systeme . . . . .	34
2	Verwendete Reagenzien und Laborhilfsmittel . . . . .	35
3	Plasmide . . . . .	37
4	Primer . . . . .	38
5	shRNAs & siRNAs . . . . .	39
6	Antikörper . . . . .	40
7	Allgemeine Lösungen und Puffer . . . . .	42
8	Enzyme . . . . .	44
9	Puffer für die Herstellung kompetenter Bakterien . . . . .	46
10	Verwendete Zelllinien . . . . .	46
11	Medien(-zusätze) & Reagenzien für die Zellkultur . . . . .	48
12	Übersicht über die Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien nach Zelllinien & sonstige verwendete Puffer . . . . .	49
13	Plasmid-DNA-Transfektion . . . . .	58
14	SYBR Green - RT-qPCR-Ansatz . . . . .	66
15	SYBR Green - RT-qPCR-Bedingungen . . . . .	67
16	Puffer für SDS-PAGE . . . . .	69
17	Fluoreszenz-basierte Zellmarkierung . . . . .	78
18	Top 10 durch sT-transkriptionell-regulierter Gene . . . . .	98
19	Transkriptomanalyse von WaGa-Zellen in Abhängigkeit des sT-Antigens . . . . .	180
20	Liste sT-regulierter Gene in ausgewählten biologischen Prozessen und moleku- laren Funktionen („GO-Terms“) . . . . .	191
21	Liste aller auf WaGa-Zellen exprimierten Liganden . . . . .	198
22	Liste aller durch sT-regulierten Oberflächenmarker auf WaGa-Zellen . . . . .	201

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	anti
°C	Grad Celsius
APC	Allophycocyanin
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{L}$	Mikroliter
4E-BP1	eIF4E Bindeprotein
57kT	57kT-Antigen
<i>ori</i>	<i>origin of replication</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ALTO	<i>Alternative frame of the LT open reading frame</i>
Amp	Ampicillin
APC/C	<i>Anaphase promoting complex</i>
BKPyV	BK Virus
bp	Basenpaare
Brd4	Bromodomain-containing protein 4
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
cDNA	complementary DNA
CTC	engl. <i>circulating tumor cells</i>
CPI	Checkpoint-Inhibitoren
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DIC	<i>Differential interference contrast</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Deoxyribonukleotid-Mix
Dox	Doxycyclin
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	<i>Early Region</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>

---

FBS	<i>fetal bovine serum</i>
Fc	<i>fragment crystallisable</i>
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
FITC	Fluorescein
g	Gramm
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GO	<i>Gene-Ontology</i>
GSEA	<i>Gene Set Enrichment Analysis</i>
HBV, HCV	Hepatitis B/C Virus
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hE	humanes E-Selektin (in Endothelzellen)
hP	humanes P-Selektin (in Endothelzellen und Thrombozyten (engl. <i>platelet</i> -Selectin))
HHV8	Humanes Herpesvirus 8 (KSHV)
HPV	Humanes Papillomvirus
HPyV	Humanes Polyomavirus
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
HSC70	<i>Heat shock Protein 70</i>
HSV-1	Herpes Simplex Virus Typ 1
HTLV-1	humane T-lymphotrope Virus
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
IKK	I $\kappa$ B Kinase
I $\kappa$ B	Inhibitor von $\kappa$ B
JCPyV	JC Virus
kB	Kilobasen
kBp	Kilobasenpaare
KD	<i>Knockdown</i>
kDA	Kilo Dalton
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
KSHV	Karposi-Sarkom-Herpesvirus (HHV8)
L	Liter
LB	Luria-Broth

---

LSD	<i>LT Stabilization Domain</i>
LT-Ag	Large T-Antigen
LT <sub>trunc</sub>	<i>truncated/ verkürztes LT-Ag</i>
M	molar
Mb	Megabasen
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MWPyV	Malawi Polyomavirus
MCC	Merkelzellkarzinom
MCPyV	Merkelzell-Polyomavirus
MCV-miR-M1	microRNA des MCPyV
MDM2, MDM4	Mouse double minute 2/4 homolog
MFI	<i>Median Fluorescence Intensity</i>
MLV	Murines Leukämievirus
min	Minuten
miRNA	microRNA
mL	Milliliter
mm	Millimeter
MMBIR	<i>microhomology-mediated break-induced replication</i>
mE	murines E-Selektin (in Endothelzellen)
mP	murines P-Selektin (in Endothelzellen und Thrombozyten (engl. <i>platelet-Selectin</i> ))
MPyV	Murines Polyomavirus
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
MUR	<i>MCPyV Unique Region</i>
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
NCCR	<i>Non-Coding Control Region</i>
NEMO	<i>NF-<math>\kappa</math>B Essential Modulator</i>
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NHEJ	<i>non-homologous end-joining</i>
NK-Zellen	natürliche Killerzellen

---

NP-40	Nonidet P-40
NJPyV	New Jersey Polyomavirus
NSE	<i>Neuron-Specific Enolase</i>
nt	Nukleotid
OBD	<i>Origin Binding Domain</i>
ORA	<i>Over-Representation Analysis</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGFR	<i>Platelet-derived growth factor receptor</i>
PEI	Polyethylenimin
Pen/Strep	Penicillin-Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PI	Phagozytischer Index
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PML	Progressive multifokale Leukoenzephalopathie
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP2A	Protein Phosphatase 2A
PP4C	Protein Phosphatase 4C
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PyV	Polyomaviren
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
PVAN	Polyomavirus-assoziierte Nephropathie
RacPyV	<i>Raccoon</i> Polyomavirus
Rb	Retinoblastom-Protein
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SCF	<i>Skp, Cullin, F-box containing complex</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

---

Seq	Sequenzierung
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
sLeA/sLeX	Sialyl-Lewis A bzw. X
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SSC	<i>squamous cell carcinoma</i>
sT-Ag	small T-Antigen
STING	<i>stimulator of IFN genes</i>
STLPyV	St. Louis Polyomavirus
SV40	Simian Virus 40
TBP	<i>TATA-Binding Protein</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
T <sub>regs</sub>	regulatorische T-Zellen
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol
TSPyV	Trichodysplasia Spinulosa Polyomavirus
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
VP1, VP2	Virales Protein 1,2
w/v	Gewicht pro Volumen
WB	Western Blot
wt	Wildtyp
xg	<i>gravity</i>

---

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich gern bei allen nachstehenden Personen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Nicole Fischer, die mir die Möglichkeit gegeben hat diese Arbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchzuführen. Danke für die sehr gute Betreuung, die inspirierenden Ideen und die Bereitstellung dieses spannenden Forschungsprojektes.

Ebenso möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Thomas Dobner für die Ko-Betreuung dieser Arbeit bedanken.

Ein großes Dankeschön geht auch an Prof. Dr. Adam Grundhoff und die Mitglieder seiner Arbeitsgruppe für die Unterstützung, konstruktiven Anmerkungen und gute Zusammenarbeit in zahlreichen Team-Meetings und Scientific Retreats. Hier möchte ich auch Daniela Indenbirken und Sanamjeet Virdi für die Durchführung und bioinformatische Auswertung der Transkriptomanalyse danken.

Ein großer Dank geht ebenfalls an alle Mitarbeiter des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene für die gute Arbeitsatmosphäre. Allen voran danke ich den Mitgliedern unserer kleinen „Mibi-Familie“, die mit der Zeit zu guten Freunden geworden sind. Danke für die schönen und unterhaltsamen Stunden innerhalb und außerhalb des Instituts. Besonders möchte ich an dieser Stelle Samira Weißelberg für ihre Unterstützung bei der Präparation von „Premium“-Makrophagen und das Teilen ihres enormen Fachwissens über die Mikroskopie danken. Maren Rudolph bin ich überaus dankbar für das Teilen kulinarischer Köstlichkeiten.

Außerdem möchte ich allen Mitgliedern der AG Fischer meinen herzlichen Dank aussprechen: Dr. Manja Czech-Sioli für das Teilen ihres großen (Fach-) Wissens, ihrer Labor-Expertise, und ihres grandiosen Musikgeschmacks, Veronika Brinschwitz für ihre positive Energie und Motivation, Claudia Schmidt für ihre Laborexpertise und natürlich Hannes Roggenkamp, unserem Quotenmann. Spezieller Dank gilt an dieser Stelle besonders Denis(e) Ohnezeit, die mir in guten wie in schlechten Zeiten mit Rat und Tat zur Seite stand, mir immer den Rücken gestärkt hat und weil ihr Alter Ego mich stets zum Lachen bringt.



Ebenso möchte ich mich bei Prof. Klaus Ruckdeschel und allen Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe für die super Stimmung im Labor bedanken.

Einen wichtigen Beitrag für die Durchführung der Experimente leistete auch die UMIF, Virgilio und Bernd, durch ihre Unterstützung bei den mikroskopischen Aufnahmen, Prof. Udo Schumacher und seine Arbeitsgruppe bei der Durchführung der Adhäsionsversuche und Christian Körner mit der Hilfe beim Zelloberflächen-Screening. Außerdem möchte ich der HPI FACS Core Facility, Arne Düsedau und Jana Henessen, für ihre Unterstützung am FACS danken.

Selbstverständlich möchte ich mich hier auch herzlich bei meinen fleißigen Korrekturleserinnen bedanken: Denise, Vero, Marie und meiner besten Freundin Maike. Ich danke euch!

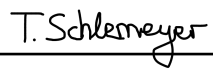
Ein großes Dankeschön geht vor allem auch an meine Eltern, die mich auf meinem Weg immer unterstützt haben und immer für mich da waren. Gleichmaßen danke ich meinem Bruder Lukas und seiner Frau Aurelia für seine Unterstützung, sowie meinen beiden zuckersüßen Neffen Felix & Alexander, die mir stets ein Lächeln aufs Gesicht zaubern.

Zu guter Letzt möchte ich mich noch bei meinen lieben Freunden und amigos bedanken, die ich im Bachelor- und Masterstudium kennenlernen durfte, und mich auf meiner Reise stetig begleitet und unterstützt haben. Ohne euch hätte ich es nicht geschafft und es wäre definitiv nicht halb so schön gewesen.

## Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, den 12.03.2021

T. Schlemeyer

---

Tabea Schlemeyer