

**Charakterisierung des onkogenen Potentials
von HPV8-E2 in transgenen Mäusen und
Analyse der Matrix-Metalloproteinase
Expression in HPV8 induzierten Hauttumoren**



Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Regina Pfefferle

aus Bergisch Gladbach

Köln, 2007

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. Herbert Pfister
Prof. Dr. Jens Brüning
Vorsitzender: Prof. Dr. Siegfried Roth
Beisitzer: Dr. Matthias Cramer
Tag der Disputation: 12.02.2008

Den Menschen, die mich begleiten.

Das Erkennen ist nicht nur für Philosophen,
sondern für jeden Menschen die höchste Lust.

Poetik, Aristoteles (384-322 v. Chr.)

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG	1
1.1. Papillomviren	1
1.2. Die Infektion durch Papillomviren und deren Replikation.....	3
1.3. Genomaufbau.....	4
1.4. Die frühen Virusproteine	6
1.4.1. Das E1-Protein	6
1.4.2. Das E2-Protein	6
1.4.3. Das E4-Protein	8
1.4.4. Das E5-Protein	8
1.4.5. Das E6-Protein	9
1.4.6. Das E7-Protein	10
1.5. Tumorinduktion durch Papillomviren	10
1.6. Beeinflussung der Hautkarzinogenese durch UV-Strahlung	13
1.7. Transgene Mausmodelle	14
1.8. Matrix-Metalloproteinasen.....	16
1.9. Ziel der vorliegenden Arbeit.....	18
II. MATERIAL	19
2.1. Versuchstiere	19
2.2. Nukleinsäuren	19
2.2.1. Synthetisch hergestellte Oligonukleotide.....	19
2.2.2. DNA-Längenstandards	20
2.2.3. sonstige natürliche Nukleinsäuren.....	20
2.3. Proteine.....	21
2.3.1. Enzyme	21
2.3.2. Antikörper	21

2.4. Reagenzien	21
2.4.1. Sonstige Chemikalien	21
2.4.2. Puffer und Lösungen	22
2.4.3. Narkosemittel für Mäuse:.....	24
2.4.4. Reagenziensysteme	24
2.5. Laborgeräte	24
III. METHODEN.....	26
3.1. Etablierung der HPV8-E2 transgenen Mäuse	26
3.1.1. Kreuzung der Mäuse	26
3.1.2. Markierung der Mäuse.....	26
3.2. DNA-Methoden	27
3.2.1. Extraktion der genomischen DNA aus Schwanzbiopsien	27
3.2.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	27
3.3. RNA Methoden	29
3.3.1. Isolierung der Gesamt-RNA	29
3.3.2. Synthese der cDNA	29
3.3.3. Quantifizierung der HPV8-E2 mRNA.....	30
3.4. Charakterisierung der HPV8-E2 transgenen Mäuse.....	31
3.4.1. Makroskopische Auswertung.....	31
3.4.2. Histologische Auswertung der E2 induzierten Hauttumore.....	31
3.5. Experimentelle Manipulation der Mäuse.....	31
3.5.1. Narkotisierung der Tiere	31
3.5.2. UV Bestrahlung der Mäuse	32
3.5.3. Wundheilungsexperimente	32
3.6. Proteinanalyse	32
3.6.1. Präparation von Gewebeextrakten	32
3.6.2. Quantitative Proteinbestimmung mit BCA	33
3.6.3. Lokalisation der gelatinolytischen Aktivität mittels <i>in situ</i> Zymographie ...	33
3.6.4. Analyse der Gelatinasen mittels <i>in vitro</i> Substratzymographie	34
3.7. Immunhistochemie	34

IV. ERGEBNISSE	36
4.1. Etablierung K14-HPV8-E2 transgener Mauslinien.....	36
4.2. Quantitative Bestimmung der HPV8-E2 mRNA Expression	39
4.3. Spontane Tumorentstehung in HPV8-E2 transgenen Mäusen.....	40
4.3.1. Zeitlicher Verlauf der Tumorentwicklung	40
4.3.2. Makroskopisches Bild der spontanen Hautläsionen	43
4.3.3. Histologie der spontanen Hauttumoren	45
4.4. Tumorentwicklung der HPV8-E2 Mäuse nach UV-Bestrahlung	48
4.4.1. Verlauf der UV-induzierten Tumorentstehung	48
4.4.2. Histologie der UV-induzierten Hauttumore	49
4.5. Immunhistochemische Charakterisierung der Spindelzelltumore	50
4.6. Wundheilungsexperimente mit HPV8-E2 transgenen Mäusen	52
4.7. Expression der Matrix-Metalloproteinasen.....	54
4.7.1. Lokalisierung der gelatinolytischen Aktivität in HPV8-GFR Mäusen.....	54
4.7.2. Gelatinolytische Aktivität in Tumoren der HPV8-E2 Mäuse.....	55
4.7.3. Gelatinolytische Aktivität in Tumoren der HPV8-E6 Mäuse.....	56
4.7.4. Charakterisierung der Gelatinasen	57
V. DISKUSSION	58
VI. ZUSAMMENFASSUNG.....	65
VII. ABSTRACT	66
VIII. LITERATURVERZEICHNIS.....	67
IX. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	84
X. DANKSAGUNG	87
XI. ERKLÄRUNG.....	88
XII. LEBENSLAUF.....	89

I. EINLEITUNG

1.1. Papillomviren

Gutartige Neubildungen der Haut in Form von Warzen sind seit Jahrhunderten bekannt. Die infektiöse Genese belegten erstmals Licht und Variot im Jahre 1894 durch experimentelle Übertragungen mit rohem Warzenextrakt. Im Jahre 1907 konnte eine Übertragung von Warzen des Menschen auf Freiwillige durch bakterienfreie Ultrafiltrate und damit die virale Genese nachgewiesen werden (Ciuffo, 1907). Rous und Beard (1935) konnten das karzinogene Potential von Papillomen des Kaninchens belegen, die nach Infektion mit dem cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) entstanden waren. Papillomviren (PV) sind weit verbreitet und konnten unter anderem bei Hunden (COPV), Rindern (BPV), Schafen, Elchen, Pferden und Vögeln nachgewiesen werden (de Villiers *et al.*, 2004). PV sind kleine, ikosaedrische, nicht-umhüllte, doppelsträngige DNA Viren, welche die eigenständige Familie der Papillomaviridae bilden. Sie zeigen eine stark ausgeprägte Wirts- und Gewebespezifität, sind streng epitheliotrop und können ausschließlich in differenzierenden Keratinozyten replizieren.

Heute sind beim Menschen über 100 komplett sequenzierte humane Papillomviren (HPV) bekannt, die auf Grund ihrer Sequenzhomologie (<90%) innerhalb des hoch konservierten Hauptstrukturproteingens L1 in fünf Genera (Alpha, Beta, Gamma, Mu, Nu) unterteilt werden (de Villiers *et al.*, 2004). Die HPV, welche die Schleimhaut des Anogenitaltrakts infizieren und daher als genitale PV bezeichnet werden, gehören zum Genus- α (Abb. 1). Zahlreiche hautspezifische (kutane) HPV (HPV5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19-25, 36, 38 und 47) wurden von Patienten mit der seltenen Erbkrankheit *Epidermodysplasia verruciformis* (EV) isoliert und daher als EV-assoziierte PV bezeichnet; heute ordnet man diese Virustypen dem Genus- β zu (Abb. 1).

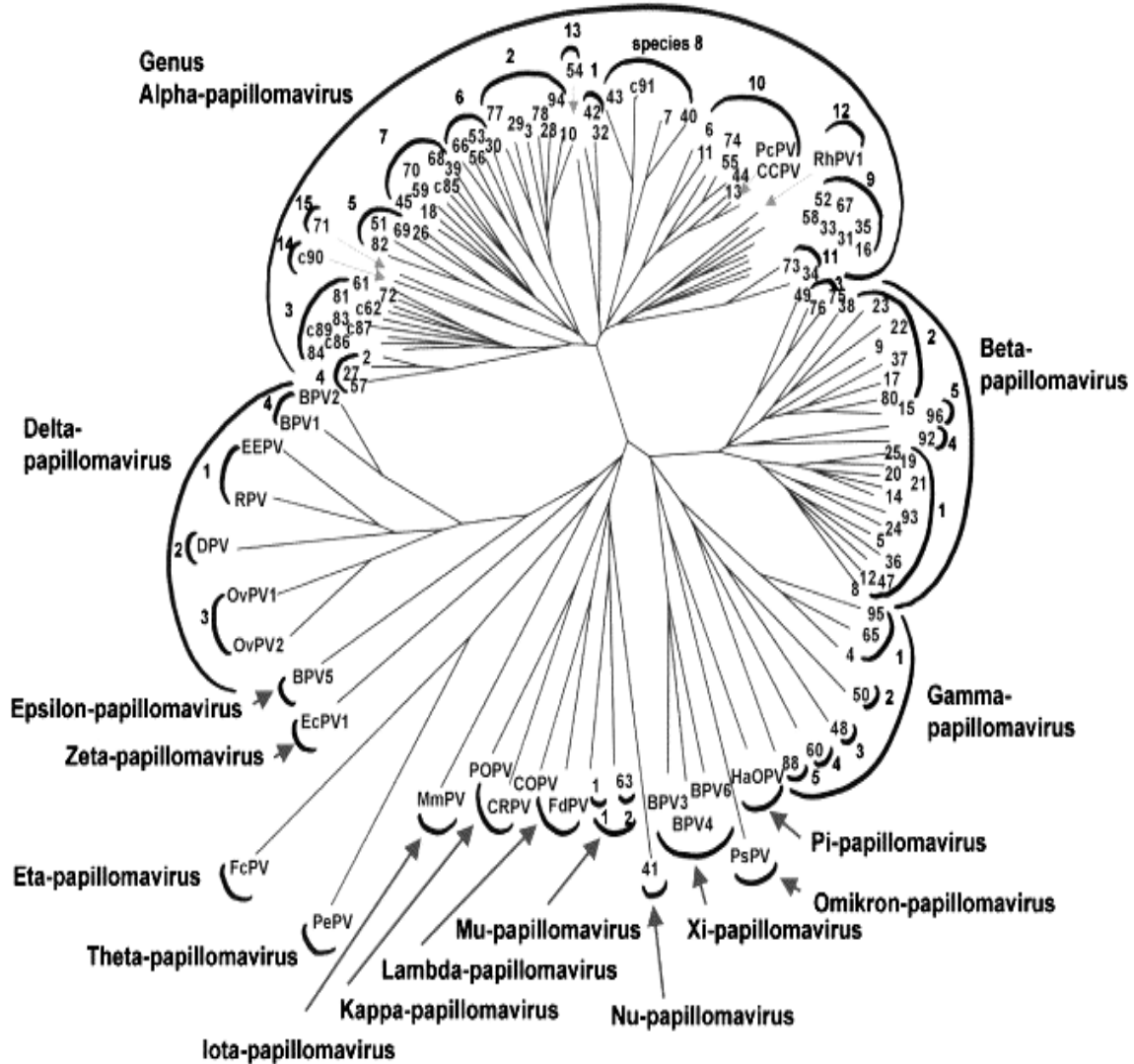


Abb. 1: Phylogenetischer Stammbaum mit den Sequenzen von 118 Papillomvirus-Typen, basierend auf den Sequenzdaten des L1-Leserahmens (de Villiers *et al.*, 2004).

Die Durchseuchung der menschlichen Bevölkerung mit HPV ist hoch. Die Übertragung erfolgt durch sexuellen Kontakt, bei der Geburt oder durch direkten Kontakt mit infizierten Hautregionen oder kontaminierten Gegenständen. PV des Genus- α gehören weltweit zu den am häufigsten sexuell übertragenen Infektionserregern (Garland, 2002). In den letzten Jahren stellte sich heraus, dass eine Infektion mit bestimmten HPV Typen ein erhöhtes Risiko der malignen Entartung birgt. Sie können z.B. das Zervixkarzinom hervorrufen. PV des Genus- α werden basierend auf der Fähigkeit, Keratinozyten zu transformieren und ihrer Assoziation mit malignen Tumoren, in Niedrig-Risiko- (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72) oder Hoch-Risiko-HPV-Typen (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 73, 82) eingestuft (Munoz *et al.*, 2003).

1.2. Die Infektion durch Papillomviren und deren Replikation

Vermutlich gelangen die PV durch Mikrotraumata der Haut- bzw. der Schleimhaut zur Basalschicht der Epidermis. Als ein möglicher Rezeptor konnte das $\alpha 6\beta 4$ -Integrin identifiziert werden, das auf der Oberfläche von epithelialen, endothelialen und neuronalen Zellen exprimiert wird (Evander *et al.*, 1997). Dieser Rezeptor scheint allerdings nicht von allen PV (z.B. BPV) gebunden zu werden (Sibbet *et al.*, 2000). Außerdem bindet das L1-Hauptkapsidprotein an das zelluläre Heparin auf der Zelloberfläche und scheint mit einem noch unbekanntem, zweiten Rezeptor zu interagieren (Giroglou *et al.*, 2001). Nach Adsorption und Aufnahme der Virionen durch Endozytose gelangt die virale DNA auf noch ungeklärte Weise in den Zellkern. Hier liegt das virale Genom in geringer Kopienzahl als Episom vor und nur die frühen Gene E1 und E2 werden transkribiert. Sie sind notwendig für die virale Replikation, nach der das virale Genom mit der Zellteilung auf die Tochterzellen weitergegeben wird. Im Rahmen des Erneuerungsprozesses der Haut teilen sich die Zellen des Stratum basale vertikal zur Hautoberfläche, worauf es zur kontinuierlichen Differenzierung der Keratinozyten kommt. In diesem Rahmen beginnt die vegetative Replikation der viralen DNA und die Expression der Strukturproteingene (Abb. 2).

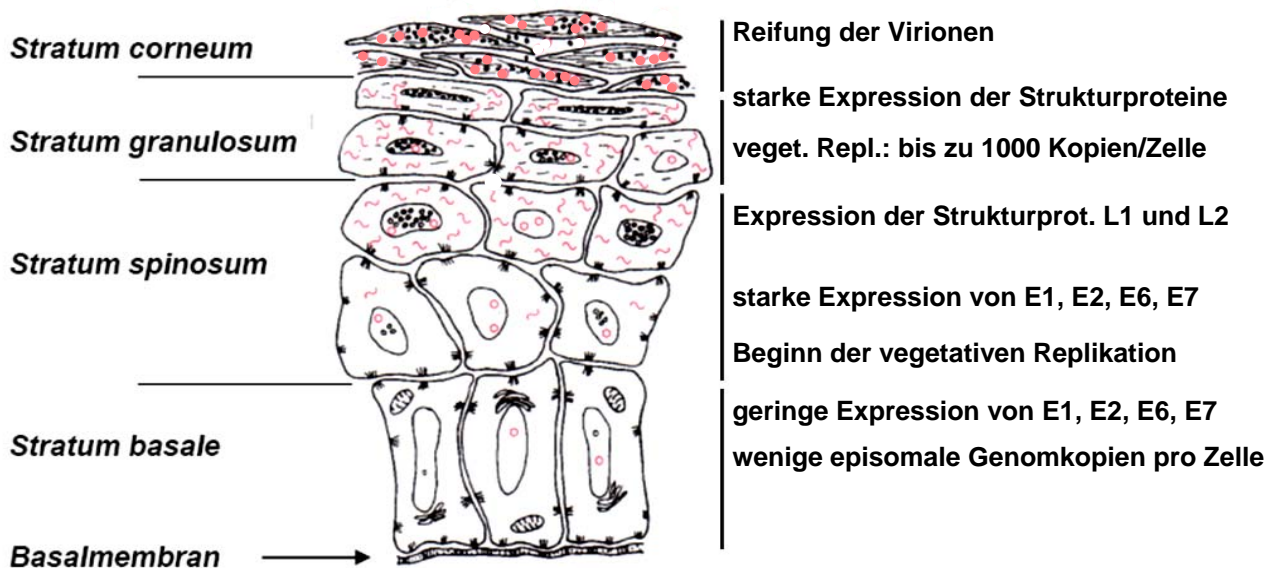


Abb. 2: Genexpression der Papillomviren in der Epidermis. Die Zeichnung stellt einen Querschnitt durch eine mit HPV infizierte Epidermis dar. Mit fortschreitender Differenzierung der Keratinozyten beginnt die vegetative Replikation der viralen DNA. Auf der linken Seite sind die verschiedenen Schichten der Haut benannt und die Linien, Kreise und Punkte in den Zellkernen stellen die dort vorhandenen viralen Transkripte und Genome bzw. die Viruspartikel dar. Die zeitlich versetzte Expression der viralen Proteine erfolgt wahrscheinlich in Abhängigkeit der spezifischen Differenzierungsstadien des Epithels (Turek, 1994).

Die während der verschiedenen Differenzierungsstadien exprimierten zellulären Transkriptionsfaktoren führen wahrscheinlich zur Aktivierung der unterschiedlichen viralen Promotoren, so dass in den verschiedenen Schichten der Epidermis unterschiedliche virale Transkripte nachweisbar sind. Die Expression der viralen Gene E6 und E7 führt zu einer vorübergehenden Verzögerung der Zelldifferenzierung und somit zur Ausbildung von Warzen (Chow und Broker, 1994; zur Hausen und de Villiers, 1994). Die PV-DNA-Replikation im Epithel wird in drei Phasen gegliedert (Lowy und Howley, 2002). Während der sogenannten „Amplifikations“-Phase in den Basalzellen wird das virale Genom unmittelbar nach der Infektion bis zum Erreichen einer für das Virus typischen Genomkopienzahl (ca.10-50) repliziert. In der darauf folgenden „Maintenance“-Phase, wird die virale DNA etwa einmal während der S-Phase des Zellzyklus dupliziert. Diese Art der Replikation sichert die Persistenz und die latente Infektion der Zellen (Lowy und Howley, 2002). Hierbei werden keine apparenten Epithelveränderungen hervorgerufen. Dieser Zustand kann Jahre andauern und spontan in einen produktiven Infektionszyklus übergehen. In den differenzierenden Epithelzellen des Stratum spinosum beginnt die dritte Phase der Virusreplikation, die sogenannte „vegetative“ DNA-Replikation. Dabei wird vor allem in den Zellen des Stratum granulosum eine große Anzahl von Virusgenomen produziert, die anschließend in Kapside verpackt werden und zu infektiösen Viruspartikeln heran reifen. Diese werden beim Zerfall der abgeschilferten Hornschuppen (Stratum corneum) freigesetzt (Lowy und Howley, 2002). Das Virus bleibt auch außerhalb der Wirtszelle sehr lange stabil und infektiös. Im Stratum granulosum erkennt man charakteristische zytopathische Effekte. So gilt die Anwesenheit sogenannter Koilozyten als typischer zytopathischer Effekt bei Kondylomen und einigen Zervixläsionen, induziert durch HPV6 oder 11. Bei Koilozyten handelt es sich um große klare Zellen, mit perinukleären Vakuolen und vergrößertem Kern (häufig Doppelkernigkeit).

1.3. Genomaufbau

Das Genom aller bisher bekannten Papillomviren ist sehr ähnlich aufgebaut und wird in einen kodierenden und einen nicht-kodierenden („noncoding region“, NCR, oder „long control region“, LCR) Bereich unterteilt. Die kodierende Region umfaßt dabei mindestens sieben offene Leserahmen („open reading frames“, ORFs), deren Produkte entsprechend ihrer Expression während des viralen Lebenszyklus als frühe

(„early“, E) und späte („late“, L) Proteine benannt werden (Lowy und Howley, 2002). Während die Leserahmen der späten Gene für die Strukturproteine des Kapsids (L1 und L2) kodieren, üben die Produkte der frühen Gene Funktionen bei der Transformation der Wirtszelle (E6, E7), der viralen DNA-Replikation (E1, E2), der Transkriptionskontrolle (E2) und der Virusfreisetzung (E4) aus (Abb. 3).

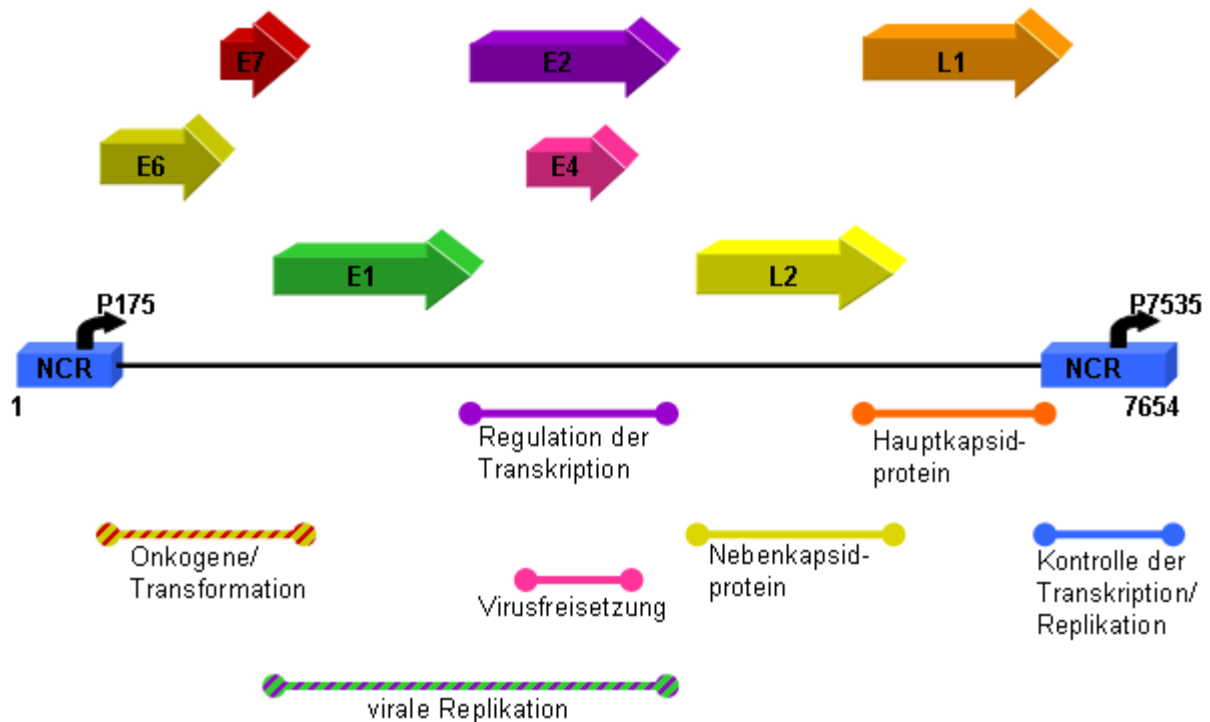


Abb. 3: Schematische Darstellung der HPV8 Genomorganisation

Das Genom des *EV*-assoziierten HPV8 ist linearisiert dargestellt, indem es zwischen den Nucleotiden 1 und 7654 geöffnet wurde. Die einzelnen Funktionen sind den Proteinen zugeordnet (Pfister und Fuchs, 1987). Im Bereich der NCR befinden sich der frühe Promotor P175 sowie der späte P7535.

Im Bereich der NCR, die etwa 7-10% des HPV-Genoms in Anspruch nimmt (zwischen L1 und E6), befinden sich bei allen bisher untersuchten PV die wichtigsten *cis*-Kontrollelemente für die Regulation der Transkription und der Replikation des viralen Genoms. Die teilweise überlappenden Leseraster liegen alle auf einem DNA-Strang und sind trotz großer Sequenzunterschiede zwischen den verschiedenen PV-Typen in ihrer Größe und Funktion hoch-konserviert (Pfister und Fuchs, 1987). Im Vergleich mit anderen PV fehlt in den *EV*-assoziierten HPV der E5-ORF.

1.4. Die frühen Virusproteine

1.4.1. Das E1-Protein

Der Leserahmen E1 kodiert für ein kernlokalisiertes, ATP bindendes Phosphoprotein, das für die Replikation des viralen Genoms essentiell ist (Sun *et al.*, 1990). Die schwach affine, sequenzspezifische Bindung von E1 an den Replikationsursprung des Papillomvirusgenoms wird durch eine Interaktion mit E2 und dessen Bindung an die benachbarten E2-Erkennungssequenzen stabilisiert (Holt *et al.*, 1994). Bedingt durch diese Interaktion, können weitere E1 Proteine rekrutiert werden und sich zu einem hexameren Komplex zusammenlagern, wobei E2 dann entlassen wird. Dieses E1-Hexamer besitzt eine ATP-abhängige Helikase-Aktivität und rekrutiert weitere zelluläre Replikationsfaktoren (Yang *et al.*, 1993).

1.4.2. Das E2-Protein

Der Leserahmen E2 kodiert für ein nukleäres, multifunktionales, DNA bindendes Phosphoprotein mit einer Größe von 43-56kDa (Chiang *et al.*, 1992). E2 moduliert unter anderem die DNA Replikation, Transkription und Segregation des viralen Genoms bei der Zellteilung (Lehman und Botchan, 1998; Skiadopoulos und McBride, 1998). Es weist einen für die meisten Transkriptionsfaktoren typischen modularen Aufbau aus zwei funktionell unterschiedlichen Domänen auf. Im Bereich des N-Terminus liegt die sogenannte Transaktivierungsdomäne (TA) und im C-terminalen Bereich findet sich eine DNA-Binde- und Dimerisierungsdomäne (DBD). Diese Bereiche sind unter den verschiedenen PV hoch-konserviert (McBride und Myers, 1996) und werden durch eine wenig konservierte und in ihrer Größe stark variierende, flexible Region („*hinge*“) miteinander verbunden, welche die Kernlokalisierungssignale enthält (Zou *et al.*, 2000; Hadaschik, 2002). Die *hinge*-Region der EV-assoziierten HPV ist vergleichsweise groß und erfüllt verschiedene Funktionen bei der Interaktion mit zellulären Transkriptionsfaktoren sowie beim Spleißprozess (Lai *et al.*, 1999; Steger *et al.*, 2002). Das E2 Protein bindet mit seiner DBD als Dimer an die palindromische Konsensussequenz mit der Basenfolge 5'-ACC(N)₆GGT-3' (Androphy *et al.*, 1987), die sich in verschiedenen Promotorelementen sowie in der Nähe des Replikationsursprungs befindet. Diese E2 Bindestelle ist unter den verschiedenen PV hoch-konserviert wenngleich ihre Anzahl stark variiert. Das E2 Protein moduliert die virale Genexpression, wobei es bei

Bindung an seine Erkennungssequenz sowohl aktivieren als auch reprimieren kann. Die Position der E2 Bindestellen innerhalb der NCR, relativ zur Lage der Erkennungssequenzen für positiv wirkende, zelluläre Transkriptionsfaktoren ist hierbei für den jeweiligen Effekt verantwortlich (Steger *et al.*, 1993; Thierry, 1993; Garrido-Guerrero *et al.*, 1996). Zum Teil vermittelt das E2 Protein eine dosisabhängige Regulation der Genexpression, bedingt durch unterschiedlich hohe Affinitäten zu seinen Bindestellen (Stubenrauch und Pfister, 1994; Steger und Corbach, 1997). So kann beispielsweise das E2 Protein des EV-assoziierten HPV8 den späten Promotor über Kontakt mit den teilweise hoch-affinen Bindestellen P0, P1, P3 und P4 aktivieren. Die Bindestelle P2 überlappt mit der Konsensussequenz für die zellulären Faktoren RUNX1 und PBF, welche die Basalaktivität des späten Promotors positiv regulieren (Boeckle *et al.*, 2002). So führt eine Bindung von E2 an seine niedrig-affine Bindestelle P2 zu einer Verdrängung der zellulären Faktoren und somit zu einer Repression. Zusätzlich zur sequenzspezifischen DNA-Bindung kann E2 auch über Wechselwirkungen mit anderen Transkriptionsfaktoren an zelluläre Promotoren rekrutiert werden und diese aktivieren. So ist z.B. Sp1 in der Lage, das E2 von HPV8 an den p21-Promotor zu rekrutieren, welcher daraufhin aktiviert wird (Steger *et al.*, 2002). Die Regulation der Transkription durch E2 ist wahrscheinlich auch auf seine chromatinmodulierenden Eigenschaften zurückzuführen. Einerseits konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der Transkription mit einer Auflockerung der Chromatinstruktur stromaufwärts der E2 Bindestelle einhergeht (Lefebvre *et al.*, 1997) und andererseits ist die Aktivierungsdomäne für eine effiziente Bindung an die promotorproximale Bindestelle in der chromatinverpackten LCR von HPV16 essentiell (Nishimura *et al.*, 2000). Nach einer Integration des Papillomvirusgenoms in das Wirtsgenom, kann HPV16-E2 den frühen Promotor P₉₇ reprimieren, was allerdings nicht möglich ist, wenn die virale DNA episomal und damit in dichter Chromatin-Verpackung vorliegt (Bechtold *et al.*, 2003). Diese Ergebnisse weisen auf eine direkte bzw. indirekte Interaktion der Aktivierungsdomäne mit verschiedenen chromatinmodulierenden Faktoren, wie z.B. den Histon-Acetyltransferasen p300/CBP oder p/CAF hin (Lee *et al.*, 2000; 2002), durch die E2 dem inhibitorischen Effekt der in Nukleosomen verpackten DNA entgegen wirken könnte.

Das E2-Protein von HPV31 (Genus- α) kann immortalisierte und normale Keratinozyten in der S-Phase des Zellzyklus arretieren. Dies beruht zum einen auf

einer Konzentrationserhöhung der cyclin A- und cyclin E-abhängigen Kinasen und zum anderen auf einem sehr schnellen Abbau des zellzyklusregulierenden Tumorsuppressors p53 (Frattini *et al.*, 1997).

Im Gegensatz zu den E2 Proteinen der genitalen Hoch-Risiko-HPV wurde für das kutane HPV8-E2 gezeigt, dass es *in vitro* ein zelltransformierendes Potential besitzt (Iftner *et al.*, 1989; Roth, 2000). Epitheliale Zellen und Mausfibroblasten bildeten nach Transfektion eines E2-Expressionsvektors Kolonien in Weichagar. Darüber hinaus wiesen die Zellen einen reduzierten Serumbedarf auf. Die transformierenden Eigenschaften des E2 Proteins hingen ab von der Transaktivierungsfunktion, was darauf schließen lässt, dass der transformierende Effekt wahrscheinlich auf einer transkriptionellen Fehlregulierung wichtiger Wachstums-Kontrollgene beruht (Fuchs *et al.*, 1993).

1.4.3. Das E4-Protein

Der Leserahmen des E4 Proteins besitzt kein eigenes Startkodon und das E4 Gen ist innerhalb der Gruppe der PV nur wenig konserviert. Durch alternatives Spleißen entsteht ein E1^{E4} Transkript, welches nur wenige Nukleotide des E1-Leserahmens enthält. Trotz seiner Lage im frühen Bereich des HPV Genoms wird E4 erst relativ spät während des viralen Lebenszyklus exprimiert. Es blockiert den Zellzyklus in der G2-Phase und verhindert die fortgesetzte zelluläre DNA Replikation (Knight *et al.*, 2004). Somit erhält es die Keratinozyten in einem metabolisch aktiven Stadium und fördert die Komplettierung der Virusproduktion. Schließlich induziert E4 einen Zusammenbruch des Zytokeratinnetzwerkes und erleichtert dadurch die Freisetzung der reifen Virionen (Doorbar *et al.*, 1991).

1.4.4. Das E5-Protein

Während E5 unter den animalen Papillomviren sehr hoch konserviert ist, ist es bei den HPV nur wenig konserviert. Bei BPV1 und einigen genitalen HPV-Typen (HPV16 und 18) liegt es zwischen den ORFs für E2 und L2. Bei den kutanen, EV-assoziierten HPV fehlt es jedoch völlig (Fuchs *et al.*, 1986). Der Leserahmen E5 kodiert für ein kleines, hydrophobes Polypeptid, das über eine Interaktion mit Wachstumsfaktor-Rezeptoren zu einer verstärkten Proliferation der Wirtszelle beiträgt (Ullman und Emery, 1996).

1.4.5. Das E6-Protein

Das E6 Protein trägt bei den Hoch-Risiko-HPV zur Transformation bei. Hawley-Nelson et al. konnten bereits 1989 zeigen, dass zur vollständigen Transformation von primären humanen Keratinozyten das E6 Protein notwendig ist (Hawley-Nelson *et al.*, 1989). Im Falle der anogenitalen Hochrisiko HPV führt die Wechselwirkung zwischen E6 und dem zellulären Tumorsuppressorprotein p53 zur Aufhebung der Zellzykluskontrolle. Nach der Bindung von E6 an die Ubiquitinligase E6-AP (E6 Associated Protein) wird p53 durch das Proteasom degradiert, was in der Zelle zu einem Mangel an diesem Tumorsuppressorprotein führt (Scheffner *et al.*, 1990; 1993). Daher ist p53 nicht mehr in der Lage den Zellzyklus zu arretieren und vorhandene DNA-Schäden können nicht mehr repariert werden. Dies führt zu einer genetischen Instabilität, die eine maligne Entartung der infizierten Zellen begünstigt (Fehrmann und Laimins, 2003). Die E6-Proteine genitaler HPV binden darüber hinaus an zahlreiche weitere zelluläre Faktoren, an Transkriptionsfaktoren (TAF, TBP, c-myc, IRF-3, p300/CBP, AMF-1/Gps2), Signaltransduktionsfaktoren (Paxillin, MAGI-1,2,3, MUPP-1), Tumorsuppressorproteine (p73) und an Proteine, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind (XRCC1, O-6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase) (Smola-Hess und Pfister, 2002).

Im Gegensatz zu den E6 Proteinen der anogenitalen HPV, interagieren die E6 Proteine der kutanen HPV-Typen weder mit p53 und E6-AP, noch konnte eine Degradation von p53 nachgewiesen werden (Steger und Pfister, 1992; Elbel *et al.*, 1997). Das E6 Protein der β -HPV kann jedoch eine UV induzierte Apoptose sowohl in p53 positiven als auch p53 negativen Zellen unterbrechen (Jackson und Storey, 2000). Dabei fördert das E6 Protein die Proteolyse des proapoptotischen Regulator-Proteins Bak (Jackson *et al.*, 2000). Biopsien β -HPV positiver Tumoren zeigten eine niedrigere Apoptose-Rate im Vergleich zu HPV negativen Hauttumoren (Jackson *et al.*, 2000). Das E6 Protein von HPV8 interagiert mit dem XRCC-1 Protein, welches an der DNA-Einzelstrangbruch-Reparatur beteiligt ist (Iftner *et al.*, 2002). Für Zellen mit einer HPV5-E6 Expression wurde eine verzögerte Reparatur UV-induzierter Schäden und ein verfrühter Übergang in die S-Phase nachgewiesen (Giampieri und Storey, 2004). Beta-HPV-E6 interagiert mit dem TATA-bindenden Protein (TBP) und den TBP assoziierten Faktoren (TAFs), aber eine funktionelle Bedeutung ist bislang noch nicht geklärt (Enzenauer *et al.*, 1998). Im Rahmen einer Doktorarbeit im Institut

für Virologie der Universität zu Köln konnte gezeigt werden, dass das E6 Protein des kutanen-HPV8 in transgenen Mäusen alleine ausreicht, um gutartige und bösartige Tumoren der Haut zu induzieren (Marcuzzi, 2006).

1.4.6. Das E7-Protein

Bei den genitalen HPV-Typen 16 und 18 wird die Fähigkeit zur Zelltransformation und Zellimmortalisierung neben dem E6-Protein vor allem dem E7-Genprodukt zugeschrieben (Lowy und Howley, 2002). Es ist in der Lage primäre Vorhautkeratinozyten zu immortalisieren (Halbert *et al.*, 1991) und interagiert während der G1-Phase mit dem zellzyklusregulierenden Tumorsuppressorprotein pRb (Retinoblastom-Protein) (Dyson *et al.*, 1989). Darüber hinaus bindet E7 die zyklinabhängige-Kinase (CDK)-Inhibitoren p21^{CIP1} und p27^{KIP1}, welche die Replikation verhindern, und inhibiert deren Funktion (Münger *et al.*, 2001). HPV38-E7 zeigt so wie HPV16-E7 eine hohe Bindungsaffinität zu pRb (Caldeira *et al.*, 2003), während HPV8-E7 nur ein Drittel dieser Bindungsaffinität zeigt (Schmitt *et al.*, 1994). Trotz dieser Unterschiede können die beiden kutanen E7 Proteine das pRb degradieren (Caldeira *et al.*, 2003; Akgül *et al.*, 2006). Niedrig-Risiko α -HPV besitzen diese Fähigkeit nicht.

Zwischenzeitlich konnte für HPV8-E7 in organotypischen Hautkulturen ein transformierendes Potential nachgewiesen werden. Es kam zur Degradation der Basalmembran des Epithels in Folge einer Überexpression von verschiedenen Matrix-Metalloproteinasen (MMP) und die HPV8-E7 exprimierenden primären Keratinozyten wuchsen invasiv (Akgül *et al.*, 2005).

1.5. Tumorinduktion durch Papillomviren

Infektionen mit HPV führen zu einer Hyperproliferation der suprabasalen Zellen des Epithels und können so lokal begrenzte, gutartige Tumoren, wie Warzen der verhornenden Haut, Genitalwarzen oder spitze Kondylome, Papillome der Mundhöhle und des Kehlkopfes oder Konjunktivalpapillome hervorrufen. Diese bilden sich meistens - wahrscheinlich infolge einer zellvermittelten Immunreaktion - spontan wieder zurück (Gross, 1997; Lowy und Howley, 2002). Manche dieser zunächst gutartigen Tumoren entarten jedoch nach längerer Persistenz, wobei das virale Genom in den Karzinomen persistiert und fortgesetzt partiell exprimiert wird

(Wettstein, 1990; Pfister, 1992). Während in gutartigen Läsionen alle Strukturen des intakten, differenzierten Epithels vorhanden sind und nur die Lebensdauer der infizierten Keratinozyten verlängert ist, kommt es im Verlauf der malignen Entartung zu einer Proliferation undifferenzierter Keratinozyten. Der Vorgang der Tumorentstehung, bei dem die viralen Proteine eine entscheidende Rolle spielen, wurde am besten bei den genitalen PV untersucht. Die Bildung von intraepithelialen Neoplasien der Gebärmutterhals-Schleimhaut (CIN I bis CIN III) ist von großer klinischer Bedeutung, da diese als Vorläufer des Gebärmutterhalskrebs gelten, der weltweit als zweithäufigster Krebs der Frau gilt (Walboomers *et al.*, 1999; Einstein und Goldberg, 2002). Über 99% der Zervixkarzinome enthalten HPV-DNA. Besonders häufig fand man dabei DNA der Hoch-Risiko-Typen HPV16 (53%) oder HPV18 (15%) (Munoz, 2000).

Die HPV des Genus- β können zu Hautkrebs führen. Patienten mit *Epidermodysplasia verruciformis* weisen eine ausgeprägte Prädisposition für multiple β -HPV-Infektionen auf und haben ein erhöhtes Risiko an Hautkrebs zu erkranken. *EV* wird autosomal rezessiv vererbt und konnte den Genloci *EV1* auf Chromosom 17 und *EV2* auf Chromosom 2 zugeordnet werden (Ramos *et al.*, 2000). Einige *EV*-Patienten weisen Mutationen in einem der zwei aneinandergrenzenden Gene *EVER1* (*TMC6*) und *EVER2* (*TMC8*) im *EV1*-Lokus auf (Orth, 2006). Die *EVER* Gene kodieren für „*transmembrane-channel-like*(*TMC*)-Proteine“ (Keresztes *et al.*, 2003; Kurima *et al.*, 2003), die im Endoplasmatischen Reticulum lokalisiert sind. Sie beeinflussen den Ionenaustausch und sind wahrscheinlich an der Signal-Transduktion beteiligt. Die Rolle bei der *EV*-Pathogenese ist noch unbekannt (Orth, 2006). Bei den *EV*-Patienten entwickeln sich in der Kindheit flache Hautläsionen, die auf dem ganzen Körper verteilt sein können. In 30-60% der Fälle entarten diese Läsionen vor allem an Sonnenlicht exponierten Körperstellen zu Plattenepithelkarzinomen (PEK) (Majewski und Jablonska, 2002; Orth, 2006). Im Gegensatz zu den etwa 20 verschiedenen HPV-Typen, die in gutartigen Läsionen gefunden wurden, konnten in PEK nur eine Untergruppe der Spezies Beta1 (HPV5, 8, 14, 20 und 47) sowie HPV17 nachgewiesen werden, die daher als Hoch-Risiko-Typen des Genus- β bezeichnet werden. In malignen Tumoren dieser Patienten wurden zahlreiche Kopien episomaler Virus-DNA und hohe Spiegel von Transkripten der viralen Onkogene E6 und E7 gefunden (Orth, 2006).

Erst in den letzten zehn Jahren konnte der Verdacht auf eine Rolle der kutanen HPV bei der Entstehung von Hautkrebs in der Allgemeinbevölkerung und insbesondere bei immunsupprimierten Patienten erhärtet werden. Beta-HPV konnten in malignen, nicht-melanozytären Hauttumoren (NMHT) immunkompetenter (30-60%) und immunsupprimierter Patienten (bis zu 90%) der Normalbevölkerung nachgewiesen werden (Pfister, 2003; Akgül *et al.*, 2006). Das kumulative Risiko der immunsupprimierten Nierentransplantatempfänger im Laufe von 20 Jahren an Hautkrebs zu erkranken, liegt in gemäßigten Klimazonen bei etwa 40% und steigt in Australien auf über 80% an. Besonders auffällig ist dabei das 150-fach erhöhte Risiko für die Entwicklung von PEK der Haut.

Beta-HPV treten nicht nur in Hauttumoren auf, sondern sie infizieren die Haut aller Menschen klinisch inapparent als kommensale Flora. In 92% der gezupften Augenbrauhaare von immunsupprimierten Nierentransplantatempfängern und in 45% der Haare immunkompetenter Probanden konnte EV-HPV-DNA nachgewiesen werden (Boxman *et al.*, 1997). Während die kutanen HPV anderer Genera und HPV16 nicht mit PEK der Haut assoziiert sind, belegten Fall-Kontroll-Studien auf der Basis eines HPV-DNA- oder Antikörpernachweises ein erhöhtes Risiko für nicht-melanozytären Hautkrebs (NMHK), insbesondere für PEK, im Zusammenhang mit β -HPV-Infektionen (Feltkamp *et al.*, 2003; Masini *et al.*, 2003; Struijk *et al.*, 2003; Harwood *et al.*, 2004).

Mit jährlich über 1 Million Fälle in den USA (Stern, 1999; Jemal *et al.*, 2004) und über 60.000 Erkrankungen in England (Goodwin *et al.*, 2004) ist der NMHK der häufigste maligne Tumor des Menschen (DePinho, 2000). Histologisch wird der NMHK in Basaliome, Morbus Bowen, PEK und aktinische Präkanzerosen unterteilt (Pfister, 2003). Die Inzidenz von NMHK nahm während der letzten Dekade dramatisch zu (Diepgen und Mahler, 2002). Ein geschwächter Immunstatus, extensive UV-Exposition, ein heller Hauttyp, verschiedene chemische Karzinogene und ein hohes Alter erhöhen die Wahrscheinlichkeit an NMHK zu erkranken (Bouwes Bavinck und Berkhout, 1997). Als wichtigster Risikofaktor gilt der Grad der natürlichen UV-Bestrahlung, da NMHK zumeist an sonnenexponierten Körperstellen auftritt. Dabei reicht die Fallzahl in Europa, Nord Amerika und Australien von 50 bis

zu 170 Fällen pro 100.000 Einwohnern (Holme *et al.*, 2000; Diepgen und Mahler, 2002).

Im Gegensatz zum Zervixkarzinom ist HPV wahrscheinlich nicht notwendig für die Aufrechterhaltung des malignen Phänotyps von Hautkrebszellen, da die HPV-DNA in den kutanen Tumoren nur in sehr geringer Kopienzahl persistiert. Quantitative Untersuchungen haben ergeben, dass aktinische Präkanzerosen höhere Viruslasten als Basaliome und PEK enthalten (Weissenborn *et al.*, 2005). Vor allem die Hoch-Risiko-Typen HPV5 und 8 konnten mit der Entwicklung aktinischer Keratosen in Verbindung gebracht werden (Bouwes Bavinck *et al.*, 2000). Dies könnte bedeuten, dass kutane HPV eine karzinogene Rolle besonders in der frühen Phase der Entwicklung von NMHK spielen. Vermutlich sind bereits wenige HPV positive Zellen in der Lage, direkt oder indirekt die Proliferation und Invasion der Keratinozyten zu beeinflussen. Dennoch bleibt bis heute unklar, welche molekularen Mechanismen der HPV-induzierten, kutanen Onkogenese zu Grunde liegen.

1.6. Beeinflussung der Hautkarzinogenese durch UV-Strahlung

Die ultraviolette Strahlung (UV-Strahlung) gilt als wichtigster Risikofaktor bei der Entwicklung von NMHK (Armstrong und Kricger, 2001). Besonders eine übermäßige Sonnen-Exposition in jungen Lebensabschnitten führt zu einem erhöhten Risiko, später im Leben an Hautkrebs zu erkranken (Bouwes Bavinck und Berkhout, 1997). UV-Licht wird in drei Bereiche unterteilt, die jeweils unterschiedliche physikalische und biologische Eigenschaften besitzen (Shea und Parrish, 1991). UV-C mit 200 bis 280nm ist die kurzwelligste und somit energiereichste Komponente des Sonnenlichts. Der Hauptbestandteil des UV-Lichts, das die Erdoberfläche erreicht, ist die UVA-Strahlung mit einer Wellenlänge von 320-400nm. Bei Mäusen und Fischen konnte ein mutagenes Potential der UVA-Strahlung nachgewiesen werden (Sternborg und van der Leun, 1990; Setlow *et al.*, 1993) und man weiß heute, dass UVA-Strahlen zusammen mit der UVB-Strahlung additive Effekte auf die Entstehung von Hautkrebs aufweisen und in hohen Dosen auch alleine krebserregend sein können (Strickland, 1986; de Gruijl, 2002; Persson *et al.*, 2002). Der Anteil der energiereichen UVB-Strahlung mit Wellenlängen von 280-320nm liegt bei ca. 10%. UVB ist ein Hauptrisikofaktor für die Entstehung von Hautkrebs (Brash *et al.*, 1991; de Gruijl und Forbes, 1995; Nataraj *et al.*, 1995). Dabei gilt insbesondere die

mutagene Schädigung der DNA als Hauptauslöser der Photokarzinogenese. Im Zellkern wird der Tumorsuppressor p53 als Sensor für strahleninduzierte DNA-Schäden angesehen (Giaccia und Kastan, 1998; Szumiel, 1998). Das aktivierte p53 kann Zellen in der G0/G1-Phase des Zellzyklus arretieren und somit eine Reparatur der DNA-Schäden ermöglichen (Lane, 1992). Ist eine Reparatur nicht möglich und sind die Schäden zu massiv, führt die Runterregulierung der Synthese des Apoptose inhibierenden Proteins Bcl-2 und die Induktion der Synthese des Apoptose fördernden Proteins Bax, zur Elimination der geschädigten Zelle (Canman und Kastan, 1996). UV bedingte Mutationen im p53-Gen findet man in 60-75% der aktinischen Keratosen, in 50% der Basaliome und in mehr als 90% der PEK der Haut (Rees, 1994). Diese Mutationen führen häufig zum Verlust der Tumorsuppressor Aktivität von p53. Bei einer Hemmung der Apoptose, z.B. durch HPV, können die Keratinozyten mit kritischen Mutationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen überleben und weiter proliferieren. Außerdem werden DNA-Reparatur-Systeme durch HPV-induzierte Effekte gestört, wodurch es zu einer chromosomalen Instabilität in den infizierten Keratinozyten kommen kann (siehe 1.4.5.). Dies läßt auf einen möglichen Synergismus von HPV-Infektion und UV-Strahlung schließen (Majewski und Jablonska, 2002; Orth, 2006).

1.7. Transgene Mausmodelle

Transgene Mäuse sind sehr gut geeignet die transformierenden Eigenschaften der HPV Onkogene *in vivo* zu untersuchen. Transgene Mäuse, welche die E6 und E7 Proteine der Genus- α HPV16 und 18 unter der Kontrolle viraler und zellulärer Promotoren exprimieren, bestätigten die onkogenen Eigenschaften dieser Proteine *in vivo* (Eckert et al., 2000).

Auch das onkogene Potential der E6 und E7 Proteine der β -HPV wurde in den letzten Jahren in Mausmodellen untersucht. FVB/N Mäuse, die die Onkoproteine E6 und E7 von HPV38 unter der Kontrolle des bovinen Homologs des humanen Keratin-10-Promotors exprimieren, entwickelten spontan keine Tumoren während ihres Lebens von 2 bis 2,5 Jahren. Nach Behandlung mit DMBA und TPA, dem klassischen 2-Stufen-Karzinogenprotokoll (Hecker, 1987), entwickelten die transgenen Tiere zahlreiche Papillome 7 bis 8 Wochen nach dem Beginn der

Behandlung. Nach 17 bis 18 Wochen entwickelten 3 von 8 Mäusen PEK (Dong *et al.*, 2005).

Haarlose SKH-hr1-Mäuse, welche die Onkoproteine E6 und E7 von HPV20 unter der Kontrolle des Keratin-10-Promotors exprimieren, entwickelten keine spontanen Tumoren während einer 2-jährigen Beobachtungsperiode (Michel *et al.*, 2006). Die Tiere wurden dann beginnend im Alter von 6 Wochen bis zu einem Alter von 15 Wochen drei Mal wöchentlich mit UVB ($90\text{mJ}/\text{cm}^2$ bis $200\text{mJ}/\text{cm}^2$) bestrahlt. Es zeigte sich eine schwache Tendenz zu erhöhter Papillominduktion bei den transgenen Mäusen. Bei HPV20 transgenen Mäusen wurden zwei PEK beobachtet.

Um das transformierende Potential des Hoch-Risiko- β -HPV8 zu charakterisieren, wurde an unserem Institut eine transgene Mauslinie etabliert, welche die gesamte frühe Region dieses Virus (HPV8-GFR) enthält (Schaper *et al.*, 2005). Anhand dieser Mäuse konnte gezeigt werden, dass die gleichzeitige Expression aller frühen Gene von HPV8 *in vivo* für die Entwicklung von NMHK ausreicht. Nahezu alle transgenen Tiere entwickelten spontan papillomatöse Hauttumoren, die unterschiedliche Dysplasiegrade aufwiesen. In 6% der HPV8-GFR Mäuse mit dem genetischen Hintergrund FVB/N entwickelten sich PEK ohne weitere Behandlung mit physikalischen oder chemischen Karzinogenen. HPV8 ist damit der erste und bislang einzige kutane HPV-Typ, der alleine ausreichend ist, um Hautkrebs zu induzieren. Darüber hinaus konnte durch eine einmalige UVA/UVB Bestrahlung die Tumorentwicklung beschleunigt werden (Marcuzzi, 2006).

Da in den HPV8-GFR Mäusen sämtliche frühen Gene, d.h. E1, E2, E4, E6 und E7 integriert sind, konnte die Tumorentstehung keinem Einzelgen zugeordnet werden. Um die Rolle der verschiedenen Gene während der Karzinogenese näher zu charakterisieren, wurden transgene Mäuse generiert, welche das E6 Gen isoliert unter der Kontrolle des humanen Keratin-14-Promotors exprimierten. Dabei zeigte sich, dass das HPV8-E6 Protein ausreichend ist, spontan Tumore zu induzieren, vergleichbar mit dem Phänotyp der HPV8-GFR Mäuse (Marcuzzi, 2006).

Im Rahmen meiner Diplomarbeit konnten transgene Mauslinien gegründet werden, die das E2 Gen von HPV8 unter der Kontrolle des humanen Zytokeratin-14-Promotors exprimieren (Lindemann, 2004).

1.8. Matrix-Metalloproteinasen

Das invasive Wachstum maligner Tumoren ist ein komplexer Prozess. Während der Tumorprogression spielen die Wechselwirkungen des Tumors mit dem umgebenden Gewebe und die Aktivierung verschiedener MMP eine wichtige Rolle.

Die MMP bilden eine Familie von Zink-abhängigen Enzymen, welche die meisten Makromoleküle der extrazellulären Matrix degradieren können (Birkedal-Hansen *et al.*, 1993). Sie sind an vielen physiologischen Prozessen wie Embryonalentwicklung, Wachstum und Wundheilung, und darüber hinaus auch an pathologischen Prozessen wie Arthritis und vor allem an der Tumordinvasion beteiligt (Yu *et al.*, 1997). Derzeit sind 21 MMP bekannt, die entweder in die extrazelluläre Matrix sezerniert werden oder als membranständige Proteasen agieren (Kerkelä und Saarialho-Kere, 2003).

Ausgehend von ihrer Struktur und ihren funktionellen Eigenschaften werden die MMP in fünf Untergruppen unterteilt:

- Kollagenasen (MMP-1, MMP-13)
- Gelatinasen (MMP-2, MMP-9)
- Stromelysin 1 und 2
- Membranständige Metalloproteinasen (MT1-MMP)
- eine heterogene Untergruppe mit Matrilysin (MMP-7), Enamelysin (MMP-20), Makrophagen Metalloelastase (MMP-12), Stromelysin-3 (MMP-11)

Aufgrund ihrer kollagenolytischen und gelatinolytischen Aktivitäten sind MMP in der Lage, interstitielles Kollagen zu degradieren. Die interstitiellen Kollagenasen spalten fibrilläres Kollagen Typ I, den Hauptbestandteil des interstitiellen Bindegewebes. Die Fragmente werden bei Körpertemperatur zu Gelatine denaturiert (Fessler *et al.*, 1984; Goldberg *et al.*, 1986), die dann durch die Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 weiter abgebaut wird. Diese Proteasen degradieren auch Kollagen Typ IV, welches ein Hauptbestandteil der Basalmembran ist (Kähäri und Saarialho-

Kere, 1999). Die Aktivität der MMP wird auf der Ebene der Transkription, der Zymogen Aktivierung und der Inhibition der proteolytischen Aktivität reguliert. Unter physiologischen Bedingungen ist die basale Expression der MMP *in vivo* niedrig. Wenn aber eine Umstrukturierung der extrazellulären Matrix notwendig wird, kann die Expression induziert werden. Verantwortlich hierfür sind verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren, Onkogene oder auch Veränderungen in der Zell-Matrix- und in der Zell-Zell-Interaktion (Mignatti und Rifkin, 1996; Kähäri und Saarialho-Kere, 1999). MMP werden als inaktive Zymogene sezerniert oder, im Falle der MT-MMP, fest in die Membran eingebaut. Mit der proteolytischen Abspaltung der Prodomäne geht eine Konformationsänderung des Proteins einher, so dass das aktive Zentrum exponiert wird. Die Aktivierung der proMMP-2 nimmt eine Sonderstellung ein. MMP-2 wird in den meisten Zellarten konstitutiv exprimiert und die Aktivierung von proMMP-2 erfolgt an der Zelloberfläche durch MT-MMP (Brown *et al.*, 1990; Sato *et al.*, 1996). *In vivo* scheint MT1-MMP ein spezifischer Aktivator von proMMP-2 zu sein. In humanen malignen Tumoren geht eine erhöhte Expression der MT1-MMP mit einer Aktivierung von proMMP-2 einher (Yamamoto *et al.*, 1996; Ueno *et al.*, 1997).

Um die Rolle der MMP während der HPV8-induzierten Tumorprogression aufzuklären, wurde die MMP Expression anhand der HPV8 induzierten Hauttumore untersucht. Dabei konnten erhöhte Mengen von MT1-MMP sowohl in den HPV8-positiven Keratinozyten als auch in den Stromazellen nachgewiesen werden. Die Expression und Aktivierung der Kollagenase MMP-13 waren erhöht und eine starke gelatinolytische Aktivität konnte auf die vermehrte Produktion und Aktivierung der Gelatinase MMP-9 zurück geführt werden. Diese Beobachtungen belegen eine Wechselwirkung von HPV8-exprimierenden Keratinozyten und Stromazellen und könnten Hinweise dafür geben, dass selbst wenige, HPV-positive Zellen, wie sie in Hauttumoren des Menschen zu finden sind, das Wachstum und die Invasion von Tumoren beeinflussen (Lindemann, 2004).

1.9. Ziel der vorliegenden Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, das bisher nur *in vitro* nachgewiesene transformierende Potential von E2 (Iftner *et al.*, 1989; Roth, 2000) auch *in vivo* zu bestätigen. Anhand der von mir während meiner Diplomarbeit generierten Mäuse (Lindemann, 2004) sollte gezeigt werden, ob die Expression des viralen E2-Gens von HPV8 *in vivo* in der Lage ist, die Entwicklung von Hauttumoren zu induzieren. Hierzu wurde die Nachkommenschaft der bereits gegründeten Mausstämme histopathologisch und bezüglich der Transgen-Expression charakterisiert. Außerdem wollten wir der Frage nachgehen, ob sich UV-Strahlung auf die Entstehung und die Entwicklung der Hautläsionen auswirkt. Des weiteren sollte der Beobachtung nachgegangen werden, dass die Hauttumore der HPV8-GFR transgenen Mäuse besonders häufig an Körperstellen auftraten, an denen sich die Tiere durch Kratzen selber verwunden. Dazu wurden mittels Hautstanzen gezielt Wunden gesetzt und der Verlauf der Wundheilung untersucht. In Bezug auf die Ergebnisse der vorangegangenen Untersuchungen ergab sich die Fragestellung, ob die Aktivität und Lokalisierung der Gelatinasen MMP-2 und -9 in den Hauttumoren der HPV8-E2 und -E6 transgenen Mäuse vergleichbar mit der gelatinolytischen Aktivität in den HPV8-GFR induzierten Hauttumoren ist.

II. MATERIAL

2.1. Versuchstiere

Hausmaus (*Mus musculus*)

- **Stamm: FVB/N**
Verwendung: Zuchtmäuse
Herkunft: Charles River Deutschland (Sulzfeld)

- **Stamm: DBA/BL6**
Verwendung: Gründermäuse
Herkunft: Charles River Deutschland (Sulzfeld)

2.2. Nukleinsäuren

2.2.1. Synthetisch hergestellte Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden HPLC-gereinigt von den Firmen Eurogentec (Brüssel, Belgien) und Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen.

- **Oligonukleotide für die β -Globin-PCR (Konkel *et al.*, 1978)**

Name	Oligonukleotidsequenz	Position (nt.)
β -Glob fw	5'-CCA ATC TGC TCA CAC AGG ATA GAG AGG GCA GG-3'	2590-2621
β -Glob bw	5'-CCT TGA GGC TGT CCA AGT GAT TCA GGC CAT CG-3'	3083-3052

- **Oligonukleotide für die HPV8-E2 spezifische PCR (Die Positionsangaben beziehen sich auf das HPV8-Genom (Fuchs *et al.*, 1986))**

Name	Oligonukleotidsequenz	Position (nt.)
E2 fw	5'-GGA TCC GAT CAA GAA GAC GAG GGC GAA C-3'	2682-2710
E2 bw	5'-GGA TCC GCA TGC TGT GTT AGT AGC AAG GCA GCG TTA G-3'	4230-4267

- **Oligonukleotide für die Kontrolle der intakten K14-Expressions-Kassette**
(Die Positionsangaben beziehen sich auf die K14-HPV8-GFR Konstrukt mit 11024bp (Schaper *et al.*, 2005))

Name	Oligonukleotidsequenz	Position (nt.)
K14-fw-Test	5'-GGG TTT GCT TTG GGA GGT TG-3'	720-739
K14-bw-Test	5'-TCT CAC ATC CAC CAC ACC ATA GG-3'	1345-1323
PolyA fw Test	5'-TGG ACA CAG ATC CCA CTG GAA G-3'	7853-7874
PolyA bw Test	5'-TGA ATG AAT ATC CCT CCG TAC CC-3'	8201-8174

- **Oligonukleotide für die qualitative Kontrolle der RT-PCR** (AN: β -Aktin mRNA: NM_007393 und β -aktin Gen: 11461)

Name	Oligonukleotidsequenz	Position (nt.)
β -Aktin fw	5'-GTG GGC CGC TCT AGG CAC CAA-3'	183-203 (mRNA, cDNA) 1141-1161 (DNA)
β -Aktin bw	5'-CTC TTT GAT GTC ACG CAC GAT TTC-3'	722-698 (mRNA, cDNA) 2221-2198 (DNA)

- **Oligonukleotide für die quantitative mRNA Bestimmung mittels Echt-Zeit-PCR im LightCycler** (AN: M12737 für HPV8 und β -aktin mRNA: NM_007393)

Name	Oligonukleotidsequenz	Position (nt.)
HPV8E2fw- RT-PCR	5'-AAC GCC ACA ACA AAC CG-3'	3410-3427
HPV8E2bw- RT-PCR	5'-AGG ACC TGG ACC TGG ATA CG-3'	3586-3567
β -aktin fw LightCycler	5'-CCA GAG CAA GAG AGG TAT CCT GAC-3'	254-277
β -aktin bw LightCycler	5'-CAT TGT AGA AGG TGT GGT GCC AG-3'	358-335

2.2.2. DNA-Längenstandards

- 1kb DNA-Leiter (Invitrogen, Karlsruhe)

2.2.3. sonstige natürliche Nukleinsäuren

- Desoxynukleotide (dNTPs) Fermentas (St. Leon-Rot)
- menschliche Plazenta-DNA Sigma-Aldrich (Steinheim)

2.3. Proteine

2.3.1. Enzyme

- Protease Type X (Thermolysin) Sigma-Aldrich (Steinheim)
- Proteinase K Qiagen (Hilden)
- Taq-Polymerase Fermentas (St.- Leon-Rot)
- Platinum-Taq-Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe)

2.3.2. Antikörper

- Ki67 (Tec-3) DAKO (Glostrup, Dänemark)
- Mouse Keratin-14 (MK14 (AF64)) Covance (Berkeley, USA)
- Vimentin (C20-sc7557) Santa Cruz (Santa Cruz, USA)

2.4. Reagenzien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Laborchemikalien wurden von Amersham Bioscience (Freiburg), AppliChem (Darmstadt), BioRad (München), Difco (Detroit, USA), Fermentas (St. Leon-Rot), Invitrogen (Karlsruhe), Pharmacia (Freiburg), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Steinheim) und Qiagen (Hilden) bezogen und besaßen den Reinheitsgrad „reinst“ oder „p. a.“ (zur Analyse).

2.4.1. Sonstige Chemikalien

- BCA Protein Assay, Reagenz A und B Pierce (Bonn)
- BSA Fermentas (St. Leon-Rot)
- DMSO Sigma-Aldrich (Steinheim)
- DNA Typing Grade Agarose Invitrogen (Karlsruhe)
- Eosin Sigma-Aldrich (Steinheim)
- Hämatoxylin Sigma-Aldrich (Steinheim)
- β -Mercaptoethanol (14,1M) Sigma-Aldrich (Steinheim)
- Rindergelatine Sigma-Aldrich (Steinheim)
- SybrGreen Invitrogen (Karlsruhe)
- TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylendiamin) Sigma-Aldrich (Steinheim)

2.4.2. Puffer und Lösungen

Alle Puffer für die molekularbiologischen Experimente wurden, soweit nicht anders angegeben, nach (Sambrook *et al.*, 1989) angesetzt. Die Puffer für die histologischen Untersuchungen wurden nach den Angaben nach (Romeis, 1989) hergestellt.

Puffer für Hautextraktherstellung:

- LSDB (Low Salt Dilution Buffer)

Glycerin	20%
Tris/Cl pH 7.9	50mM
DTT	1mM
NP40	0,1%

Puffer und Lösungen für Proteingele:

- Tris/HCl-SDS, pH 8.8

Tris/Cl pH 8.8	1,5M
SDS	0,4%
- Tris/HCl-SDS, pH 6.8

Tris/Cl pH 6.8	500mM
SDS	0,4%

- **SDS-Polyacrylamidgel (PAGE):**

Trenngel:	Acrylamid	7,5-15%
	Tris/HCl-SDS pH 8.8	25%
	Ammoniumpersulfat	0,03%
	TEMED	0,1%
	Gelatine	1mg/ml

Sammelgel:	Acrylamid/Bisacrylamid	5% / 0,1%
	Tris/HCl-SDS pH 8.8	25%
	Ammoniumpersulfat	0,05%
	TEMED	0,1%

II. MATERIAL

- SDS-Elektrophoresepuffer
Tris-Base 25mM
Glycin 192mM
SDS 0,1%
- Coomassie-Blau - Färbelösung
Methanol 50%
Essigsäure 10%
Coomassie 0,05%
- Entfärbelösung
Methanol 5%
Essigsäure 7%

Puffer für Zymographie:

- Waschpuffer
Triton 2,5%
- Substratpuffer
Tris-Base pH 8.0 50mM
CaCl₂ 5mM

Puffer für Agarose Gelelektrophorese:

- 50x TAE
Tris-Acetat pH 8.0 2M
EDTA 0,05M
- 6x Farbmarker
Glycerin 30%
Bromphenolblau 0,25%
Xylen-Cyanol-Lösung, 0,25%
Tris-HCl pH 7.5 10mM
EDTA 1mM

Ethidiumbromidstammlösung 10µg/ml in H₂O

Thermolysin-Puffer:

Hepes	10mM
NaCl	15mM
KCl	6mM
CaCl ₂	1mM
MgCl ₂	1mM

2.4.3. Narkosemittel für Mäuse:

Für das Narkosemittel wurden 100mg des Analgetikums Ketamine-Hydrochlorid (Sigma-Aldrich, Steinheim) sowie 20mg des Sedativums Xylazine-Hydrochlorid (Sigma-Aldrich, Steinheim) in 20ml sterilem PBS gelöst. Das Narkosemittel konnte bei 4°C und lichtgeschützt etwa einen Monat gelagert werden.

2.4.4. Reagenziensysteme

- First Strand cDNA Synthesis Kit Fermentas (St. Leon-Rot)
- Rneasy Fibrous Tissue Kit Qiagen (Hilden)
- Omniscript RT Kit Qiagen (Hilden)
- QIAmp DNA Mini Kit Qiagen (Hilden)

Plastikware wurde von den Firmen Beckman (München), Eppendorf (Hamburg), Greiner (Solingen), Sarstedt (Nümbrecht) und bezogen.

2.5. Laborgeräte

Elektrophorese-Kammern

- Proteine, Novex Mini-Cell Invitrogen (Karlsruhe)

Gewebeextrakte

- Adhäsiv-Objektträger Menzel (Braunschweig)
- ImmunoReader NJ 2000 Nunc (Wiesbaden)
- Mikrotom Leica (Solms)
- Mixer Mill 301 Qiagen (Hilden)

Mäusemanipulation

- Biopsie-Stanzen PFM (Köln)
- elektrischer Haarschneider Wella (Berlin)
- Ohrlochzange Natsame (Seikaguchi, Tokio, Japan)

PCR-Geräte

- Biometra T3-Thermocycler Biometra (Göttingen)
- LightCycler Roche (Mannheim)

UV-Bestrahlung

- UV801 Waldmann-Medizintechnik(Villingen-Schwenningen)
PUVA: 320-400nm
UV21: 280-360nm
- Variocontrol (Meßgerät) Waldmann-Medizintechnik(Villingen-Schwenningen)

Zentrifugen:

Kühlzentrifugen:

- Sigma-Aldrich-Zentrifuge 2K15 Sigma-Aldrich (Steinheim)
- Varifuge 3.OR Heraeus (Hanau)

Tischzentrifugen:

- Biofuge 13 Heraeus Sepatech (Osterode)
- Eppendorf Zentrifuge 5417 C Eppendorf (Hamburg)
- Pico Fuge Stratagene (La Jolla, CA, USA)

III. METHODEN

3.1. Etablierung der HPV8-E2 transgenen Mäuse

3.1.1. Kreuzung der Mäuse

- heterozygote HPV8-E2 transgene Mäuse

Für die Etablierung der Mauslinien 2, 21 und 35 wurden heterozygote HPV8-E2 transgene Mäuse der Generation F0 (Lindemann, 2004), mit FVB/N Wildtyp-Tieren verpaart. Wenn bei den Weibchen eine Trächtigkeit anhand des vermehrten Bauchumfanges festgestellt werden konnte, kamen diese in Einzelkäfige und nach etwa 21 Tagen wurden die heterozygoten Mäuse der nächsten Generation geboren. Im Alter von ca. drei Wochen wurden die Nachkommen nach Geschlecht getrennt in neue Käfige versetzt und nach Erreichen der Geschlechtsreife weiter verpaart.

- homozygote HPV8-E2 transgene Mäuse

Um in der Linie 2 homozygote Mäuse zu generieren, wurden ausgehend von der F1 Generation zunächst heterozygote, Transgen-positive Geschwistertiere miteinander verpaart. Die positiven Nachkommen aus dieser Verpaarung wurden anschließend wiederum miteinander gekreuzt, so dass bereits in der zweiten Folgegeneration sämtliche Jungtiere Transgen-positiv für HPV8-E2 waren. Für alle folgenden Generationen wurden weiterhin positive Geschwistertiere miteinander verpaart. Um die Homozygotie zu bestätigen, wurden sämtliche Nachkommen der F6 Generation mit FVB/N Wildtyp-Mäusen gekreuzt. Da alle Nachkommen Transgen-positiv für E2 waren, konnte die Homozygotie als bewiesen erachtet werden.

3.1.2. Markierung der Mäuse

Unmittelbar nach dem Absetzen der Jungtiere erfolgte die Markierung mittels einer Ohrlochzange. Die Markierung basiert auf einer Kodierung, bestehend aus Einkerbungen und Löchern, die an unterschiedlichen Positionen des Ohres eingestanzt werden. Jede Markierung steht hierbei für eine bestimmte Zahl (Abb. 4). Die Zahlen wurden so gewählt, dass aus einer Linie sämtliche Nachkommen einer Generation von eins ausgehend fortlaufend numeriert wurden. In Kombination mit den jeweiligen Käfignummern konnte so jede Maus eindeutig identifiziert und ihre Abstammung einwandfrei nachvollzogen werden.

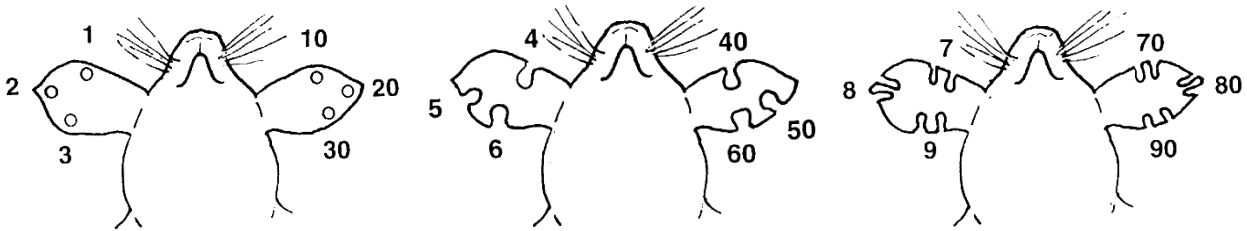


Abb. 4: Markierungsschema der Mäuse (von unten gesehen). Die unterschiedlichen Löcher oder Kerben in den Ohren der Mäuse stehen für bestimmte Zahlen. Anhand der Markierung am linken Ohr jeder Maus können die Zehnerschritte der Nummern und im rechten Ohr die Zahlen von 1-9 identifiziert werden. So identifiziert beispielsweise ein Loch im oberen Bereich des linken Ohres und eine Kerbe in der Mitte des rechten Ohres die Maus mit der Nummer 15.

3.2. DNA-Methoden

3.2.1. Extraktion der genomischen DNA aus Schwanzbiopsien

Die Extraktion der genomischen DNA erfolgte mit Hilfe des QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden). Hierfür wurde die etwa 0,5cm lange Schwanzspitze der zu testenden Maus mit ProteinaseK (Qiagen, Hilden) für mindestens zwei Stunden bei 56°C inkubiert und anschließend nach den Angaben des Herstellers behandelt. Zur Elution der DNA wurden 100µl Puffer AE auf die Säule pipettiert, 1min bei RT inkubiert und schließlich 1min bei 8000g zentrifugiert. Die genomische DNA wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.2.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion ist ein Verfahren zur selektiven Amplifikation von DNA-Sequenzen, die über die Bindung von zwei Oligonukleotiden, die in entgegengesetzter Orientierung an eine DNA-Matrize binden, definiert werden (Mulis und Fallona, 1987). Zur Gewährleistung maximaler Homogenität der Ansätze wurde mit vorgemischten Ansätzen gearbeitet, welche auf die einzelnen Reaktionsgefäße verteilt wurden. In der Regel wurden 150-300ng Matrizen DNA, je 30pmol der jeweiligen Primer, 200µM dNTPs, 5µl 10x-Taq-Polymerase-Puffer, eine Einheit Taq-Polymerase, sowie 0,25µg Bovines Serum Albumin (BSA) eingesetzt und mit Wasser auf 50µl aufgefüllt. Je nach unterschiedlicher Beschaffenheit der Oligonukleotide und Größe der zu amplifizierenden Bereiche wurden die Hybridisierungstemperatur und die Extensionszeit des Basisprotokolls angepasst. Die Größe und die Menge der amplifizierten DNA wurde anschließend in einem

Agarosegel überprüft. Alle PCRs wurden mit Taq Polymerase und dem dazugehörigen Puffer in 0,2ml PCR-Gefäßen in einem programmierbaren PCR-Heizblock durchgeführt.

- **β-Globin PCR**

Nach erfolgter Isolierung der genomischen DNA nach 3.2.1. wurden 4µl dieser DNA-Lösung als Matrize in einer β-Globin PCR eingesetzt, um die Qualität der Aufreinigung zu überprüfen (Konkel *et al.*, 1978). Die β-Globin PCR Reaktion bestand aus einem anfänglichen Denaturierungsschritt von 3min (95°C) gefolgt von 35 Zyklen der Amplifizierung (95°C für 30sec; 60°C für 90sec und 72°C für 90sec). Die PCR wurde mit einem Elongationsschritt bei 72°C für 10min und anschließendem Abkühlen auf 4°C beendet.

- **HPV8-E2 PCR**

Nach einer erfolgreichen β-Globin PCR wurde die genomische DNA der Mäuse auf das Vorhandensein des Transgens überprüft. Die PCR wurde mit HPV8-E2 spezifischen Primern durchgeführt. Die Amplifikation erfolgte in 50µl Gesamtvolumen mit einer Einheit Taq Polymerase und dem dazugehörigen Puffer, sowie 0,25µg BSA und 2mM MgCl₂. Die E2 PCR wurde unter ähnlichen Bedingungen wie die β-Globin PCR durchgeführt und bestand aus einem anfänglichen Denaturierungsschritt von 3min (95°C) gefolgt von 30 Zyklen Amplifizierung (95°C für 45sek; 65°C für 45sek und 72°C für 120 sek). Beendet wurde auch diese PCR mit einem Elongationsschritt bei 72°C für 10min und einer Runterkühlung auf 4°C.

- **Kontrolle der Expressionskassette**

Um zu kontrollieren, ob in allen Linien eine intakte Transgen-Expressionskassette vorlag, wurden PCR-Experimente zur Analyse des Zytokeratin-14-Promotorelements und des K14-Polyadenylierungssignals durchgeführt. Der Test des K14-Promotors erfolgte in 50µl Gesamtvolumen mit einer Einheit Taq Polymerase und dem dazugehörigen Puffer, sowie 0,25µg BSA und 1mM MgCl₂. Zunächst wurde die DNA bei 95°C für 2min denaturiert, gefolgt von 30 Wiederholungen der Amplifikation mit 30sek bei 95°C, 30sek bei 58°C und 75sek bei 72°C. Die Reaktion wurde durch zehn Minuten bei 72°C und einer Kühlung bis auf 4°C beendet.

Die Analyse des K14-Poly-Adenylierungssignals erfolgte mit den hierfür synthetisierten Oligonukleotiden unter den gleichen Bedingungen wie die oben beschriebene K14-Promotor-Test-PCR.

3.3. RNA Methoden

3.3.1. Isolierung der Gesamt-RNA

Die Extraktion der mRNA aus den Gewebeproben der HPV8-E2 transgenen Mäuse erfolgte mit Hilfe des Rneasy Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen, Hilden). Die zu untersuchenden Tiere wurden narkotisiert, im Rückenbereich rasiert und vier 4 mm durchmessende Stanzen der Rückenhaut bzw. des Tumors entnommen. Jeweils zwei Stanzen wurden zusammen einem Reaktionsgefäß über Nacht mit Protease X (Sigma, Deisenhofen) inkubiert, um Dermis und Epidermis voneinander trennen zu können. Das epidermale Gewebe wurde anschließend mit Hilfe einer 5mm durchmessenden Stahlkugel in 600µl RLT-Puffer (mit 1% β -Mercaptoethanol) in einer Schwingmühle (Mixer Mill 301, Qiagen, Hilden) für 3min bei 30Hz mechanisch homogenisiert. Die weitere Vorgehensweise richtete sich nach den Angaben des Herstellers, wobei ein zusätzlicher DNase Verdau eingefügt wurde, um einen vollständigen Abbau der DNA zu gewährleisten. Die Gesamt-RNA wurde in 50µl Rnase freiem Wasser eluiert und bei -80°C gelagert.

3.3.2. Synthese der cDNA

Aus der zuvor isolierten mRNA wurde mit Hilfe der Reversen-Transkriptase (RT) die entsprechende cDNA bei einem Einsatz von 1µg Gesamt-RNA synthetisiert. Die Transkription wurde entsprechend den Anweisungen des Herstellers des Omniscript-RT-Kits (Qiagen, Hilden) oder des First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, St. Leon-Rot) durchgeführt. Die Synthese der cDNA wurde durch eine Inaktivierung der RT für 5min bei 93°C beendet. Der Erfolg der mRNA Aufreinigung mit einer anschließenden cDNA Transkription wurde mit Hilfe einer β -Aktin PCR mit Intron überspannenden Primern überprüft. Diese PCR verlief mit 3min bei 95°C, gefolgt von 35 Zyklen der Amplifikation für 45sek bei 95°C, 45sek bei 60°C, 120sek bei 72°C und einem abschließenden Elongationsschritt für 7min bei 72°C und anschließender Abkühlung auf 4°C.

3.3.3. Quantifizierung der HPV8-E2 mRNA

Mit Hilfe der quantitativen Echt-Zeit-PCR sollte der Expressionsspiegel von E2 in unterschiedlichen Generationen der transgenen Mäuse der verschiedenen Linien bestimmt werden. Um zwischen der cDNA und evtl. verbliebener zellulärer DNA-Überreste unterscheiden zu können, wurde die Expressionsrate von E2 bzw. β -Aktin in einem vorgegeben Volumen RNA ohne reverser Transkription von der Kopienzahl der cDNA abgezogen. Hierfür wurde zunächst die Expressionsrate des „single copy“ Genes β -Aktin bestimmt, um die Kopienzahl des E2 Transgens pro Zelle zu errechnen. Diese Kopienzahl wurde dann als n Kopien des HPV8-E2 Transgens, pro einer Kopie von β -Aktin normalisiert dargestellt.

Die Amplifikation erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 μ l mit 0,8U Platinum-Taq-DNA-Polymerase und dem entsprechenden Puffer, 500ng/ μ l BSA, 5% DMSO, 200 μ mol/l dNTPs, 0,5 μ mol/l Primer und 2 μ l einer 1:1000 Verdünnung von SybrGreen. Die Berechnung der Expressionsraten erfolgte durch die LightCycler-Software unter der Verwendung einer Standardkurve, die aus sechs Verdünnungen in 10er Schritten (10^6 - 10^1 Kopien) der HPV8-E2 oder Maus-DNA bestand. Die Kopienzahl der beiden Gene wurde in allen untersuchten Mäusen anhand von zwei unabhängigen Messungen mit jeweils zwei verschiedenen Gewebeproben ermittelt.

Die Standardverdünnungen wurden, basierend auf sechs unabhängigen Messungen drei verschiedener DNA-Aliquots, auf die gewünschte Endkonzentration eingestellt. Die Verdünnungsreihe für HPV8-E2 war mit 40 ng/ μ l menschliche Plazenta DNA versetzt, um den zellulären Hintergrund nachzuahmen. Die Empfindlichkeit der Messungen lag bei <20 Kopien und die Quantifizierung war linear von 20 - 10^6 Kopien. Die Reaktionsbedingungen der β -Aktin und der HPV8-E2 Echt-Zeit-PCR entsprachen 60sek bei 95°C, gefolgt von 45 Wiederholungen von 1sek bei 95°C (20°C/sek), sowie 5sek bei verschiedenen Annealingtemperaturen (β -Aktin: 55°C, HPV8-E2: 56°C) und einer Konzentration von 3mM Mg^{2+} in beiden Fällen. Die entstandene Fluoreszenz wurde einmal pro Zyklus am Ende des Elongationsschrittes gemessen.

3.4. Charakterisierung der HPV8-E2 transgenen Mäuse

3.4.1. Makroskopische Auswertung

Alle Mäuse wurden in einem Abstand von etwa sieben Tagen auf Auffälligkeiten im Verhalten oder auf evtl. auftretende Hautveränderungen untersucht. Die Mäuse wurden in einer Datenbank (SPSS 14.0) erfaßt und sämtliche Ereignisse während der gesamten Lebensdauer in diesem Programm verzeichnet. Die E2 positiven Tiere, die aus unbekanntem Gründen verstorben waren, ohne vorher einen Hauttumor zu entwickeln, wurden für die Statistik zensiert. Hatten die Hauttumore eine vorgegebene Größe erreicht oder wenn die Mäuse deutliche Verhaltensauffälligkeiten zeigten, wurden sie euthanasiert und anschließend obduziert. Dabei wurden die Tumore exzidiert und für eine anschließende histologische Analyse in Formalin fixiert. Darüber hinaus wurden verschiedene Proben der Normalhaut, des Tumors und der Leber in flüssigem Stickstoff konserviert und für spätere molekularbiologische Untersuchungen bei -80°C gelagert.

3.4.2. Histologische Auswertung der E2 induzierten Hauttumore

Die auffälligen Gewebeproben wurden in 4%igem gepuffertem Formalin (Sigma, Deisenhofen) fixiert und entsprechend dem routinemäßigen Standardprotokoll in einem Autotechnikon (Tissue-TE VIP) entwässert und in Paraffin eingebettet (Romeis, 1989). Von diesen Paraffinblöcken wurden 4 µm dicke Gewebeschnitte auf Adhäsiv-Objektträger aufgezogen und anschließend mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Die so behandelten Schnitte wurden später auf pathologische Auffälligkeiten untersucht.

3.5. Experimentelle Manipulation der Mäuse

3.5.1. Narkotisierung der Tiere

Den Mäusen, die jünger waren als vier Wochen und daher weniger als ca. 25g wogen, wurden 300µl und den Tieren, die älter als vier Wochen waren, 500µl des Narkosemittels (siehe Material 2.4.3.) intraperitoneal gespritzt. Diese Dosis war im allgemeinen für eine etwa 45min andauernde Narkose ausreichend.

3.5.2. UV Bestrahlung der Mäuse

Die narkotisierten Mäuse wurden zunächst mit Hilfe eines elektrischen Rasierers (Wella, Berlin) auf dem Rücken rasiert und jeweils vier Tiere auf einer vorbereiteten Unterlage fixiert. Die Mäuse wurden mit einer Alufolie abgedeckt, welche insgesamt vier jeweils 2x2cm große quadratische Aussparungen aufwies. Anschließend wurden die Tiere mit einem UV-Gerät bestrahlt, welches in der Lage ist, sowohl UVA- (PUVA: 320-400nm) als auch UVB-Licht (UV21: 280-360nm) zu emittieren. Durch ein externes Messgerät wurde gewährleistet, dass alle Mäuse in einem homogenen Bestrahlungsfeld lagen und mit derselben Intensität bestrahlt wurden.

3.5.3. Wundheilungsexperimente

Bei narkotisierten und rasierten Mäusen wurden Biopsiestanzen (PFM, Köln) der Rückenhaut entnommen, so dass vier kreisrunde 4mm durchmessende Wunden entstanden. Die entnommenen Hautbiopsien wurden wie oben beschrieben für eine spätere RNA Quantifizierung vorbereitet. Die verwundeten Mäuse wurden separiert und alle zwei Tage fotografiert, um den genauen Verlauf der Wundheilung zu dokumentieren.

3.6. Proteinanalyse

3.6.1. Präparation von Gewebeextrakten

Nach der Entnahme von Haut- und Tumorbiosien aus den transgenen Mäusen, wurden die Proben in 1ml LSDB-Puffer (0,1%) mit Hilfe einer Stahlkugel in der Kugelmühle Mixer Mill 301 (Qiagen, Hilden) aufgebrochen. Dieser Ansatz wurde für 5min bei 30Hz in der Kugelmühle zerrüttelt. Anschließend wurde die Stahlkugel mit einer sterilen Pinzette entfernt und die Gewebeextrakte 12-16Std bei 4°C im Rollinkubator lysiert. Die so erhaltenen Gewebeextrakte wurden bei 15000g für 20min bei 4°C zentrifugiert, die Überstände entnommen und die Proteinkonzentration ermittelt.

3.6.2. Quantitative Proteinbestimmung mit BCA

Zur Messung des Proteingehaltes der Gewebeextrakte wurden 10µl des Überstandes mit 50µl BCATM-Protein Assay Reagenz A (Pierce, Bonn) sowie 1µl BCATM-Protein Assay Reagenz B (Pierce, Bonn) in einer 96 Well-Platte vermischt und 30min bei 37°C inkubiert. Außerdem wurde eine Standardreihe von BSA Proben mit einer Konzentration von 10µg/µl, 5µg/µl, 3µg/µl, 1µg/µl, 0,5µg/µl, 0,1µg/µl sowie 0µg/µl mit den oben genannten Reagenzien versehen und ebenfalls bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde mit Hilfe des ImmunoReader NJ 2000 (Nunc, Wiesbaden) und von BSA-Standardproben mit einer Konzentration von 0-10mg/ml BSA die Proteinkonzentration der Gewebeextrakte bestimmt.

3.6.3. Lokalisation der gelatinolytischen Aktivität mittels *in situ* Zymographie

Zunächst werden 50µm dicke Polyacrylamidgele ohne SDS, mit einer Konzentration von 15mg/ml Rindergelatine auf Objektträger aufgebracht. Kryoschnitte von Haut- und Tumorproben der zu untersuchenden Mäuse mit einer Stärke von 5-8µm wurden dann auf die vorbereiteten Gelatine-Polyacrylamidgele aufgezogen und in einer feuchten Kammer 16Std bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Gewebeschnitte mit Methylenblau (0,125% in PBS) gefärbt und fotografiert. Diese Mikroskopfotos dienten später der genauen Positionskontrolle der einzelnen Gewebeschnitte. Die Objektträger wurden anschließend 5min bei 50°C in 5% SDS/PBS inkubiert, um die Gewebeschnitte vorsichtig von den Polyacrylamidgelen entfernen zu können. Die Gele wurden danach mit Coomassie (Coomassie Brilliant BlueR-250 0,1%, Methanol 45%, Essigsäure 10%) gefärbt. Nach der Entfärbung des Gels mit einer Entfärbelösung (Essigsäure 10%v/v, Ethanol 50%) stellte sich die gelatinolytische Aktivität als weiße Areale gegen den blauen Hintergrund dar, da hier die aktiven Gelatinasen die im Gel enthaltene Gelatine degradiert haben. Die gefärbten Objektträger wurden erneut unter dem Mikroskop fotografiert.

3.6.4. Analyse der Gelatinasen mittels *in vitro* Substratzymographie

Um die *in situ* beobachtete gelatinolytische Aktivität der Gelatinasen MMP-2 oder -9 zuordnen zu können, wurden *in vitro* Gelatine-Zymographien durchgeführt. Hierfür wurden 10 µg Proteinextrakt der Haut- oder Tumorbiospien auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel, welches 1mg/ml Rindergelatine enthielt, aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte unter nicht reduzierten Bedingungen. Das Gel wurde nach einem kurzen Abspülen mit H₂O für 30min in Triton (2,5%v/v) gewaschen, wonach eine Inkubation im Zymographie-Substratpuffer (50mM Tris-HCl pH 8, 5mM CaCl₂) bei 37°C im Brutschrank folgte. Nach 12-16 Std wurde das Gel mit Coomassie Färbelösung (10%v/v Isopropanol, 10%v/v Essigsäure, 0,2%w/v Serva Blau R) inkubiert. Nach der Entfärbung des Gels mit Entfärbelösung (10%v/v Essigsäure, 50% Ethanol) stellten sich die Banden der unterschiedlich großen Gelatinasen als weiße Zonen gegen den blauen Hintergrund dar und man konnte MMP-2 von MMP-9 unterscheiden. Auch die inaktiven Vorläuferformen der Enzyme können mit Hilfe dieser Methode nachgewiesen werden, da in Anwesenheit von SDS die Enzyme entfaltet werden, und somit das katalytische Zentrum exponiert wird und das Enzym partiell aktiv ist (Birkedal-Hansen *et al.*, 1993).

3.7. Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Färbungen wurden anhand von 3 µm dicken Paraffinschnitten durchgeführt. Die Schnitte wurden mit einem Mikrotom angefertigt und nach einer Glättung bei 42°C im Wasserbad auf Adhäsiv-Objektträger aufgebracht und im Brutschrank bei 42°C getrocknet. Zur Entparaffinierung und Rehydrierung wurden die Gewebeschnitte für jeweils 5min in einer absteigenden Alkoholreihe (100% Isopropanol, 96% EtOH, 75% EtOH, 50% EtOH) inkubiert und anschließend in PBS gewaschen. Danach wurden die Präparate mit Zitratpuffer pH 6.0 (ChemMate, Target Retrieval Solution, DAKO) bei 96°C im Wasserbad aufgekocht um die Schnitte für die anschließende Antikörperfärbung vorzubereiten. Danach wurden die Objektträger für 10min in 3%igem H₂O₂/MeOH inkubiert und die Gewebeschnitte mit einem Fettstift eingekreist, um das Verlaufen der Antikörperlösungen zu vermeiden.

Um unspezifische Bindungsstellen des Antikörpers vorher abzusättigen, wurden die Präparate mit Normalserum des jeweiligen Tieres, aus dem der 1. Antikörper gewonnen wurde, für 1Std bei RT inkubiert und anschließend der spezifische Primärantikörper über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C aufgetragen. Am Folgetag wurden die Präparate dreimal für 5min mit PBS gewaschen und der sekundäre Antikörper für die Darstellung der Antikörper-Antigen-Komplexe mittels Avidin-Biotin-Methode aufgetragen. Bei dieser Methode bindet sich ein Biotin-konjugierter sekundärer Antikörper an den spezifischen Primärantikörper und kann des weiteren mit seinem Biotin das Peroxidase-konjugierte Avidin binden. Auf diese Weise wurde die spezifische Bindung mit einem Substrat-Chromogen-System (Liquid DAB Substrate Chromogen System, DAKO, Glostrup, Dänemark) oder dem Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, USA) sichtbar gemacht.

Bei jeder Färbung wurde eine Negativ-Kontrolle mitgeführt, bei der der Primärantikörper weggelassen wurde. Um die spezifische Färbung in den Gewebeschnitten besser lokalisieren zu können, wurde im Falle der Ki67- und der Zytokeratin-14-Färbung eine Hämatoxylin und für die Vimentin-Färbung eine Hämatoxylin-Eosin (H&E)-Gegenfärbung durchgeführt.

IV. ERGEBNISSE

4.1. Etablierung K14-HPV8-E2 transgener Mauslinien

Die während meiner Diplomarbeit generierten Mäuse exprimieren das E2 Gen von HPV8 unter der Kontrolle des humanen Zytokeratin-14-Promotors (Abb. 5). Sie dienten als Gründer-Generation für die Untersuchungen in dieser Arbeit.

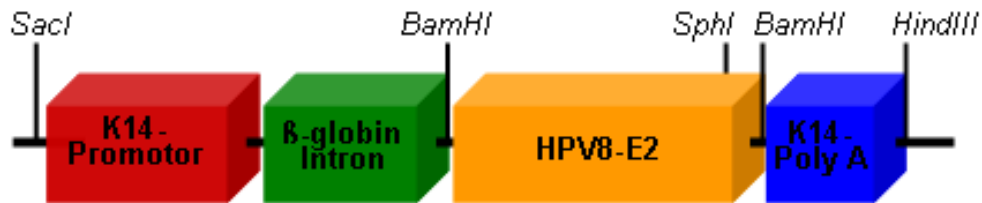


Abb. 5: Schematische Darstellung des K14-HPV8-E2 Konstrukts, bestehend aus dem humanen Zytokeratin-14-Promotor, dem Intron 2 des Kaninchen- β -Globin-Gens, dem E2 Gen von HPV8 und dem K14-Polyadenylierungssignal.

Insgesamt konnten drei transgene Mauslinien etabliert werden, zwei von Transgen-positiven F0-Tieren mit DBA/BL6 Hintergrund (Linie 21 und 35) und eine aus dem FVB/N Hintergrund (Linie 2). Diese wurden kontinuierlich mit FVB/N Wildtyp Mäusen gekreuzt und die heterozygoten Nachkommen konnten teilweise bis in die elfte Generation beobachtet werden. Der FVB/N Stamm wurde ausgesucht, da dieser genetische Hintergrund für die Ausbildung von Hauttumoren besonders prädisponiert zu sein scheint (Hennings *et al.*, 1993; Brown und Balmain, 1995; Coussens *et al.*, 1996; Wakabayashi *et al.*, 2007). Um den Transgen-Status der Tiere zu überprüfen wurde von jeder Maus im Alter von etwa drei Wochen ein ca. 0,5cm langes Schwanzstück entnommen und die gesamtzelluläre DNA extrahiert. Die Aufreinigung der einzelnen Proben wurde mit Hilfe einer β -Globin-PCR (Abb. 6) überprüft.

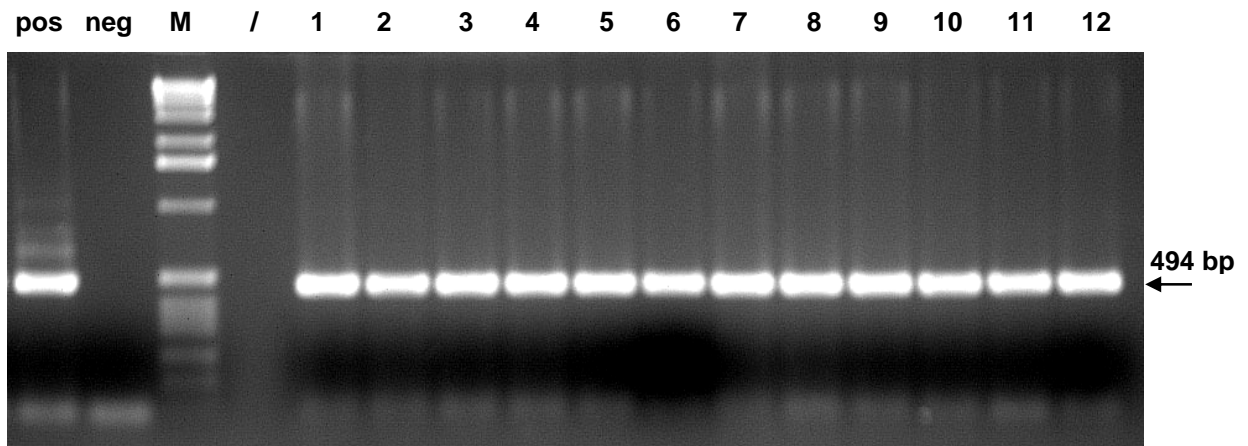


Abb. 6: Qualitätssicherung der Aufreinigung der Mausschwanz-DNA mit Hilfe einer β -Globin-PCR. Bei allen 12 untersuchten Proben erscheint im Agarosegel die für β -Globin spezifische Bande mit 494 bp. In der ersten Spur ist die Positivkontrolle und in Spur 2 die Negativkontrolle aufgetragen. Beim Größenstandard handelt es sich um den 1kb-Leiter Marker (M).

Nach einem positiven β -Globin Befund wurde das Vorhandensein des Transgens mittels E2-PCR überprüft. Das HPV8-E2-spezifische PCR Produkt ist 1566 bp lang und konnte mittels elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel dargestellt werden. Unter den Nachkommen heterozygoter Mäuse gab es etwa 50% E2 Transgen-positive Tiere (Abb. 7).

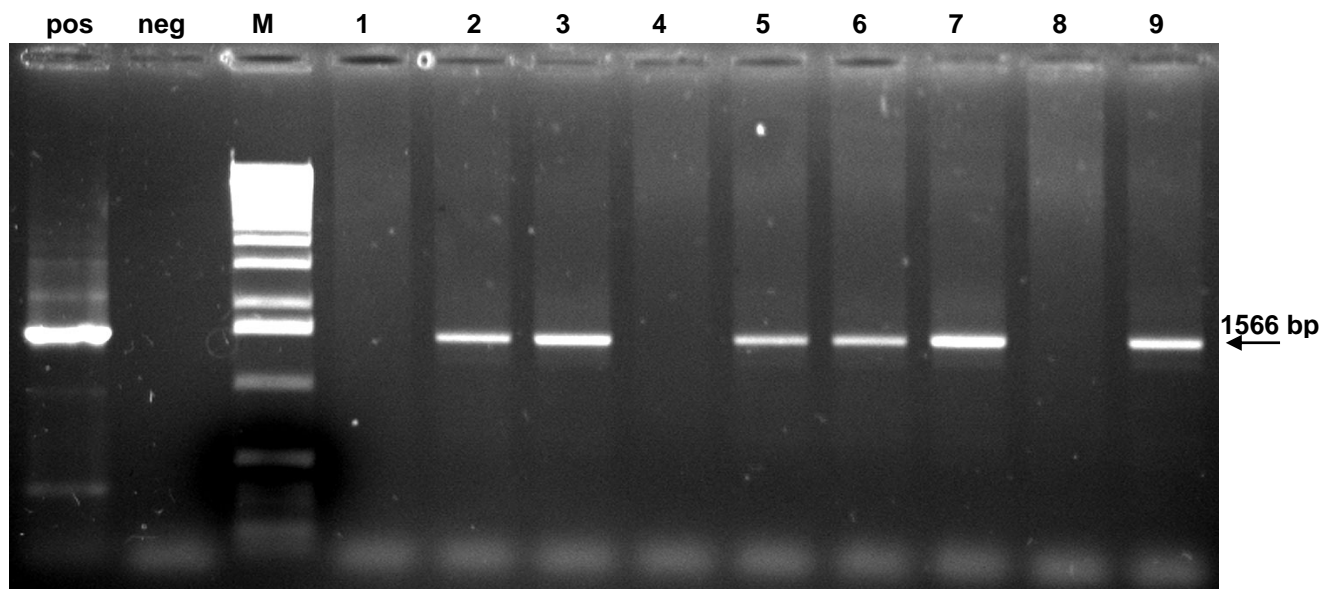


Abb. 7: Nachweis des HPV8-E2 Transgens. Bei den getesteten Mäusen der F4 Generation konnte bei den Tieren mit den Nummern 2, 3, 5, 6, 7, und 9 die HPV8-E2 spezifische Bande von 1566 bp nachgewiesen werden. In der ersten Spur ist die Positivkontrolle und in der zweiten Spur die Negativkontrolle aufgetragen. Beim Marker (M) handelt es sich um den 1kb-Leiter.

IV. ERGEBNISSE

Um die Rolle der Gendosis näher zu untersuchen, wurden außerdem homozygote Tiere etabliert. Hierfür wurden Transgen-positive, heterozygote Geschwistertiere aus der F1 Generation der Linie 2 miteinander verpaart. Bereits zwei Generationen später waren sämtliche Nachkommen positiv für das HPV8-E2 Gen. Um die Homozygotie zu bestätigen, wurden alle Nachkommen der F6 Generation mit Wildtyp FVB/N Mäusen gekreuzt. Aus diesen Verpaarungen gingen wiederum ausschließlich Transgen-positive Tiere hervor. Dieser Vorgang wurde mit sechs Tieren der F7 Generation wiederholt, wobei alle Nachkommen positiv für das E2 Gen getestet wurden. Daher kann man die Homozygotie als bestätigt ansehen (Abb. 8).

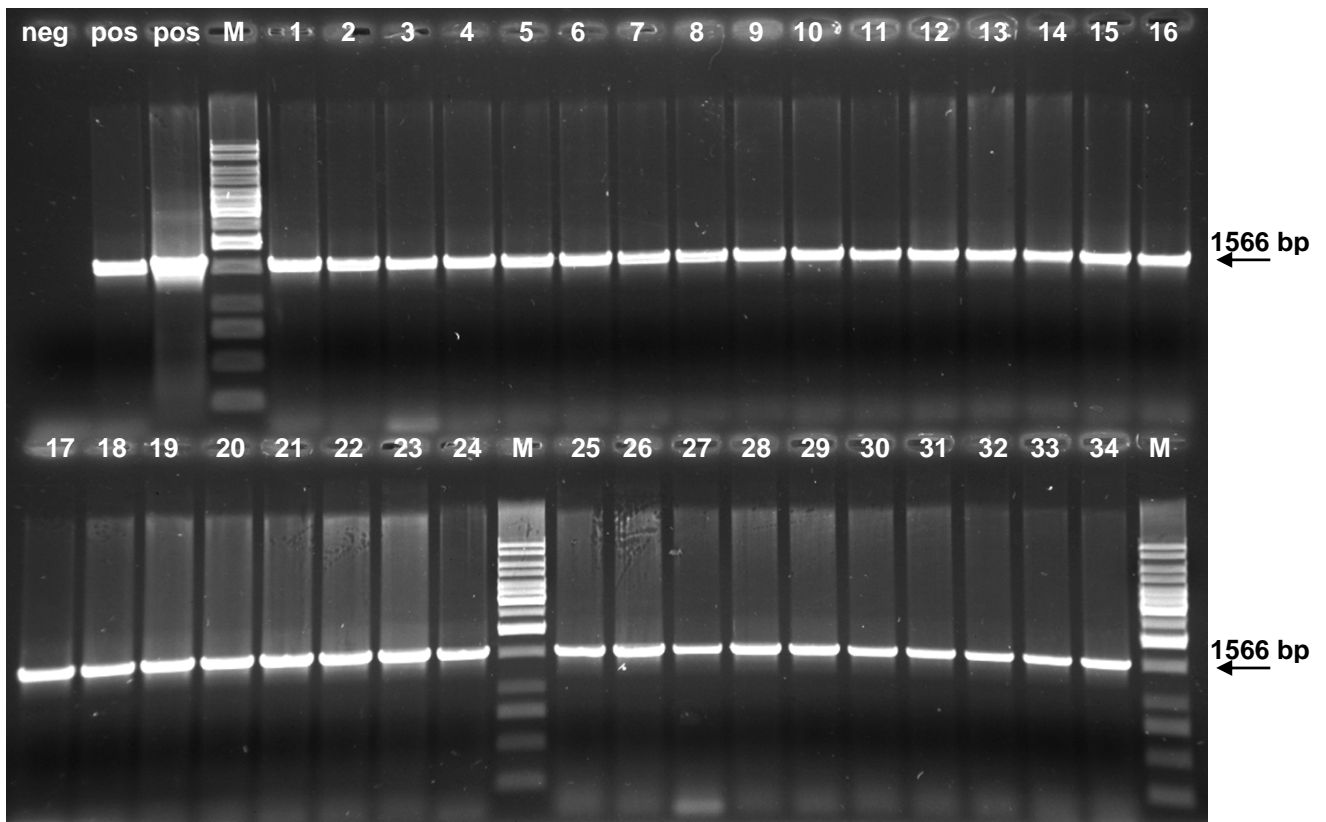


Abb. 8: Bestätigung der Homozygotie. Bei allen Nachkommen der homozygoten F6 Generation, die mit FVB/N Wildtyp Mäusen verpaart wurden, konnte das E2 Gen durch seine spezifische Bande im Agarosegel von 1566 bp nachgewiesen werden. In der ersten Spur ist die die Negativkontrolle und in den Spuren 2 und 3 wurden zwei unabhängige Positivkontrollen aufgetragen. Die homozygoten Mütter der Mäuse mit den Nummern 1-24 und 25-34 sind Wurfgeschwister. Beim Marker (M) handelt es sich um die 1kb-Leiter.

4.2. Quantitative Bestimmung der HPV8-E2 mRNA Expression

Mit Hilfe der quantitativen Echt-Zeit-PCR sollte der Expressionsspiegel von HPV8-E2 bestimmt werden. Hierfür wurden von transgenen Mäusen der drei heterozygoten Linien 2, 21 und 35, sowie der homozygoten Linie 2, Hautstanzen im Bereich des Rückens entnommen. Nach der Trennung von Dermis und Epidermis wurde aus den Zellen der Epidermis mittels RT-PCR die entsprechende cDNA synthetisiert. Der Erfolg der cDNA Synthese wurde in einer β -Aktin PCR überprüft (Daten nicht gezeigt) und anschließend eine quantitative Echt-Zeit-PCR mit den spezifischen Primern für HPV8-E2 im LightCycler durchgeführt. Die Kopienzahl der E2 Transkripte wurde mit der Kopienzahl von β -Aktin normalisiert.

Diese Messung zeigte unterschiedliche RNA Expressionsspiegel in den Mäusen der vier Linien. Die Tiere der homozygoten Linie 2 (FVB/N) zeigten etwa die doppelte RNA Menge (3,4 HPV8-E2 Transkripte / β -Aktin Transkript) im Vergleich zu den heterozygoten Mäusen derselben Linie (1,7 HPV8-E2 Transkripte / β -Aktin Transkript). Diese wiederum wiesen eine dreifach erhöhte RNA Expression auf, verglichen mit den heterozygoten Tieren der Linie 35 (DBA/BI6) (0,6 HPV8-E2 Transkripte / β -Aktin Transkript). Die Expressionsraten waren innerhalb einer Linie über alle Generationen hinweg vergleichbar. Bei keiner der transgenen Mäuse aus Linie 21 konnte HPV8-E2 mRNA nachgewiesen werden (Tab. 1).

Nr.	Linie	Generation	Alter (Wochen)	n HPV8-E2 Transkripte / β -Aktin Transkript
1	Line 2 ht	F0	87	1,85 \pm 0,17
2	Line 2 ht	F1	60	1,61 \pm 0,33
3	Line 2 ht	F2	47	1,45 \pm 0,09
4	Line 2 ht	F3	30	1,94 \pm 0,27
5	Line 2 ht	F7	69	1,97 \pm 0,45
6	Line 2 ho	F6	52	3,00 \pm 0,10
7	Line 2 ho	F6	52	3,04 \pm 0,30
8	Line 2 ho	F7	38	3,88 \pm 0,46
9	Line 2 ho	F7	38	3,67 \pm 0,15
10	Line 35 ht	F0	86	0,68 \pm 0,03
11	Line 35 ht	F1	56	0,45 \pm 0,13
12	Line 35 ht	F8	8	1,05 \pm 0,21
13	Line 35 ht	F8	8	0,20 \pm 0,06
14	Line 21 ht	F0	86	0,00
15	Line 21 ht	F2	56	0,00
16	Line 21 ht	F8	34	0,00

Tab. 1: Expressionsspiegel von HPV8-E2 in Mäusen der verschiedenen Linien in unterschiedlichen Generationen. Die Kopienzahl der Transkripte von HPV8-E2 wurde mit der Kopienzahl von β -Aktin normalisiert. Die Abkürzung „ht“ kennzeichnet heterozygote und „ho“ steht für homozygote E2 Transgen-positive Mäuse. Die Transkripte sind hier als Mittelwert aus zwei unabhängigen Messungen von jeweils zwei Proben derselben Maus mit den sich daraus ergebenden Standardabweichungen dargestellt.

4.3. Spontane Tumorentstehung in HPV8-E2 transgenen Mäusen

4.3.1. Zeitlicher Verlauf der Tumorentwicklung

Alle HPV8-E2 Transgen-positiven Tiere wurden während ihres gesamten Lebens genauestens beobachtet. In einem Abstand von sieben Tagen wurden die Tiere auf Auffälligkeiten im Verhalten oder auf Hautveränderungen untersucht und bei gegebenem Anlass euthanasiert. Im Alter von 52 Wochen hatten 8% (5/60) der heterozygoten Tiere (Abb. 9a) und 67% (8/12) der homozygoten (Abb. 9b) Mäuse aus Linie 2 spontan Hautläsionen entwickelt.

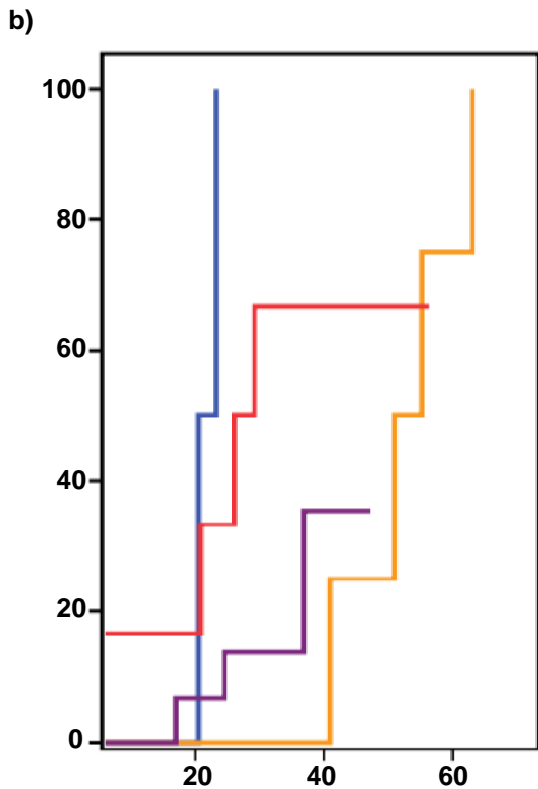
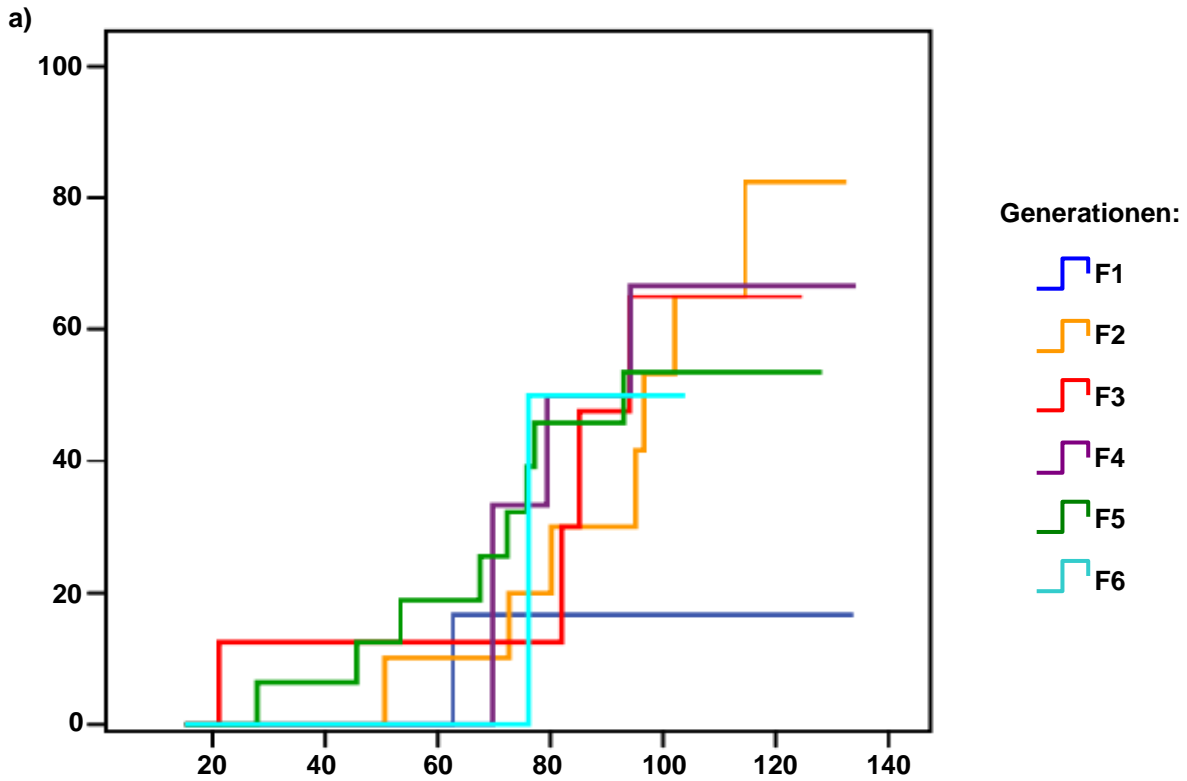


Abb. 9: Zeitlicher Verlauf der Tumorentwicklung in HPV8-E2 transgenen Mäusen. Die Tumorentwicklung wird hier mittels der Kaplan-Meier-Analyse dargestellt. Auf der X-Achse ist das Alter der Mäuse bei Tumorentstehung in Wochen angegeben und die Y-Achse zeigt den Anteil der transgenen Mäuse mit einem Tumor in %. a) Zeitlicher Verlauf der Tumorentwicklung in sechs Generationen der HPV8-E2 heterozygoten Mäuse aus Linie 2. Zensiert wurden hier innerhalb des ersten Lebensjahres 6 von 60 Mäusen, die aus unbekanntem Grund verstorben sind und keine Hautveränderung entwickelt haben. Im zweiten Lebensjahr wurden zehn weitere Tiere aus diesem Grund zensiert. b) Tumorentwicklung in vier Generationen der homozygoten Mäuse aus der Linie 2. Von insgesamt 27 homozygoten Mäusen verstarb nur ein Tier innerhalb des ersten Lebensjahres ohne einen Tumor entwickelt zu haben.

Verglichen mit den heterozygoten Mäusen ergibt sich für die homozygoten Tiere mit dem doppelten E2 Expressionsspiegel ein 22-fach erhöhtes Risiko innerhalb des ersten Lebensjahres einen Hauttumor zu entwickeln ($p < 0,001$) (x-Quadrat-Test).

Bei einer verlängerten Beobachtungszeit der heterozygoten Mäuse aus den Generationen F1 bis F6, im Einzelfall bis zu 144 Wochen, entwickelten 20 weitere Tiere Hautläsionen (Abb. 9a). Wenn man die Mäuse ausschließt, die aus unbekanntem Gründen verstarben bevor sie einen Tumor entwickelten, zeigten nach 2 Jahren über 60% der HPV8-E2 Transgen-positiven, heterozygoten Tiere der Generationen F2, F3 und F4 Hautveränderungen. Im Durchschnitt entwickelten sich diese Hauttumore 74 ± 22 Wochen, in Ausnahmefällen jedoch bereits 21 Wochen oder spätestens 114 Wochen nach der Geburt (Abb. 10).

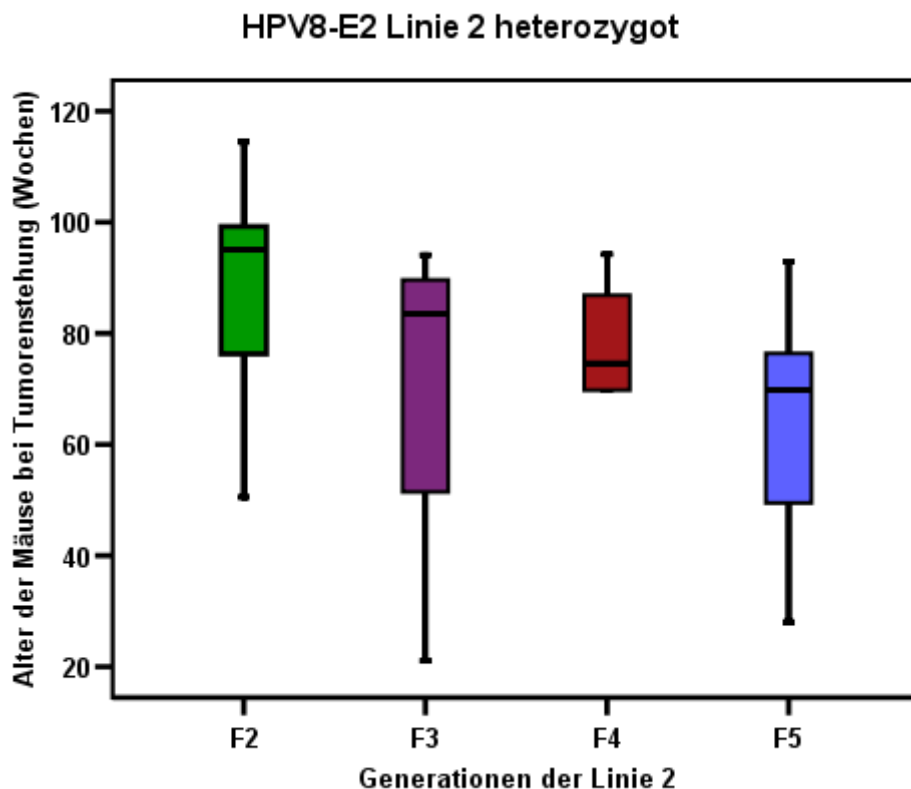


Abb. 10: Zeitlicher Verlauf der Tumorentwicklung in HPV8-E2 transgenen Mäusen der Linie 2.

Dieser vertikale Box-Plot zeigt das durchschnittliche Alter der heterozygoten HPV8-E2 Mäuse bei Tumorentstehung exemplarisch für die Generationen F2, F3, F4 und F5 der Linie 2. Der Median ist jeweils durch einen schwarzen Querbalken innerhalb der Box gekennzeichnet. Die farbig unterlegten Kästchen kennzeichnen den Altersbereich, in dem die meisten der Tiere aus der jeweiligen Generation einen Tumor entwickelten und die schwarzen Linien kennzeichnen die jeweiligen Ausnahmefälle die nicht innerhalb des durchschnittlichen Zeitraums einen Tumor entwickelt haben.

Bei den heterozygoten Mäusen der Linie 35 (DBA/BL6) verstarben 43% (12/28) der transgenen Mäuse innerhalb des ersten Lebensjahres aus unbekanntem Gründen ohne Hautveränderung und 13 weitere (47%) im zweiten Lebensjahr. Von insgesamt 9 Mäusen die ein Alter von mindestens 100 Wochen erreichten, entwickelten bis heute zwei spontan Hautläsionen im Alter von 100 bzw. 140 Wochen. Keines der HPV8-E2 negativen Kontrolltiere entwickelte Auffälligkeiten der Haut oder des Fells. Auch die Tiere der Linie 21, die keine HPV8-E2 mRNA Expression zeigten, entwickelten während des gesamten Beobachtungszeitraums keinerlei Hauttumoren.

4.3.2. Makroskopisches Bild der spontanen Hautläsionen

Die HPV8-E2 transgenen Tiere zeigten einen völlig neuartigen Phänotyp, der sich vom Phänotyp der zuvor beschriebenen HPV8-GFR und -E6 transgenen Mäuse (Schaper *et al.*, 2005; Marcuzzi, 2006) deutlich unterschied. Mit zunehmendem Alter verschlechterte sich der Gesamtzustand der Mäuse. Verglichen mit den negativen Kontrolltieren wirkten sie geschwächt und hatten ein struppiges, nicht mehr so dichtes Fell. Selbst wenn keine makroskopisch erkennbaren Hautläsionen vorlagen, zeigten die Tiere vornehmlich an vorderen dorsalen Körperregionen Haarverlust und eine schuppige Haut (Abb. 11).

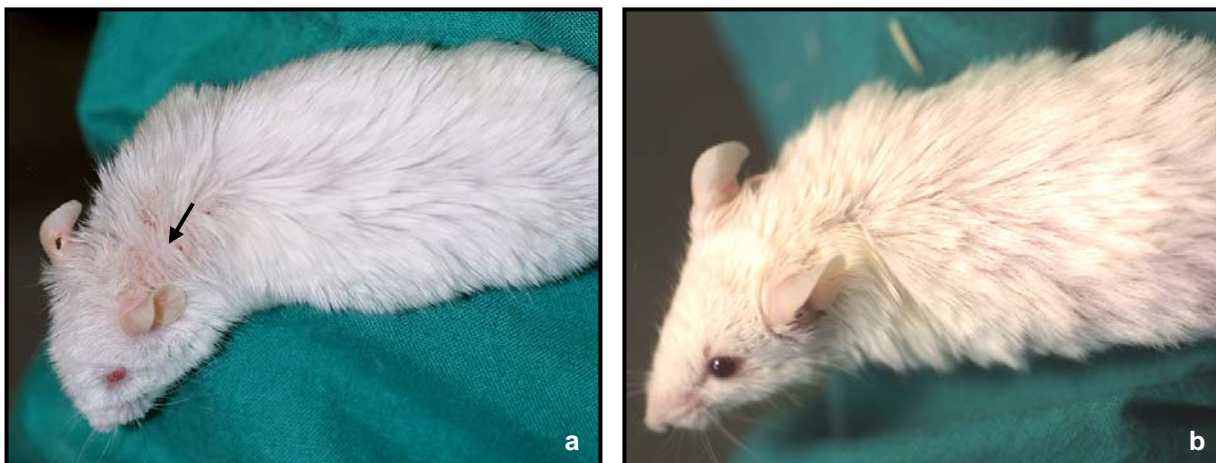


Abb. 11: HPV8-E2 transgene Mäuse ohne makroskopisch erkennbare Hauttumoren. a) Heterozygote E2 Transgen-positive Maus aus der F2 Generation der Linie 2 im Alter von 83 Wochen, mit deutlich sichtbarem Haarverlust (Alopezie) im Bereich krustig belegter Haut am Hals dorsal sowie am vorderen Rücken. (siehe Pfeil). b) HPV8-E2 transgene Maus der F3 Generation der heterozygoten Linie 2 im Alter von 109 Wochen. Das Haarkleid ist stumpf; die normalerweise sichtbare parallele Anordnung der Haare ist gestört (struppiger Aspekt).

Die zumeist flachen, plaqueartigen erhabenen, teils verrukösen Tumoren der heterozygoten HPV8-E2 Mäuse entwickelten sich zunächst meist in der dorsocranialen Region oder auf der Bauchseite und breiteten sich im weiteren Verlauf dorsoventral und ventralcaudal aus. Die Läsionen waren oft krustig belegt und von Haarverlust begleitet und zeichneten sich durch die Bildung von Ulcera aus (Abb. 12a). Alle entstandenen Tumore zeigten ein kontinuierliches Wachstum und in keinem Fall der untersuchten Tiere kam es zu einer späteren Abheilung der Hautläsionen. Die Hauttumoren der HPV8-E2 homozygoten Tiere unterschieden sich makroskopisch nicht von denen der heterozygoten Mäuse. Sie erschienen meistens zunächst auf der dorsalen Seite und breiteten sich dann bei längerer Beobachtungszeit ventralcaudal aus. Sie waren entzündlich, ulceriert und von Haarverlust begleitet (Abb. 12b).

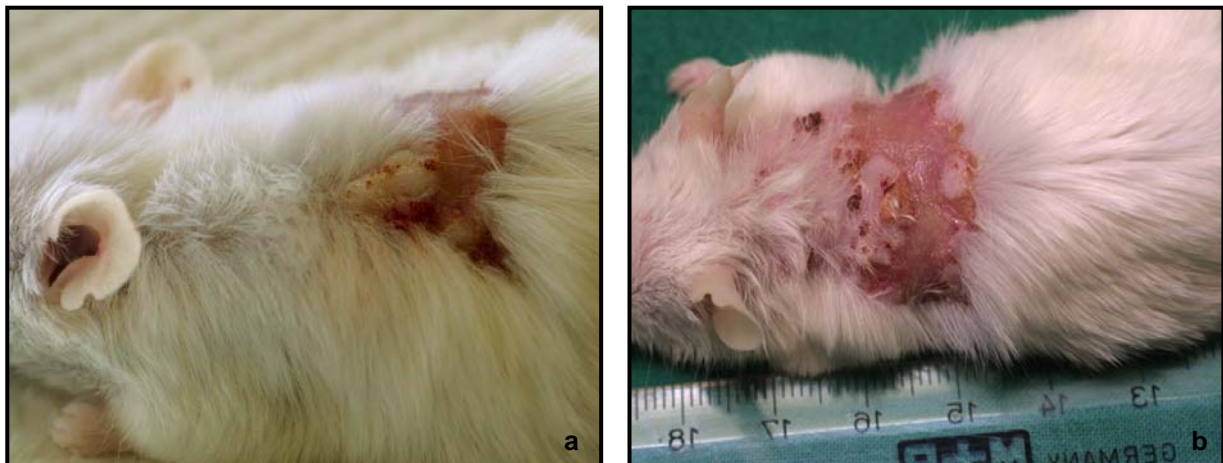


Abb. 12: Charakteristische Hautläsionen HPV8-E2 transgener Mäuse. a) Heterozygote HPV8-E2 Maus der F2 Generation im Alter von 98 Wochen mit einem plaqueartig wachsenden Tumor mit Ulceration und Alopezie. b) Homozygote Maus aus der F4 Generation der Linie 2 im Alter von 47 Wochen mit einer typischen Hautläsion im dorsocranialen Rückenbereich.

Die bisher beobachteten spontanen Hautläsionen der zwei transgenen Mäuse der Linie 35 waren, ähnlich den spontanen Tumoren der transgenen Mäuse der Linie 2, zeigten aber zusätzlich vermehrt oberflächliche Ulcerationen (Abb. 13).

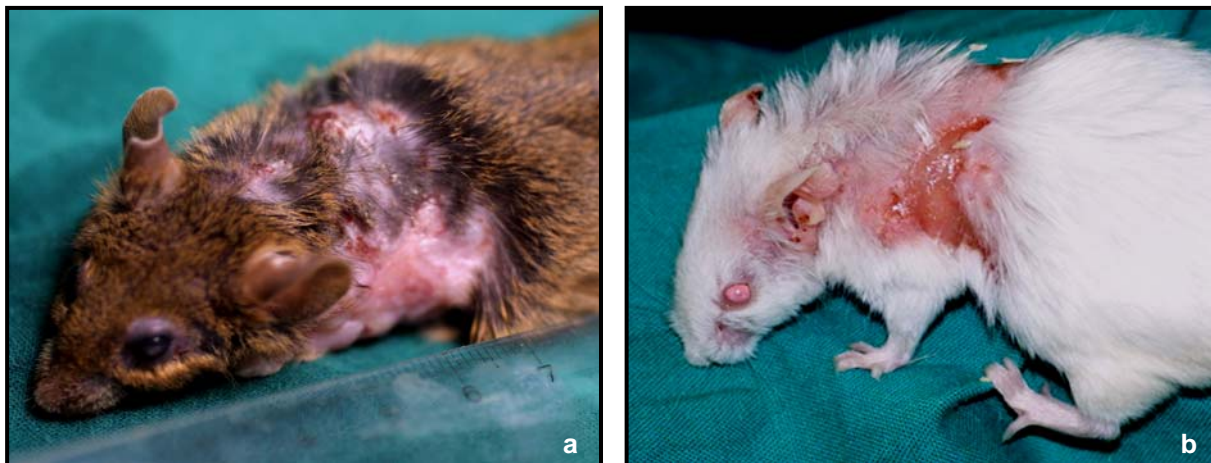


Abb. 13: Hautläsionen der HPV8-E2 transgenen Mäuse aus der Linie 35. a) E2 transgene Maus der F1 Generation aus Linie 35 im Alter von 140 Wochen mit einem ausgedehnten, großflächig ulcerierten Hauttumor. b) Transgene Maus der F5 Generation der Linie 35 im Alter von 100 Wochen mit einem plaqueartig erhabenen, oberflächlich ulcerierten Tumor.

4.3.3. Histologie der spontanen Hauttumoren

Insgesamt wurden Hauttumore von 16 heterozygoten Tieren der Linie 2 und von 17 Mäusen mit einer unklaren Zygotie, die aus Inzucht-Verpaarungen für die Etablierung der homozygoten Linie 2 stammten, histologisch untersucht. Keine Maus zeigte das für die HPV8-GFR Tumoren charakteristische, massive exophytische Wachstum. Dreißig (91%) der untersuchten Hautläsionen zeigten ein hyperplastisches Haarfollikel epithel, vor allem im Bereich der Haarfollikelöffnung (Infundibulum) (Abb. 14a). Die interfollikuläre Epidermis war abschnittsweise stark oder mittelgradig verbreitert (Akanthose) und zeigte eine deutliche Verdickung der Hornschicht (Hyperkeratose). Die Hornschicht (stratum corneum) enthielt abschnittsweise intakte Zellkerne (Parakeratose) als Zeichen für den unvollständigen Ablauf des Differenzierungsprogramms. Abschnittsweise fanden sich leichte Dysplasiezeichen wie eine gestörte Schichtung des Epithels und einzelne atypische Keratinozyten in den basalen und suprabasalen Schichten des interfollikulären und infundibulären Epithels (Abb. 14b). Schwere Dysplasien wurden bei zwei (6%) der spontan entstandenen Tumoren beobachtet. Diese entwickelten sich im Alter von 90 bzw. 101 Wochen (Abb. 14c). Die Talgdrüsen erschienen bei einigen Mäusen leicht vergrößert (nicht gezeigt). Oft zeigte die Dermis eine stark entzündliche Reaktion. Im Entzündungsinfiltrat fanden sich mononukleäre Zellen (Lymphozyten, Makrophagen) sowie polymorphkernige Granulozyten.

Die Histologie von zwei Tumoren der Linie 35 entsprach der von den spontanen Tumoren der Linie 2. Die Läsionen waren durch eine infundibuläre Hyperplasie, Akanthose und hyperplastisches Haarfollikel-epithel, vor allem im Bereich des Infundibulum und leichter Dysplasie gekennzeichnet (Abb. 14d).

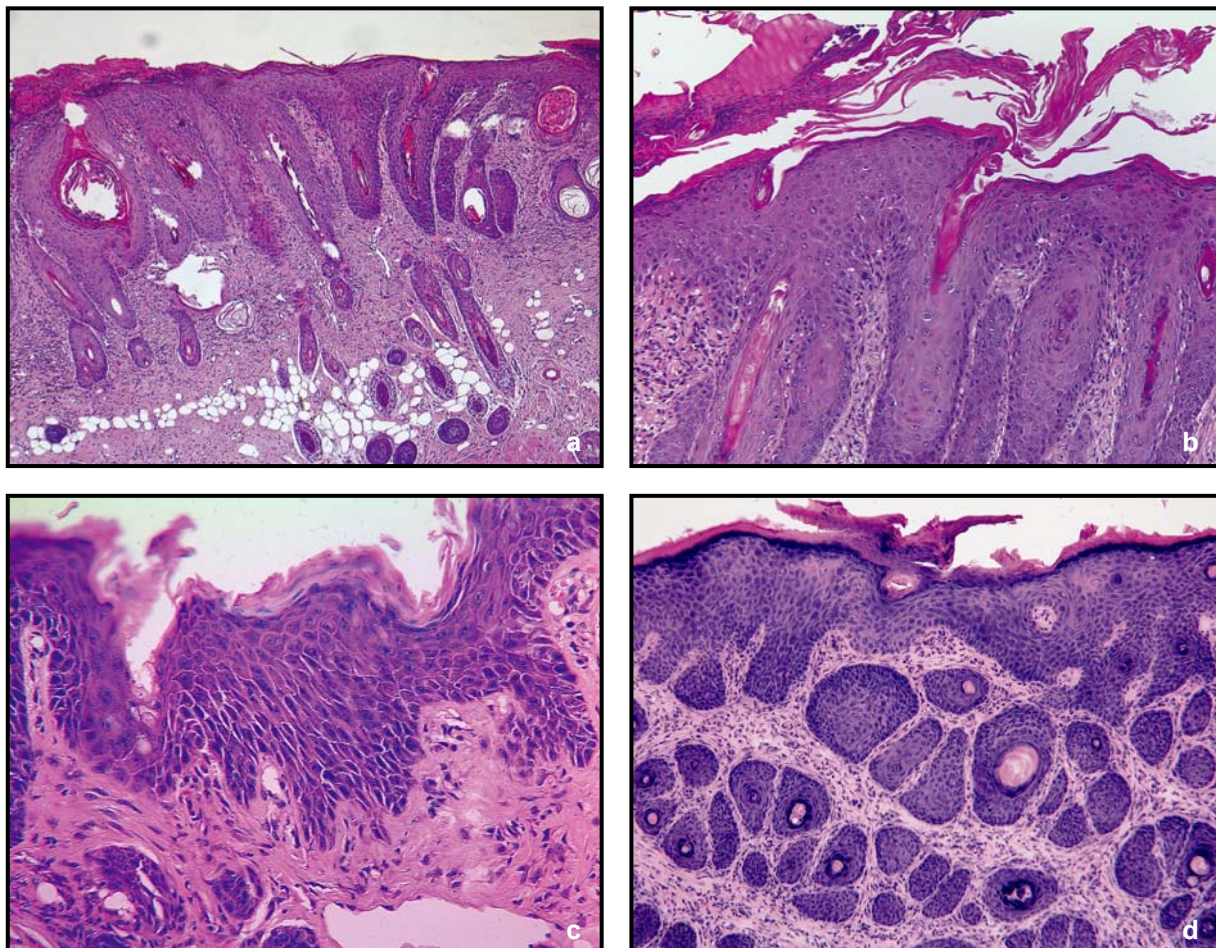


Abb. 14: Histologie spontaner Hauttumoren HPV8-E2 transgener Mäuse. ((a-d) H&E Färbungen) a) Läsion der Rückenhaut mit starker infundibulärer Hyperplasie, Akanthose und kutaner Fibrose. In der Dermis ist ein dichtes entzündliches Infiltrat zu erkennen (100x Vergrößerung). b) Diese stärkere Vergrößerung (250x) einer weiteren spontan entstandenen Läsion einer HPV8-E2 transgenen Maus zeigt eine milde Dysplasie mit einzelnen atypischen Keratinozyten, starker Akanthose sowie Hyper- und Parakeratose. Das entzündliche Infiltrat enthält vorwiegend mononukleäre Zellen. c) Verlust der regulären epidermalen Schichtung und einzelne atypische Keratinozyten sowie entzündlich-fibrosierende Stromareaktion in einer deutlich dysplastischen Hautläsion. d) Hautläsion einer transgenen Maus der Linie 35. Hier stehen infundibuläre Hyperplasie und Akanthose sowie Hyper- und Parakeratose im Vordergrund. ((c-d) Vergrößerung 250x.)

Bei zwei heterozygoten Mäusen der Linie 2 wurden im Alter von 103 Wochen und 69 Wochen schnell wachsende, wenig differenzierte Plattenepithelkarzinome der Haut diagnostiziert, die besonders durch ihre Spindelzell-Morphologie auffielen (Abb. 15a, b). Die hohe proliferative Aktivität dieser PEK wurde durch eine Ki67 Färbung nachgewiesen (Abb. 15c). Die immunhistochemischen Färbungen für Zytokeratin-14 zeigten eine deutliche Färbung von invasiven, teils spindelzelligen Tumoranteilen, was auf die Herkunft des Tumors vom geschichteten Plattenepithel hinweist. Die offensichtliche, histologisch nachweisbare Verbindung des Tumors zur Epidermis ist ein weiterer Beleg für seinen Ursprung aus derselben. (Abb. 15d).

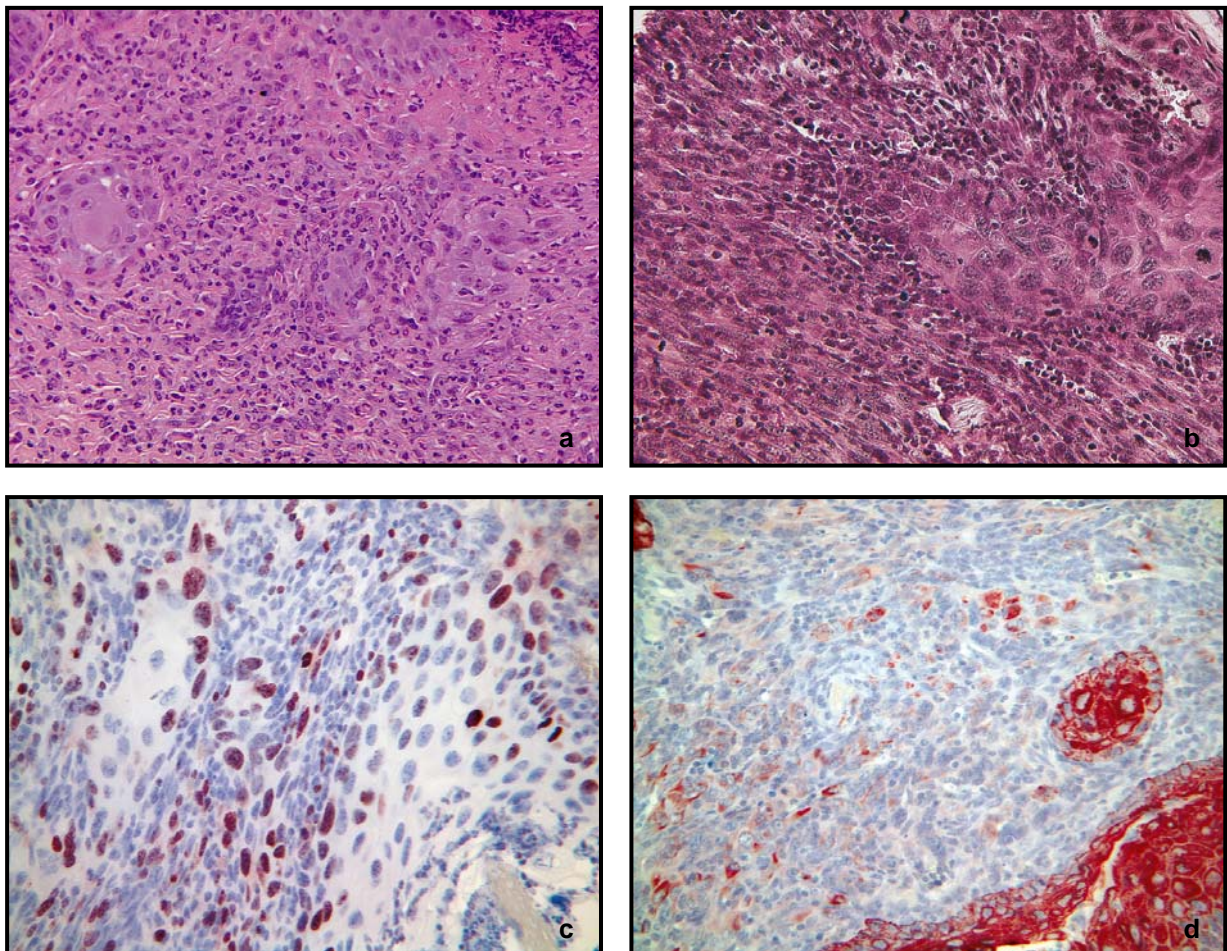


Abb. 15: Histologie und Immunhistochemie spontan entstandener Plattenepithelkarzinome HPV8-E2 transgener Mäuse. ((a-b) H&E Färbung) a, b) Ausschnitt aus einem histologischen Präparat eines PEK. Man erkennt atypische epitheloide Zellverbände (a) neben spindelzelligen Formationen (b) in einem entzündlichen Stroma. Deutliche Zell- und Kernpolymorphie mit zahlreichen atypischen Mitosen der Tumorzellen (b). Die herausragenden Bestandteile dieses Tumors sind die Spindelzellen. Eine charakteristische Plattenepithel-Zellaggregation wird deutlich. c) Die Ki67 Färbung (braun) zahlreicher Tumorzellen zeigt die hohe proliferative Aktivität des Tumorgewebes. d) Die immunhistochemische Färbung für Zytokeratin-14 zeigt den epidermalen Ursprung der Tumorzellen. ((a-d) Vergrößerung 400x).

Von den spontan entstandenen Hautveränderungen der homozygoten HPV8-E2 Mäuse der Linie 2 wurden bislang vier als irreguläre Läsionen mit infundibulärer Hyperplasie, Akanthose und leichter Dysplasie beschrieben (nicht gezeigt).

4.4. Tumorentwicklung der HPV8-E2 Mäuse nach UV-Bestrahlung

4.4.1. Verlauf der UV-induzierten Tumorentstehung

Um den Effekt einer UV-Bestrahlung auf die Tumorentwicklung in HPV8-E2 Mäusen zu untersuchen und auf diese Weise einen möglichen Synergismus einer HPV-Infektion und UV-Licht bei der Hautkarzinogenese nachzuweisen, wurden Transgen-positive Mäuse einmalig einer UV-Dosis ausgesetzt, die in vorangegangenen Experimenten bestimmt worden war (Marcuzzi, 2006). Heterozygote Tiere wurden im Alter von 8 bis 56 Wochen, wenn sie noch keine erkennbaren Hautveränderungen aufwiesen, gleichzeitig mit $10\text{J}/\text{cm}^2$ UVA und $1\text{J}/\text{cm}^2$ UVB bestrahlt. Nach etwa vier Tagen war ein deutliches Erythem erkennbar (Abb. 16a, d). Dieses Erythem heilte bei den ebenfalls bestrahlten Transgen-negativen Geschwistertieren innerhalb von 28 Tagen vollständig ab (Abb. 16b, e). Die UV-induzierten Hautläsionen transgener Tieren verheilten nur ansatzweise und innerhalb der nächsten drei Wochen manifestierten sich Entzündungen, die bei den meisten Mäusen auch bei längerer Beobachtung nicht mehr abheilten (Abb. 16c, f). Nach der Bestrahlung entwickelten 87% (13/15) der Mäuse aus Linie 2 und 36% (4/11) aus Linie 35 Hauttumore. Durch die UV-Bestrahlung konnte somit der Zeitpunkt der Tumorentstehung in den HPV8-E2 transgenen Mäusen beeinflusst werden. Während die spontane Tumorentwicklung im Durchschnitt 74 ± 22 Wochen nach der Geburt stattfand, bildeten sich die UV-induzierten Tumore vier Wochen nach Bestrahlung.

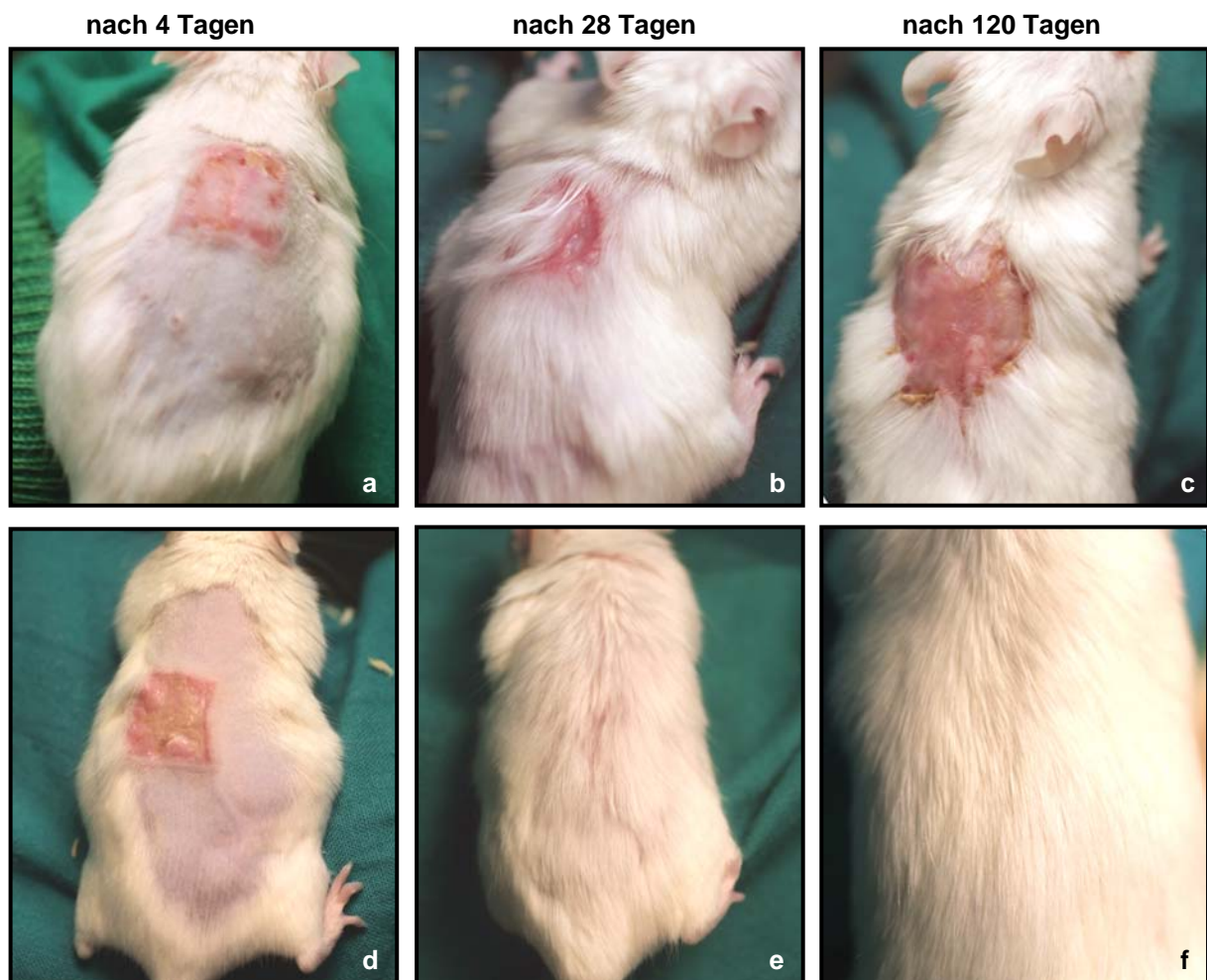


Abb. 16: Entwicklung UV-induzierter Hauttumore bei den heterozygoten HPV8-E2 transgenen Mäusen der Linie 2. Gezeigt sind jeweils drei Bilder von bestrahlten Mäusen am Tag 4, 28 und 120 nach der UVA/UVB Exposition. Die obere Bildreihe (a, b, c) zeigt eine E2 Transgen-positive, heterozygote Maus der F7 Generation von Linie 2, die im Alter von 34 Wochen bestrahlt wurde. Die untere Bildreihe (d, e, f) zeigt ein Transgen-negatives Tier, aus dem gleichen Wurf der oben gezeigten Maus, das zum selben Zeitpunkt bestrahlt wurde.

4.4.2. Histologie der UV-induzierten Hauttumore

Die histologischen Untersuchungen ergaben, dass sich die UV-induzierten Hauttumore nicht von den spontan entstandenen Tumoren der HPV8-E2 transgenen Mäuse unterscheiden. Eine 34 Wochen alte Maus der Linie 35 entwickelte zehn Wochen nach UV-Bestrahlung einen Tumor im hinteren Rückenbereich (Abb. 17a). Nach drei Wochen mußte sie euthanasiert werden. Histologische Untersuchungen ergaben, dass es sich hier um ein wenig differenziertes PEK mit ausgeprägter Spindelzell-Morphologie handelte. Der Tumor wies charakteristische Malignitätsmerkmale wie eine Störung der normalen epidermalen Schichtung, Zell- und Kernpolymorphie sowie atypische Mitosen auf und war oberflächlich ulceriert (Abb. 17b).

Die atypischen spindelzelligen Tumorverbände zeigten ein invasives Wachstum mit Infiltration des Pannikulus carnosus (Abb. 17c). Eine Zytokeratin-14 Färbung bewies den epidermalen Ursprung der Tumorzellen (Abb.17 d).

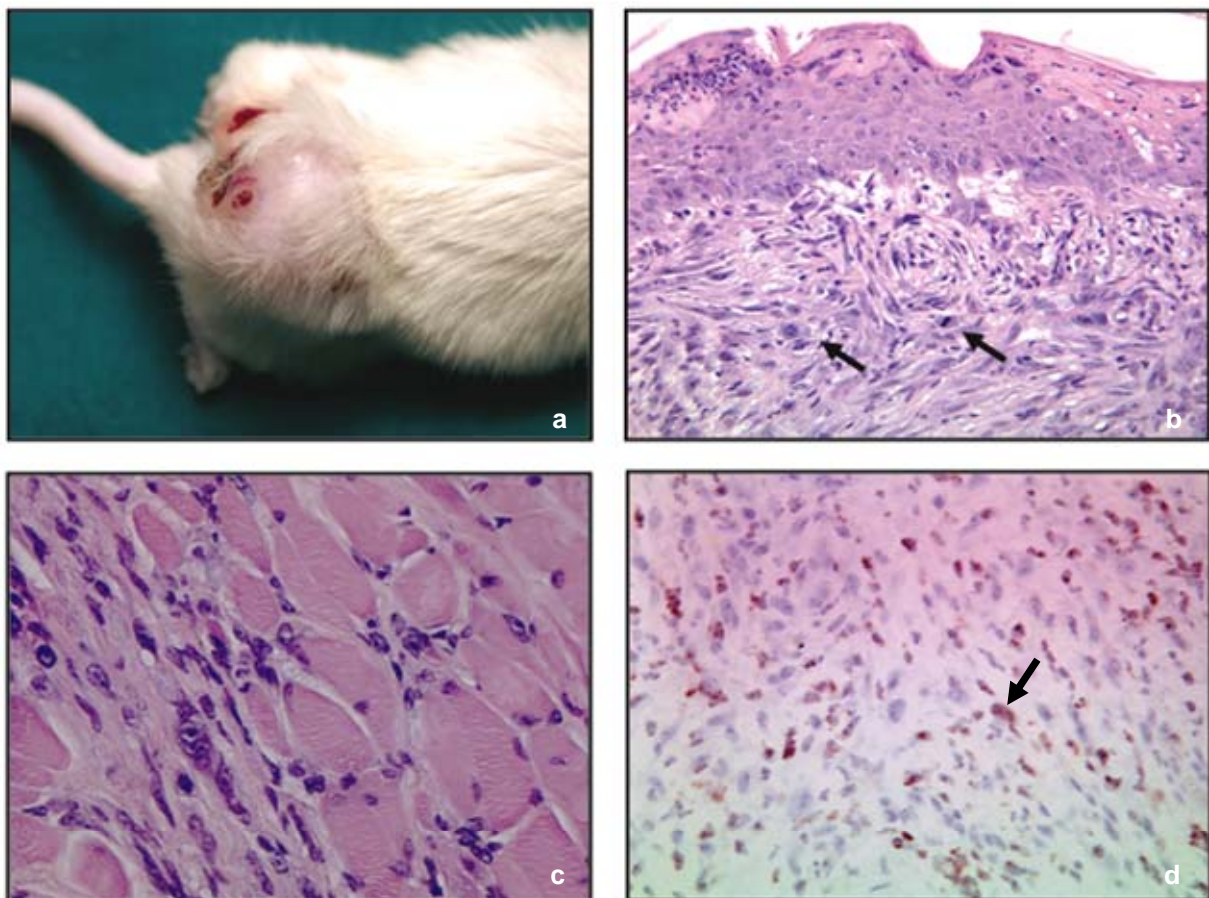


Abb. 17: UV-induzierte Tumorentwicklung in HPV8-E2 transgenen Mäusen. a) Diese transgene Maus der Linie 35 entwickelte einen 1,5 x 2 x 0,7 cm großen, sehr schnell exophytisch wachsenden Tumor, 10 Wochen nach der Bestrahlung im Bereich des UV-induzierten Erythems. b) Gestörte epitheliale Schichtung und oberflächliche Ulceration eines PEK. Es finden sich Bereiche mit stark ausgeprägter Spindelzell-Morphologie und zahlreichen Atypien (durch die Pfeile gekennzeichnet). (H&E Färbung des UV-induzierten Spindelzelltumors, Vergrößerung 250x). c) Invasives Wachstum des Tumors mit Infiltration der quergestreiften Muskulatur (Vergrößerung 650x). d) Die Tumorzellen zeigen eine positive Färbung für Zytokeratin-14 (Vergrößerung 400x) (Pfeil deutet auf eine positiv gefärbte Tumorzelle).

4.5. Immunhistochemische Charakterisierung der Spindelzelltumore

Die Progression von gutartigen Läsionen zu invasiv wachsenden Karzinomen wird vom Verlust der epidermalen Zell-Adhäsion begleitet (Thompson *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006). Dieser als „Epitheliale-Mesenchymale-Transition“ (EMT) bezeichnete Prozess umfasst eine veränderte apical-basolaterale Zellpolarität und

veränderte Zell-Zell-Kontakte. Der daraus resultierende fibroblastoide Phänotyp zeichnet sich dadurch aus, dass die epithelialen Zellen nun auch mesenchymale Marker wie Fibronectin exprimieren. Um zu überprüfen, ob die Karzinom-Zellen der HPV8-E2 transgenen Mäuse diese EMT durchlaufen haben, wurden das UV-induzierte PEK, zwei spontane entstandene Karzinome sowie als Kontrolle ein spontan entstandener, gutartiger Tumor mit einem Antikörper gegen Vimentin gefärbt. Obwohl viele Zellen des Bindegewebes erwartungsgemäß angefärbt wurden, blieb die Mehrheit der spindelzellförmigen Tumorzellen Vimentin negativ (Abb. 18).

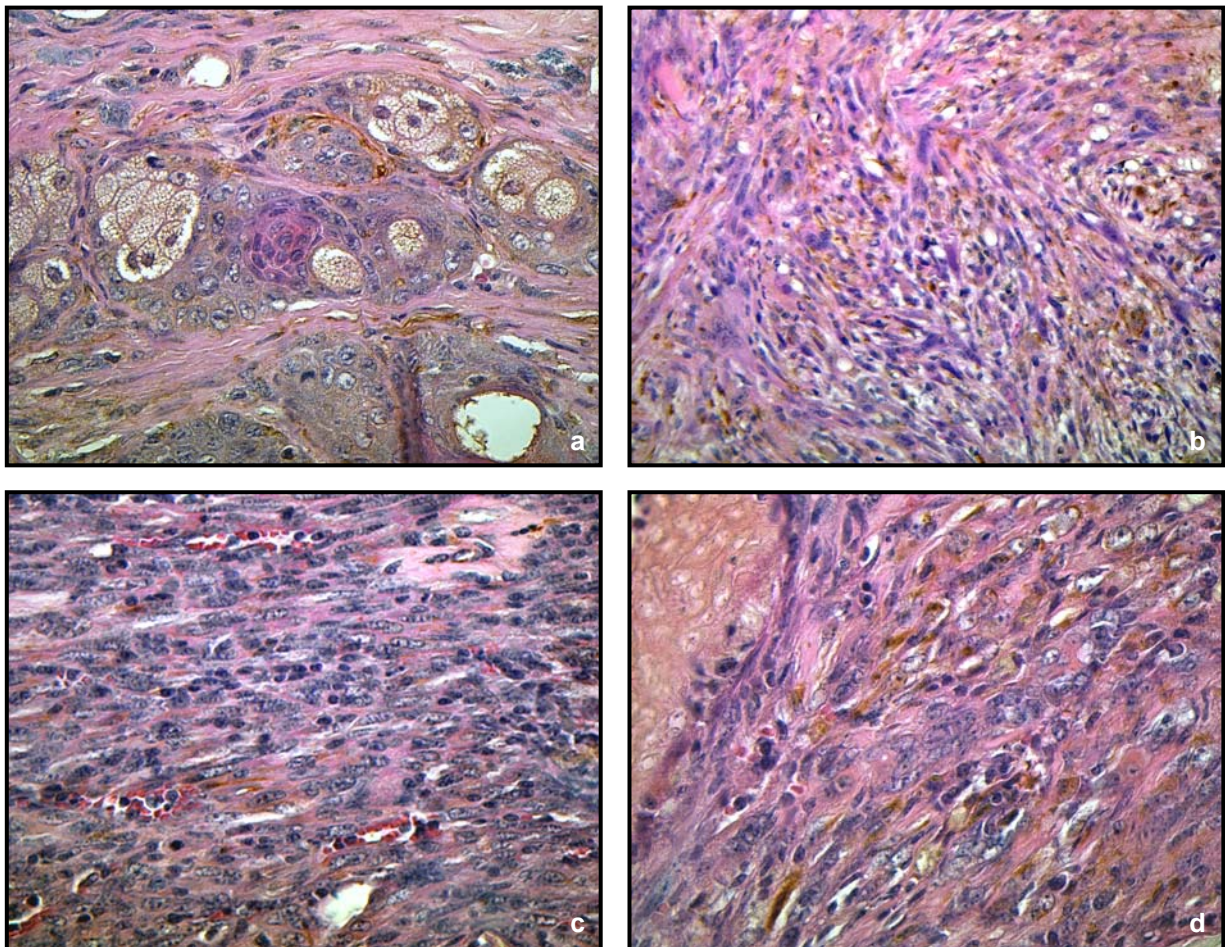


Abb. 18: Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin in Hauttumoren der HPV8-E2 transgenen Mäuse. a) Vimentin Färbung eines spontan entstandenen, gutartigen Hauttumors einer E2 transgenen Maus. Positive Vimentin- Färbung von Zellen des Tumor-Stromas. Die Tumorzellen selber sind Vimentin negativ. (Vergrößerung 400x). b) UV-induziertes PEK der Haut. Die Tumorzellen sind Vimentin-negativ; Zellen des Stromas zeigen Vimentin-Färbung (Vergrößerung 200x). c) d) Spontan entstandenes Karzinom der Haut. Tumorzellen sind Vimentin- negativ; Zellen des Stromas sind Vimentin- positiv (Vergrößerung 400x) (Braun-Färbung: spezifische Färbung gegen Vimentin).

4.6. Wundheilungsexperimente mit HPV8-E2 transgenen Mäusen

Vorangegangene Beobachtungen haben vermuten lassen, dass die Hauttumore der HPV transgenen Mäuse zunächst überwiegend an Stellen auftreten, die durch selbständiges Kratzen oder durch gegenseitig zugefügte Bissverletzungen verwundet worden waren. Um der Vermutung, Wundheilungsprozesse würden die Tumorbildung auslösen, nachzugehen, wurden HPV8-E2 transgene Mäuse, die noch keine sichtbaren Hautveränderungen aufwiesen, durch jeweils vier Hautstanzen gezielt verwundet und anschließend in Einzelhaltung beobachtet. Nach etwa 4 Wochen waren die Wunden bei allen E2 negativen Kontroll-Geschwistertieren vollständig abgeheilt und keine dieser Mäuse entwickelte zu einem späteren Zeitpunkt Hautveränderungen (Abb. 19c, d).

Von den verwundeten Transgen-positiven Tieren entwickelten innerhalb von 28 Tagen 60% (3/5) der heterozygoten Linie 2 und 67% (2/3) der Tiere aus Linie 35 Hautläsionen. In allen Fällen entstanden die Tumore an jeweils nur einer der verwundeten Stellen, die anderen drei gestanzten Hautareale verheilten vollständig innerhalb von etwa vier Wochen (Abb. 19a, b). Von den Mäusen der Linie 21, die keine E2 mRNA Expression zeigen und als zusätzliche Kontrolle dienten, entwickelte keine von fünf verwundeten Tieren eine Hautveränderung. Diese Experimente verdeutlichen, dass die Prozesse der Wundheilung in HPV8-E2 transgenen Mäusen die Entstehung von Hauttumoren zusätzlich induzieren.

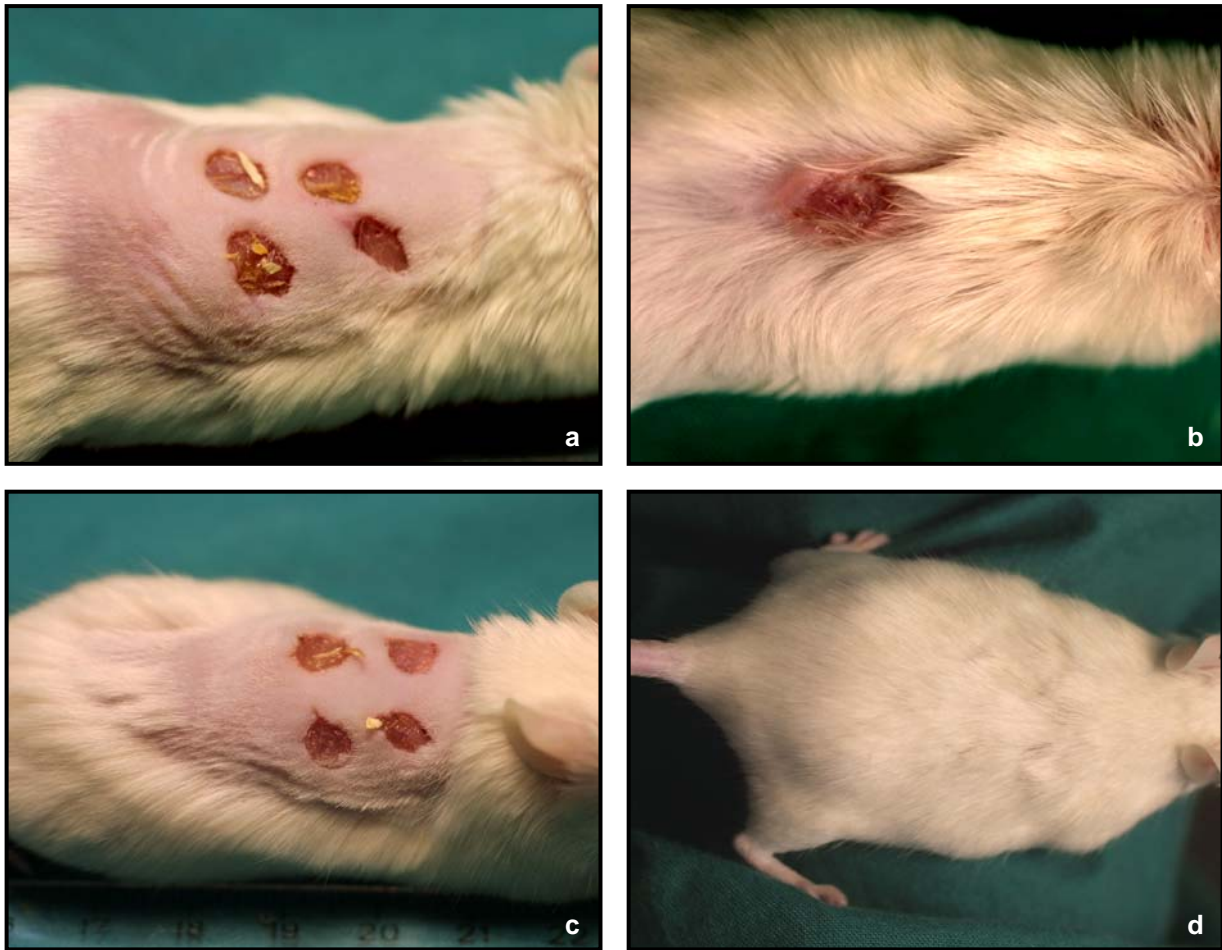


Abb. 19: Wundheilungsexperimente mit HPV8-E2 transgenen Mäusen. (a, b) E2 transgene, heterozygote Maus aus Linie 2 und ihr Transgen-negatives Geschwistertier (c, d) wurden im Alter von 52 Wochen mit vier 4mm durchmessenden Hautstanzen verwundet. Zwei Tage nach der Verwundung ist bei beiden Tieren eine leichte Schorfbildung erkennbar (a, c). Nach 28 Tagen waren die Wunden bei dem negativen Kontrolltier vollständig verheilt (d), während sich an einer der Biopsiestellen der E2 transgenen Maus ein Hauttumor entwickelt hat (b).

4.7. Expression der Matrix-Metalloproteinasen

4.7.1. Lokalisierung der gelatinolytischen Aktivität in HPV8-GFR Mäusen

Das invasive Wachstum von PEK erfordert die Penetration verschiedener Barrieren der Basalmembran und des Bindegewebes. Bei diesem Vorgang spielen insbesondere die Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 eine wichtige Rolle. Bereits während meiner Diplomarbeit konnte ich zeigen, dass die gelatinolytische Aktivität in den Tumoren der transgenen HPV8-GFR-Mäuse erhöht war. Um diese Aktivität im Tumorgewebe zu lokalisieren, wurden Papillome und PEK der HPV8-GFR Mäuse mittel *in situ* Zymographie untersucht. In allen untersuchten Tumoren war die gelatinolytische Aktivität im peritumoralem Stroma lokalisiert (Abb. 20).

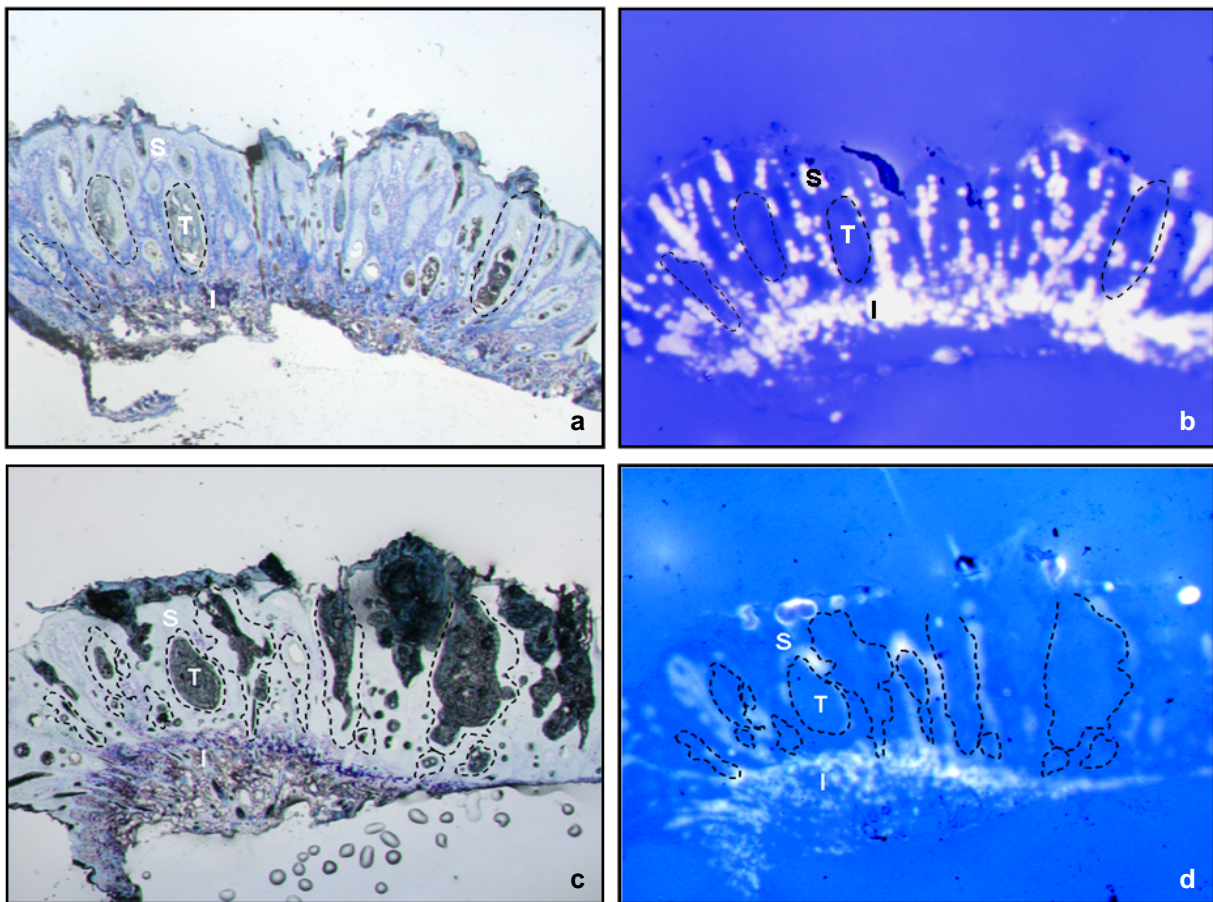


Abb. 20: Lokalisierung der gelatinolytischen Aktivität mit Hilfe der *in-situ* Zymographie. Die Tumorsinseln wurden durch gestrichelte Linien gekennzeichnet; (S= Stroma, T= Tumor, I= entzündliches Infiltrat) (Vergrößerung 200x). a) Spontan entstandenes Papillom einer HPV8-GFR transgenen Maus nach Methyleneblau-Färbung. b) Lokalisierung der gelatinolytischen Aktivität bei dem in a) gezeigten Papillom mittels Coomassie-Färbung. c) Methyleneblau-Färbung eines spontan entstandenen PEK einer HPV8-GFR transgenen Maus. d) Coomassie-Färbung desselben PEK.

4.7.2. Gelatinolytische Aktivität in Tumoren der HPV8-E2 Mäuse

Experimente mit HPV8-E2 exprimierenden humanen Keratinozyten in organotypischen Hautmodellen zeigten, dass die Gelatinase MMP-9 in diesen Kulturen überexprimiert war (Akgül, persönliche Mitteilung). Deshalb wurde die gelatinolytische Aktivität in Hautläsionen HPV8-E2-transgener Mäuse untersucht. Die spontan entstandenen gutartigen Tumore zeigten eine ähnlich starke und entsprechend lokalisierte gelatinolytische Aktivität wie die Papillome der HPV8-GFR Mäuse (Abb. 21).

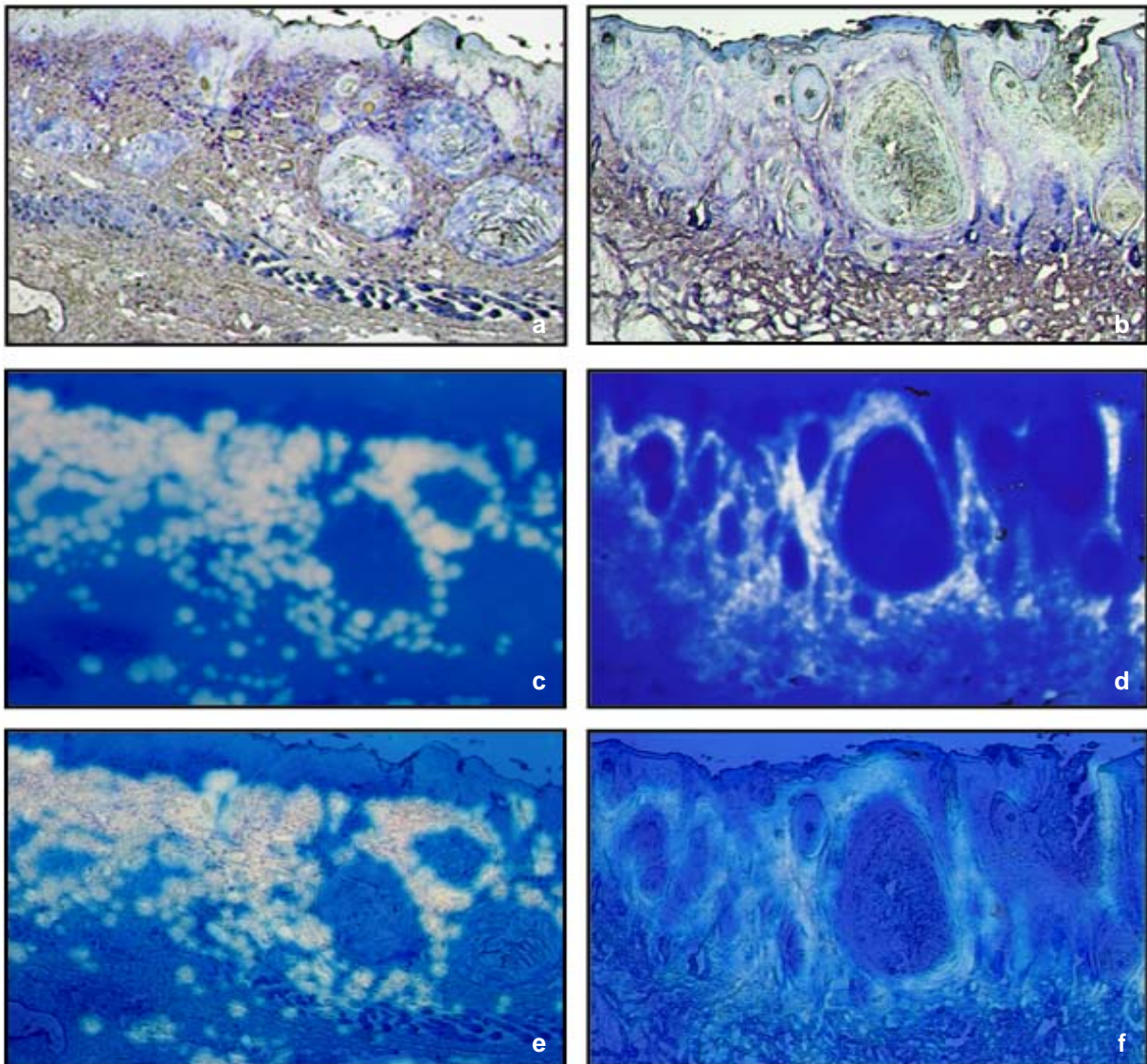


Abb. 21: Lokalisierung der aktiven Gelatinasen im peritumoralen Stroma der HPV8-E2 induzierten Hauttumore. (a, b) Methylenblau-Färbungen von zwei spontan entstandenen gutartigen Tumoren E2 transgener Mäuse. (c, d) Gelatinolytische Aktivität im Stroma dieser Tumore als weiße Areale auf blauen Hintergrund im Coomassie-gefärbten Gel. (e, f) Die jeweilige Methylenblau-Färbung und das Coomassie-Gel wurden überlagert, um die Aktivität der Gelatinasen im Gewebe lokalisieren zu können. ((a-f) Vergrößerung 200x).

4.7.3. Gelatinolytische Aktivität in Tumoren der HPV8-E6 Mäuse

Um zu überprüfen, ob die gelatinolytische Aktivität in den HPV8-GFR Mäusen ausschließlich durch die Expression von E2 induziert wurde, sollten außerdem Tumore der HPV8-E6 Mäuse mittels *in situ* Zymographien charakterisiert werden. Die untersuchten Papillome der HPV8-E6 transgenen Mäuse zeigten eine vergleichbare gelatinolytische Aktivität wie die Hauttumore der HPV8-GFR und -E2 transgenen Mäuse (Abb. 22).

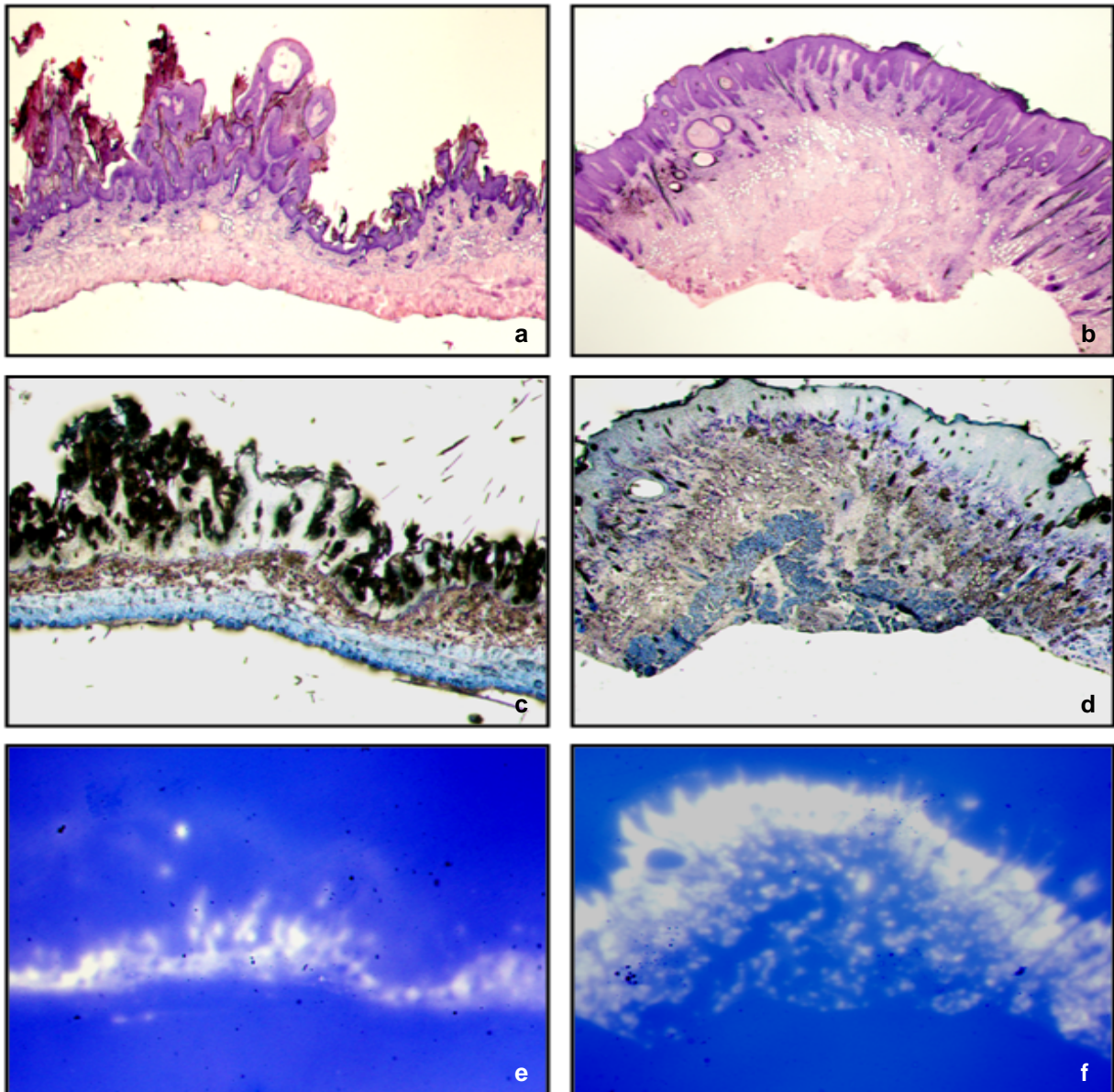


Abb. 22: Lokalisierung der aktiven Gelatinasen in Papillomen der E6 transgenen Mäuse mittels *in situ* Zymographie. (a, b) H&E Färbungen von zwei Papillomen der HPV8-E6 transgenen Mäuse. (c, d) Methylenblau-Färbung derselben Tumore. (e, f) Lokalisierung der gelatinolytischen Aktivität im peritumoralen Stroma als weiße Areale vor blauem Hintergrund (Coomassie-Färbung). ((a-f) Vergrößerung 200x).

4.7.4. Charakterisierung der Gelatinasen

Um zu unterscheiden, welche aktive Gelatinase (MMP-2 oder MMP-9) für die in den *in situ* Zymographien dokumentierte gelatinolytische Aktivität verantwortlich ist, wurden Haut- und Tumorextrakte der HPV8-E2 und -E6 transgenen Mäuse mittels *in vitro* Zymographien genauer charakterisiert. Dadurch können die latenten und aktiven Formen der unterschiedlich großen MMPs unterschieden werden (Abb. 23). In den Extrakten der Wildtyp-Maushaut war keinerlei gelatinolytische Aktivität erkennbar (Spur Kontr.). Die Proben der unauffälligen Haut von HPV8-E2 und -E6 transgenen Mäusen wiesen überwiegend latente MMP-2 auf (Spur 1, 2). Sowohl die untersuchten Tumore der HPV8-GFR Mäuse (Spur 3) als auch die E2 induzierten Tumore (Spur 4, 5, und 6) und die Tumore der E6 Mäuse (Spur 7) zeigten eine deutliche Überexpression und Aktivierung von MMP-9. Hinsichtlich der Menge von MMP-2 und deren Aktivierung gibt es in den Tumoren keine deutlichen Unterschiede zu den Extrakten aus der Normalhaut (Abb. 23).

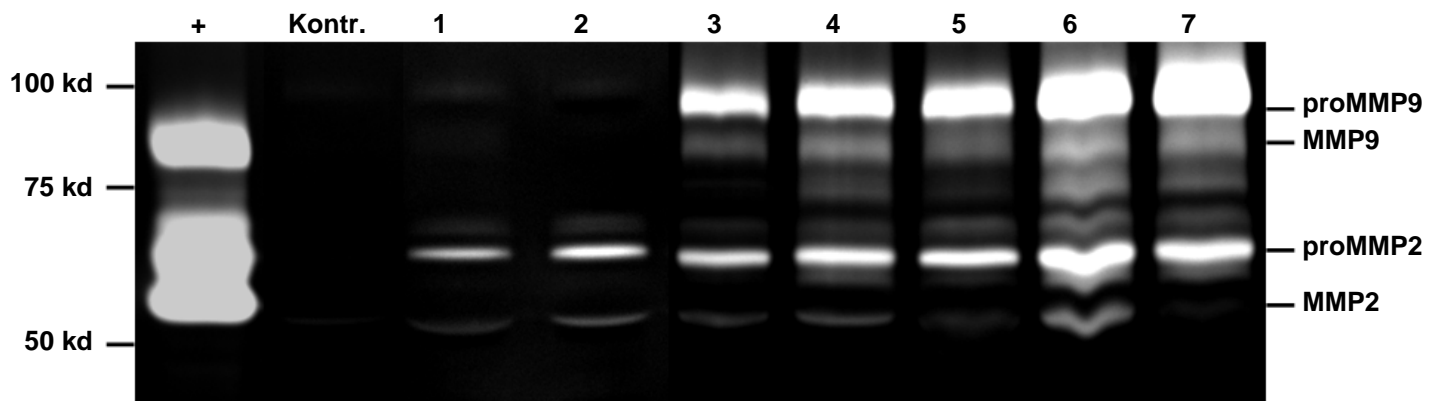


Abb. 23: Identifizierung der Gelatinasen mittels *in vitro* Zymographie. +: Positiv Kontrolle (Überstand muriner Fibroblasten), Kontr.: Normalhaut einer nicht-transgenen Wildtyp-Maus, 1: unauffällige Haut einer HPV8-E6 Maus, 2: unauffällige Haut einer HPV8-E2 Maus, 3: Papillom einer HPV8-GFR Maus, 4: Hautläsion einer HPV8-E2 Maus aus Linie 35, 5: Hautläsion einer heterozygoten HPV8-E2 Maus aus Linie 2, 6: Hautläsion einer heterozygoten HPV8-E2 Maus aus Linie 2, 7: Papillom einer HPV8-E6 Maus.

V. DISKUSSION

In dieser Arbeit wurden erstmalig transgene Mäuse für ein E2 Gen der humanen Papillomviren vom Genus- β etabliert. Bei diesen Mäusen wird E2 von HPV8 unter der Kontrolle des humanen Keratin-14-Promotors gezielt im Stratum basale und im Stratum spinosum der Haut und in den sich entwickelnden Haarfollikeln exprimiert (Sethi und Palefsky, 2004). Bislang wurde das E2 Gen der HPV allgemein nicht als Onkogen angesehen. Ganz im Gegenteil führt eine Überexpression von Genus- α HPV16- und HPV18-E2 in den Zellzyklus-Arrest (Francis *et al.*, 2000; Wells *et al.*, 2000) und abhängig vom jeweiligen Zelltyp und vom vorliegenden p53 Status, wird Apoptose induziert (Desaintes *et al.*, 1999; Webster *et al.*, 2000). Außerdem zeigten transgene Mäuse, die das E2 Gen des Niedrig-Risiko- α -HPV11 unter der Kontrolle des Ubiquitin-C-Promotors exprimieren, keine histologischen Veränderungen der Haut (Leykauf *et al.*, 2007).

Die HPV8-E2 transgenen Mäuse entwickeln durchschnittlich 74 ± 22 Wochen nach der Geburt spontan Tumoren der Haut. Diese Beobachtung deutet auf ein wesentliches onkogenes Potential des Genus- β HPV8-E2 Proteins *in vivo* hin. Alle Tiere wurden in den genetischen Hintergrund FVB/N gekreuzt, da dieser Inzucht-Mausstamm für die epidermale Karzinogenese besonders prädisponiert zu sein scheint (Hennings *et al.*, 1993; Brown und Balmain, 1995; Coussens *et al.*, 1996; Wakabayashi *et al.*, 2007). Außerdem zeigten Transplantationsversuche, in denen verschiedene Mauszellen, die mit HPV16-E6/E7 infiziert waren und auf Nacktmäuse übertragen wurden, dass FVB/N Keratinozyten am häufigsten Hauttumore hervorrufen (Woodworth *et al.*, 2004).

Die unterschiedlichen HPV8-E2 mRNA Konzentrationen in den drei verschiedenen transgenen Mauslinien übten einen großen Einfluss auf den Zeitpunkt der Tumorentwicklung aus. Die homozygoten Tiere der Linie 2 wiesen eine zweifach erhöhte Transkriptionsrate des E2 Transgens auf, verglichen mit der Transkriptionsrate der heterozygoten Mäuse derselben Linie. Deren Expressionsspiegel ist wiederum dreimal so hoch wie in den heterozygoten Mäusen der Linie 35. Nach einem Beobachtungszeitraum von einem Jahr hatten lediglich 8% der heterozygoten, aber bereits 67% der homozygoten Mäuse aus Linie 2 spontan

Hauttumore entwickelt. Erweiterte man den Beobachtungszeitraum jedoch auf bis zu 144 Wochen, dann wiesen letztendlich bis zu 82% der heterozygoten Tiere spontan Hautläsionen auf. Lediglich zwei transgene Mäuse aus Linie 35 zeigten Hauttumore mit einer leichten Dysplasie, die bei beiden Tieren nach mehr als 100 Wochen spontan entstanden sind. Keine der transgen-positiven Mäuse der Linie 21, die keine meßbare mRNA Expression zeigten, entwickelte während des gesamten Beobachtungszeitraums Fellauffälligkeiten oder Hauttumore. Wie für ein integriertes Transgen erwartet, wird E2 auch in den Hauttumoren kontinuierlich exprimiert, was bereits anhand der HPV8-GFR transgenen Mäuse gezeigt werden konnte (Schaper *et al.*, 2005). Die ermittelten Expressionsraten für die Tumore können allerdings nicht quantitativ mit den Ergebnissen aus der transgenen Haut verglichen werden, da die Anzahl der K14-Promotor permissiven Zellen in diesen verschiedenen Geweben vollkommen unterschiedlich ist.

Die spontane Tumorentwicklung in den heterozygoten Mäusen der Linie 2 braucht etwa 1,3- bis 2,8-mal so lange wie bei den HPV8-GFR transgenen Tieren der Linien 85 und 9 mit FVB/N Hintergrund (Schaper *et al.*, 2005). Makroskopisch erscheinen die Hauttumore der HPV8-E2 transgenen Mäuse relativ flach und zeigen in keinem Fall das für die HPV8-GFR Mäuse charakteristische stark exophytische Wachstumsmuster und die typische massive Verdickung der Epidermis. Trotzdem konnte ähnlich wie in den HPV8-GFR Tieren bei 6% der untersuchten Tumore eine schwere Dysplasie der Epidermis nachgewiesen werden. Bei zwei der HPV8-E2 transgenen Mäuse aus Linie 2 konnten spontane PEK der Haut diagnostiziert werden. Diese zeichnete sich besonders durch ihren sehr auffälligen Spindelzellcharakter aus, der in dieser Form noch bei keinem transgenen Mausmodell beschrieben ist.

Die meisten Tumore der HPV8-E2 transgenen Mäuse treten in Verbindung mit schweren Ulcera der umgebenden Haut auf. So entsteht der Eindruck, diese Entzündungsprozesse könnten einer Tumorentwicklung voraus gehen. Diese massive Ulceration der Haut könnte durch die Expression von E2 in den basalen epidermalen Keratinozyten ausgelöst werden. Die Interaktion von E2 mit verschiedenen zellulären Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise C/EBP und die Aktivierung des C/EBP β abhängigen Involukrin-Gen-Promotors deutet auf einen Einfluss von E2 auf

die Differenzierung der Keratinozyten hin (Hadaschik *et al.*, 2003). Im Zusammenspiel aller frühen Gene in den HPV8-GFR Mäusen wird dieser Einfluss von E2 durch die Effekte der Gene E6 und E7 überlagert, die eine vorzeitige Differenzierung der Keratinozyten unterdrücken. Dies geht einher mit der natürlichen Situation einer HPV Infektion. Hier kommt es zu einer E7 vermittelten Aktivierung der Zell-Proliferation in den suprabasalen Schichten des Epithels, um die virale DNA Replikation zu sichern. Die später stattfindende E2 vermittelte Induktion der Keratinozyten Differenzierung garantiert das Heranreifen des Virus. Im hier vorliegenden Mausmodell wird ausschließlich das E2 Gen unter der Kontrolle des Keratin-14-Promotors im Stratum basale und dem Stratum spinosum exprimiert. Das führt wahrscheinlich zu einer verfrühten Differenzierung der Keratinozyten, wodurch die Anzahl der teilungsfähigen Zellen zu früh abnimmt, so dass es mit steigendem Alter der Maus zu einer stark verdünnten Epidermis kommt. Diese Annahme wird durch unsere histologische Untersuchung gestützt, die ergeben hat, dass HPV8-E2 transgene Mäuse, die älter als 70 Wochen sind, in vielen Bereichen der Haut eine stark verdünnte Epidermis aufweisen. Darüber hinaus war in diesen Bereichen keine klar geordnete basale Schichtung der Keratinozyten mehr erkennbar. Es ist gut vorstellbar, dass bereits kleinste Verletzungen in diesen Mäusen zu Hautläsionen führen und es durch das Fehlen der teilungsfähigen basalen Keratinozyten nicht zu einer effizienten Wundheilung kommen kann. Die chronische Hautentzündung und/oder eine gescheiterte Wundheilung könnten dann die Voraussetzung für eine weitere Tumorentwicklung sein. Diese Überlegungen werden zusätzlich durch Beobachtungen an den HPV8-GFR Mäusen bestätigt, die gezeigt haben, dass sich die Hauttumore vor allem bei den männlichen Tieren in den Regionen entwickeln, die durch Bisse aus den Rankkämpfen verletzt wurden (Schaper *et al.*, 2005). Durch gezielte Hautstanzen konnte gezeigt werden, dass eine solche Verwundung bei bis zu 67% der behandelten Tiere bereits nach wenigen Wochen zu einer Entwicklung von Hauttumoren mit unterschiedlichen Dysplasie Stadien führte, während die Wunden bei den negativen Kontrolltieren innerhalb von vier Wochen vollständig verheilten. Dies steht im Einklang mit klinischen Beobachtungen, die gezeigt haben, dass beim Menschen chronisch-entzündete, nicht heilende Wunden häufig zu PEK entarten.

Auch wenn die chronische Hautentzündung in Zusammenhang mit einer späteren Karzinogenese gebracht wird (van Hogerlinden *et al.*, 2004), ist dieser Entzündungsprozess wahrscheinlich nicht der einzige Auslöser der Tumorentstehung in den HPV8-E2 transgenen Mäusen. Auch Tumore, die nicht direkt an Entzündungsareale angrenzten, wiesen Anzeichen einer leichten bis mittleren Dysplasie auf.

In früheren Studien wurde gezeigt, dass eine Überexpression des gesamten E2-Proteins von HPV8 in humanen, primären Vorhautkeratinozyten nicht in einer Induktion der Apoptose resultiert, ganz im Gegensatz zum E2 Protein von HPV18 (Oldak *et al.*, 2004). Wie bereits diskutiert, kommt es in den HPV8-GFR Mäusen trotz hoher E2 mRNA Konzentrationen zur Tumorentwicklung, was darauf schließen lässt, dass das E2 Protein von HPV8 letztendlich keinen inhibitorischen Effekt auf die Tumorentwicklung ausübt (Schaper *et al.*, 2005). Das steht im Gegensatz zu den Eigenschaften der Hoch-Risiko-HPV des Genus- α . In K14-HPV16 transgenen Mäusen wird E2 nur schwach exprimiert (Sethi und Palefsky, 2004) und während der zervikalen Krebs-Progression im Menschen geht das E2 Gen häufig in Folge der Integration der viralen DNA in das Wirtsgenom verloren (Wentzensen *et al.*, 2004). Der selektive Vorteil des häufigen Verlustes von E2 für die α -HPV wird durch die fehlende Induktion der Zellzyklus-Arretierung und der Apoptose und die nicht mehr stattfindende Suppression des viralen E6/E7 Promotors erklärt (Tan *et al.*, 1994; Desaintes *et al.*, 1999; Wells *et al.*, 2000). Unsere Untersuchungen zeigten, dass das β -HPV8-E2 nicht nur keine hemmende Wirkung auf die Tumorentstehung ausübt, sondern vielmehr aktiv die Transformation der Zellen beeinflusst. Nichtsdestoweniger ist das Fehlen der proapoptotischen Eigenschaften eine wichtige Voraussetzung für die onkogene Wirkungsweise von HPV8-E2.

Eine einmalige Bestrahlung der HPV8-E2 transgenen Mäuse mit $10\text{J}/\text{cm}^2$ UVA und $1\text{J}/\text{cm}^2$ UVB war ausreichend, um bereits drei Wochen nach der Behandlung die Bildung einer Hautläsion hervorzurufen. Dabei entwickelten 87% der heterozygoten Mäuse von Linie 2 und 36% der Tiere aus der Linie 35 Geschwüre innerhalb des bestrahlten Hautareals. Darüber hinaus wurde bei einer Maus der Linie 35 ein sehr schnell invasiv wachsendes Spindelzellkarzinom 10 Wochen nach der Bestrahlung diagnostiziert. Es ist bekannt, dass UVB Strahlung den Keratin-14-Promotor

aktiviert (Bernerd *et al.*, 2001). Dies könnte in den HPV8-E2 transgenen Mäusen dazu führen, dass E2 in den Keratin-14-Promotor permissiven Zellen verstärkt exprimiert wird und somit schneller in hohen Konzentrationen vorliegt, so dass die Effekte von E2 verstärkt werden. Außerdem könnte E2 Einfluss auf die Tumorprogression haben, indem es den UV Reparaturprozess stört und sowohl den bevorstehenden Zell-Zyklus-Arrest als auch die anschließende Apoptose verhindert. Diese Hypothese wird von der Tatsache untermauert, dass das E2 Protein verschiedener HPVs mit zellulären Proteinen, wie beispielsweise p53 (Massimi *et al.*, 1999; Akgül *et al.*, 2003), TopBP1 (Boner *et al.*, 2002) oder PARB (Lee *et al.*, 2002) interagieren kann.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass HPV8-E2 alleine ausreicht, um in transgenen Mäusen Hauttumore hervorzurufen. Bei einer zusätzlichen Bestrahlung mit UV-Licht erhöht sich die Tumorrare und die Hautläsionen entwickeln sich wesentlich früher. Wird der Mensch vom Virus infiziert, unterliegt HPV8-E2 der Kontrolle des natürlichen Viruspromotors und wird daher in den suprabasalen Keratinozyten sehr viel schwächer exprimiert als es in den transgenen Mäusen unter der Kontrolle des humanen Keratin-14-Promotors der Fall ist. Nichts desto trotz ist allgemein anerkannt, dass HPV-E2 zusammen mit dem E1 Protein in teilungsfähigen basalen Zellen des Epithels essentiell ist, um die virale DNA als Episom zu erhalten (Frattoni und Laimins, 1994) und das virale Genom an mitotische Chromosomen für eine Segregation während der Zellteilung zu binden (You *et al.*, 2004). Bereits die geringen E2 Mengen, die während des natürlichen Infektionszyklus der PV im Wirt vorliegen und über viele Jahre in den Zellen persistieren, könnten eine Rolle bei der Entstehung von Hautkrebs spielen.

In dieser Arbeit wurde die Expression und Aktivität der Gelatinasen MMP-2 und -9 in spontan entstandenen Hauttumoren der HPV8-E2 und -E6 Mäuse im Vergleich zu den HPV8-GFR Maustumoren untersucht. Da das CRPV-E2-Protein die Expression von MMP-9 induziert (Behren *et al.*, 2005), sollte überprüft werden, ob die MMP-9 Induktion in HPV8 transgenen Mäusen spezifisch auf E2 zurückzuführen ist. Vergleichbar zu HPV8-GFR zeigten die hier untersuchten HPV8-E2 Tumoren eine vermehrte Expression und Aktivierung der Gelatinase MMP-9. Da aber auch die Papillome der HPV8-E6 transgenen Mäuse diese Überexpression und Aktivierung

zeigten, kann diese Induktion nicht spezifisch auf das E2 Protein von HPV8 zurück geführt werden. Die starke gelatinolytische Aktivität wurde im Grenzbereich zwischen Dermis und epidermalen Tumorzellen beobachtet. Bisläng konnte nicht geklärt werden, ob Keratinozyten direkt MMP-9 sezernieren, oder ob die Keratinozyten über Sekretion von Zytokinen peritumorale Fibroblasten und Infiltratzellen aktivieren und in diesen die Synthese von MMP-9 induzieren. In humanen NMHT ist die Expression der Gelatinasen vor allem im peritumoralen Stroma von PEK lokalisiert (O'Grady *et al.*, 2007).

Sämtliche PEK der transgenen HPV8-E2 Mäuse, egal ob sie spontan entstanden sind oder sich nach einer UV-Bestrahlung entwickelt haben, zeigten zusätzlich zu ihren epithelialen Komponenten einen ungewöhnlich hohen Anteil an spindelzellförmigen Tumorzellen. Diese morphologische Konversion der Keratinozyten zu einem fibroblastoiden Erscheinungsbild zeichnet sich typischerweise durch eine Überexpression des mesenchymalen Markers Vimentin anstelle des Keratin-Zytoskeletts aus (Thompson *et al.*, 2005). Bei den untersuchten spindelzellförmigen PEK der HPV8-E2 Mäuse konnte jedoch in den Tumorzellen keine Vimentin Expression nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die intermediären Zellfilamente durch die Expression von HPV8-E2 unbeeinflusst bleiben. Um die Mechanismen der HPV8-E2 vermittelten EMT näher zu charakterisieren, sollten in Zukunft weitere Untersuchungen bezüglich der Zell-Zell- (Cadherine und Catenine) und der Zell-Matrix-Adhäsion (Integrine) folgen.

Angesichts des in den HPV8-E2 Mäusen beschriebenen, sehr seltenen histologischen Bildes, ist es interessant, dass dieser Spindelzellcharakter auch beim Menschen in etwa 20% der PEK der Haut immunsupprimierter Organtransplantat-Empfänger beobachtet werden konnte. Dabei bestand die Tumormasse von fünf aus insgesamt 60 untersuchten Karzinomen zu mehr als 90% aus diesen Spindelzellen. Alle fünf Tumore wiesen stark ulcerierte Bereiche auf, zwei zeichneten sich durch ihr sehr schnelles und aggressives Wachstumsmuster aus und in einem Fall kam es sogar zu Metastasierung (Harwood *et al.*, 2006).

In klinischen Studien hat man bei immunkompromitierten Nierentransplantat-Empfängern eine dreifach erhöhte Prävalenz von HPV8 spezifischen Antikörpern gefunden, verglichen mit den Menschen aus der Normalbevölkerung (Stark *et al.*, 1998). Diese Beobachtung deutet auf eine vermehrte Replikation von HPV8 in immunsupprimierten Patienten hin. Auf Grund der Untersuchungen an den HPV8-E2 transgenen Mäusen kann spekuliert werden, dass die Entwicklung von PEK mit einer charakteristischen Spindelzellmorphologie durch das E2 Protein von HPV8 beeinflusst werden könnte.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Nahezu alle transgenen Mäuse, die die gesamte frühe Region (GFR) mit den Genen E1, E2, E4, E6 und E7 des humanen Papillomvirus (HPV) Typ 8 exprimieren, entwickeln spontan Papillome, epidermale Dysplasien und in 6% der Fälle Plattenepithelkarzinome (PEK) der Haut. Da frühere *in vitro* Studien für das E2-Gen von HPV8 ein zelltransformierendes Potential nachwiesen, wurden in dieser Arbeit transgene FVB/N Mauslinien (2, 21 und 35) etabliert, die HPV8-E2 unter der Kontrolle des humanen Keratin-14-Promotors exprimieren. Die Expressionsspiegel der E2-mRNA unterschieden sich im Verhältnis 6 (homozygote Tiere, Linie 2) zu 3 (heterozygote Mäuse, Linie 2) zu 1 (Linie 35). Die Rate der Tumorentwicklung korrelierte mit den unterschiedlichen E2-mRNA Konzentrationen. Bis zu 82% der heterozygoten Mäuse aus Linie 2 entwickelten spontan stark ulcerierte Hauttumoren während eines Beobachtungszeitraums von bis zu 144 Wochen, durchschnittlich 74 ± 22 Wochen nach der Geburt. Bei keinem Transgen-negativen Kontrolltier wurde während des gesamten Lebens eine Hautveränderung beobachtet. Der Großteil der Tumoren (91%) zeigte ein hyperplastisches Haarfollikel-epithel, vor allem im Bereich der Haarfollikelöffnung, die interfollikuläre Epidermis war abschnittsweise stark oder mittelgradig verbreitert, die Hornschicht war deutlich verdickt und teilweise fanden sich leichte Dysplasien. Schwere Dysplasien wurden in 6% der spontan entstandenen Tumoren beobachtet. Zwei schnell wachsende, wenig differenzierte PEK der Haut fielen besonders durch ihre Spindelzell-Morphologie auf. Bereits vier Wochen nach einer einmaligen UV-Bestrahlung ($10\text{J}/\text{cm}^2$ UVA und $1\text{J}/\text{cm}^2$ UVB) entwickelten 87% der heterozygoten Mäuse aus Linie 2 und 36% aus Linie 35 Hauttumoren. Ein wenig differenziertes, schnell wachsendes PEK mit ausgeprägter Spindelzell-Morphologie wurde 10 Wochen nach UV-Bestrahlung bei einer Maus der Linie 35 nachgewiesen. Bei 60% der heterozygoten Mäuse aus Linie 2 und 67% der Tiere von Linie 35 entwickelte sich aus einer von vier Wunden, die mittels Hautstanzen gezielt gesetzt worden waren, nach etwa vier Wochen eine Hautveränderung. Diese Ergebnisse zeigen, dass das E2 Protein von HPV8 ausreicht, um in transgenen Mäusen Hauttumore hervorzurufen. Bei einer zusätzlichen Bestrahlung mit UV-Licht oder nach gezielter Verwundung erhöht sich die Tumorraten und die Hautveränderungen entwickeln sich wesentlich früher.

Die in Hauttumoren HPV8-GFR transgener Mäuse beobachtete starke gelatinolytische Aktivität auf Grund erhöhter Mengen aktivierter MMP-9 war sowohl in HPV8-E2 als auch -E6 induzierten Hauttumoren nachweisbar und stellt somit keinen E2-spezifischen Phänotyp dar.

VII. ABSTRACT

Nearly all transgenic mice expressing the complete early region (CER) with the genes E1, E2, E4, E6 and E7 of the human papillomavirus (HPV) type 8 spontaneously develop skin papillomas, epidermal dysplasia and, in 6% of the cases, squamous cell carcinoma (SCC). As the early protein E2 of HPV8 revealed transforming capacity *in vitro*, we established transgenic FVB/N mouse lines (2, 21 and 35) which express HPV8-E2 under the control of the human keratin-14 promoter. The E2-mRNA levels differed in the ratio of 6 (homozygotes, line 2) to 3 (heterozygotes, line 2) to 1 (line 35). The rate of tumor formation correlated with the different E2-mRNA levels. Up to 82% of heterozygous line 2 mice spontaneously developed ulcerous lesions of the skin over an observation period of up to 144 weeks beginning on average 74 ± 22 weeks after birth. None of the HPV8 negative control litter-mates showed any skin alteration during lifetime. The majority of the tumors (91%) presented infundibular hyperplasia and acanthosis combined with hyperkeratosis and partially low grade dysplasia. Severe dysplasia of the epidermis occurred in 6% of the cases. Two fast growing poorly differentiated SCC revealed a sharply demarked spindle cell component. Already 4 weeks after a single UV irradiation (10 J/cm^2 UVA and 1 J/cm^2 UVB) 87% of heterozygous line 2 and 36% of line 35 mice developed skin tumors. A rapidly growing invasive tumor composed of spindle cells arose 10 weeks after irradiation of a line 35 animal. Sixty % of heterozygous line 2 and 67% of line 35 mice developed in one of four punch biopsies skin tumors already 4 weeks after wounding. These results demonstrate that HPV8-E2 is sufficient to induce skin tumors in transgenic mice. After further UV-irradiation or specific wounding the rate of tumor formation is increased and the lesions appear much earlier.

The strong gelatinolytic activity in tumors of the HPV8-CER mice attributed to the increased amounts of activated MMP-9 was also found in HPV8-E2 and -E6 induced lesions and represents therefore not an E2-specific phenotype.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

- Akgül, B.; Cooke, J. C. und Storey, A.** (2006). "HPV-associated skin disease." *J Pathol* **208**(2): 165-175
- Akgül, B.; Karle, P.; Adam, M.; Fuchs, P. G. und Pfister, H. J.** (2003). "Dual role of tumor suppressor p53 in regulation of DNA replication and oncogene E6-promoter activity of epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus type 8." *Virology* **308**(2): 279-290
- Akgül, B.; Pfefferle, R.; Marcuzzi, G. P.; Zigrino, P.; Krieg, T.; Pfister, H. und Mauch, C.** (2005). "Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9, MMP-13 and MT1-MMP in skin tumors of human papillomavirus type 8 transgenic mice." *Exp Dermatol* **15**: 35-42
- Androphy, E.; Lowy, D. R. und Schiller, J. T.** (1987). "Bovine papillomavirus E2 transactivating gene product binds to specific sites in papillomavirus DNA." *Nature* **325**: 70-73
- Armstrong, B. K. und Krickler, A.** (2001). "The epidemiology of UV induced skin cancer." *J Photochem Photobiol B* **63**: 8-18
- Bechtold, V.; Beard, P. und Raj, K.** (2003). "Human papillomavirus type 16 E2 protein has no effect on transcription from episomal viral DNA." *J Virol* **77**: 2021-2018
- Behren, A.; Simon, C.; Schwab, R. M.; Loetzsch, E.; Brodbeck, S.; Huber, E.; Stubenrauch, F.; Zenner, H. P. und Iftner, T.** (2005). "Papillomavirus E2 protein induces expression of the matrix metalloproteinase-9 via the extracellular signal-regulated kinase/activator protein-1 signaling pathway." *Cancer Res* **65**(24): 11613-11621
- Berner, F.; Del Bino, S. und Asselineau, D.** (2001). "Regulation of keratin expression by ultraviolet radiation: differential and specific effects of ultraviolet B and ultraviolet a exposure." *J Invest Dermatol* **117**(6): 1421-1429
- Birkedal-Hansen, H.; Moore, W. G. und Boddien, M. K.** (1993). "Matrix metalloproteinases: a review." *Crit Rev Oral Biol Med* **4**: 197-250

- Boeckle, S.; Pfister, H. und Steger, G.** (2002). "A new cellular factor recognizes E2 binding sites of papillomaviruses which mediate transcriptional repression by E2." *Virology* **293**(1): 103-117
- Boner, W.; Taylor, E. R.; Tsirimonaki, E.; Yamane, K.; Campo, M. S. und Morgan, I. M.** (2002). "A Functional interaction between the human papillomavirus 16 transcription/replication factor E2 and the DNA damage response protein TopBP1." *J Biol Chem* **277**(25): 22297-22303
- Bouwes Bavinck, J. N. und Berkhout, R. J.** (1997). "HPV infections and immunosuppression." *Clin Dermatol* **15**(3): 427-437
- Bouwes Bavinck, J. N.; Stark, S.; Petridis, A. K.; Marugg, M. E.; Ter Schegget, J.; Westendorp, R. G.; Fuchs, P. G.; Vermeer, B. J. und Pfister, H.** (2000). "The presence of antibodies against virus-like particles of epidermodysplasia verruciformis-associated humanpapillomavirus type 8 in patients with actinic keratoses." *Br J Dermatol* **142**(1): 103-109
- Boxman, I. L.; Berkhout, R. J.; Mulder, L. H.; Wolkers, M. C.; Bouwes Bavinck, J. N.; Vermeer, B. J. und ter Schegget, J.** (1997). "Detection of human papillomavirus DNA in plucked hairs from renal transplant recipients and healthy volunteers." *J Invest Dermatol* **108**(5): 712-715
- Brash, D. E.; Rudolph, J. A. und Simon, J. A.** (1991). "A role for sunlight in skin cancer: UV induced p53 mutations in squamous cell carcinoma." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 10124-10128
- Brown, K. und Balmain, A.** (1995). "Transgenic mice and squamous multistage skin carcinogenesis." *Cancer Metastasis Rev* **14**: 113-124
- Brown, P. D.; Levy, A. T.; Margulies, I. M.; Liotta, L. A. und Stetler-Stevenson, W. G.** (1990). "Independent expression and cellular processing of Mr 72,000 type IV collagenase and interstitial collagenase in human tumorigenic cell lines." *Cancer Res* **50**: 6184-6191

- Caldeira, S.; Zehbe, I.; Accardi, R.; Malanchi, I.; Dong, W.; Giarre, M.; de Villiers, E. M.; Filotico, R.; Boukamp, P. und Tommasino, M.** (2003). "The E6 and E7 proteins of the cutaneous human papillomavirus type 38 display transforming properties." *J Virol* **77**(3): 2195-2206
- Canman, C. E. und Kastan, M. B.** (1996). "Signal transduction. Three paths to stress relief." *Nature* **384**: 213-214
- Chiang, C. M.; Ustav, M.; Stenlund, A.; Ho, T. F.; Broker, T. R. und Chow, L. T.** (1992). "Viral E1 and E2 proteins support replication of homologous and heterologous papillomaviral origins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(13): 5799-5803
- Chow, L. und Broker, T. R.** (1994). "Papillomavirus DNA replication." *Intervirology* **37**: 150-158
- Ciuffo, G.** (1907). "Innesto positivo con filtrato di verruca vulgare." *Giorn Ital Mal Venereol* **42**: 12-17
- Coussens, L. M.; Hanahan, D. und Arbeit, J. M.** (1996). "Genetic predisposition and parameters of malignant progression in K14-HPV16 transgenic mice." *Am J Pathol* **149**: 1899-1917
- de Gruijl, F. R.** (2002). "Photocarcinogenesis: UVA vs. UVB radiation." *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* **15**(5): 316-320
- de Gruijl, F. R. und Forbes, P. D.** (1995). "UV-induced skin cancer in a hairless mouse model." *Bioessays* **17**: 61-660
- de Villiers, E. M.; Fauquet, C.; Broker, T. R.; Bernard, H. U. und zur Hausen, H.** (2004). "Classification of papillomaviruses." *Virology* **324**(1): 17-27
- DePinho, R. A.** (2000). "The age of cancer." *Nature* **408**: 248-254
- Desaintes, C.; Goyat, S.; Garbay, S.; Yaniv, M. und Thierry, F.** (1999). "Papillomavirus E2 induces p53-independent apoptosis in HeLa cells." *Oncogene* **18**: 4538-4545

- Diepgen, T. L. und Mahler, V.** (2002). "The epidemiology of skin cancer." *Br J Dermatol* **146 Suppl 61**: 1-6
- Dong, W.; Kloz, U.; Accardi, R.; Caldeira, S.; Tong, W. M.; Wang, Z. Q.; Jansen, L.; Durst, M.; Sylla, B. S.; Gissmann, L. und Tommasino, M.** (2005). "Skin hyperproliferation and susceptibility to chemical carcinogenesis in transgenic mice expressing E6 and E7 of human papillomavirus type 38." *J Virol* **79**: 14899-14908
- Doorbar, J.; Ely, S.; Sterling, J.; McLean, C. und Crawford, L.** (1991). "Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network." *Nature* **352(6338)**: 824-827
- Dyson, N.; Howley, P. M.; Münger, K. und Harlow, E.** (1989). "The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind the retinoblastoma gene product." *Science* **243**: 934-937
- Eckert, R. L.; Crish, J. F.; Balasubramanian, S. und Rorke, E. A.** (2000). "Transgenic animal models of human papillomavirus-dependent disease (Review)." *Int J Oncol* **16(5)**: 853-870
- Einstein, M. H. und Goldberg, G. L.** (2002). "Human papillomavirus and cervical neoplasia." *Cancer Invest* **20(7-8)**: 1080-1085
- Elbel, M.; Carl, S.; Spaderna, S. und Iftner, T.** (1997). "A comparative analysis of the interactions of the E6 proteins from cutaneous and genital papillomaviruses with p53 and E6AP in correlation to their transforming potential." *Virology* **239(1)**: 132-149
- Enzenauer, C.; Mengus, G.; Lavigne, A.; Davidson, I.; Pfister, H. und May, M.** (1998). "Interaction of human papillomavirus 8 regulatory proteins E2, E6 and E7 with components of the TFIID complex." *Intervirology* **41(2-3)**: 80-90
- Evander, M.; Frazer, I. H.; Payne, E.; Qi, Y. M.; Hengst, K. und McMillan, N. A.** (1997). "Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses." *J Virol* **71**: 2449-2456

- Fehrmann, F. und Laimins, L. A.** (2003). "Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation." *Oncogene* **22**(33): 5201-5207
- Feltkamp, M. C.; Broer, R.; di Summa, F. M.; Struijk, L.; van der Meijden, E.; Verlaan, B. P.; Westendorp, R. G.; ter Schegget, J.; Spaan, W. J. und Bouwes Bavinck, J. N.** (2003). "Seroreactivity to epidermodysplasia verruciformis-related human papillomavirus types is associated with nonmelanoma skin cancer." *Cancer Res* **63**(10): 2695-2700
- Fessler, L.; Duncan, K.; Fessler, J. H.; Salo, T. und Tryggvason, K.** (1984). "Characterization of the procollagen IV cleavage products produced by a specific tumor collagenase." *J Biol Chem* **259**: 9783-9789
- Francis, D. A.; Schmid, S. I. und Howley, P. M.** (2000). "Repression of the integrated papillomavirus E6/E7 promoter is required for growth suppression of cervical cancer cells." *J Virol* **74**: 2679-2686
- Frattini, M. G.; Hurst, S. D.; Lim, H. B.; Swaminathan, S. und Laimins, L. A.** (1997). "Abrogation of a mitotic checkpoint by E2 proteins from oncogenic human papillomaviruses correlates with increased turnover of the p53 tumor suppressor protein." *Embo J* **16**: 318-331
- Frattini, M. G. und Laimins, L. A.** (1994). "Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(26): 12398-12402
- Fuchs, P.; Horn, S.; Iftner, T.; May, M.; Stubenrauch, F. und Pfister, H.** (1993). "Molecular Biology of Epidermodysplasia Verruciformis-Associated Human Papillomaviruses" In: *Virus Strategies - Molecular Biology and Pathogenesis.* (Doerfler, W. und Böhm, P., Eds.). Weinheim: Verlag Chemie: 517-529.
- Fuchs, P. G.; Iftner, T.; Weninger, J. und Pfister, H.** (1986). "Epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus 8: genomic sequence and comparative analysis." *J Virol* **58**(2): 626-634
- Garland, S. M.** (2002). "Human papillomavirus update with a particular focus on cervical disease." *Pathology* **34**(3): 213-224

- Garrido-Guerrero, E.; Carrillo, E.; Guido, M.; Zamorano, R.; Garcia-Carranca, A. und Gariglio, P.** (1996). "Different arrangement of human papillomavirus E2 binding sites distinguishes cutaneous types from those associated with mucosal lesions." *Arch Med Res* **27**: 389-394
- Giaccia, A. J. und Kastan, M. B.** (1998). "The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals." *Genes Dev* **12**: 2973-2983
- Giampieri, S. und Storey, A.** (2004). "Repair of UV-induced thymine dimers is compromised in cells expressing the E6 protein from human papillomaviruses types 5 and 18." *Br J Cancer* **90**(11): 2203-2209
- Giroglou, T.; Florin, L.; Schafer, F.; Streeck, R. E. und Sapp, M.** (2001). "Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate." *J Virol* **75**(3): 1565-1570
- Goldberg, G. I.; Wilhelm, S. M.; Kronberger, A.; Bauer, E. A.; Grant, G. A. und Eisen, A. Z.** (1986). "Human fibroblast collagenase." *J Biol Chem* **261**: 6600-6605
- Goodwin, R. G.; Holme, S. A. und Roberts, D. L.** (2004). "Variations in registration of skin cancer in the United Kingdom." *Clin Exp Dermatol* **29**: 328-330
- Gross, G. E.** (1997). "Human papillomavirus infection of the skin: Treatment" In: Human Papillomavirus infection. (Gross, G. E. und Barasso, R., Eds.). Ullstein Mosby, Berlin, Wiesbaden: 127-143.
- Hadaschik, D.** (2002). "Das Papillomvirus E2-Protein: Lokalisation and Modulation der zellulären Transkription." Dissertation; Institut für Virologie, Universität zu Köln.
- Hadaschik, D.; Hinterkeuser, K.; Oldak, M.; Pfister, H. J. und Smola-Hess, S.** (2003). "The Papillomavirus E2 protein binds to and synergizes with C/EBP factors involved in keratinocyte differentiation." *J Virol* **77**(9): 5253-5265
- Halbert, C. L.; Demers, G. W. und Galloway, D. A.** (1991). "The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells." *J Virol* **65**: 473-478

- Harwood, C. A.; Proby, C. M.; McGregor, J. M.; Sheaff, M. T.; Leigh, I. M. und Cerio, R.** (2006). "Clinicopathologic features of skin cancer in organ transplant recipients: a retrospective case-control series." *J Am Acad Dermatol* **54**(2): 290-300
- Harwood, C. A.; Suretheran, T.; Sasieni, P.; Proby, C. M.; Bordea, C.; Leigh, I. M.; Wojnarowska, F.; Breuer, J. und McGregor, J. M.** (2004). "Increased risk of skin cancer associated with the presence of epidermodysplasia verruciformis human papillomavirus types in normal skin." *Br J Dermatol* **150**(5): 949-957
- Hawley-Nelson, P.; Vousden, K. H.; Hubbert, N. L.; Lowy, D. R. und Schiller, J. T.** (1989). "HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes." *Embo J* **8**(12): 3905-3910
- Hecker, E.** (1987). "Three stage carcinogenesis in mouse skin--recent results and present status of an advanced model system of chemical carcinogenesis." *Toxicol Pathol* **15**(2): 245-258
- Hennings, H.; Glick, A. B.; Lowry, D. T.; Krsmanovic, L. S.; Sly, L. M. und Yuspa, S. H.** (1993). "FVB/N mice: an inbred strain sensitive to the chemical induction of squamous cell carcinomas in the skin." *Carcinogenesis* **14**: 2353-2358
- Holme, S. A.; Malinowszky, K. und Roberts, D. L.** (2000). "Changing trends in non melanoma skin cancer in South Wales." *Br J Dermatol* **143**: 1224-1229
- Holt, S.; Schuller, G. und Wilson, V.** (1994). "DNA binding specificity of the bovine papillomavirus E1 protein is determined by sequences containing within an 18 basepair inverted repeat element at the origin of replication." *J Virol* **68**: 1094-1102
- Iftner, T.; Elbel, M.; Schopp, B.; Hiller, T.; Loizou, J. I.; Caldecott, K. W. und Stubenrauch, F.** (2002). "Interference of papillomavirus E6 protein with single-strand break repair by interaction with XRCC1." *Embo J* **21**(17): 4741-4748
- Iftner, T.; Fuchs, P. G. und Pfister, H.** (1989). "Two independently transforming functions of human papillomavirus 8." *Curr Top Microbiol Immunol* **144**: 167-173

- Jackson, S.; Harwood, C.; Thomas, M.; Banks, L. und Storey, A.** (2000). "Role of Bak in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins." *Genes Dev* **14**(23): 3065-3073
- Jackson, S. und Storey, A.** (2000). "E6 proteins from diverse cutaneous HPV types inhibit apoptosis in response to UV damage." *Oncogene* **19**: 592-598
- Jemal, A.; Clegg, L. X.; Ward, E.; Ries, L. A.; Wu, X.; Jamison, P. M.; Wingo, P. A.; Howe, H. L.; Anderson, R. N. und Edwards, B. K.** (2004). "Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2001, with a special feature regarding survival." *Cancer* **101**: 3-27
- Kähäri, V. M. und Saarialho-Kere, U.** (1999). "Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumor growth and invasion." *Ann Med* **31**(1): 34-45
- Keresztes, G.; Mutai, H. und Heller, S.** (2003). "TMC and EVER genes belong to a larger novel family, the TMC gene family encoding transmembrane proteins." *BMC Genomics* **4**: 24-35
- Kerkelä, E. und Saarialho-Kere, U.** (2003). "Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer." *Exp Dermatol* **12**(2): 109-125
- Knight, G. L.; Grainger, J. R.; Gallimore, P. H. und Roberts, S.** (2004). "Cooperation between different forms of the human papillomavirus type 1 E4 protein to block cell cycle progression and cellular DNA synthesis." *J Virol* **78**(24): 13920-13933
- Konkel, D. A.; Tilgham, S. M. und Leder, P.** (1978). "The Sequence of the chromosomal mouse beta-globin major gene: homologies in capping, splicing and Poly(A) sites." *Cell* **15**: 1125-1132
- Kurima, K.; Yang, Y.; Sorber, K. und Griffith, A. J.** (2003). "Characterization of the transmembrane channel-like (TMC) gene family: functional clues from hearing loss and *epidermodysplasia verruciformis*." *Genomics* **82**: 300-308

- Lai, M. C.; Teh, B. H. und Tarn, W. Y.** (1999). "A human papillomavirus E2 transcriptional activator. The interactions with cellular splicing factors and potential function in pre-mRNA processing." *J Biol Chem* **274**(17): 11832-11841
- Lane, D. P.** (1992). "Cancer: p53, guardian of the genome." *Nature* **394**: 616-617
- Lee, D.; Hwang, S. G.; Kim, J. und Choe, J.** (2002). "Functional interaction between p/CAF and human papillomavirus E2 protein." *J Biol Chem* **277**: 6483-6489
- Lee, D.; Kim, J. W.; Kim, K.; Joe, C. O.; Schreiber, V.; Menissier-De Murcia, J. und Choe, J.** (2002). "Functional interaction between human papillomavirus type 18 E2 and poly(ADP-ribose) polymerase 1." *Oncogene* **21**(38): 5877-5885
- Lee, D.; Lee, B.; Kim, J.; Kim, D. W. und Choe, J.** (2000). "cAMP response element-binding protein-binding protein binds to human papillomavirus E2 protein and activates E2-dependent transcription." *J Biol Chem* **275**(10): 7045-7051
- Lee, J. M.; Dedhar, S.; Kalluri, R. und Thompson, E. W.** (2006). "The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease." *J Cell Biol* **172**(7): 973-981
- Lefebvre, O.; Steger, G. und Yaniv, M.** (1997). "Synergistic transcriptional-activation by the papillomavirus E2 protein occurs after DNA binding and correlates with a change in chromatin structure." *J Mol Biol* **266**: 465-478
- Lehman, C. W. und Botchan, M.** (1998). "Segregation of viral plasmids depends on tethering to chromosomes and is regulated by phosphorylation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 4338-4343
- Leykauf, K.; Kabsch, K.; Gassler, N.; Gissmann, L.; Alonso, A. und Schenkel, J.** (2007). "Expression of the HPV11 E2 gene in transgenic mice does not result in alterations of the phenotypic pattern." *Transgenic Res*; E.pub (ahead of print)
- Lindemann, R.** (2004). "Etablierung HPV8-E2 transgener Mäuse und Charakterisierung der Matrix-Metalloproteinase Expression in HPV8 induzierten Hauttumoren." Diplomarbeit; Institut für Virologie der Universität zu Köln

- Lowy, D. R. und Howley, P. M.** (2002). "Papillomaviruses and their replication" In: Fields of Virology. (Knipe, D. M., Howley P. M., Eds.). Lippincott Williams & Williams: 2197-2228.
- Majewski, S. und Jablonska, S.** (2002). "Do *epidermodysplasia verruciformis* human papillomaviruses contribute to malignant and benign epidermal proliferations?" *Arch Dermatol* **138**: 649-654
- Marcuzzi, G. P. A.** (2006). "Analyse des onkogenen Potentials der frühen Gene E6 und E7 des humanen Papillomvirus Typ 8 durch die Etablierung transgener Mausmodelle." Dissertation; Institut für Virologie der Universität zu Köln
- Masini, C.; Fuchs, P. G.; Gabrielli, F.; Stark, S.; Sera, F.; Ploner, M.; Melchi, C. F.; Primavera, G.; Pirchio, G.; Picconi, O.; Petasecca, P.; Cattaruzza, M. S.; Pfister, H. J. und Abeni, D.** (2003). "Evidence for the association of human papillomavirus infection and cutaneous squamous cell carcinoma in immunocompetent individuals." *Arch Dermatol* **139**(7): 890-894
- Massimi, P.; Pim, D.; Bertoli, C.; Bouvard, V. und Banks, L.** (1999). "Interaction between the HPV-16 E2 transcriptional activator and p53." *Oncogene* **18**(54): 7748-7754
- McBride, A. A. und Myers, G.** (1996). "The E2 Proteins. Papillomavirus Colloquium, III; 15-31."
- Michel, A.; Kopp-Schneider, A.; Zentgraf, H.; Gruber, A. D. und de Villiers, E. M.** (2006). "E6/E7 expression of human papillomavirus type 20 (HPV-20) and HPV-27 influences proliferation and differentiation of the skin in UV-irradiated SKH-hr1 transgenic mice." *J Virol* **80**(22): 11153-11164
- Mignatti, P. und Rifkin, D. B.** (1996). "Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis." *Enzyme Protein* **49**: 117-137
- Mulis, K. B. und Fallona, F. A.** (1987). "Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction." *Methods Enzym* **155**: 335-350

- Münger, K.; Basile, J. R.; Duensing, S.; Eichten, A.; Gonzalez, S. L.; Grace, M. und Zacny, V. L.** (2001). "Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein." *Oncogene* **20**(54): 7888-7898
- Munoz, N.** (2000). "Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence." *J Clin Virol* **19**(1-2): 1-5
- Munoz, N.; Bosch, F. X.; de Sanjose, S.; Herrero, R.; Castellsague, X.; Shah, K. V.; Snijders, P. J. und Meijer, C. J.** (2003). "Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer." *N Engl J Med* **348**(6): 518-527
- Nataraj, A. J.; Trent, J. C. und Ananthaswamy, H. N.** (1995). "P53 gene mutations and photocarcinogenesis." *J Photochem Photobiol B* **62**: 18-30
- Nishimura, A.; Ono, T.; Ishimoto, A.; Dowhanick, J. J.; Frizzell, M. A.; Howley, P. M. und Sakai, H.** (2000). "Mechanisms of human papillomavirus E2-mediated repression of viral oncogene expression and cervical cancer cell growth inhibition." *J Virol* **74**: 3752-3760
- O'Grady, A.; Dunne, C.; O'Kelly, P.; Murphy, G. M.; Leader, M. und Kay, E.** (2007). "Differential expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2 in non-melanoma skin cancer: implications for tumour progression." *Histopathology* **51**(6): 793-804
- Oldak, M.; Smola, H.; Aumailley, M.; Rivero, F.; Pfister, H. und Smola-Hess, S.** (2004). "The human papillomavirus type 8 E2 protein suppresses beta4-integrin expression in primary human keratinocytes." *J Virol* **78**(19): 10738-10746
- Orth, G.** (2006). "Genetics of epidermodysplasia verruciformis: Insights into host defense against papillomaviruses." *Semin Immunol* **18**(6): 362-374
- Persson, A. E.; Edstrom, D. W. und Backvall, H.** (2002). "The mutagenic effect of ultraviolet-A1 on human skin demonstrated by sequencing the p53 gene in single keratinocytes." *Photodermatol Photoimmunol Photome* **18**: 287-293

- Pfister, H.** (1992). "Human papillomaviruses and skin cancer." *Semin Cancer Biol* **3**(5): 263-271
- Pfister, H.** (2003). "Chapter 8: Human papillomavirus and skin cancer." *J Natl Cancer Inst Monogr*(31): 52-56
- Pfister, H. und Fuchs, P. G.** (1987). "Papillomaviruses: Particles, genome organization and proteins" In: Papillomavirus and human disease. (Syrjänen, K.; Gissmann, L. et al, Eds.). Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1987; 1-18:
- Ramoz, N.; Taieb, A.; Rueda, L. A.; Montoya, L. S.; Bouadjar, B. und Favre, M.** (2000). "Evidence for a nonallelic heterogeneity of epidermodysplasia verruciformis with two susceptibility loci mapped to chromosome regions 2p21-p24 and 17q25." *J Invest Dermatol* **114**: 1148-1153
- Rees, J.** (1994). "Genetic alterations in non-melanoma skin cancer." *J Invest Dermatol* **103**: 747-750
- Romeis, B.** (1989). "Mikroskopische Technik" (Romeis, B., Eds.). Urban und Schwarzenberg Verlag, München
- Roth, D.** (2000). "Untersuchungen des zelltransformierenden Potentials hautspezifischer humaner Papillomviren." Diplomarbeit; Institut für Virologie der Universität zu Köln
- Rous, P. und Beard, J. W.** (1935). "The progression to carcinoma of virus-induced rabbit papillomas (Shope)." *J Exp Med* **65**: 523-548
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F. und Maniatis, T.** (1989). "Molecular cloning: a laboratory manual" (Maniatis, T., Eds.). 2nd Edition Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N Y
- Sato, H.; Kinoshita, T.; Takino, T.; Nakayama, K. und Seiki, M.** (1996). "Activation of a recombinant membrane type I matrix metalloproteinases (MT1-MMP) by furin and its interaction with tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-2)." *FEBS Lett* **385**: 238-240

- Schaper, I. D.; Marcuzzi, G. P.; Weissenborn, S. J.; Kasper, H. U.; Dries, V.; Smyth, N.; Fuchs, P. und Pfister, H.** (2005). "Development of skin tumors in mice transgenic for early genes of human papillomavirus type 8." *Cancer Res* **65**(4): 1394-1400
- Scheffner, M.; Huibregtse, J. M.; Vierstra, R. D. und Howley, P. M.** (1993). "The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53." *Cell* **75**(3): 495-505
- Scheffner, M.; Werness, B. A.; Huibregtse, J. M.; Levine, A. J. und Howley, P. M.** (1990). "The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53." *Cell* **63**(6): 1129-1136
- Schmitt, A.; Harry, J. B.; Rapp, B.; Wettstein, F. O. und Iftner, T.** (1994). "Comparison of the properties of the E6 and E7 genes of low- and high-risk cutaneous papillomaviruses reveals strongly transforming and high Rb-binding activity for the E7 protein of the low-risk human papillomavirus type 1." *J Virol* **68**(11): 7051-7059
- Sethi, N. und Palefsky, J.** (2004). "Transcriptional profiling of dysplastic lesions in K14-HPV16 transgenic mice using laser microdissection." *Faseb J* **18**(11): 1243-1245
- Setlow, R. B.; Grist, E.; Thompson, K. und D., W. A.** (1993). "Wavelengths effective in induction of malignant melanoma." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 6666-6670
- Shea, C. und Parrish, J.** (1991). "Non ionising radiation and the skin " In: *Physiology, biochemistry and molecular biology of the skin.* (Goldsmith, L. A., Eds.). New York: Oxford University Press, 2nd Ed.: 910-927.
- Sibbet, G.; Roero-Graillet, C.; Meneguzzi, G. und Campo, M. S.** (2000). "Alpha6-integrin is not the obligatory cell receptor for bovine papillomavirus type 4." *J Gen Virol* **81**: 327-334
- Skiadopoulos, M. H. und McBride, A. A.** (1998). "Bovine papillomavirus type 1 genomes and the E2 transactivator protein are closely associated with mitotic chromatin." *J Virol* **72**: 2079-2088

- Smola-Hess, S. und Pfister, H.** (2002). "Interaction of papillomaviral oncoproteins with cellular factors" In: Structure-function relationships of human pathogenic viruses. (Holzenburg, A. und Bogner, E., Eds.). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, London, Dordrecht, Boston, Moscow: 431-464.
- Stark, S.; Petridis, A. K.; Ghim, S. J.; Jenson, A. B.; Bouwes Bavinck, J. N.; Gross, G.; Stockfleth, E.; Fuchs, P. G. und Pfister, H.** (1998). "Prevalence of antibodies against virus-like particles of Epidermodysplasia verruciformis-associated HPV8 in patients at risk of skin cancer." *J Invest Dermatol* **111**(4): 696-701
- Steger, G. und Corbach, S.** (1997). "Dose-dependent regulation of the early promoter of human papillomavirus type 18 by the viral E2 protein." *J Virol* **71**(1): 50-58
- Steger, G.; Ham, J.; Thierry, F. und Yaniv, M.** (1993). "The E2 proteins of papillomaviruses as transcription and replication factors" In: Virus strategies. (Doerfler, W. und Böhm, P., Eds.). Verlag Chemie, Weinheim: 263-278.
- Steger, G. und Pfister, H.** (1992). "In vitro expressed HPV 8 E6 protein does not bind p53." *Arch Virol* **125**(1-4): 355-360
- Steger, G.; Schnabel, C. und Schmidt, H. M.** (2002). "The hinge region of the human papillomavirus type 8 E2 protein activates the human p21^{WAF1/CIP1} promoter via interaction with Sp1." *J Gen Virol* **83**: 503-510
- Sterenborg, H. J. und van der Leun, J. C.** (1990). "Tumorigenesis by a long wavelength UV-A source." *J Photochem Photobiol* **51**: 325-330
- Stern, R. S.** (1999). "The mysteries of geographic variability in nonmelanoma skin cancer incidence." *Arch Dermatol* **135**: 843-844
- Strickland, P. T.** (1986). "Photocarcinogenesis by near-ultraviolet (UVA) radiation in Sencar mice." *J Invest Dermatol* **87**: 272-275

- Struijk, L.; Bouwes Bavinck, J. N.; Wanningen, P.; van der Meijden, E.; Westendorp, R. G.; Ter Schegget, J. und Feltkamp, M. C.** (2003). "Presence of human papillomavirus DNA in plucked eyebrow hairs is associated with a history of cutaneous squamous cell carcinoma." *J Invest Dermatol* **121**(6): 1531-1535
- Stubenrauch, F. und Pfister, H.** (1994). "Low-affinity E2-binding site mediates downmodulation of E2 transactivation of the human papillomavirus type 8 late promoter." *J Virol* **68**: 6959-6966
- Sun, S.; Thorner, L.; Lentz, M.; MacPherson, P. und Botchan, M.** (1990). "Identification of a 68-kilodalton nuclear ATP-binding phosphoprotein encoded by bovine papillomavirus type 1." *J Virol* **64**: 5093-5105
- Szumiel, I.** (1998). "Monitoring and signaling of radiation-induced damage in mammalian cells." *Radiat Res* **150**: 92-101
- Tan, T. M.; Gloss, B.; Bernard, H. U. und Ting, R. C.** (1994). "Mechanism of translation of the bicistronic mRNA encoding human papillomavirus type 16 E6-E7 genes." *J Gen Virol* **75** (10): 2663-2670
- Thierry, F.** (1993). "Proteins involved in the control of HPV transcription." *Papillomavirus Report* **4**: 27-32
- Thompson, E. W.; Newgreen, D. F. und Tarin, D.** (2005). "Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition?" *Cancer Res* **65**(14): 5991-5995; discussion 5995
- Turek, L. P.** (1994). "The structure, function, and regulation of papillomavirus genes in infection and cervical cancer." *Adv Virus Res* **44**: 305-356
- Ueno, H.; Nakamura, H.; Inoue, M.; Imai, K.; Noguchi, M.; Sato, H.; Seiki, M. und Okada, Y.** (1997). "Expression and tissue localisation of membrane types 1, 2 and 3 matrix metalloproteinases in human invasive breast carcinomas." *Cancer Res* **57**(10): 1255-1260
- Ullman, C. G. und Emery, V. C.** (1996). "Transforming proteins of human papillomaviruses." *Rev Med Virol* **6**: 39-55

- van Hogerlinden, M.; Rozell, B. L.; Toftgard, R. und Sundberg, J. P.** (2004). "Characterization of the progressive skin disease and inflammatory cell infiltrate in mice with inhibited NF-kappaB signaling." *J Invest Dermatol* **123**(1): 101-108
- Wakabayashi, Y.; Mao, J. H.; Brown, K.; Girardi, M. und Balmain, A.** (2007). "Promotion of Hras-induced squamous carcinomas by a polymorphic variant of the Patched gene in FVB mice." *Nature* **445**(7129): 761-765
- Walboomers, J. M.; Jacobs, M. V.; Manos, M. M.; Bosch, F. X.; Kummer, J. A.; Shah, K. V.; Snijders, P. J.; Peto, J.; Meijer, C. J. und Munoz, N.** (1999). "Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide." *J Pathol* **189**(1): 12-19
- Webster, K.; Parish, J.; Pandya, M.; Stern, P. L.; Clarke, A. R. und Gaston, K.** (2000). "The human papillomavirus (HPV) 16 E2 protein induces apoptosis in the absence of other HPV proteins and via a p53-dependent pathway." *J Biol Chem* **275**: 87-94
- Weissenborn, S. J.; Nindl, I.; Purdie, K.; Harwood, C.; Proby, C.; Breuer, J.; Majewski, S.; Pfister, H. und Wieland, U.** (2005). "Human papillomavirus-DNA loads in actinic keratoses exceed those in non-melanoma skin cancers." *J Invest Dermatol* **125**(1): 93-97
- Wells, S. I.; Francis, D. A.; Karpova, A. Y.; Dowhanick, J. J.; Benson, J. D. und Howley, P. M.** (2000). "Papillomavirus E2 induces senescence in HPV-positive cells via pRB- and p21(CIP)-dependent pathways." *Embo J.* **19**(5762-5771)
- Wentzensen, N.; Vinokurova, S. und von Knebel Doeberitz, M.** (2004). "Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract." *Cancer Res* **64**(11): 3878-3884
- Wettstein, F. O.** (1990). "State of viral DNA and gene expression in benign vs. malignant tumors" In: Papillomaviruses and human cancer. (Pfister, H., Eds.). CRS Press, Inc., Boca Raton: 155-179.

- Woodworth, C. D.; Michael, E.; Smith, L.; Vijayachandra, K.; Glick, A.; Hennings, H. und Yuspa, S. H. (2004).** "Strain-dependent differences in malignant conversion of mouse skin tumors is an inherent property of the epidermal keratinocyte." *Carcinogenesis* **25**(9): 1771-1778
- Yamamoto, M.; Mohanam, S.; Sawaya, R.; Fuller, G. N.; Seiki, M.; Sato, H.; Gokaslan, Z. L.; Liotta, L. A.; Nicolson, G. L. und Rao, J. S. (1996).** "Differential expression of membrane type matrix metalloproteinase and its correlation with gelatinase-A activation in human malignant brain tumors in vivo and in vitro." *Cancer Res* **56**(2): 384-392
- Yang, L.; Mohr, I.; Clark, R. und Botchan, M. (1993).** "The E1 protein of bovine papillomavirus 1 is an ATP-dependent DNA helicase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 5086-5090
- You, J.; Croyle, J. L.; Nishimura, A.; Ozato, K. und Howley, P. M. (2004).** "Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes." *Cell* **117**(3): 349-360
- Yu, A. E.; Hewitt, R. E.; Connor, E. W. und Stetler-Stevenson, W. G. (1997).** "Matrix metalloproteinases. Novel targets for directed cancer therapy." *Drugs Aging* **11**(3): 229-244
- Zou, N.; Lin, B. Y.; Duan, F.; Lee, K. Y.; Jin, G.; Guan, R.; Yao, G.; Lefkowitz, E. J.; Broker, T. R. und Chow, L. T. (2000).** "The hinge of the human papillomavirus type 11 E2 protein contains major determinants for nuclear localization and nuclear matrix association." *J Virol* **74**(8): 3761-3770
- zur Hausen, H. und de Villiers, E. M. (1994).** "Human papillomaviruses." *Annu Rev Microbiol* **48**: 427-447

IX. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µmol	Mikromol
Abb.	Abbildung
AK	Aktivierungsdomäne
AN	<i>Accession Number</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure, -n
ATP	Adenosin-Triphosphat
BL6	<i>C57BL/6J</i> (Mausstamm mit schwarzem Fell)
bp	Basenpaar
BPV	Bovines Papillomvirus
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CIN	<i>Cervical Intraepithelial Neoplasia</i> (zervikale intraepitheliale Neoplasie),
cm	Zentimeter
COPV	<i>Canine Oral Papillomavirus</i> (Hunde-Papillomvirus)
CRPV	<i>Cottontail Rabbit Papillomavirus</i> (Wild-Kaninchen-Papillomvirus)
DBA	<i>Dilute braun</i> (Mausstamm mit braunem Fell)
DBA/BL6	Mausstamm aus den beiden Stämmen DBA und BL6
DBD	DNA-binde- und Dimerisierungsdomäne
DMBA	Dimethylbenzanthrazen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
E6-AP	<i>E6-Associated-Protein</i> (E6 assoziiertes Protein)
et al.	und andere
EtOH	Ethanol
EV	<i>Epidermodysplasia verruciformis</i>
F	Filialgeneration
FVB/N	<i>Friend Leukaemia Virus B Strain</i> (albino Mausstamm)

IX. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

g	Erdbeschleunigung
GFR	gesamte frühe Region von HPV8 (Gene E1, E2, E4, E6, E7)
H&E	Hämatoxyli-Eosin-Färbung
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
HPV	Humanes Papillomvirus
HRP	Meerrettich-Peroxidase
Hz	Herz
K14	humaner Zytokeratin-14-Promotor
K14-HPV8 GFR	transgene Mäuse, welche die gesamte frühe Region des HPV8 Genoms enthalten, unter der Kontrolle des humanen Zytokeratin-14-Promotors
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LCR	<i>Long control Region</i>
LSDB	<i>Low Salt Dilution Buffer</i>
MeOH	Methanol
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)
MT-MMP	<i>Membrane-Type-Matrix-Metalloproteinase</i> (membranständige Matrix-Metalloproteinase)
NCR	<i>Non-Coding-Region</i> (nicht-kodierende-Region)
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NMJK	nicht-melanozytärer-Hautkrebs
NMHT	Nicht melanozytärer Hauttumor
nt	Nukleotid
ORF	open-reading-frame (offene Leserahmen)
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	<i>Polymerase-Chain-Reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)

IX. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

PEK	Plattenepithel-Karzinom
pmol	Picomol
pRb	Retinoblastom-Protein
PV	Papillomvirus
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
TA	Transaktivierungsdomäne
TAF	<i>TBP Associated Factor</i>
TBP	<i>TATA Binding Protein</i>
TEMED	N, N, N', N' - Tetramethylethylendiamin
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Azetat
Tris	Tris(-hydroxymethyl-)aminomethan
U	<i>Units</i> (Einheiten)
u.a.	unter anderen, -m
UV	Ultraviolett
<i>wt</i>	Wildtype
z.B.	zum Beispiel

X. DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Herbert Pfister für die Möglichkeit, diese Arbeit im Institut für Virologie durchgeführt haben zu können und für die kritische Diskussion meiner Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. Jens Brüning und Herrn Prof. Dr. Siegfried Roth danke ich für ihre Bereitschaft die vorliegende Arbeit vor der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu vertreten.

Bei Herrn Priv.-Doz. Dr. Hans-Udo Kasper, Frau Prof. Dr. Claudia Wickenhauser, Herrn Dr. Falko Schulze und Frau Dr. Catherin Niemann aus dem Institut für Pathologie möchte ich mich für die fachliche Unterstützung bedanken.

Herrn Dr. Dr. Ingo Haase und Frau Prof. Dr. Dr. Cornelia Mauch und allen Mitarbeitern ihrer Arbeitsgruppen aus dem Institut für Dermatologie sei für die gute Zusammenarbeit und ihre wissenschaftliche und soziale Unterstützung gedankt.

Bei Frau Renate Knaupp, Frau Alexandra van Mil und insbesondere bei Herrn Dirk Wessler möchte ich mich für die technische Assistenz und ihre ständige Hilfsbereitschaft bedanken.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Virologie der Universität zu Köln, besonders aber meinen Kollegen Dr. Baki Akgül und Dr. Gian Paolo Marcuzzi sei für die sehr gute Zusammenarbeit und das familiäre Arbeitsklima gedankt.

Diese Arbeit wurde vom SFB589 der Dermatologie und vom Zentrum für Molekulare Medizin (ZMMK) gefördert.

Den Menschen, die mich begleiten – ganz besonders meinem Ehemann und meinen Eltern– danke ich für die ständige Unterstützung und die aufbauenden Worte und Taten in der kritischen Phase meiner Arbeit.

XI. ERKLÄRUNG

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Herbert Pfister betreut worden.

Teile der vorliegenden Dissertation wurden unter den folgenden Titeln zur Veröffentlichung eingereicht:

Akgül, B.*; Pfefferle, R.*; Marcuzzi, G. P.; Zigrino, P.; Krieg, T.; Pfister, H. und Mauch, C. (2005). "Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9, MMP-13 and MT1-MMP in skin tumors of human papillomavirus type 8 transgenic mice." *Exp Dermatol* **15**: 35-42.

* Diese Autoren trugen gleichwertig zu dieser Publikation bei.

R. Pfefferle, G. P. Marcuzzi, B. Akgül, H. U. Kasper, F. Schulze, I. Haase, C. Wickenhauser, H. Pfister (2007). The human papillomavirus type 8 E2 protein induces skin tumors in transgenic mice. *J Invest Dermatol* (in review).

Köln, den 10. Dezember 2007

(Regina Pfefferle)

XII. LEBENS LAUF

Zur Person

Name	Regina Pfefferle (geb. Lindemann)
Anschrift	Schnellweiderstr. 126, 51067 Köln
Geburtsdatum	22.09.1978
Geburtsort	Bergisch Gladbach
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	verheiratet

Schulbildung

Sept. 1985 – Juli 1989	Gemeinschaftsgrundschule Sülzthal, Overath
Sept. 1989 – Juli. 1998	Paul-Klee-Gymnasium, Overath
Abschluss:	Allgemeine Hochschulreife

Studium und Beruf

Okt. 1998 – Jan. 2004	Hochschulstudium an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln
Studiengang:	Diplom-Biologie
Hauptfach:	Genetik
1.Nebenfach:	Entwicklungsbiologie
2.Nebenfach:	Pharmakologie
Jan. 2003 - Jan. 2004	Diplomarbeit am Institut für Virologie der Universität zu Köln; Titel: „Etablierung HPV8-E2 transgener Mäuse und Charakterisierung der Matrix-Metalloproteinase Expression in HPV8 induzierten Hauttumoren.“
Jan. 2004 Abschluss:	Diplom-Biologin
Febr. 2004 – Feb. 2008	Promotionsstudium im Fachbereich Biologie an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln Experimentelle Doktorarbeit im Institut für Virologie, Titel: „Charakterisierung des onkogenen Potentials von HPV8-E2 in transgenen Mäusen und Analyse der Matrix-Metalloproteinase Expression in HPV8 induzierten Hauttumoren.“