

Analyse des onkogenen Potentials  
der frühen Gene E6 und E7  
des humanen Papillomvirus Typ 8 durch die  
Etablierung transgener Mausmodelle.

**Inaugural-Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Gian Paolo Marcuzzi

aus

Köln

2006

**Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. Herbert Pfister**

**Prof. Dr. Jens Brüning**

**Vorsitzender: Prof. Dr. Siegfried Roth**

**Beisitzer: Dr. Matthias Cramer**

**Tag der Disputation: 12.12.2006**

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. Papillomviren – Taxonomie.....	1
1.2. Aufbau der Papillomviren.....	2
1.3. Funktionen der viralen Genprodukte.....	4
1.3.1. Das E1-Protein.....	4
1.3.2. Das E2-Protein.....	4
1.3.3. Das E6-Protein.....	5
1.3.4. Das E7-Protein.....	6
1.4. Vermehrungszyklus von humanen Papillomviren.....	8
1.5. Papillomvirus-bedingte Tumorentstehung.....	10
1.5.1. Beteiligung humaner Papillomviren bei der Entstehung des Zervixkarzinoms.....	11
1.5.2. Rolle von HPV bei der Entstehung des „nicht-melanozytären Hautkrebses“.....	11
1.5.2.1 Epidermodysplasia verruciformis.....	12
1.5.2.2 HPV-assoziierte Hauttumoren bei immunsupprimierten Patienten und in der Normalbevölkerung.....	13
1.5.3. Molekulare Mechanismen der Hautkarzinogenese.....	13
1.5.4. Der Einfluss von UV-Strahlung auf die Entstehung von nicht-melanozytärem Hautkrebs.....	15
1.6. Zielsetzung der Arbeit.....	17
<b>2. Material</b> .....	<b>18</b>
2.1. Bakterienstämme.....	18
2.2. Versuchstiere.....	18
2.3. Medien für die Bakterienkultur.....	19
2.4. Nukleinsäuren.....	19
2.4.1. Rekombinante Plasmide.....	19
2.4.2. Klonierungsvektoren.....	20
2.4.3. Synthetisch hergestellte Oligonukleotide.....	20
2.4.4. DNA Längenstandards.....	23
2.5. Enzyme.....	23
2.6. Reagenziensysteme.....	23
2.7. Reagenzien.....	24
2.7.1. Antikörper.....	24
2.8. Lösungen und Puffer.....	24
2.9. Narkosemittel für Mäuse.....	24
<b>3. Methoden</b> .....	<b>25</b>
3.1. Bakterienkultur.....	25
3.1.1. Erzeugung kompetenter Bakterien für die Transformation.....	25
3.1.2. Transformation kompetenter Bakterien.....	25

3.1.3.	Langzeitlagerung von Bakterien.....	26
<b>3.2.</b>	<b>DNA-Methoden .....</b>	<b>26</b>
3.2.1.	Plasmidisolierung aus Bakterien .....	26
3.2.2.	Plasmidpräparationen .....	26
3.2.3.	DNA-Standardmethoden .....	26
<b>3.3.</b>	<b>Erzeugung transgener Mäuse durch Mikroinjektion .....</b>	<b>27</b>
3.3.1.	Aufreinigung des Transgens .....	27
3.3.2.	Gewinnung befruchteter Oozyten.....	27
3.3.3.	Mikroinjektion des Transgens und Implantation der Oozyten .....	27
<b>3.4.</b>	<b>Etablierung transgener Maus Linien.....</b>	<b>28</b>
3.4.1.	Kreuzung von Mäusen .....	28
3.4.2.	Markierung der Mäuse .....	28
<b>3.5.</b>	<b>Genotypisierung der Mäuse.....</b>	<b>29</b>
3.5.1.	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	29
3.5.2.	Extraktion von genomischer DNA aus Schwanzbiopsien .....	29
<b>3.6.</b>	<b>DNA-Sequenzierung und Analyse der Sequenzen .....</b>	<b>30</b>
<b>3.7.</b>	<b>Analyse der Mäuse.....</b>	<b>30</b>
3.7.1.	Makroskopische Analyse der Mäuse.....	30
3.7.2.	Histologische Untersuchungen.....	30
<b>3.8.</b>	<b>Experimentelle Eingriffe an Mäusen .....</b>	<b>31</b>
3.8.1.	Narkotisieren der Mäuse .....	31
3.8.2.	UV-Bestrahlungen .....	31
3.8.3.	Wundheilungsexperimente.....	31
<b>3.9.</b>	<b>RNA-Methoden .....</b>	<b>32</b>
3.9.1.	Extraktion von Gesamt-RNA .....	32
3.9.2.	Herstellung der cDNA.....	32
3.9.3.	Quantifizierung von mRNA.....	33
<b>3.10.</b>	<b>Statistische Analysen .....</b>	<b>34</b>
<b>3.11.</b>	<b>Analyse des p53 und H-ras Status in DNA aus Haut- oder Tumorbiopsien .....</b>	<b>34</b>
<b>3.12.</b>	<b>Immunhistochemie .....</b>	<b>35</b>
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>36</b>
<b>4.1.</b>	<b>Tumorentwicklung bei HPV8-GFR Mäusen .....</b>	<b>36</b>
4.1.1.	Zeitlicher Verlauf der Tumorentwicklung in den verschiedenen Linien HPV8-GFR transgener Mäuse .....	36
4.1.2.	Histologie der Tumoren aller Linien der HPV8-GFR transgenen Mäuse .....	39
4.1.3.	Quantitative Bestimmung der E2, E6 und E7 mRNAs in der normalen Haut von HPV8- GFR Mäusen verschiedener Linien und Generationen. ....	40
4.1.4.	Quantitative Bestimmung der E2, E6 und E7 mRNA Transkripte in Tumoren der HPV8-GFR Mäuse .....	41
<b>4.2.</b>	<b>Etablierung HPV8-E6, -E6/E7 und E7 transgener Mäuse .....</b>	<b>42</b>
4.2.1.	Konstruktion der Transgene und Erzeugung der transgenen Mäuse .....	42

4.2.2.	Nachweis der HPV8-Gene in Mäusen der F0-Generation und folgender Generationen .....	43
4.2.3.	Tumor Entwicklung in HPV8-E6 und HPV8- E6/E7 transgenen Mäusen .....	48
4.2.3.1	Makroskopische Untersuchungen.....	48
4.2.3.2	Zeitlicher Verlauf der Tumorentwicklung in HPV8-E6 transgenen Mäusen.....	50
4.2.3.3	Mikroskopische Untersuchungen.....	53
4.2.3.4	Histologische Untersuchung der Thymus Veränderungen .....	56
4.2.3.5	Tumorentwicklung in den HPV8-E6/E7 F0-Mäusen .....	56
4.2.4.	HPV8-E7 transgene Mäuse.....	57
<b>4.3.</b>	<b>Wundheilungsexperimente mit HPV8 transgenen Mäusen .....</b>	<b>58</b>
<b>4.4.</b>	<b>Bestrahlung der HPV8 transgenen Mäuse mit UV-Licht .....</b>	<b>61</b>
4.4.1.	p53 Färbungen UV bestrahlter Haut von HPV8 transgenen Mäusen.....	66
<b>4.5.</b>	<b>DNA Sequenzanalysen der Gene p53 und H-ras aus HPV8 Tumoren .....</b>	<b>69</b>
4.5.1.	p53-Mutationsanalyse von HPV8-E6 und E6/E7 Tumoren.....	69
4.5.2.	H-ras Mutationsanalyse der PEK von HPV8-GFR und HPV8-E6 Mäusen .....	70
<b>5.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>72</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>81</b>
<b>7.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>100</b>
<b>8.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>102</b>
<b>9.</b>	<b>Abstract.....</b>	<b>104</b>
<b>10.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>105</b>
<b>11.</b>	<b>Vorträge und Poster .....</b>	<b>106</b>
<b>12.</b>	<b>Erklärung.....</b>	<b>108</b>
<b>13.</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>109</b>

## 1. Einleitung

### 1.1. Papillomviren – Taxonomie

Papillomviren (PV) sind unbehüllte, ikosaedrische, doppelsträngige DNA Viren und bilden die eigenständige Familie Papillomaviridae. Sie infizieren das mehrschichtige Plattenepithel der Haut oder Schleimhaut vieler Säugetierarten, einschließlich des Menschen (Pfister, 1984; Howley, 1996). Oft bleiben Infektionen mit PV klinisch inapparent, sie können aber auch zur verstärkten Proliferation des Epithelgewebes führen. So induzieren PV die Bildung gutartiger Tumoren der Haut und Schleimhaut in Form von Warzen, Kondylomen, Larynx- und Konjunktivalpapillomen sowie Dysplasien der Zervix (Shah und Howley, 1996; Gross und Barraso, 1997). Diese Tumoren wachsen in der Regel begrenzt und bilden sich meistens - vermutlich in Folge einer zellvermittelten Immunreaktion - spontan zurück. Bei längerer Persistenz können einige dieser Läsionen jedoch zu Karzinomen entarten (Pfister, 1992a).

Allein beim Menschen sind nahezu 100 komplett sequenzierte humane PV (HPV)-Typen bekannt, die per Definition weniger als 90% Sequenzhomologie innerhalb des hoch konservierten Hauptstrukturproteingens L1 zeigen. Subtypen dürfen nur 2% bis 10% und Varianten maximal 2% voneinander abweichen (de Villiers *et al.*, 2004). HPV sind strikt epitheliotrop und vermehren sich ausschließlich in den Keratinozyten der Haut oder der Schleimhäute. Man unterscheidet kutane und mukosale bzw. genitale HPV-Typen (Shah und Howley, 1996; zur Hausen, 2000). HPV8 wird gemeinsam mit anderen kutanen Papillomviren der so genannten *Epidermodysplasia verruciformis* (EV-) Gruppe, dem Genus *Beta*, zugeordnet (Abb.1).

Die genitalen HPV-Typen unterteilt man nach ihrer Fähigkeit, Keratinozyten zu transformieren, in Niedrig-Risiko (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72) und Hoch-Risiko (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 73, 82) HPV-Typen (Munoz *et al.*, 2003). Hoch-Risiko Typen sind mit invasiv wachsenden Zervixkarzinomen und anderen, anogenitalen Karzinomen assoziiert, während Niedrig-Risiko Typen gutartige, genitale Warzen, *Condylomata acuminata*, hervorrufen (zur Hausen, 2002).

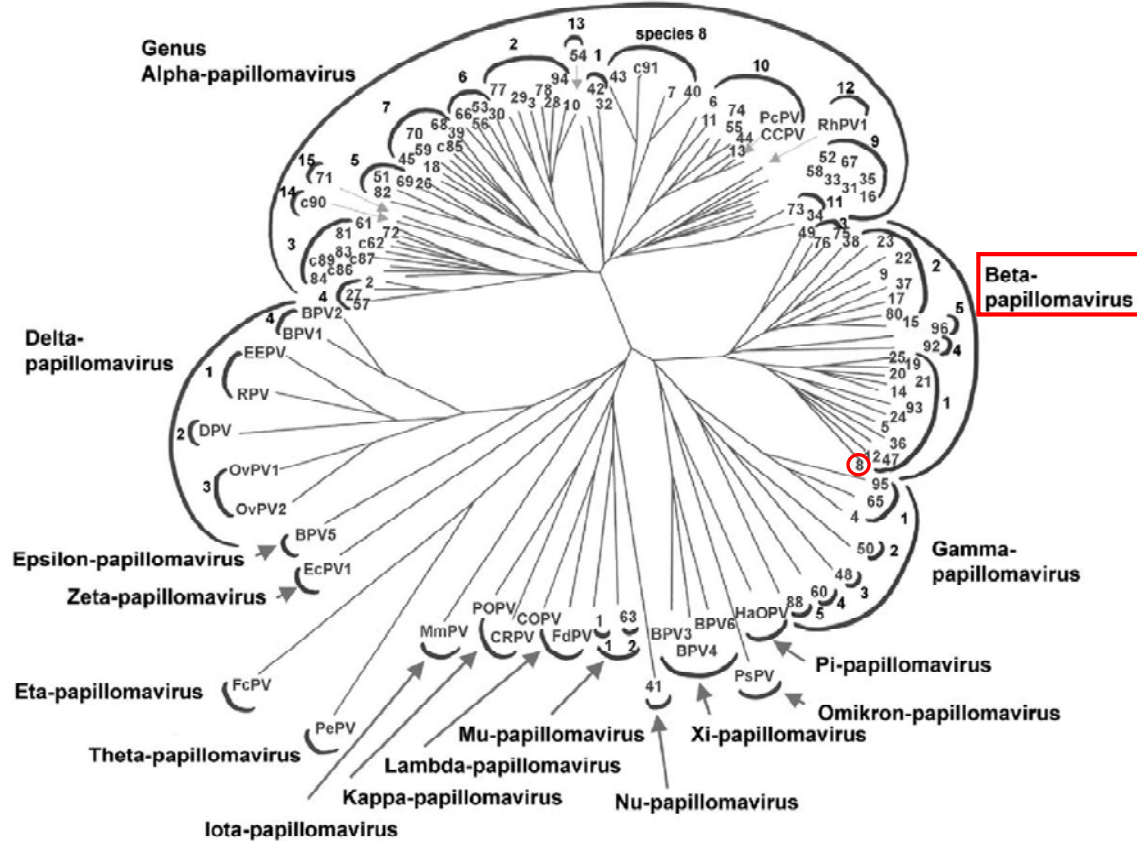


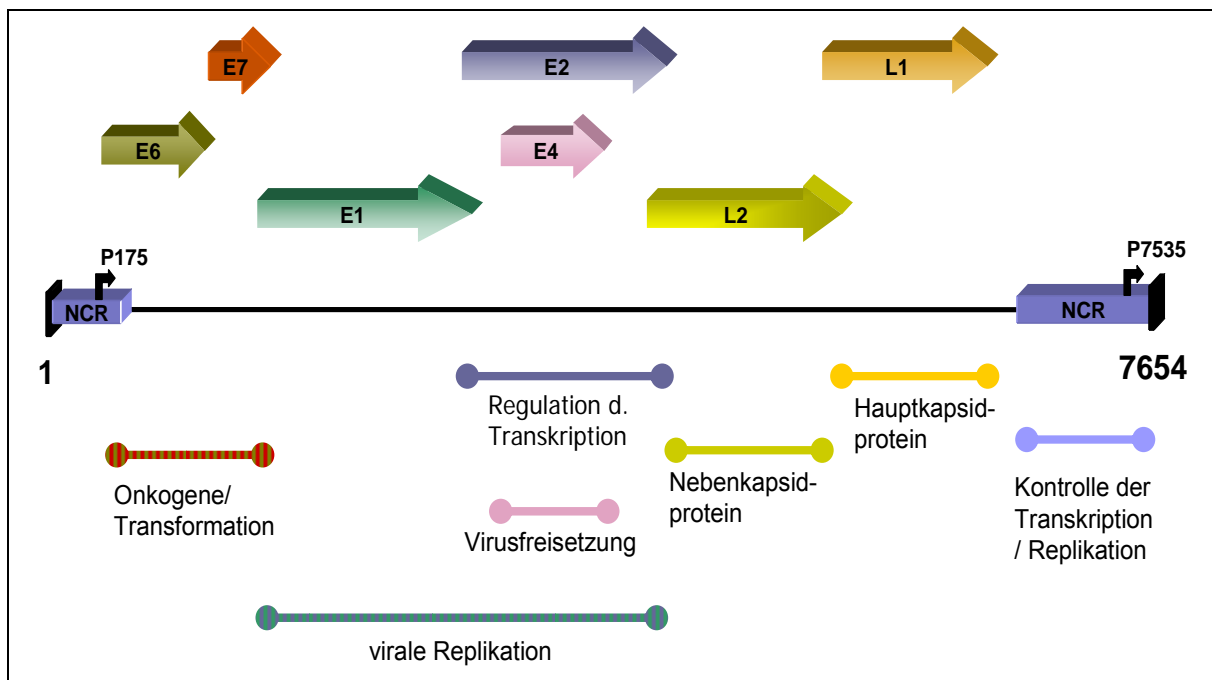
Abb. 1 Phylogenetischer Stammbaum von Papillomviren (de Villiers *et al.*; 2004)

## 1.2. Aufbau der Papillomviren

Die ikosaedrischen Kapside der PV haben einen Durchmesser von ca. 55 nm und bestehen aus 72 pentameren Kapsomeren. In ihnen befindet sich eine doppelsträngige, zirkulär geschlossene DNA, von etwa 7500 bis 8000 Basenpaaren (bp). In ausgereiften Virionen ist die virale DNA mit den Histonproteinen H2a, H2b, H3 und H4 der Wirtszelle zu einem Chromatin-ähnlichen Komplex assoziiert (Pfister, 1984).

Alle teilweise überlappenden offenen Leserahmen („open reading frames“, ORFs), liegen auf demselben DNA-Strang und sind trotz großer Sequenzunterschiede zwischen den verschiedenen Typen in ihrer Funktion, Größe und Anordnung hoch konserviert (Pfister und Fuchs, 1987). Die Genprodukte einzelner offener Leserahmen werden teilweise zu unterschiedlichen Zeiten des viralen Vermehrungszyklus gebildet (Pfister und Fuchs, 1994) und aufgrund dessen in frühe

(„early“, E) und späte („late“, L) Proteine unterteilt (Abb. 2). Hierbei kommen den frühen Proteinen vor allem regulatorische Funktionen bei der viralen Replikations- und Transkriptionskontrolle (E1, E2) und der Transformation der Wirtszelle (E6, E7) zu. Die späten Gene L1 und L2 kodieren für das Haupt- bzw. Nebenkapsidprotein und sind für die Virusproduktion notwendig.



### Abb. 2 Schematische Darstellung der HPV8 Genomorganisation

Das Genom des EV-assoziierten HPV8 ist linearisiert dargestellt, indem es zwischen den Nukleotiden 1 und 7654 geöffnet wurde. Die einzelnen Funktionen sind den Proteinen zugeordnet (modifiziert nach Pfister und Fuchs, 1987). In der NCR (non coding region) befinden sich die beiden Promotoren.

Zwischen den offenen Leserahmen L1 und E6 befindet sich die Nicht-Kodierende-Region („non coding region“, NCR), die in der Regel ca. 1000bp lang ist. Dieser DNA-Abschnitt enthält bei allen bisher untersuchten PV neben dem Ursprungspunkt der viralen DNA-Replikation und den Promotoren zahlreiche weitere cis-aktive Kontrollelemente, welche der Modulation der Transkription und der viralen Replikation dienen (Pfister und Fuchs, 1987; 1994; Iftner *et al.*, 1992; Howley, 1996; Ustav und Stenlund, 1991).

Mindestens zwei Promotoren sind an der Transkription der polycistronischen mRNA beteiligt und durch alternatives Spleißen dieser mRNA entstehen eine Vielzahl von



Transkripten, die neben den vollständigen Proteinen auch für verkürzte Formen und Fusionsproteine kodieren (Baker und Calef, 1995).

### 1.3. Funktionen der viralen Genprodukte

#### 1.3.1. Das E1-Protein

Das E1-Protein der PV ist bei den mukosalen und kutanen Typen hoch konserviert und essentiell für die virale Replikation (Chow und Broker, 1994). Es besitzt als einziges Protein der PV enzymatische Funktionen als ATPase und Helikase (Yang *et al.*, 1993, Seo *et al.*, 1993). Nach der Bindung von E1 an den Replikationsursprung (ori; origin of replication) entfernt es mit der viralen DNA verbundene Histone in Interaktion mit E2 und zellulären Proteinen und induziert so die Synthese viraler Genomkopien (Wilson *et al.*, 2002).

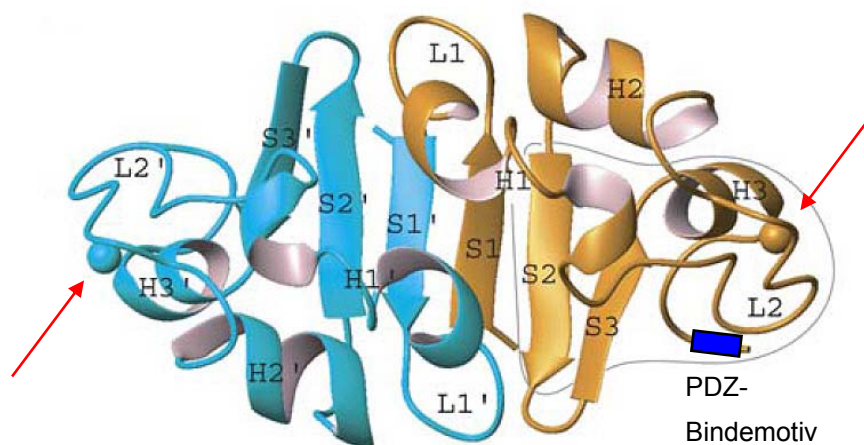
#### 1.3.2. Das E2-Protein

Das E2-Protein ist ein 43-48 kDa großes, multifunktionales, nukleäres Phosphoprotein, das aus zwei funktionellen Domänen besteht: einer N-terminalen Aktivierungsdomäne (AD) sowie einer C-terminalen Dimerisierungs- und DNA-bindenden Domäne (DBD). E2 bindet als Dimer an die palindromische Konsensussequenz 5'-ACCG(N)<sub>4</sub>CGGT-3', die sich in verschiedenen Promotorelementen im Bereich der NCR und in der Nähe des ori befindet. Beide E2-Domänen sind durch Aminosäuren (Hinge-Region) verbunden, deren Anzahl und Sequenz sich bei verschiedenen HPV-Typen unterscheiden. Vor allem die Hinge-Region von EV-assoziierten HPV-Typen ist relativ groß und erfüllt Funktionen bei der Interaktion mit zellulären Transkriptionsfaktoren (Steger *et al.*, 2002). Die N- und C-terminalen Regionen sind allerdings unter den HPV hoch konserviert (McBride *et al.*, 1991). Das E2-Protein fungiert als sequenzspezifischer Transaktivator oder Repressor der Transkription, wobei die Position der E2-Bindestellen relativ zu anderen *cis*-aktiven Promotorelementen für den jeweiligen Effekt verantwortlich ist (Steger *et al.*, 1993). Bei HPV16 und 18 tritt die Repression erst bei erhöhter E2-Konzentration auf, während bei niedriger E2-Menge eine Aktivierung des E6/E7-Promotors gemessen

wurde (Bouvard *et al.*, 1994; Steger und Corbach, 1997). Die Aktivierungsdomäne von E2 ist verantwortlich für die Virusreplikation und den durch E2-induzierten Stopp des Zellzyklus in der G<sub>1</sub>/S-Phase (Goodwin *et al.*, 1998). Über die Rekrutierung des TATA-bindenden Proteins und des Transkriptionsfaktors TFIIB an die TATA box der NCR (Yao *et al.*, 1998) aktiviert sie direkt die E6-Transkription (Hou *et al.*, 2000).

### 1.3.3. Das E6-Protein

Das ca. 160 Aminosäuren (AS) große E6-Protein trägt bei den Hoch-Risiko HPV-Typen zur Transformation bei, kann jedoch diesen Prozess nicht allein induzieren (Hawley-Nelson *et al.*, 1989; Hudson *et al.*, 1990; Münger *et al.*, 1989). Lediglich das E6-Protein von HPV16 ist allein in der Lage menschliche Mammazellen zu immortalisieren (Band *et al.*, 1991). Es ist im Nukleus sowie in nicht nukleären Membranen lokalisiert und enthält vier Cys-X-X-Cys Motive, die zwei Zinkfingerdomänen formen (Abb.3), die mit jeweils 29-30 AS ungewöhnlich groß sind (Grossman und Laimins, 1989).



**Abb. 3 Dreidimensionale Darstellung des E6-Proteins von HPV16**

Dargestellt ist das E6-Protein mit seinen zwei Zinkfingern (rote Pfeile weisen auf die Zn<sup>2+</sup> Ionen) und dem PDZ-Bindemotiv, das nur bei Hochrisiko E6-Proteinen, z.B. HPV16 und 18, vorkommt. Die grau umrandete Region zeigt die DNA-bindende Region im C-terminalen Bereich (mit freundlicher Genehmigung von Gilles Travé; Nominé *et al.*, 2006).

Das E6-Protein der anogenitalen Hoch-Risiko HPVs interagiert mit dem zellulären Tumorsuppressorprotein p53 (Werness *et al.*, 1990). Diese Wechselwirkung

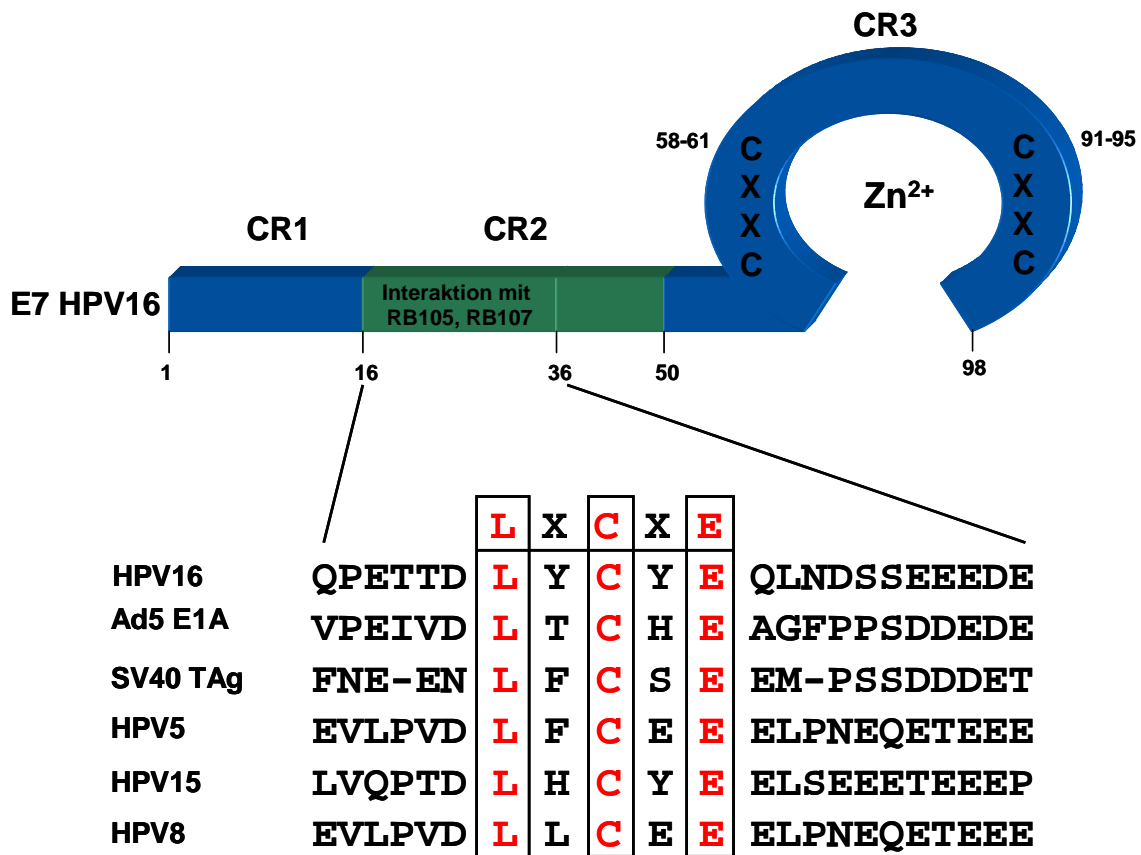
verhindert den Transport von p53 in den Zellkern und bewirkt die Bindung des E6-assoziierten Proteins (E6-AP). Dabei handelt es sich um eine Ubiquitin-Ligase, die das p53 der ubiquitinabhängigen Proteolyse zuführt. Dies führt in der Zelle zu einem Mangel an diesem Tumorsuppressorprotein (Scheffner *et al.*, 1990, 1993). Das hat wiederum zur Folge, dass es zu einer Aufhebung der Zellzykluskontrolle am G<sub>1</sub>/S- und G<sub>2</sub>/M Kontrollpunkt kommt. Dies ist ein wichtiger Schritt im Vermehrungszyklus der PV, weil ein produktiver Infektionszyklus nur in Zellen möglich ist, die sich in der S-Phase des Teilungszyklus befinden. Allerdings können dadurch DNA-Schäden nicht repariert werden und es kommt zu genetischer Instabilität und zur malignen Transformation der mit Hoch-Risiko HPV-infizierten Zellen (Fehrmann und Laimins, 2003). Außerdem binden sich die E6-Proteine auch an das proapoptotische Protein Bak und verursachen durch Anlagerung von E6-AP seinen Abbau. Der Eintritt der Zellen in die Apoptose wird dadurch verhindert (Jackson und Storey, 2000). Einen weiteren wichtigen Beitrag zur Zelltransformation leistet das E6-Protein durch die Aktivierung des Promotors der humanen Telomerase Reverse-Transkriptase (hTert), die für die katalytische Untereinheit der Telomerase kodiert (Gewin und Galloway, 2001).

Ein strukturelles Motiv mit der Konsensussequenz X-S/T-X-V/L befindet sich im C-Terminus von genitalen Hoch-Risiko E6-Proteinen. Mit diesem so genannten PDZ-Bindemotiv kann E6 eine Vielzahl von Proteinen mit PDZ-Domänen (hDLG, hScrib, MUPP1, MAGUKs) binden und in die Proteolyse führen (Gardioli *et al.*, 1999; Nakagawa *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 2002). Das Motiv scheint unabhängig von der p53-Inaktivierung für das onkogene Potential der E6-Proteine eine wichtige Rolle zu spielen (Kiyono *et al.*, 1997).

#### **1.3.4. Das E7-Protein**

Der E7 ORF von PV kodiert für ein Zinkfinger-Protein, welches aus ungefähr 100 Aminosäuren besteht und die Hauptursache für das transformierende Potenzial bestimmter HPV-Typen ist. Es befindet sich hauptsächlich im Kern der Zelle, jedoch auch in geringeren Mengen im Zytoplasma (Sato *et al.*, 1989; Smotkin und Wettstein, 1987). Das E7 Protein zeigt sowohl funktionelle als auch strukturelle Ähnlichkeiten mit dem E1A Protein von Adenoviren und dem großen T-Antigen von SV40 (Abb.4). Das E7-Protein weist zwei konservierte Regionen auf (conserved regions; CR1 und

CR2). Die CR2 Region ist Substrat für die Kasein Kinase II (CKII). Die Phosphorylierung führt zu einer Erhöhung der transformierenden Aktivität der E7-Proteine (Barbosa *et al.*, 1990; Firzlaff *et al.*, 1989; Massimi *et al.*, 1996; Phelps *et al.*, 1992). In CR2 der meisten E7 Proteine befindet sich außerdem ein Motiv L-X-C-X-E, welches in verschiedenen Protein-Protein Interaktionen involviert ist (Chellappan *et al.*, 1992). Neben CR1 und CR2, findet man noch zwei Cys-X-X-Cys Motive in der CR3-Region im carboxyterminalen Bereich des Proteins, die eine Zinkfingerdomäne bilden, der man die transformierenden Eigenschaften zuschreibt (Jewers *et al.*, 1992; Watanabe *et al.*, 1992 ).



**Abb.4 Das E7-Protein des humanen Papillomvirus Typ 16.**

Die Zahlenangaben beziehen sich auf die Aminosäurepositionen, beginnend am aminoterminalen Ende. Das E7-Protein weist in der carboxyterminalen Domäne 2 konservierte Motive der Form Cys-X-X-Cys auf, die einen Zinkfinger bilden. Zwischen den Positionen 16 und 36 befindet sich eine Domäne, die das Motiv L-X-C-X-E enthält (vergrößerte Darstellung), welches man auch im großen T-Antigen von SV40, dem E1A-Protein der Adenoviren, und in kutanen HPV findet (z.B. HPV15 und HPV5). Über diese Proteinregion wird die Interaktion mit den zellulären Tumorsuppressoren RB105 und RB107 vermittelt.

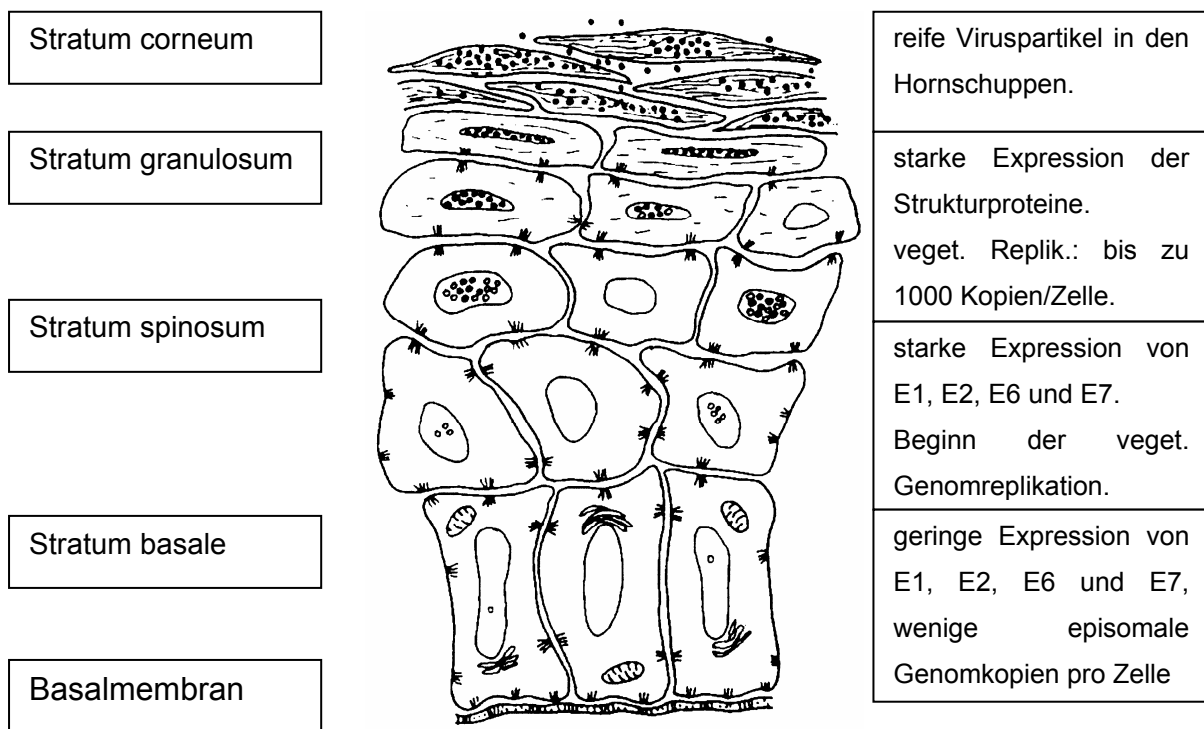
Die Distanz zwischen den zwei Cys-X-X-Cys Motiven (29 oder 30 AS) ist unter den E7-Proteinen genau wie bei den E6-Proteinen hoch konserviert. Außerdem ist die carboxyterminale Region zur funktionell wichtigen Dimerisierung des E7-Proteins notwendig (Clemens *et al.*, 1995).

Die E7-Proteine von Hoch-Risiko HPV-Typen binden Mitglieder der *Retinoblastoma* (pRB) Tumorsuppressor Familie RB105, RB107 und RB130 (Dyson *et al.*, 1989; 1992) und beschleunigen deren Degradation über den Ubiquitin-abhängigen Abbau, worauf das transformierende Potential von E7 maßgeblich zurückgeführt wird (Gonzales *et al.*, 2001; Jones und Münger, 1997). Durch kompetitive Bindung an pRB und dessen Proteolyse wird der Transkriptionsfaktor E2F freigesetzt, der in ruhenden Zellen mit hypophosphoryliertem pRB assoziiert ist. E2F aktiviert daraufhin die Expression von Proteinen für die DNA-Synthese und von Zellzyklusregulatoren, die den G<sub>1</sub>/S-Übergang steuern. Außerdem bindet E7 die zyklinabhängige-Kinase (CDK)-Inhibitoren p21<sup>CIP1</sup> und p27<sup>KIP1</sup>, die die Replikation verhindern, und inhibiert deren Funktion (Münger *et al.*, 2001). Die Zellen in denen E7 exprimiert wird, werden daraufhin in die S-Phase geleitet, um so optimale Bedingungen für die vegetative Replikation der viralen DNA zu schaffen. Die Folge ist eine unregulierte Zellteilung (Jones *et al.*, 1997), die eine Akkumulation von somatischen Mutationen nach sich zieht, da eventuelle DNA-Schäden in der S-Phase des Teilungszyklus von den DNA-Reparatursystemen nicht mehr beseitigt werden können (Dyson *et al.*, 1989; Werness *et al.*, 1990).

#### 1.4. Vermehrungszyklus von humanen Papillomviren

Der Lebenszyklus der PV ist eng an den Verlauf der Differenzierung der infizierten Keratinozyten gebunden (Abb.5). Die Viren erreichen über Mikroverletzungen der Haut bzw. Schleimhaut die undifferenzierten Zellen der Basalschicht des Epithels (Stratum basale) und infizieren diese zunächst nicht produktiv. Den Rezeptor, der für die Adsorption der Viruspartikel verantwortlich ist, kennt man noch nicht endgültig. Es konnte gezeigt werden, dass HPV6 und HPV16 mittels ihrer L1-Proteine an Integrine binden, welche die  $\alpha_6$ -Kette als Untereinheit der heterodimeren Integrinmoleküle enthalten (Joyce *et al.*, 1999; Giroglou *et al.*, 2001). Zusätzlich interagieren L1-Proteine mit den Heparinsulfatketten von Syndekan, einem Proteoglykan, das in der

Plasmamembran von Epithelzellen lokalisiert ist und in die extrazelluläre Matrix ragt (Shafti-Keramat *et al.*, 2003). Die anschließende Aufnahme der Partikel erfolgt vermutlich durch Endozytose. Nach der Infektion liegen die Genome in geringer Kopienzahl als Episome in den Zellkernen der proliferationskompetenten Basalzellen vor und 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.



**Abb.5: Verlauf einer produktiven Papillomvirusinfektion des Epithels**

Die Zeichnung zeigt einen Querschnitt durch die humane Epidermis. Die Punkte in den Zellkernen stellen die dort vorhandenen Viruspartikel dar. Auf der linken Seite sind die verschiedenen Schichten des Epithels bezeichnet. Auf der rechten Seite ist die differenzierungsabhängige Genexpression der Papillomviren wiedergegeben (modifiziert nach Cossart *et al.*, 1995).

Im Rahmen des Erneuerungsprozesses der Haut teilen sich die Zellen des Stratum basale zur Hautoberfläche hin. Dabei kommt es zur kontinuierlichen Differenzierung. Im Laufe dieses Prozesses führen die in den spezifischen Differenzierungsstadien exprimierten zellulären Transkriptionsfaktoren vermutlich zu einer Induktion der unterschiedlichen viralen Promotoren, so dass im oberen Stratum spinosum die Transkripte der frühen Gene E6 und E7 nachweisbar werden und die vegetative

Replikation beginnt. Dies kann zu einer vorübergehenden Verzögerung der Zelldifferenzierung bzw. zu einer verstärkten Proliferation der suprabasalen Zellen führen, wobei es zum Beispiel in der Haut zur Ausbildung von Warzen kommt (Chow und Broker, 1994; zur Hausen und De Villiers, 1994).

Beginnend im Stratum granulosum ist die DNA-Replikation von der Expression viraler Strukturproteine und dem Zusammenbau neuer Viruspartikel begleitet. In den terminal ausdifferenzierten Zellen des Stratum corneum kann man die reifen Virionen teilweise als parakristalline, in Keratin eingebettete Strukturen vorfinden (Howley, 1996). Mit dem Absterben der obersten Zellschichten und deren Zersetzung kommt es zur Freisetzung der reifen Viruspartikel. Dafür ist möglicherweise das virale E4-Protein wichtig, welches zur Zerstörung des Zytoskeletts beiträgt (Doorbar *et al.*, 1991). Da die virale DNA in den Basalzellen über längere Zeit replizieren kann, kommt es in vielen Fällen zu einer Persistenz der Infektion mit sehr geringer Freisetzung von Viruspartikeln. Bei latenten Infektionen dagegen persistiert die virale DNA ohne Virusproduktion. In beiden Fällen treten jedoch keine apparenten Epithelveränderungen auf. Diese Zustände können Monate oder Jahre andauern und danach wieder in einen produktiven Infektionszyklus übergehen.

### **1.5. Papillomvirus-bedingte Tumorentstehung**

Während in gutartigen Läsionen alle Strukturen des differenzierten Epithels vorhanden sind und nur die Lebensdauer der HPV-infizierten Keratinozyten vorübergehend verlängert ist, kommt es im Verlauf der malignen Entartung zu einer Dedifferenzierung des Epithels. Der Mechanismus der Tumorentstehung, bei der neben anderen Faktoren wie Onkogenen oder einer genetischen Disposition des Wirtes vor allem virale Proteine eine entscheidende Rolle spielen, ist am besten bei den genitalen HPV-Typen untersucht.

### **1.5.1. Beteiligung humaner Papillomviren bei der Entstehung des Zervixkarzinoms**

Der Gebärmutterhalskrebs ist die zweithäufigste Krebserkrankung bei Frauen mit schätzungsweise 471.000 Neuerkrankungen und 233.000 Todesfällen weltweit im Jahre 2000, wovon 47.000 Fälle aus den Industriestaaten und 186.000 aus den Entwicklungsländern stammen (Parkin *et al.*, 2001). Seit 1995 werden die genitalen Typen HPV16 und HPV18 von der WHO (*World Health Organization*) als auslösende Faktoren für die Entstehung von Gebärmutterhalskrebs anerkannt, denn in mehr als 98% aller invasiv wachsenden Zervixkarzinome konnten HPV Genome nachgewiesen werden (Walboomers *et al.*, 1999). Meistens findet man HPV16 (46-68%), HPV18 (10-14%), HPV45 (2-8%) und HPV31 (2-7%) in den Tumoren (Clifford *et al.*, 2003).

### **1.5.2. Rolle von HPV bei der Entstehung des „nicht-melanozytären Hautkrebses“**

Nicht-melanozytärer Hautkrebs (NMHK) ist die häufigste Krebsart in der kaukasischen Bevölkerung (Pfister, 2003). In den USA treten jährlich bis zu eine Million neue Fälle auf. Das Basal-Zell-Karzinom (BZK) ist der am häufigsten vorkommende NMHK, während das Plattenepithelkarzinom (PEK) 20% aller NMHK repräsentiert. Die Neuerkrankungsrate an NMHK hat sich während der letzten Dekaden ständig erhöht, und macht zurzeit ungefähr 30% aller Krebserkrankungen aus (DePinho, 2000). Dies liegt zum Teil an der verstärkten Sonnenexposition und an der steigenden Zahl von Personen mit erworbener Immunsuppression. Transplantatempfänger haben ein bis zu 100fach erhöhtes Risiko PEK und ein 10fach erhöhtes Risiko BZK zu entwickeln.



### 1.5.2.1 Epidermodysplasia verruciformis

Das Krankheitsbild EV wurde erstmals im Jahre 1922 von Lewandowsky und Lutz beschrieben. Hier wurde später erstmals die Beteiligung einer HPV Infektion an der Entstehung des Hautkrebses belegt (Orth, 1986; Jablonska und Majewski, 1994). EV ist eine seltene, autosomal rezessiv vererbte Krankheit, die durch eine Prädisposition für Infektionen mit spezifischen HPV-Typen gekennzeichnet ist, den so genannten EV-HPV Typen (auch  $\beta$ -HPV genannt). Dabei handelt es sich um die HPV-Typen 5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19-25, 36, 38 und 47. In den Genomen EV-assoziiierter HPV fällt das Fehlen des E5-Leserahmens und die Länge der NCR auf, die mit ca. 400bp nicht einmal halb so lang wie die der anderen HPV-Typen ist (Fuchs und Pfister, 1990). Auch die Organisation der NCR unterscheidet sich von den anderen HPV-Typen, ist aber unter den EV-assoziierten Viren hoch konserviert (Ensser und Pfister, 1990). Bereits im Kindesalter treten bei EV-Patienten überwiegend im Gesicht, auf Handrücken und Beinen zahlreiche flache Warzen und charakteristische, fleckige Hautveränderungen auf, die normalerweise während des gesamten Lebens fortbestehen ohne eine Tendenz zur Remission (Jablonska *et al.*, 1972). Ungefähr 30-60% der Patienten entwickeln ab dem 30. Lebensjahr auf dem Boden der ursprünglich benignen EV-Läsionen *Carcinoma in situ* oder PEK an Sonnenlicht exponierten Körperstellen (Tanigaki *et al.*, 1986; Orth, 1987; Jablonska, 1991), was wahrscheinlich auf die co-karzinogene Wirkung des UV-Anteils des Sonnenlichts zurückzuführen ist. Die Tumoren wachsen lokal invasiv, metastasieren jedoch sehr selten (Pfister, 1992a und b). Während in den benignen Läsionen mindestens 23 verschiedene HPV-Typen nachweisbar sind, findet man in über 90% der Karzinome hauptsächlich HPV5 oder 8 und manchmal HPV 14, 17, 20 oder 47, weshalb man diese als kutane Hoch-Risiko Typen betrachtet. Eine Eigenschaft dieser Erkrankung scheint eine spezifische Unfähigkeit zu sein, die HPV Infektion in den Keratinozyten zu kontrollieren (Majewski und Jablonska, 1995; de Oliveira *et al.*, 2003; Majewski und Jablonska, 2002). Eine genetische Prädisposition für diese Krankheit konnte DNA-Loci auf dem langen Arm von Chromosom 17 und auf dem Chromosom 2 zugeordnet werden (Ramos *et al.*, 2000). Auf dem Chromosom 17 sind zwei für EV verantwortliche Gene (EVER1 und EVER2) mit EV-assoziierten Mutationen entdeckt worden (Ramos *et al.*, 2002). Jedoch ist die Rolle dieser beiden Gene bei der Kontrolle einer EV-HPV Infektion noch völlig unbekannt.

### **1.5.2.2 HPV-assoziierte Hauttumoren bei immunsupprimierten Patienten und in der Normalbevölkerung**

Neue epidemiologische Studien haben gezeigt, dass EV-HPV nicht auf EV-Patienten beschränkt sind. Sie werden auch in NMHK der Normalbevölkerung gefunden und sind in NMHK von immunsupprimierten Organ-Transplantatempfängern besonders häufig (Harwood *et al.*, 2000; Berkhout *et al.*, 2000; Pfister, 2003). Die Bedeutung dieser Entdeckungen für die Hautkarzinogenese ist noch unklar, weil keine Hochrisiko HPV Typen in NMHK der nicht-EV Patienten vorherrschen und niedrige Viruslasten darauf hin deuten, dass nur eine Minderheit der Tumorzellen HPV DNA enthalten (Pfister, 2003). Jedoch konnte gezeigt werden, dass das Vorhandensein von Antikörpern gegen HPV8 Kapside mit Hautkrebs (PEK) (Feltkamp *et al.*, 2003; Masini *et al.*, 2003) und mit der Entwicklung vieler präaligner, aktinischer Keratosen (Bouwes Bavinck *et al.*, 2000) assoziiert ist, was bedeuten könnte, dass dieser EV-Typ auch eine Rolle bei NMHK in der Normalbevölkerung spielt.

### **1.5.3. Molekulare Mechanismen der Hautkarzinogenese**

Umfangreiche Studien der Schleimhaut-assoziierten HPV Typen (z.B. HPV16) haben gezeigt, dass die Onkoproteine E6 und E7 für die Krebsentstehung verantwortlich sind, indem sie die Regelung des Zellzyklus und der Apoptose behindern. Verhältnismäßig wenig ist über die kutanen HPV Typen bekannt und die meisten vorliegenden Daten legen nahe, dass die Onkogene von HPV Typen der Haut und der Schleimhäute nur wenige gemeinsame Eigenschaften haben. Im Gegensatz zu HPV16, interferieren die E6 Proteine der EV-assoziierten HPV5 und HPV8 nicht mit p53 oder E6-AP (Scheffner *et al.*, 1990; Kiyono *et al.*, 1994) und können p53 nicht degradieren (Steger und Pfister, 1992; Elbel *et al.*, 1997). Dennoch können sie Nagerzellen transformieren und Wachstum in Weichagar induzieren (Iftner *et al.*, 1988; Kiyono *et al.*, 1992). Diese E6-Proteine transformieren Zellen folglich auf einem anderen Weg, über den bisher noch wenig bekannt ist. Sie degradieren ebenso wie HPV16 oder 18 E6 Proteine das p53-induzierte, proapoptotische Protein Bak (Thomas und Banks, 1999; Jackson *et al.*, 2000). Einige kutane Typen (z.B. HPV5) verhindern so nach UV-Bestrahlung die Induktion der Apoptose (Jackson und

Storey, 2000). Wenn Zellen mit DNA Schäden aufgrund einer vorübergehenden Sonnenlicht-Exposition nicht durch Apoptose beseitigt werden, können sich somatische Mutationen ansammeln, die schließlich zu Krebs führen. Die E7 Proteine der EV-HPV, mit Ausnahme von HPV38, interagieren viel schwächer mit dem Tumorsuppressor pRB (Iftner *et al.*, 1988; Kiyono *et al.*, 1989; Schmitt *et al.*, 1994; Caldeira *et al.*, 2003) als die von HPV16 und transformieren Nagetierzellen nur gemeinsam mit einem aktivierten H-ras Gen (Yamashita *et al.*, 1993). Expression des HPV8 E2 Proteins führte zu Wachstum von Nagerfibroblasten und humanen Hautkeratinozyten (HaCat) in Weichagar (Fuchs *et al.*, 1993).

Aufgrund dieser *in-vitro* Unterschiede zwischen Haut- und Schleimhaut- HPV Typen könnte man erwarten, dass die kutanen Viren eine niedrigere krebserzeugende Aktivität haben. Um die Effekte der frühen Gene von HPV8 *in vivo* zu studieren, wurde ein transgenes Mausmodell mit der gesamten frühen Region (GFR) von HPV8 etabliert (Schaper, 2003), in dem die Gene E1, E2, E4, E6 und E7 unter Kontrolle des humanen Keratin-14 Promotors in der Basalschicht von Plattenepithelien exprimiert werden. In diesen transgenen Tieren entwickelten sich vereinzelt oder multifokal gutartige Tumoren, gekennzeichnet durch Papillomatose, Akanthose und Hyperkeratose, vor allem an Körperstellen, an denen sie sich leicht kratzen oder beißen konnten. In zwei Fällen konnte ein PEK diagnostiziert werden, was eindrucksvoll ein karzinogenes Potential des EV-assoziierten HPV8 belegte. Es wurde begonnen, transgene Tiere mit FVB/N und BL6 Wildtyp Mäusen zu kreuzen, um Unterschiede in der spontanen Entwicklung der Papillomatose in den beiden genetischen Hintergründen zu untersuchen. Außerdem wurden für drei Hauttumoren mittels Echtzeit RT-PCR höchste Expressionsspiegel für HPV8-E2 ermittelt, gefolgt von E7 und E6. Weder in den gutartigen noch in den bösartigen Mäusetumoren konnten Mutationen im Tumorsuppressorprotein p53 beobachtet werden.

#### 1.5.4. Der Einfluss von UV-Strahlung auf die Entstehung von nicht-melanozytärem Hautkrebs

Ein anerkannter und wichtiger Risikofaktor für NMHK ist UV-Licht (Armstrong und Kricger, 2001). Es gibt Hinweise, dass die Sonnenlicht Exposition in jungen Jahren mehr zur Entwicklung von solaren oder aktinischen Keratosen und den damit assoziierten Hauttumoren später im Leben beiträgt, als die Exposition im höheren Alter (Bouwes Bavinck und Berkhout, 1997). Die UV-Strahlung des Sonnenlichtes setzt sich zusammen aus UV-A mit einer Wellenlänge von 320 bis 400nm, UV-B von 280 bis 320nm und UV-C von 200 bis 280nm. Das mutagene Potential von UV-A konnte in Bestrahlungsexperimenten mit Mäusen und Fischen nachgewiesen werden (Sternborg und van der Leun, 1990; Setlow *et al.*, 1993). UV-A wirkt auf die Entstehung von Hautkrebs additiv zu UV-B, ist aber alleine erst in hohen Dosen krebserregend (Strickland, 1986; de Gruijl, 2002; Persson *et al.*, 2002). Am meisten wird die Haut von der energiereicheren UV-B Strahlung geschädigt. Epidemiologische und experimentelle Studien konnten belegen, dass UV-B ein Hauptrisikofaktor für die Entstehung von Hautkrebs ist (Brash *et al.*, 1991; de Gruijl und Forbes, 1995; Nataraj *et al.*, 1995). Die UV-B Strahlung induziert viele Gene der DNA-Reparatur, Zellzykluskontrolle, Proteinsynthese und -degradierung sowie der RNA-Metabolisierung (Koch-Paiz *et al.*, 2004). Hauptverantwortlich für die Photokarzinogenese sind mutagene Schädigungen der DNA durch UV-B-Strahlung. Die Strahlung wird in der Haut von organischen Molekülen mit konjugierten Doppelbindungen wie DNA, RNA und Proteinen, die Tryptophan oder Tyrosin enthalten, absorbiert (de Gruijl *et al.*, 2001). Die häufigsten Produkte dieser Energieabsorption sind Folge von Reaktionen zwischen benachbarten Pyrimidinen, bevorzugt zwischen Thymin-Resten. Das Thymin-Dimer, das kovalent über einen Cyclobutan-Ring verbunden ist, kann bis zu 85% aller UV-Schäden ausmachen (Livneh *et al.*, 1993). In etwa 10% aller Fälle findet man ein (6-4) Pyrimidin-Pyrimidon-Photoprodukt, was eine Verzerrung der DNA verursacht (Brash *et al.*, 1991). Das p53-Gen ist aufgrund von UV-Strahlung in 60 bis 75% der aktinischen Keratosen, ca. 50% der Basaliome und in mehr als 90% der kutanen PEK mutiert (Rees, 1994). In der Regel handelt es sich bei diesen Mutationen um Transitionen von Cytosin nach Thymin (Ziegler *et al.*, 1993). Diese p53-Mutationen können zum

Verlust der Funktion als Tumorsuppressor und gleichzeitig zur Zunahme karzinogener Funktion führen.

Hinsichtlich einer möglichen Wechselwirkung zwischen HPV und UV-Exposition ist es interessant zu vermerken, dass ein UV-induzierbares, p53-abhängiges Element in HPV77 (isoliert aus einem PEK eines Transplantatempfängers) gefunden wurde, das eine Aktivierung der viralen Transkription vermittelt (Purdie *et al.*, 1999). Eine Aktivierung des Promotors durch UV-Bestrahlung wurde auch für HPV20 und einige andere EV-HPV (Ruhland und de Villiers 2001) sowie für HPV5 und HPV8 beschrieben (Akgül *et al.*, 2005a). Bei der Analyse des minimalen DNA-Replikationsursprungs und des damit überlappenden frühen Promotors des EV-HPV8 konnte eine unkonventionelle Binderegion des viralen E2 Proteins und eine DNA-Binderegion des Tumorsuppressorproteins p53 identifiziert werden. Beide Faktoren binden konkurrierend an die Promotorregion. Im Gegensatz zu seinem negativen Effekt auf die DNA Replikation, stimulierte p53 den frühen Promotor (Akgül *et al.*, 2003). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass UV-Bestrahlung, die p53 induziert, auch den frühen Promotor und damit die Expression der Onkogene von persistierendem HPV8 stimuliert. Dadurch kommt es in Proto-Onkogenen durch Mutationen zu einer gesteigerten Aktivität dieser Gene. In Hauttumoren werden häufig Mutationen in der ras-Genfamilie identifiziert (Spencer *et al.*, 1995) Die ras-Gene (H-ras, K-ras, N-ras) kodieren für GTP-bindende GTPasen, welche an der Signaltransduktion von Wachstumsfaktoren beteiligt sind. Mutierte ras-Gene besitzen nicht mehr die GTP-hydrolysierende Aktivität und übertragen so kontinuierlich das Signal auf die raf-Kinase im Ras-MAP-Kinase-Signalweg, wodurch es zur Dysregulation des Zellwachstums kommt (Adjei, 2001).

## 1.6. Zielsetzung der Arbeit

Die Etablierung des transgenen Mausmodells mit der gesamten frühen Region (GFR) von HPV8 ließ erkennen, dass die Expression viraler Gene *in vivo* für die Entwicklung von NMHK ausreichend ist (Schaper, 2003). Im ersten Teil dieser Dissertation wurde dieses Projekt weitergeführt. Die Nachkommenschaft der bereits gegründeten Mausstämmen sollte durch zusätzliche pathologische und histologische Untersuchungen weiter charakterisiert werden. Weiterhin sollten Unterschiede in der RNA Expression der einzelnen frühen Gene zwischen den verschiedenen Linien und genetischen Hintergründen HPV8 positiver Tiere erforscht werden.

Da im HPV8-GFR Mausmodell alle frühen Gene von HPV8 gleichzeitig exprimiert werden, sollten im Rahmen dieser Dissertation die Gene auch einzeln im transgenen Mausmodell untersucht werden, um deren Rolle in der Karzinogenese zu charakterisieren. HPV8-E6, -E6/E7 und -E7 wurden hierzu unter die Kontrolle des Keratin-14 Promotors gestellt, welcher die Expression dieser Gene in basalen Hautkeratinozyten aktiviert. Eventuell auftretende Hautläsionen sollten histologisch untersucht werden und mit den bereits vorhandenen Befunden an HPV8-GFR Mäusen verglichen werden.

Im zweiten Teil dieser Dissertation sollte der Frage nachgegangen werden, ob UV-Licht mit den frühen Proteinen von HPV8 in additiver oder synergistischer Weise die Entstehung und Weiterentwicklung der Hauttumoren moduliert. Zur Beantwortung dieser Frage sollten HPV8 transgene Mäuse, die noch keine spontanen, HPV8 typischen Hautveränderungen aufwiesen, mit UV bestrahlt werden und der Verlauf der Tumorentwicklung pathologisch und histologisch charakterisiert werden.

Aufgrund unserer Beobachtungen, dass Hautläsionen zunächst meistens an Stellen auftraten, an denen sich die Mäuse gekratzt haben, sollte auch der Frage nachgegangen werden, ob das gezielte Setzen von Wunden ausreicht, um die HPV8 bedingte Papillomatose zu induzieren.

## **2. Material**

### **2.1. Bakterienstämme**

#### **Escherichia coli Top10**

Dieser Bakterienstamm wurde für die Zwischenklonierung in pCR-Blunt verwendet. Genotyp: F, mcrA,  $\Delta$ (mrr hsdRMS mcrBC),  $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15,  $\Delta$ lacX74, deoR, recA1, araDI39,  $\Delta$ (ara leu)7697, galU, galK, rpsL, endA1, nupG (Invitrogen, Karlsruhe).

#### **Escherichia coli XL2 blue**

Dieser Bakterienstamm wurde für Klonierungen eingesetzt. Genotyp: recA1, endA1, gyrA96, thi 1, hsdR17, supE44, relA1, lac[F', proAB, lacIqZ $\Delta$ M15, Tn10 (Tetr)] (Stratagene, Heidelberg).

### **2.2. Versuchstiere**

#### **Hausmaus (Mus musculus)**

##### **Stamm: DBA/BL6**

Verwendung: Gründermäuse

Herkunft: Charles River Deutschland, Sulzfeld

##### **Stamm: FVB/N**

Verwendung: Zuchtmäuse

Herkunft: Charles River Deutschland, Sulzfeld

##### **Stamm: BL6**

Verwendung: Zuchtmäuse

Herkunft: Charles River Deutschland, Sulzfeld

## 2.3. Medien für die Bakterienkultur

### LB Medium (Luria Bertani Medium, Difco)

Bacto Trypton	10 g/l
Bacto Hefe Extrakt	5 g/l
NaCl	8 g/l

### LB Agar (Difco)

Bacto Trypton	10 g/l
Bacto Hefe Extrakt	5 g/l
NaCl	8 g/l
Bacto Agar	15 g/l

(pH 7,2)

### SOC Medium (Difco)

Bacto Trypton	20 g/l
Bacto Hefe Extrakt	5 g/l
NaCl	500 mg/l
KCl	250 mM
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
Glucose	20 mM

(pH 7,0)

## 2.4. Nukleinsäuren

### 2.4.1. Rekombinante Plasmide

Die Positionsangaben beziehen sich jeweils auf die veröffentlichten Sequenzen unter Angabe der Accession Nr. (AN) der Genbank.

#### K14-CreErtam

Dieser Vektor besteht aus dem pGEM-3Z Rückgrat, dem humanen K14-Promotor (Länge 2007bp; von nt. 281 – 2288; AN: gi533529), dem 2.Intron des  $\beta$ -Globin-Gens vom Kaninchen (Länge: 639bp; von nt. 557-1196; AN: V00878), dem T7 Primer, dem



K14 Poly A-Signal (Länge: 485bp; von nt. 4746-5231; AN: gi186704) und dem SP6-Primer.

### **K14-HPV8-GFR (gesamte frühe Region; 11024bp)**

Dieser Vektor ist genauso aufgebaut wie der K14-CreErtam Vektor, jedoch befinden sich zwischen dem T7 Promotor und dem Poly A-Signal die frühen Gene E1, E2, E4, E6 und E7 von HPV8 (Länge 5111bp von nt. 1-5111; AN: M12737).

## **2.4.2. Klonierungsvektoren**

### **pUC18 (2,7 kb)**

Hierbei handelt es sich um einen E. coli Klonierungsvektor von 2,7kb. Er enthält das  $\beta$ -Lactamasegen, das Gen für Ampizillinresistenz, den Replikationsursprung von pBR322 und zusätzlich das Gen für die  $\beta$ -Galaktosidase. (Yanisch-Perron *et al.*, 1985). Dieser Vektor diente als Positivkontrolle für die Transformation.

### **pCR-blunt-TOPO (3,5 kb)**

Dieser Vektor der Firma Invitrogen (Leek, Holland) eignet sich besonders gut für die Klonierung von PCR-Produkten. Die multiple Klonierungsstelle liegt im Leserahmen des *ccdB*-Gens, welches für ein toxisches Genprodukt kodiert. Deshalb wird eine direkte Selektion gegen nicht rekombinante Vektoren möglich. Weiterhin besitzt der Vektor das Gen für Kanamycin-Resistenz. Dieser Vektor wurde für die Zwischenklonierung verwendet.

## **2.4.3. Synthetisch hergestellte Oligonukleotide**

Sämtliche HPLC-gereinigte Oligonukleotide wurden bei den Firmen Eurogentec (Brüssel, Belgien) und Sigma Ark GmbH (Steinheim) synthetisiert. Restriktionsnuklease Schnittstellen sind fett hervorgehoben.

**Oligonukleotide für die Klonierung der K14-HPV8-E6, -E6/E7 und -E7 Plasmide**

Name	Nukleotidsequenz in 5'-3' Richtung	Position (nt)*
HPV8-E6fw	<b>GGATCCTTTCCTAAGCAAATGGACGGG</b>	184-204
HPV8-E6bw	<b>GGATCCGCATGCCACAAAATCTTGCACAGTGACCTC</b>	688-665
HPV8-E7fw	<b>GGATCCAGGAGTTTGCAGGCTTTGTAAGC</b>	621-643
HPV8-E7bw	<b>GGATCCGCATGCCCTTTATGATCCGCCATGTTTG</b>	967-946

\*AN von HPV8: M12737; **GGATCC**:BamHI, **GCATGC**:SphI

**Oligonukleotide für die Sequenzierung der K14-HPV8-E6, -E6/E7 und -E7 Plasmide**

Name	Nukleotidsequenz in 5'- 3' Richtung	Position (nt.)*
K14-Rabbit fw vor T7	CCTGCCTTTCTCTTTATGG	2505-2523
K14-PolyA	CCACTCCTAACAATGACCAG	8002-7983

\*Positionen bezogen auf K14-HPV8-GFR mit 11024bp

**Oligonukleotide für die  $\beta$ -Globin-PCR**

Name	Nukleotidsequenz in 5'- 3' Richtung	Position (nt.)*
$\beta$ -Glob fw	CCAATCTGCTCACACAGGATAGAGAGGGCAGG	2590-2621
$\beta$ -Glob bw	CCT TGAGGCTGTCCAAGTGATTCAGGCCATCG	3083-3052

\*Konkel *et al.*, 1978; AN:J00413

**Oligonukleotide für die Kontrolle auf intakte K14 Expressions-Kassette**

Name	Nukleotidsequenz in 5'- 3' Richtung	Position (nt.)*
K14Prom-fw-Test PCR	GGGTTTGCTTTGGGAGGTTG	720-739
K14Prom-bw-Test PCR	TCTCACATCCACCACACCATAGG	1345-1323
K14-PolyA Test PCR fw	TGGACACAGATCCCACTGGAAG	7853-7874
K14-PolyA Test PCR bw	TGAATGAATATCCCTCCGTACCC	8201-8174

\*Positionen bezogen auf K14-HPV8-GFR mit 11024bp

**Oligonukleotide für die Analyse von p53-Gen Mutationen**

Name	Nukleotidsequenz in 5'- 3' Richtung	Position (nt.)*
Exon4fw	TAGGCTGAGAACACAGTCCTGAGG	81452 – 81475
Exon4bw	GCATTGAAAGGTCACACGAAAGAC	81804 – 81781
Exon5fw	CCTGATCGTTACTCGGCTTGTC	82438 – 82459
Exon5bw	CAACTGTCTCTAAGACGCACAAACC	82907 – 82883
Exon7fw	TGTAGTGAGGTAGGGAGCGACTTC	83219 – 83242
Exon7bw	GGGTAGGAACCAAAGAGCGTTG	83490 – 83469
Exon8+9fw	GCAGATATGACAAGAGGGGTTG	83589 – 83610
Exon8+9bw	GCGAGAGACAGAGGCAATAATGG	84053 – 84031

\*AN von p53: AL731687

**Oligonukleotide für die Analyse von H-ras-Gen Mutationen**

Name	Nukleotidsequenz in 5'- 3' Richtung	Position (nt.)*
H-ras fw	CTGGAGGCGTGGGAAAGAGTG	56370-56390
H-ras bw	CTGTACTGATGGATGTCCTCGAAG	56837-56814

\*AN von H-ras: AC108908

**Oligonukleotide für die qualitative Kontrolle der RT-PCR**

Name	Nukleotidsequenz in 5'- 3' Richtung	Position (nt.)*
β-aktin fw	GTGGGCCGCTCTAGGCACCAA	183-203 (mRNA, cDNA) 1141-1161 (DNA)
β-aktin bw	CTCTTTGATGTCACGCACGATTTC	722-698 (mRNA, cDNA) 2221-2198 (DNA)

\*AN von β-aktin mRNA: NM\_007393 und β-aktin Gen: 11461

### Oligonukleotide für die quantitative mRNA Bestimmung im Lightcycler

Name	Nukleotidsequenz in 5' – 3' Richtung	Position (nt.)*
HPV8E6fw-RT PCR	GCGGCTTTAGGTATTCCATTGC	271-292
HPV8E6bw-RT PCR	GCTACACAACAACAACGACAACACG	428-404
HPV8E7fw- RT-PCR	CCTGAAGTGTTACCAGTTGACCTGC	734-710
HPV8E7bw- RT-PCR	CAGTTGCGTTGACAAAAAGACG	870-848
HPV8E2fw- RT-PCR	AACGCCACAACAAACCG	3410-3427
HPV8E2bw- RT-PCR	AGGACCTGGACCTGGATACG	3586-3567
β-aktin fw Lightcycler	CCAGAGCAAGAGAGGTATCCTGAC	254-277
β-aktin bw Lightcycler	CATTGTAGAAGGTGTGGTGCCAG	358-335

\*AN: M12737 für HPV8 und β-aktin mRNA: NM\_007393

#### 2.4.4. DNA Längenstandards

1 kb DNA Leiter	(New England Biolabs, Eggenstein)
1 kb DNA Leiter	(Invitrogen, Karlsruhe)
100 bp DNA-Leiter	(New England Biolabs, Eggenstein)

#### 2.5. Enzyme

Enzyme wurden bei folgenden Firmen erworben:

- Roche (Mannheim)
- Invitrogen (Karlsruhe)
- New England Biolabs (Schwalbach)
- Promega (Madison, USA)
- Stratagene (Heidelberg)

#### 2.6. Reagenziensysteme

- |                             |                  |
|-----------------------------|------------------|
| • QIA prep 8 Miniprep Kit   | (Qiagen, Hilden) |
| • Plasmid Maxi Kit          | (Qiagen, Hilden) |
| • Gel Extraktion Kit        | (Qiagen, Hilden) |
| • Rneasy Fibrous Tissue Kit | (Qiagen, Hilden) |
| • PCR/Gel Extraktion Kit    | (Qiagen, Hilden) |

- QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden)
- Omniscript RT Kit (Qiagen, Hilden)

## 2.7. Reagenzien

Es wurden Laborchemikalien folgender Firmen eingesetzt:

- Amersham Pharmacia (Freiburg),
- Bio-Rad (München),
- Merck (Darmstadt),
- New England Biolabs (Schwalbach),
- Pharmacia (Uppsala),
- Qiagen (Hilden),
- Roche Diagnostics (Mannheim),
- Roth (Karlsruhe),
- Sigma Aldrich (Deisenhofen) im Reinheitsgrad „reinst“ bzw. „p.a.“

### 2.7.1. Antikörper

- CM5 - p53 Protein, polyklonal; Novocastra (Großbritannien)

## 2.8. Lösungen und Puffer

Alle Puffer für molekularbiologische Experimente wurden, soweit nicht anders angegeben, nach Sambrook *et al.*, (1989) angesetzt. Lösungen und Puffer für histologische Untersuchungen wurden nach Romeis (1989) angesetzt.

### Narkosemittel für Mäuse

Das Narkosemittel wurde aus zwei Komponenten zusammengesetzt. In 20ml sterilem PBS wurden 100mg des Analgetikums Ketamine-hydrochlorid (Sigma, Deisenhofen) und 20mg des Sedativums Xylazine-hydrochlorid (Sigma, Deisenhofen) gelöst. Bei 4°C und vor Licht geschützt gelagert war das Narkosemittel ca. 1 Monat haltbar.

### **3. Methoden**

#### **3.1. Bakterienkultur**

##### **3.1.1. Erzeugung kompetenter Bakterien für die Transformation**

Transformationskompetente XL2-Blue Bakterien wurden nach der Methode von Chung und Miller (1988) hergestellt. Dabei wurden 100 ml LB-Medium mit 2,5 ml einer frischen Bakterien-Vorkultur angeimpft und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD600 von 0,5 inkubiert. Anschließend wurden 20 ml dieser Kultur in weitere 100 ml LB-Medium verdünnt und wiederum bis zu einer OD600 von 0,5 inkubiert. Danach wurden die Bakterien für 10 min auf Eis gestellt und anschließend 10 min bei 0°C und 3000g zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Bakterien in 5 ml, 4°C kaltem TSB (Transformation and Storage Buffer; PEG (MW = 3350) 30 mM, DMSO 5%, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM in LB-Medium) resuspendiert, und erneut 10 min auf Eis inkubiert. Zum Schluss wurden die Bakterien zu je 500 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und daraufhin bei -80°C gelagert. Die Effizienz der kompetenten Bakterien wurde getestet indem 100 µl der Bakterien mit 1 ng pUC18 Plasmid transformiert wurden. Anhand der Anzahl der gewachsenen Kolonien wurde die Transformationseffizienz der Bakterien für 1 µg zu transformierender DNA berechnet. In der Regel lag die Effizienz zwischen  $5 \times 10^5$  bis  $3 \times 10^6$  Kolonien/µg DNA.

##### **3.1.2. Transformation kompetenter Bakterien**

Für die Transformation kompetenter XL2-Blue Bakterien wurden 1 ng DNA bzw. die DNA eines Ligationsansatzes mit 50 µl Bakterien 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 45 sec bei 42°C im Wasserbad wurden 250 µl SOC-Medium zugegeben. Damit die Bakterien das Resistenzgen exprimieren konnten, erfolgte eine einstündige Inkubation bei 37°C. Die Bakterien wurden dann auf selektive LB-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 3.1.3. Langzeitlagerung von Bakterien

Für die Langzeitlagerung wurden 750 µl einer dichten Bakterien-Vorkultur mit 250 µl 100% Glycerin vermischt und bei -80°C eingefroren.

## 3.2. DNA-Methoden

### 3.2.1. Plasmidisolierung aus Bakterien

Für die Plasmidisolierung wurden Bakterien in LB-Medium mit dem geeigneten Selektionsmarker überführt und bei 37°C über Nacht unter Schütteln inkubiert bis die Kultur dicht gewachsen war. Für eine analytische Plasmidisolierung wurden 5 ml und für eine präparative Plasmidisolierung bis zu 200 ml LB-Medium angeimpft.

### 3.2.2. Plasmidpräparationen

Präparative Plasmidisolierungen wie Mini-, Midi-, oder Maxipräparationen, Gel- und PCR-Extraktionen wurden mit Reagenzsystemen der Firma Qiagen (Hilden) nach den Protokollen des Herstellers durchgeführt. Sie basieren auf der alkalischen Extraktionsmethode nach Birnboim und Doly (1979) und der Bindung der DNA an Anionen-Austauscher-Säulen. Zum Schluss wurde die DNA in 10 mM Tris EDTA Puffer (pH 8.0) eluiert. Die Konzentration der DNA wurde spektrometrisch bei 260 nm in Quarzküvetten bestimmt.

### 3.2.3. DNA-Standardmethoden

Sämtliche hier aufgeführten Methoden wurden nach Protokollen von Sambrook *et al.* (1989) und Ausubel *et al.* (1994) durchgeführt.

- Ethanol-Präzipitation von DNA
- Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA
- Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen
- Dephosphorylierung von 5'-überhängenden DNA-Fragmenten
- Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-Ligase
- Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

### **3.3. Erzeugung transgener Mäuse durch Mikroinjektion**

#### **3.3.1. Aufreinigung des Transgens**

Für die verschiedenen Mikroinjektionen wurden jeweils 50µg Plasmid DNA mit SacI und HindIII geschnitten und auf ein Agarosegel aufgetragen, um nach Elektrophorese die K14-Fragmente mit den HPV8-E6, -E7 oder -E6/E7 Genen auszuschneiden (Abb.7). Die gereinigte DNA wurde über eine Millipore-Membran filtriert, mit 100 - 200µl H<sub>2</sub>O eluiert, erneut filtriert und mit 100 – 200µl M2-Medium (Hogan *et al.*, 1994) eluiert, das 300µg/ml Hyaluronidase enthielt. Die DNA wurde dann in einer Konzentration von 1 pg/µl für die Mikroinjektion verwendet.

#### **3.3.2. Gewinnung befruchteter Oozyten**

Befruchtete Oozyten wurden erhalten, indem man juvenile D2B6F1 (DBA/2 (D2) x C57BL6 (B6) F1) Weibchen durch eine intraperitoneale Gabe von 15U Pregnant-Mare-Serum-Gonadotropin (PMSG) zur Superovulation anregte. Drei Tage später erfolgte eine intraperitoneale Injektion von 5U humanem Choriogonadotropin (hCG). Anschließend wurden die Weibchen verpaart. Am nächsten Tag konnte eine erfolgreiche Befruchtung anhand des aufgetretenen Vaginalpfropfens erkannt werden. Nach Euthanasie der Weibchen durch zervikale Dislokation wurden die befruchteten Oozyten aus den Ovidukten entfernt und in M2-Medium überführt, das zusätzlich 300µg/ml Hyaluronidase enthielt, damit sich die Oozyten von den Follikelzellen lösen. Zum Schluss wurden die Oozyten mit frischem M2-Medium dreimal gewaschen. Auf diese Weise wurden ca. 30 Oozyten pro Maus isoliert.

#### **3.3.3. Mikroinjektion des Transgens und Implantation der Oozyten**

Für die Mikroinjektion wurden die befruchteten Oozyten zunächst in frisches M2-Medium überführt. Mit Hilfe eines Mikromanipulators wurden ca. 1-2 µl DNA-Lösung in den männlichen Pronukleus der Oozyte injiziert. Anschließend wurden die Oozyten in M16-Medium (Hogan *et al.*, 1994) überführt.

Aufgrund der Tatsache, dass sich bei Mäusen befruchtete Eier nur nach einer Kopulation in der Gebärmutterschleimhaut einnisten, wurden Weibchen im Alter von etwa 8 Wochen mit vasktomierten Männchen verpaart. Am nächsten Tag wurden



Weibchen mit Vaginalpfropfen narkotisiert und ca. 15-30 mikroinjizierte Oozyten in das Ovidukt implantiert. Nach drei Wochen wurde die F0-Generation geboren.

### **3.4. Etablierung transgener Maus Linien**

#### **3.4.1. Kreuzung von Mäusen**

Die transgen-positiven Mäuse der F0 Generation wurden sowohl mit FVB/N als auch mit BL6 Wildtyp Mäusen verpaart. Für die weitere Zucht wurden bevorzugt männliche transgen-positive Tiere ausgewählt, die dann in der Regel mit zwei Wildtyp-Weibchen verpaart wurden. Nach 21 Tagen wurden die Nachkommen geboren und im Alter von ca. 3 Wochen abgesetzt.

#### **3.4.2. Markierung der Mäuse**

Nach dem Absetzen des Wurfes wurden die Tiere mit Hilfe einer Ohrlochzange markiert. Die Nummerierung der Mäuse eines Wurfes erfolgte meistens von eins ausgehend. In Kombination mit den Käfignummern konnte so jede Maus eindeutig zugeordnet werden. Beispielsweise hat die Maus Nr. 16 aus Käfig Nr. 312 die Kurzbezeichnung 16K312 erhalten. Jede Maus wurde außerdem noch mit einer weiteren Nummer gekennzeichnet, um ihre Herkunft und Linie genau bestimmen zu können. So hatte beispielsweise die Maus Nr. 16 aus Käfig 312 die Bezeichnung 631-8-15-10-16. Bei der ersten Nummer handelt es sich um die F0-Maus und die darauf folgenden Generationen sind dahinter gestellt, d.h. bei der Nr. 16 handelt es sich um die F4 Generation der Linie 631.

### 3.5. Genotypisierung der Mäuse

#### 3.5.1. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von definierten DNA-Fragmenten wurde die Polymerasekettenreaktion (Mullis und Fallona, 1987) eingesetzt. In der Regel wurden 150-300ng Matrizen-DNA, je 30pmol Primer, 200 $\mu$ M dNTPs, 5 $\mu$ l 10x-Taq-Polymerase-Puffer, eine Einheit Taq-Polymerase eingesetzt und mit Wasser auf 50 $\mu$ l aufgefüllt. Der Denaturierungsschritt erfolgte für 3 min bei 95°C, die Hybridisierung für 1 min bei entsprechend optimierter Temperatur und die Elongation für 2 min pro kb DNA bei 72°C.

#### 3.5.2. Extraktion von genomischer DNA aus Schwanzbiopsien

Unmittelbar nach der Markierung wurden den Mäusen 5mm ihrer Schwanzspitze abgeschnitten, aus denen mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) genomische DNA extrahiert wurde. Die genomische DNA wurde mit 100 $\mu$ l eluiert, um die DNA-Konzentration zu erhöhen. Danach wurden 4 $\mu$ l dieser DNA als Matrize in einer  $\beta$ -globin PCR eingesetzt, um die Qualität der Aufreinigung zu überprüfen und das Vorhandensein inhibitorischer Substanzen auszuschließen (Konkel *et al.*, 1978). Die  $\beta$ -globin PCR Reaktion bestand aus einem anfänglichen Denaturierungsschritt von 3 min (95°C) gefolgt von 29 Zyklen der Amplifizierung (95°C, 30 sec; 60°C, 1,5 min; 72°C, 2 min). Beendet wurde die PCR Reaktion mit einem 10 min Elongationsschritt bei 72°C. Nach einer erfolgreichen  $\beta$ -globin PCR wurde die genomische DNA der Mäuse auf das Vorhandensein des Transgens überprüft. Die PCR wurde mit Primern durchgeführt, die außerhalb der frühen Gene von HPV8-E6 oder E7 hybridisieren. Die Amplifikation erfolgte in 50  $\mu$ l Gesamtvolumen mit 1 Einheit Taq Polymerase, dem dazugehörigen Puffer (Fermentas, St. Leon-Rot), 0,25  $\mu$ g Bovines Serum Albumin (BSA), Deoxynukleotid Triphosphate (je 0,2mM), Primer (je 30 pmol) und 2mM MgCl<sub>2</sub>. Die E6 und E7 PCR wurde unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wie die oben erwähnte  $\beta$ -globin PCR.

### **3.6. DNA-Sequenzierung und Analyse der Sequenzen**

Jeweils 3 bis 10 pmol Primer und ca. 150 – 300ng Plasmid-DNA wurden in einem Gesamtvolumen von 6µl auf einem ABI Prism 377 Sequencer (Applied Biosystems, Perkin Elmer, Norwalk) sequenziert. Die Auswertung erfolgte mithilfe der Software Edit View (Perkin Elmer, Norwalk). Anschließend wurden die ermittelten DNA-Sequenzen mit dem Programm Mac Vector 7.0 (Accelrys, Cambridge) untersucht und mit der HPV8 Referenz Genom Sequenz verglichen.

### **3.7. Analyse der Mäuse**

#### **3.7.1. Makroskopische Analyse der Mäuse**

Die Mäuse wurden alle drei Tage auf Veränderungen der Haut untersucht und die aufgetretenen Hautveränderungen in einer Datenbank (SPSS 12.0) notiert. Die Mäuse, bei denen die Läsionen eine bestimmte Größe erreicht hatten, wurden obduziert. Bei der Obduktion wurden die Tumore heraus präpariert und besonders auffällige Bereiche für die anschließende histologische Untersuchung in Formalin gelegt. Außerdem wurden Biopsien des Tumorgewebes, der Haut und der Leber für spätere molekularbiologische Untersuchungen entnommen, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

#### **3.7.2. Histologische Untersuchungen**

Die entnommenen Gewebeproben wurden in gepuffertem Formalin (4%) über Nacht fixiert und entsprechend dem routinemäßigen Standardprotokoll in einem Autotechnikon (Tissue-TE VIP) entwässert und in Paraffin eingebettet (Romeis *et al*, 1989). Von diesen Paraffinblöcken wurden 4µm dicke Schnitte angefertigt, auf Adhäsiv-Objekträgern fixiert und anschließend mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Die gefärbten Schnitte der Gewebeproben wurden daraufhin auf pathologische Auffälligkeiten untersucht.

### **3.8. Experimentelle Eingriffe an Mäusen**

#### **3.8.1. Narkotisieren der Mäuse**

Mäusen im Alter von 3-4 Wochen (<25g) wurden 250-350µl und 6-8 Wochen alten Tieren (>25g) ca. 450µl Narkosemittel (2.9) intraperitoneal gespritzt. Diese Menge war ausreichend um die Mäuse ca. 45 min lang ruhig zu stellen.

#### **3.8.2. UV-Bestrahlungen**

Den narkotisierten Mäusen wurde mit Hilfe eines elektrischen Rasierers (Eickemeyer, Tuttlingen) der Rücken, 2cm oberhalb des Schwanzansatzes rasiert. Diese Stelle wurde gewählt, weil die Mäuse sich dort nicht selber kratzen können. Vor der Bestrahlung wurden die Mäuse mit einer Alufolie abgedeckt, die mit 2cm x 2cm großen Aussparungen versehen war. Danach wurden die Tiere mit einem UV-Gerät bestrahlt, das sowohl UVA- (PUVA; 320-400nm) als auch UVB-Licht (UV21; 280-360nm) emittieren konnte (UV801; Waldmann Medizintechnik, Villingen-Schwenningen). Dabei wurde mit einem Messgerät (Variocontrol, Waldmann Medizintechnik) darauf geachtet, dass alle Mäuse in einem homogenen Bestrahlungsfeld und mit derselben Intensität bestrahlt wurden.

#### **3.8.3. Wundheilungsexperimente**

Für die Wundheilungsexperimente wurden die Tiere narkotisiert, der Rücken rasiert und desinfiziert. Anschließend wurde die Rückenhaut mit Biopsiestanzen (PFM, Köln) so gestanzt, dass zwei kreisrunde 4mm große Wunden entstanden. Die ausgestanzten Hautstücke wurden in gepuffertem Formalin für die Paraffineinbettung, in Tissue Tek O.C.T Compound (Sakura Finetek, Heppenheim) für Kryoschnitte und in RNAlater (Qiagen, Hilden) für die Extraktion von RNA eingelegt.

### **3.9. RNA-Methoden**

#### **3.9.1. Extraktion von Gesamt-RNA**

Die Isolierung der RNA aus Haut- und Tumorproben erfolgte mit dem Rneasy Fibrous Tissue Mini Kit von Qiagen. Die bei -80 °C gelagerten Gewebeproben wurden für die Aufreinigung zunächst in ca. 30 mg schwere Stücke geschnitten. Anschließend wurde das Gewebe in ein 2 ml fassendes Eppendorf Gefäß mit einer 5mm Stahlkugel und 300µl RLT-Puffer ( $\beta$ -Mercaptoethanol; Endkonz. 1%) überführt. Danach wurden die Proben mit Hilfe einer Schwingmühle (Mixer Mill 301, Fa. Retsch, Haan) 3 min bei 30 Hz homogenisiert. Die weitere Extraktion erfolgte genau nach Protokoll des Herstellers. Lediglich der DNase Verdau wurde auf 30 min verlängert, um einen vollständigeren Abbau der DNA zu ermöglichen. Die RNA wurde mit 50µl Rnase freiem Wasser eluiert und anschließend bei -80°C eingefroren.

#### **3.9.2. Herstellung der cDNA**

Die isolierte mRNA wurde zunächst durch eine Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Dabei wurden jeweils 4 µl der RNA-Extrakte eingesetzt. Die reverse Transkription wurde entsprechend den Anweisungen des Herstellers des Omniskript Reverse Transkriptase Kits (Qiagen, Hilden) durchgeführt unter Verwendung von 1µM Anchored Oligo-dT23-Primern (Sigma, Deisenhofen). Außerdem wurden dem Ansatz noch 10 Einheiten Rnase Inhibitor (Promega, Mannheim) beigefügt, um eventuell vorkommende Rnasen zu inhibieren. Die reverse Transkription für 60 min bei 37°C wurde bei 93°C für 5 min zum Inaktivieren des Enzyms beendet und dann auf Eis gestellt. Um eine erfolgreiche RNA-Aufreinigung mit anschließender Transkription von mRNA in cDNA zu überprüfen, wurde eine  $\beta$ -Aktin PCR mit intronüberspannenden Primern durchgeführt. Die PCR Bedingungen waren 3 min bei 95°C, gefolgt von 35 Zyklen der Amplifikation von 45 sec bei 95°C, 45 sec bei 60°C und 2 min bei 72°C, mit einem abschließenden Elongationsschritt von 7 min bei 72°C.

### 3.9.3. Quantifizierung von mRNA

Die quantitative Messung der RNA erfolgte mit Hilfe von Echtzeit-PCR Protokollen für HPV8-E2, HPV8-E6 und HPV8-E7 und das Maus  $\beta$ -Aktin Gen mit dem LightCycler (Roche, Mannheim) System mit Sybr Green (Invitrogen) als Fluorophor. Die quantitative Bestimmung des „single copy“  $\beta$ -Aktin Gens wurde verwendet, um die Kopienanzahl des Transgens pro Zelle zu errechnen, die als HPV8-E6-DNA Kopien pro zwei  $\beta$ -Aktin Genkopien definiert wurde. Um zwischen cDNA und nach dem DNase Verdau verbliebener zellulärer DNA zu unterscheiden, wurde die Kopienanzahl von HPV8-DNA in einem vorgegebenen Volumen RNA ohne den Schritt der reversen Transkription, von der Kopienanzahl der cDNA mit reverser Transkription abgezogen.

Die resultierende cDNA Kopienanzahl wurde auf gleichwertig ermittelte cDNA Kopien des  $\beta$ -Aktins als zellulären Bezugspunkt normalisiert. Die Amplifikation erfolgte in 20  $\mu$ l Gesamtvolumen mit 0,8 U Platinum Taq DNA Polymerase und dem dazugehörigen Puffer (Invitrogen). Außerdem waren enthalten nicht acetyliertes Tierserumalbumin (500 ng/ $\mu$ l; Sigma), DMSO (5%; Sigma), Deoxynukleotid Triphosphate (je 200  $\mu$ mol/l), Primer (0,5  $\mu$ mol/l) und 2  $\mu$ l einer 1:1000 Verdünnung von Sybr Green (Sigma). Die Anzahl der Kopien wurde in doppelter Ausführung ermittelt. Die Berechnung der Kopienanzahl in den Proben wurde durch die LightCycler Software (Version 3.1.102) unter Verwendung der Standardkurve ermittelt, die mit einer 10er Verdünnungsreihe von HPV8- oder Maus-DNA im gleichen PCR Lauf erzeugt wurde.

Standard Verdünnungsreihen basierten auf 5fach wiederholten Absorptions Messungen bei 260 nm aus fünf verschiedenen DNA Aliquots, die dann mit Wasser auf die gewünschte Ausgangskonzentration vereinigt und justiert wurden. Die HPV8 Verdünnungsreihen waren mit 40 ng/ $\mu$ l menschlicher Plazenta DNA (Sigma) versetzt, um einen zellulären Hintergrund nachzuahmen. Die Empfindlichkeit lag bei unter 20 Kopien und die Quantifizierung war linear von 20 bis  $10^7$  Kopien für alle HPV-Protokolle und 20 bis  $10^4$  für  $\beta$ -Aktin. Die PCR Bedingungen lagen bei 60 sec bei 95°C, gefolgt von 45 Zyklen von 1 sec bei 95°C (20°C/s), 5 sec bei verschiedenen Annealingtemperaturen ( $T_{ann.}$ ) und  $Mg^{2+}$  Konzentrationen (Tab.1) (20°C/s) und 12 sec bei 72°C (E2: 5°C/s; E6, E7 und  $\beta$ -Aktin: 20°C/s).

Die Fluoreszenz wurde einmal pro Zyklus am Ende des Elongationsschrittes (HPV8-E2,  $\beta$ -Aktin) gemessen oder bei einer erhöhten Temperatur (78°C) nach dem

Elongationsschritt (HPV8-E6 und HPV8-E7). Für  $\beta$ -Aktin ging dem oben beschriebenen Amplifikations-Protokoll noch ein Touchdown Protokoll mit 10 Zyklen voraus. Hier wurde die Annealingtemperatur stufenweise um  $1^{\circ}\text{C}/\text{Zyklus}$  von  $65^{\circ}\text{C}$  auf  $55^{\circ}\text{C}$  verringert.

Zielgen	T <sub>ann.</sub> [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Mg <sup>2+</sup> [mM]
$\beta$ -Aktin	55	3,0
HPV8-E2	56	3,0
HPV8-E6	56	4,0
HPV8-E7	56	4,0

**Tabelle 1: Annealingtemperaturen (T<sub>ann.</sub>) und Magnesiumchloridkonzentrationen für die Echtzeit-PCR.**

### 3.10. Statistische Analysen

Alle statistischen Analysen (Deskriptive Statistik, Kaplan-Mayer Tafeln) wurden mit der Software SPSS 12 (SPSS, Chicago) berechnet.

### 3.11. Analyse des p53 und H-ras Status in DNA aus Haut- oder Tumorbiopsien

Die Exons 4, 5, 7 und 8/9 von p53 und die H-ras Exons 1 und 2 von Maus-DNA wurden über PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Die Amplifikation fand in  $50\ \mu\text{l}$  Gesamtvolumen statt mit 1 Einheit Taq-Polymerase (Fermentas, St. Leon-Rot), dem dazugehörenden Puffer, den Desoxynukleotid Triphosphaten (je  $200\ \mu\text{mol/l}$ ), den Primern ( $0,3\ \mu\text{mol/l}$ ,  $1,5\ \text{mmol/l Mg}^{2+}$ ) und  $2\ \mu\text{l}$  Template DNA. Die PCR Bedingungen waren 3 min bei  $95^{\circ}\text{C}$ , gefolgt von 35 Zyklen der Amplifikation von 30 sec bei  $95^{\circ}\text{C}$ , dann 1,5 min bei  $57^{\circ}\text{C}$  und 2 min bei  $72^{\circ}\text{C}$ , mit einem abschließenden Elongationschritt von 5 min bei  $72^{\circ}\text{C}$ .

### 3.12. Immunhistochemie

Für immunhistochemische Untersuchungen wurden mit einem Mikrotom 4µm dicke Schnitte der Paraffinblöcke angefertigt. Die einzelnen Schnitte wurden anschließend in einem Wasserbad bei 42°C geglättet, auf Adhäsiv-Objektträger aufgetragen und in einem Brutschrank bei 42°C getrocknet. Das Entparaffinieren und Rehydrieren der Schnitte erfolgte durch serielle Inkubationen für jeweils 5 min in Tauchbädern von 100%igem Xylol (I) und (II), 100%igem Ethanol (I) und (II), 90% und 70%igem Ethanol bei Raumtemperatur (RT). Danach wurden die Präparate in destilliertem Wasser für 10 min belassen. Vor der Immunfärbung wurden die Schnitte in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Präparate mit Citratpuffer (10mM, pH 6.0) in Überdruck Küvetten 2 min aufgekocht und 15 min inkubiert. Hierdurch wird die Membran der Zellen perforiert und für den Antikörper zugänglich gemacht. Danach wurden die Schnitte in destilliertem Wasser gespült. Alle Inkubationen der Objektträger mit Antikörpern wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt. Um unspezifische Bindungsstellen für den Antikörper abzusättigen, deckte man die Schnitte mit normalem Ziegenserum (NGS 2,5%ig, DAKO) für 5 Stunden ab. Anschließend wurden je 100µl der Antikörperlösung (Verdünnung 1:100 in NGS) auf die Schnitte geträufelt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am Folgetag wurden die Zellen dreimal für je 5 min in PBS gespült. Die Darstellung der Antikörper-Antigen-Komplexe erfolgte mittels der „markierten Avidin-Biotin-Methode“, einer indirekten Immunperoxidase-Methode, und zwar mit Hilfe des StreptABComplex/HRP (DAKO) nach Angaben des Herstellers. Das Prinzip dieses Nachweisverfahrens beruht auf der hohen Bindungsaffinität des Glykoproteins Avidin zu Biotin. Ein biotinkonjugierter Sekundärantikörper bindet sich dabei an den gegen das zu bestimmende Antigen gerichteten Primärantikörper. Mit seinen freien Valenzen bindet sich dann das peroxidasekonjugierte Avidin an das Biotin des Sekundärantikörpers. Als Chromogen für die Peroxidase wurde das 3-amino-9-Ethylcarbazol (AEC, DAKO) benutzt, welches rot leuchtet.

Bei jeder Serie von Färbungen wird jeweils eine Positiv-Kontrolle mitgefärbt. Entsprechend wird auch parallel zu jeder gefärbten Serie eine Negativ-Kontrolle durchgeführt bei der der spezifische Antikörper nicht zugegeben wird.



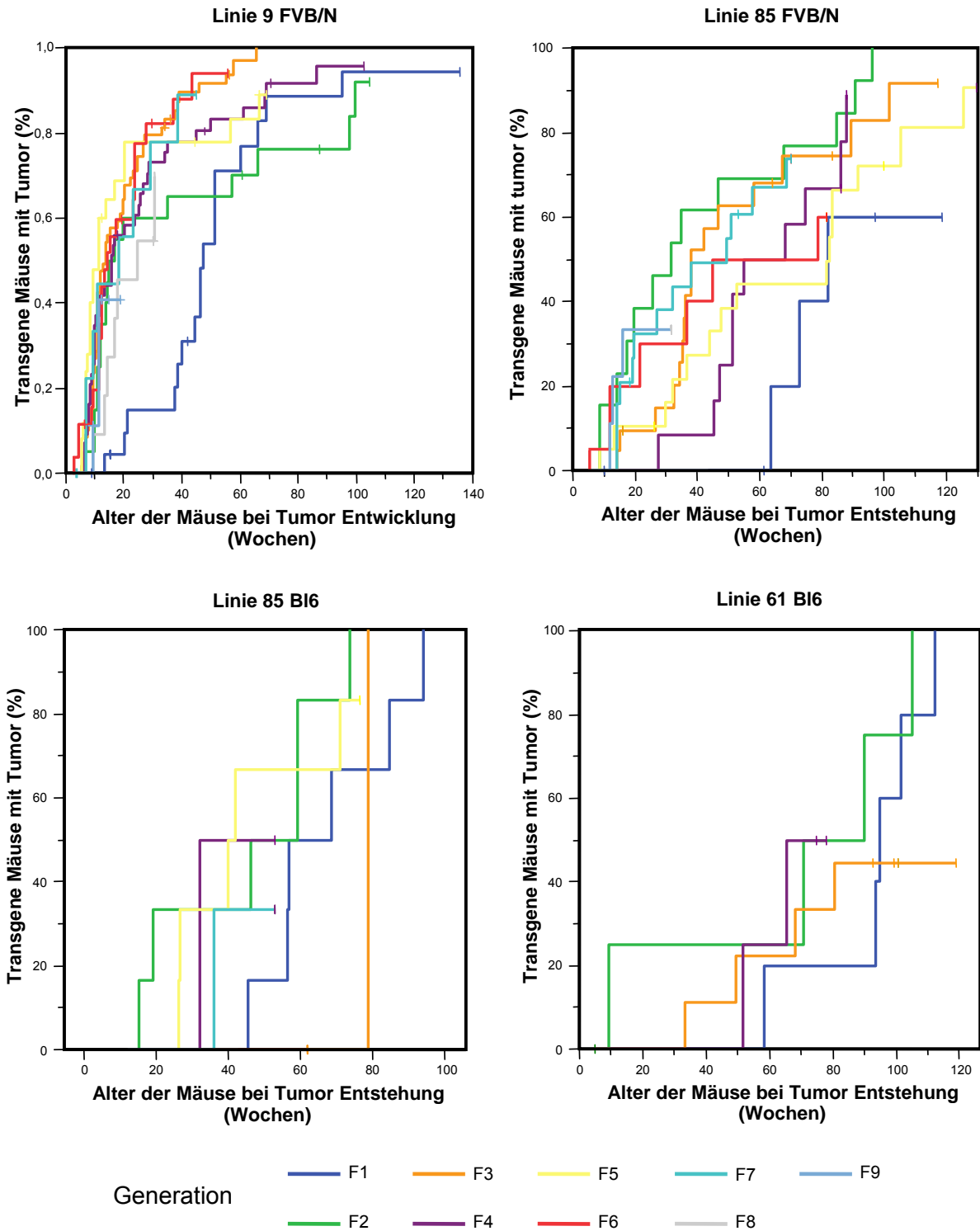
## 4. Ergebnisse

### 4.1. Tumorentwicklung bei HPV8-GFR Mäusen

Die bereits etablierten HPV8-transgenen Maus Linien wurden weiter in den FVB/N und BL6 Hintergrund gekreuzt. Zusätzlich zu den 4 bestehenden Linien (Linie 9 FVB/N, Linie 85 FVB/N, Linie 61 BL6 und Linie 85 BL6) wurde eine Linie 9 BL6 etabliert, um auch für diese Linie eine direkte Vergleichsmöglichkeit zu FVB/N zu haben. Die Linien 9 und 85 FVB/N und 85 BL6 wurden bis in die zehnte Generation zurückgekreuzt. Die Tiere wurden alle drei Tage nach neu entstandenen Hautveränderungen untersucht. In den Tieren von allen fünf Linien konnten in ca. 80% multifokal und in 20% der Fälle singulär auftretende Papillome ausgemacht werden. Es gab zwischen den Linien und Generationen keine Unterschiede was die Häufigkeit und die Anzahl der Papillome betrifft.

#### 4.1.1. Zeitlicher Verlauf der Tumorentwicklung in den verschiedenen Linien HPV8-GFR transgener Mäuse

In allen Linien und Generationen zusammen haben nach mindestens 60 Wochen 319 von 365 transgenen Mäusen (87,4%) Hauttumoren entwickelt. Auf einen 120 Wochen langen Beobachtungszeitraum erweitert, haben fast alle Mäuse (99,4%) eine Hautveränderung entwickelt. Der genaue zeitliche Verlauf der Tumorentwicklung in vier von fünf transgenen Linien ist in Kaplan-Meyer Tafeln angezeigt (Abb.6). In Linie 9 verringerte sich das Alter der Mäuse bei Tumorentstehung je weiter sie in den FVB/N Hintergrund zurück gekreuzt wurden. Statistisch signifikant war der Unterschied zwischen der F1 und der F3-F9 Generation (log-rank Test,  $P < 0,0001 - 0,006$ ). Das mediane Alter in der F1 Generation lag bei 47,4 Wochen und in der F5 Generation nur noch bei 11,4 Wochen. Dieser Trend ist in den anderen Linien nur in Bezug auf die F1 und die F2 Generation zu beobachten. In den späteren Generationen erreichten die Tiere wieder ein höheres Alter bevor sie einen Tumor entwickelten.



**Abb.6 Zeitlicher Verlauf der Tumorentwicklung in vier transgenen HPV8-GFR Mauslinien.** Die Mäuse wurden alle drei Tage untersucht, um auftretende Hautveränderungen zu protokollieren. Zensiert wurden Mäuse, die aus unbekanntem Gründen verstorben sind, bevor sie einen Tumor entwickelt haben.

In keiner Linie und Generation verging im Mittel wieder soviel Zeit bis zur Tumorentstehung wie in der F1 Generation, obwohl einige Kurven sich im späteren Verlauf überschneiden. In Linie 85 BL6 existierten in der F3 Generation nur 2 Mäuse, wovon eine zensiert wurde, weshalb diese Kurve wenig aussagekräftig ist. In der Line 9 BL6 lag der Mittelwert bei Tumorentstehung bei 71 Wochen in der F1 Generation, bei 37 Wochen in der F2 Generation und 49 Wochen in der F3 Generation. Die F2 Generation zeigte in dieser Linie eine vergleichbare Reduktion des Alters bei Tumorbeginn wie in den anderen Linien (Tab.2).

Gen.	Linie 9 FVB/N	Linie 85 FVB/N	Linie 61 BL6	Linie 85 BL6	Linie 9 BL6
<b>F1</b>	<b>52,9</b> (40,4-65,5; 6,4)	<b>91,3</b> (71-111,7; 10,4)	<b>92,1</b> (74,3-109,8; 9,1)	<b>67,6</b> (52,8-82,5; 7,6)	<b>70,5</b> (41,6-99,4; 14,7)
<b>F2</b>	<b>40,3</b> (23,8-56,8; 8,4)	<b>42,1</b> (24,7-59,6; 8,9)	<b>68,8</b> (27,6-110,1; 21,1)	<b>45,3</b> (26,4-64,2; 9,6)	<b>36,9</b> (12,7-61,1; 12,3)
<b>F3</b>	<b>20,4</b> (16,4-24,5; 2,1)	<b>54,6</b> (40,3-68,8; 7,3)	<b>91,8</b> (70,5-113,1; 10,9)	<b>78,6*</b>	<b>48,9</b> (30,5-67,4;9,4)
<b>F4</b>	<b>28</b> (19,9-36,1; 4,1)	<b>64,2</b> (52,4-76; 6)	<b>68,3</b> (57,6-79; 5,4)	<b>42,5</b> (28,2-56,8; 7,3)	
<b>F5</b>	<b>22,7</b> (13,3-32; 4,8)	<b>71,9</b> (54,2-89,7; 9,1)	-	<b>46,9</b> (31-62,8; 8,1)	
<b>F6</b>	<b>19,9</b> (14,3-25,5; 2,9)	<b>52,5</b> (33,8-71,3; 9,6)	-	-	
<b>F7</b>	<b>20,9</b> (12,2-29,5; 4,4)	<b>43,2</b> (32,8-53,7; 5,3)	-	-	
<b>F8</b>	<b>22,7</b> (17,5-27,9; 2,6)	-	-	-	
<b>F9</b>	<b>15,5</b> (12,7-18,3; 1,4)	-	-	-	

**Tab.2 Mittleres Alter in Wochen von HPV8-GFR positiven Mäusen bei Tumorentstehung nach Linie und Generation.** In Klammern ist jeweils die Spannweite (95% Confidence Interval = CI) und die Standardabweichung angegeben. \*Es konnte nur eine einzige Maus ausgewertet werden.

#### **4.1.2. Histologie der Tumoren aller Linien der HPV8-GFR transgenen Mäuse**

Für die HPV8-GFR Mäuse wurde auf der Basis von 18 Tieren der Linie 9 und der F0 Maus der Linie 85 bereits gezeigt, dass es sich bei den entstandenen Tumoren sowohl um benigne Papillome als auch um maligne Plattenepithelkarzinome handelte (Schaper, 2003). In einem Fall wurden Metastasen in der Lunge gefunden. Es wurde zunächst nicht zwischen den einzelnen Dysplasiestadien der Papillome unterschieden.

Die Charakterisierung der Tumoren wurde im Rahmen dieser Dissertation auf alle Linien erweitert und insgesamt wurden weitere 201 Mäuse histologisch untersucht. Von den insgesamt 220 untersuchten Mäusen wiesen 116 (52,7%) ein Papillom mit Hyperkeratose und Dyskeratose auf. Es wurden unterschiedliche Dysplasiegrade in den Papillomen von 90 (41%) Mäusen diagnostiziert. Bei 47 (21,4%) Mäusen war eine leichte Dysplasie zu beobachten und 36 (16,4%) Fälle wurden mit mittlerer Dysplasie diagnostiziert. Sieben Papillome (3,2%) wiesen eine schwere Dysplasie auf. Plattenepithelkarzinome mit infiltrativem Wachstum der Tumorzellen ins Bindegewebe wurden in 13 (6%) Fällen beobachtet, allerdings nur bei den Tieren, die in den FVB/N Hintergrund gezüchtet wurden. In einigen Fällen wurde auch der Skelettmuskel vom Tumor invadiert. Nur selten wurde ein Lymphozyteninfiltrat beobachtet. Die histologischen Veränderungen aller HPV8-GFR Mäuse sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Histologische Veränderung	9 FVBN	9 BL6	85 FVBN	85BL6	61 BL6	Alle Linien
Papillom	72	2	27	6	9	116
Papillom mit leichter Dysplasie	29	2	12	3	1	47
Papillom mit mittlerer Dysplasie	24	-	8	2	2	36
Papillom mit starker Dysplasie	6	-	-	-	1	7
Plattenepithelkarzinom	9	-	4	-	-	13
Plattenepithelkarzinom mit Metastasen	1	-	-	-	-	1
<b>Insgesamt</b>	<b>141</b>	<b>4</b>	<b>51</b>	<b>11</b>	<b>13</b>	<b>220</b>

Tab.3 Ergebnisse der Histologie der Tumoren in fünf HPV8-GFR Mauslinien.

#### 4.1.3. Quantitative Bestimmung der E2, E6 und E7 mRNAs in der normalen Haut von HPV8-GFR Mäusen verschiedener Linien und Generationen.

Vorangegangene Untersuchungen konnten durch quantitative Echt-Zeit-RT-PCR für die HPV8-Gene E2, E6 und E7 höchste Expressionsspiegel für E2 belegen, gefolgt von E7 und E6 (Schaper 2003). Hier sollten weitere Tiere aus verschiedenen Linien und Generationen untersucht werden, um die Frage zu beantworten, ob niedrigere Expressionsspiegel in den BL6 Mäusen für das verlangsamte Auftreten der Papillome verantwortlich sein könnten. Außerdem sollte analysiert werden, ob mit zunehmendem Rückkreuzen in den FVB/N Hintergrund die anfängliche Beschleunigung der Papillomatose-Entwicklung in der Linie 9 durch vermehrte Expression erklärt werden kann.

Nach der cDNA Synthese wurde eine Echt-Zeit-RT-PCR mit Primern für die frühen HPV8 Gene E2, E6 und E7 durchgeführt. Die Kopienzahl der HPV8 Transkripte wurde mit der  $\beta$ -Aktin Kopienzahl normalisiert. Die Expressionsspiegel waren in der Haut der verschiedenen Gründermäuse und der zurück gekreuzten Generationen ähnlich und waren für das Gen E2 am höchsten, gefolgt von E7 und von E6 (Tab.4). Das Verhältnis der E2/E7 Transkripte betrug ungefähr 10 und das der E7/E6 Transkripte ungefähr 2.

Nr.	85	61	9	9-20	9-3-8-9	85-37-6
Gen.	F0	F0	F0	F1	F3	F2
Backgr.	(DBA/BL6)	(DBA/BL6)	(DBA/BL6)	(DBA/BL6x FVB/N)	(DBA/BL6x FVB/N)	(DBA/BL6x BL6)
<b>E2</b>	0,46±0,21	2,69±0,21	0,64±0,49	0,95±0,33	1,11±0,02	1,32±0,06
<b>E6</b>	0,04±0,02	0,22±0,01	0,04±0,03	0,04±0,02	0,01±0,01	0,09±0,09
<b>E7</b>	0,10±0,05	0,5±0,02	0,08±0,06	0,08±0,05	0,07±0,03	0,13±0,01

**Tab.4 Expressionsspiegel der frühen Gene E2, E6, und E7 in normaler Haut von HPV8-GFR transgenen Mäusen, die mit  $\beta$ -aktin mRNA Spiegel abgeglichen wurden.** Es wurden zwei bis drei unabhängige Extraktionen von verschiedenen Proben mit Echtzeit RT-PCR analysiert.

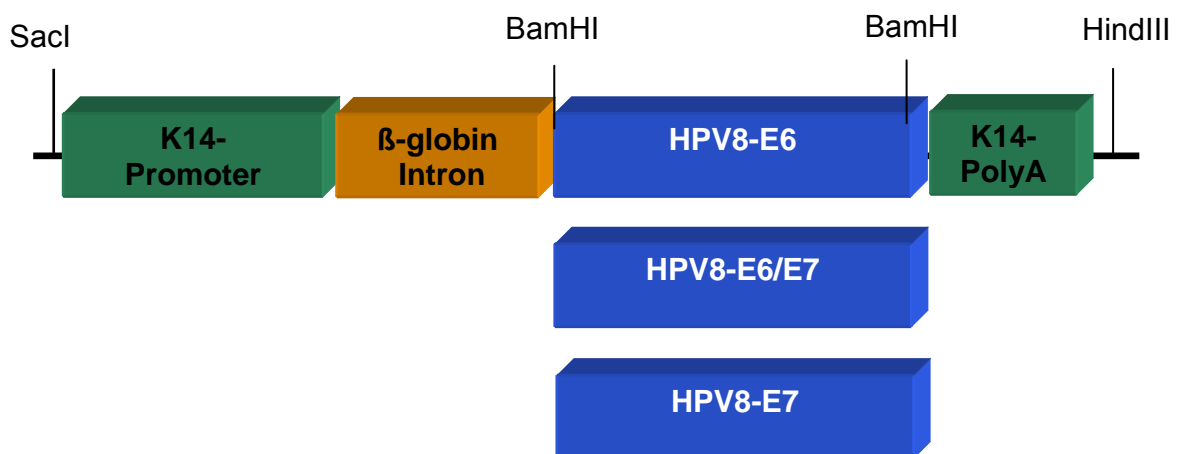
#### 4.1.4. Quantitative Bestimmung der E2, E6 und E7 mRNA Transkripte in Tumoren der HPV8-GFR Mäuse.

Die HPV8 Gene E2, E6 und E7 wurden fortgesetzt in den gutartigen und premalignen Tumoren exprimiert. In einigen Fällen erschienen die Spiegel der Transkripte verglichen mit normaler Haut vom gleichen Tier bis zu 20-fach erhöht relativ zu den  $\beta$ -Aktin mRNA Transkripten (Daten nicht gezeigt). Jedoch können diese Werte aufgrund der unterschiedlichen Anteile von Keratin-14 Promotor permissiven Zellen in den Papillomen und der normalen Haut nur als Näherungswert angegeben werden. Es ist bemerkenswert, dass der relative Überschuss an E2 Transkripten sich während der Tumorentwicklung nicht änderte. In den Tumoren lag das Verhältnis der E2/E7 Transkripte bei 10 bis 30 und das der E7/E6 Transkripte bei 6 bis 7.

## 4.2. Etablierung HPV8-E6, -E6/E7 und E7 transgener Mäuse

### 4.2.1. Konstruktion der Transgene und Erzeugung der transgenen Mäuse.

Um die Rolle von HPV8 E6 und E7 bei der Keratinozytentransformation im Mausmodell zu bestimmen, wurden Vektoren konstruiert, die diese viralen Gene einzeln oder in Kombination unter der Kontrolle des humanen Keratin-14 Promotors enthielten. Zunächst wurden die jeweiligen Leserahmen der frühen Gene von HPV8 in PCR-Reaktionen amplifiziert. Die Primer wurden mit jeweils einer BamHI Restriktionsschnittstellen konstruiert. Der 3'-Primer enthielt eine zusätzliche SphI-Erkennungssequenz um die richtige Orientierung des PCR-Amplifikats zu überprüfen. Anschließend wurden die Amplifikate in den Vektor K14-CreErtam ligiert, der das  $\beta$ -globin Intron 2 vom Kaninchen stromabwärts des K14-Promotors und ein Polyadenylierungssignal enthält, um durch mRNA-Splicing und Polyadenylierung eine effiziente Expression des Transgens zu gewährleisten (Brinster et al., 1988; Abb.7). Zum Schluß wurden die K14-HPV8-E6, -E6/E7 oder -E7 Konstrukte mit SacI und HindIII geschnitten und für die Mikroinjektion vorbereitet.



**Abb. 7 Schematische Darstellung der drei HPV8 Transgenkonstrukte.**

Die Konstrukte bestehen aus dem Promoter des humanen Zytokeratin-14 Gens, dem Intron 2 des  $\beta$ -globin Gens vom Kaninchen, den frühen Genen E6, E6/E7 oder E7 von HPV8 und dem K14 Polyadenylierungs Signal.

Die K14-HPV8-Konstrukte wurden mit Hilfe eines Mikromanipulators in den männlichen Pronukleus befruchteter Eizellen von D2B6F1 Mäusen mikroinjiziert. Diese Hybridmäuse aus zwei unterschiedlichen genetischen Hintergründen (DBA und BL6) zeichnen sich durch eine erhöhte Fertilität aus und lassen sich gut

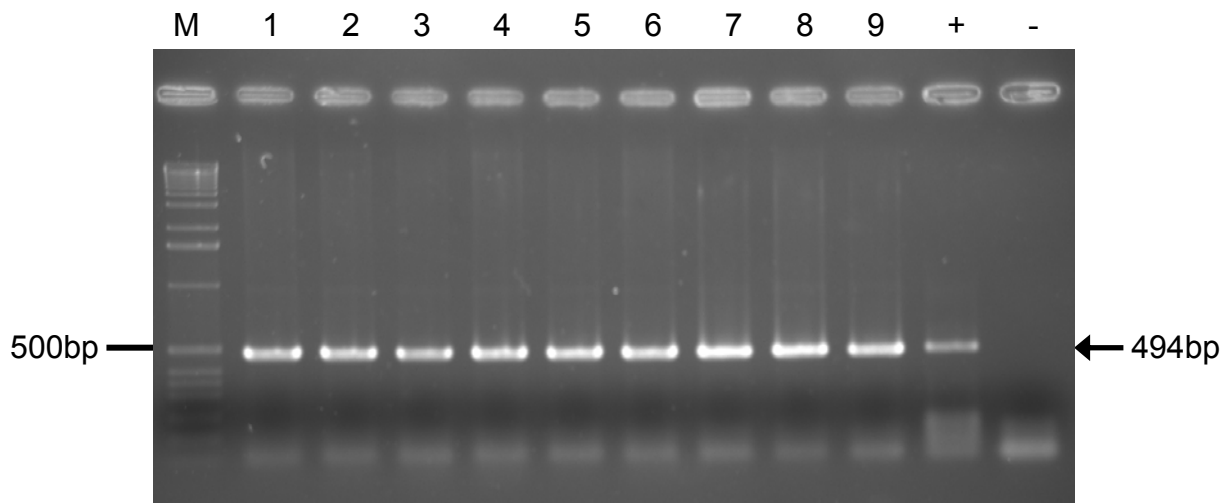
superovulieren. Anschließend wurden die mikroinjizierten Eier in die Ovidukte von scheinsschwangeren Ammenmüttern implantiert. Nach drei Wochen wurden die ersten transgenen Mäuse geboren, die so genannte Gründer-Generation (F0). Diese wurden mittels PCR auf das Vorhandensein des Transgens untersucht.

#### **4.2.2. Nachweis der HPV8-Gene in Mäusen der F0-Generation und folgender Generationen**

Die Integration des Transgens in das Genom erfolgt meistens noch im Einzellstadium, kann aber auch erst im Mehrzellstadium stattfinden. Eine Integration im Mehrzellstadium hat zur Folge, dass F0-Tiere entstehen, die aus genetisch unterschiedlichen Zellen bestehen. Diese sogenannten "Mosaik-Tiere", können unter Umständen in der Keimbahn transgen negativ sein und in der Haut transgen positiv. Solche F0-Mäuse sind nicht in der Lage das Transgen an die Nachkommen der F1-Generation weiter zu vererben. Im Allgemeinen erwartet man bei Kreuzung von transgenen Mäusen mit Wildtyp Mäusen eine Rate von 50% transgen-positiven Nachkommen.

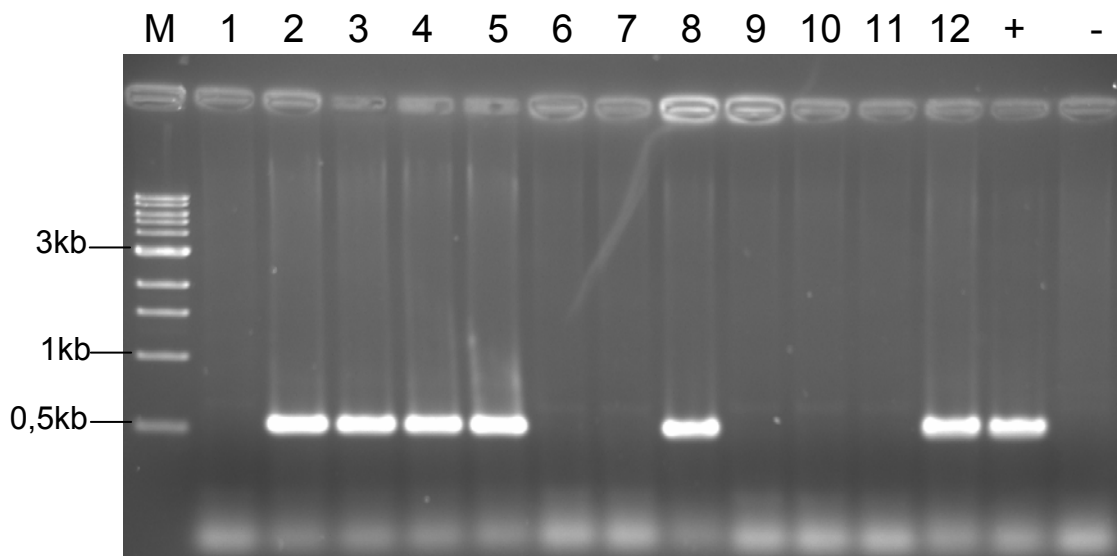
Zur Überprüfung des transgenen Status wurde den Mäusen im Alter von 3 Wochen ein ca. 0,5-1cm langes Stück Schwanzspitze entnommen und daraus die gesamtzelluläre DNA extrahiert. Um den Erfolg der Aufreinigung der genomischen DNA zu überprüfen, wurde eine PCR mit  $\beta$ -Globin spezifischen Primern durchgeführt. Erst wenn die zu untersuchenden Proben nach der Gelelektrophorese eine für die  $\beta$ -Globin-PCR spezifische Bande von 494bp aufwiesen (Abb.8), wurde das Vorhandensein des Transgens mittels einer HPV8-E6, -E6/E7 bzw. -E7 spezifischen PCR überprüft.





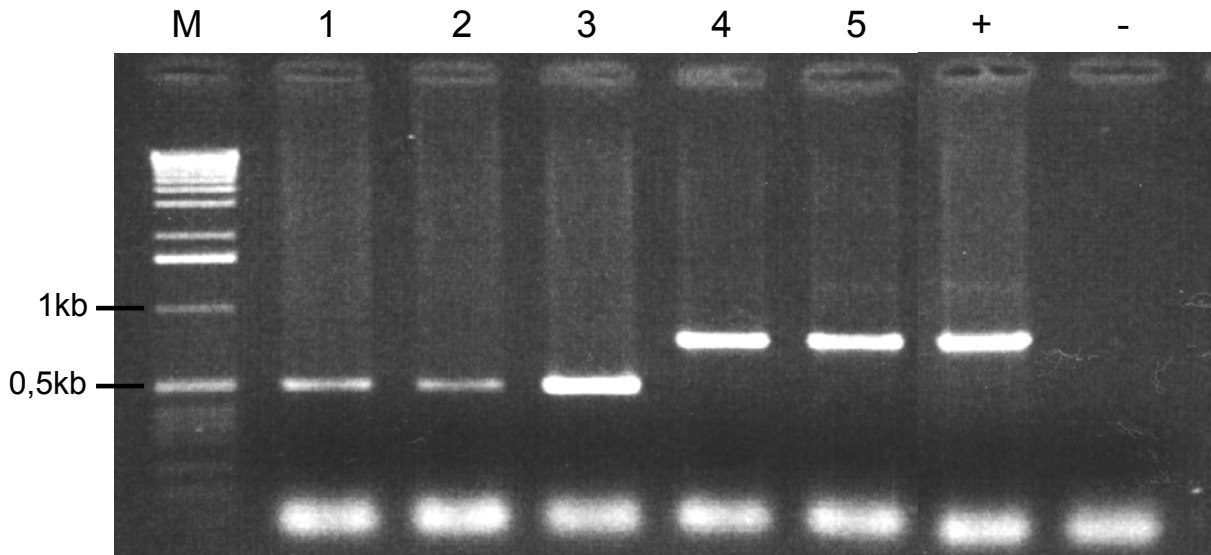
**Abb.8 Überprüfung der Qualität der extrahierten Mausschwanz-DNA mittels  $\beta$ -Globin-PCR.** Die Bande von 494 bp entspricht dem zu erwartenden  $\beta$ -Globin-Amplifikat. Bei allen 9 untersuchten Mäusen war die DNA-Aufreinigung erfolgreich. In der vorletzten Spur rechts ist die Positivkontrolle (1:100 verdünnt) und daneben die Negativkontrolle aufgetragen (M = 1kb-Leiter, Invitrogen).

Das HPV8-E6 PCR-Produkt besitzt eine Größe von 522 bp. In Abbildung 9 ist exemplarisch die gelelektrophoretische Analyse der PCR-Reaktionen von 12 untersuchten Mäusen dargestellt. Insgesamt wurden in diesem Lauf 6 Transgen-positive (Bahnen 2, 3, 4, 5, 8 und 12) und 6 Transgen-negative Mäuse (Bahnen 1, 6, 7, 9, 10 und 11) identifiziert. Die E6-PCR wurde auch für die Identifizierung der HPV8-GFR Mäuse verwendet.

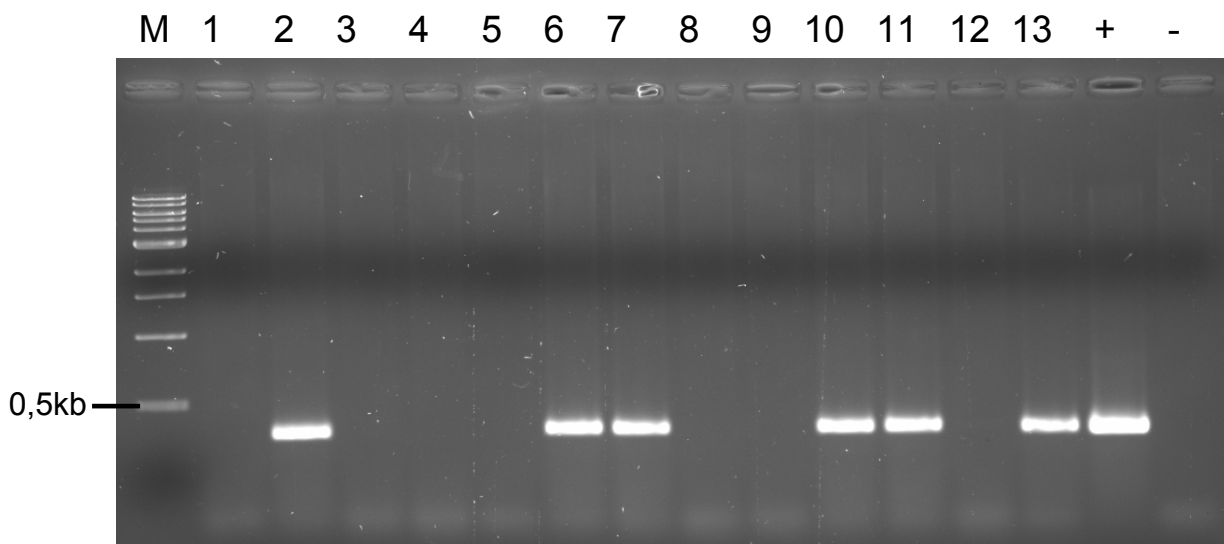


**Abb.9 Nachweis des E6 Transgens.** In 6 Spuren sind 522bp große HPV8-E6 spezifische Amplimere zu sehen. In der vorletzten Spur rechts ist die Positivkontrolle und daneben die Negativkontrolle aufgetragen (M = 1kb-Leiter, New England Biolabs).

Die HPV8-E7 transgenen Mäuse wurden mit einer E7-spezifischen PCR und die HPV8-E6/E7 Mäuse mit einer E6/E7 spezifischen PCR ermittelt. Das E6/E7 Amplifikat hat eine Größe von 783bp (Abb.10), das E7 Amplifikat eine Größe von 346bp (Abb.11).

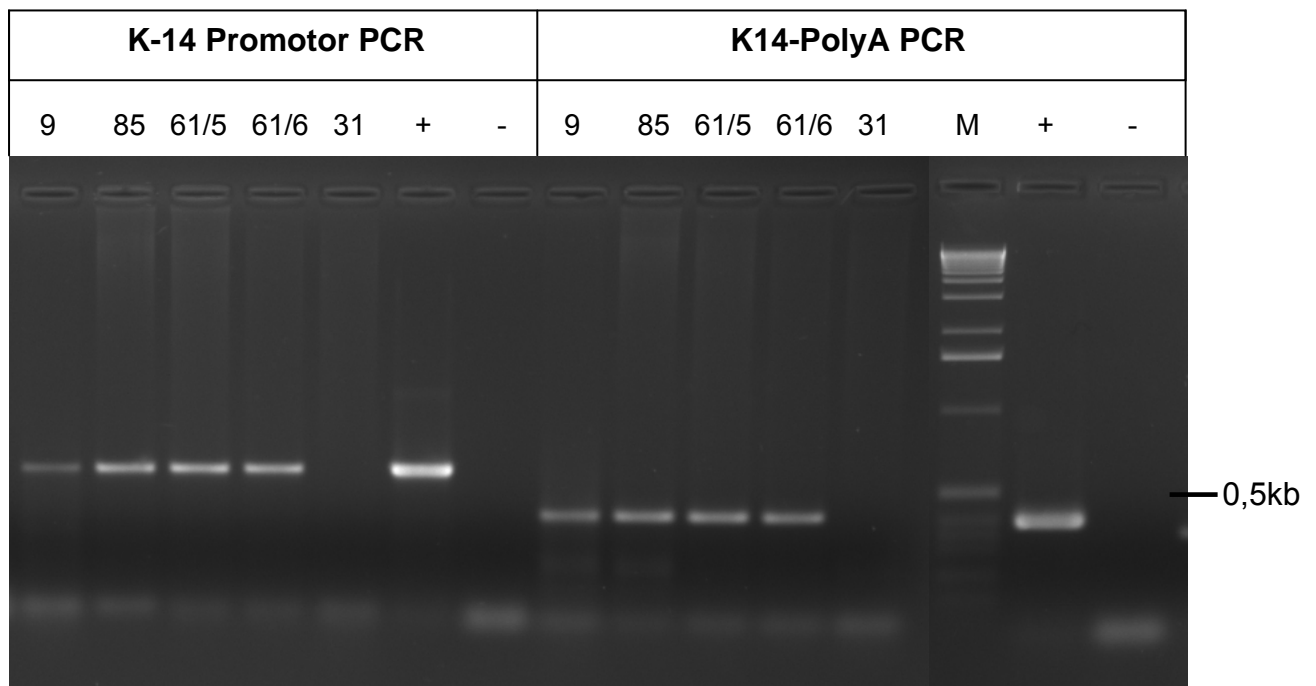


**Abb.10 Nachweis des E6/E7 Transgens.** In Spur 1-3 sind HPV8-E6 Amplifikate aufgetragen und in Spur 4 und 5 die PCR-Produkte mit 783bp der beiden HPV8-E6/E7 positiven F0 Mäuse (Nr.25 und 28). In der vorletzten Spur rechts ist die Positivkontrolle und daneben die Negativkontrolle aufgetragen (M = 1kB-Leiter, Invitrogen).



**Abb.11 Nachweis des E7 Transgens.** Die Bande von 346bp entspricht dem zu erwartenden HPV8-E7-Amplifikat. Bei 6 von 13 untersuchten Mäusen war das E7-Transgen vorhanden. In der vorletzten Spur rechts ist die Positivkontrolle und daneben die Negativkontrolle aufgetragen (M = 1kB-Leiter, New England Biolabs).

Nach der Mikroinjektion wurden 119 Mäuse der HPV8-E6 F0-Generation geboren, wovon 9 (7,8%) transgen positiv waren. Die HPV8-E7 F0-Generation bestand aus 108 Mäusen mit 7 transgenen Tieren (6,5%) und die HPV8E6/E7 F0-Generation aus 28 Mäusen mit 2 (7,1%) transgenen Tieren. Die transgen-positiv getesteten Tiere wurden anschließend daraufhin überprüft, ob der K14-Promotor und das K14-PolyA Ende auch integriert wurden. Dazu wurde jeweils eine K14-Promotor- und eine K14-PolyA-PCR durchgeführt. In Abbildung 12 ist die gelelektrophoretische Analyse von 2 verschiedenen HPV8-GFR F0- (Linie 9 und 85) und 2 verschiedenen HPV8-GFR F1-Tieren (Linie 61/5 und 61/6) gezeigt. Diese etablierten Linien, die alle Hautveränderungen gezeigt hatten (Schaper, 2003), sind exemplarisch der HPV8-E6 transgen positiven Maus Nr. 31 gegenübergestellt und dienten als Positivkontrolle. Die HPV8-E6 positive Maus Nr. 31 hatte genauso wie eine weitere transgen-positive E6-Maus (Nr. 32) und eine HPV8-E7 Maus (Nr. 38) außer den HPV8 Genen keine der beiden untersuchten Komponenten des Konstrukts integriert.



**Abb.12 Kontrolle der K14 Expressionskassette.** Die extrahierten DNAs aus der Haut von HPV8-GFR F0-Tieren, die alle Hautveränderungen bekommen haben, wurden als Positivkontrolle für eine K14-Promotor (625bp) und eine K14-PolyA (348bp) PCR verwendet, um eine intakte K14-Expressionskassette in den transgen-positiv getesteten Mäusen zu überprüfen. Die HPV8-E6 positive Maus Nr. 31 hatte genauso wie 2 weitere transgen-positive Mäuse außer den HPV8 Genen keine der beiden untersuchten Komponenten des Konstrukts integriert (M = 1kb-Leiter, Invitrogen).

Alle transgen-positiven Tiere der F0 Generation wurden auf diese Weise getestet und dabei blieben von den anfänglichen 9 HPV8-E6 transgenen Mäusen 7 mit intakter K14-Expressions-Kassette übrig. Ebenfalls mit intakter K14-Expressions-Kassette waren 6 der 7 transgen-positiven HPV8-E7 Mäuse, wovon fünf verpaart wurden, und beide HPV8-E6/E7 Tiere. Die transgenen Mäuse wurden mit FVB/N Wildtyp Tieren verpaart. Von jeder neu entstandenen Generation wurden einige, bevorzugt männliche, HPV8-positive Mäuse zur weiteren Zucht mit den entsprechenden Wildtyp-Mäusen verwendet. Es konnten drei verschiedene HPV8-E6 (Nr. 631, 635 und 637) und fünf HPV8-E7 Linien (Nr. 9, 14, 29, 49 und 57) mit bis zu 5 Generationen etabliert werden (Tab.5). Interessanterweise sind alle transgen-positiven Mäuse der Linie 635 männlich. Somit hat sich das Transgen in das Y-Chromosom integriert.

Konstrukt	Anzahl transgen-positiver Mäuse mit intakter K14-Expressions-Kassette	Anzahl der Mosaiktiere	Etablierte Linien
HPV8-E6	7	2 (Maus Nr. 24 und 622)	Linie 631, 635 und 637 (Nr. 53 und 638 vermehrten sich nicht)
HPV8-E7	6	1 (Maus Nr. 10)	Linie 9, 14, 29, 49 und 57
HPV8-E6/E7	2	2	keine

**Tabelle 5. Etablierte transgene Mauslinien mit den einzelnen frühen Genen von HPV8**

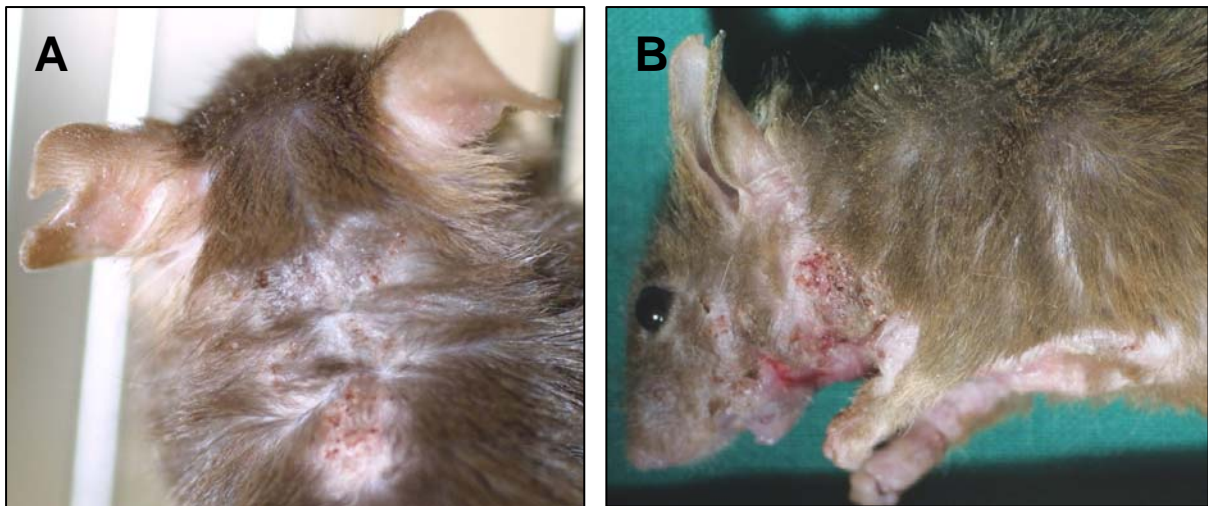
Alle Nachkommen der HPV8 E6-positiven Mäuse 24 und 622, der HPV8 E7-positiven Maus 10 und der beiden HPV8-E6/E7-positiven Mäuse waren HPV-negativ. Eine HPV8-E6/E7 Linie konnte deshalb nicht etabliert werden. Dies lässt darauf schließen, dass das Transgen bei diesen Tieren erst im Mehrzellstadium und dabei nicht in Zellen der Keimbahn integriert wurde.

Insgesamt wurden aus allen Linien und Generationen 394 Mäuse getestet, wovon 138 (35%) transgen positiv für HPV8-E6 waren und 101 (36%) von 281 für HPV8-E7. Parallel wurden für die weitere Charakterisierung der bereits etablierten HPV8-GFR Linien 563 Mäuse mittels E6-PCR analysiert, wovon 303 (54%) als transgen positiv identifiziert wurden.

### 4.2.3. Tumor Entwicklung in HPV8-E6 und HPV8- E6/E7 transgenen Mäusen

#### 4.2.3.1 Makroskopische Untersuchungen

Von den ursprünglich 7 HPV8-E6 transgen-positiven F0-Mäusen mit vollständiger K14-Expressions-Kassette entwickelten fünf spontan Hauttumore im Alter von 8 bis 21 Wochen. Bei fast allen F0-Mäusen entwickelten sich Tumoren in der dorsocranialen Region des Rückens, die mit Haarverlust und schuppiger Haut begannen. Im späteren Verlauf breiteten sich die aufgerauten und trocken-borkig wirkenden, erhabenen Hautläsionen dorsoventral und dann ventralcaudal aus. Teilweise kam es zur Bildung von Ulcera, vor allem unterhalb der Schnauze (Abb.13).



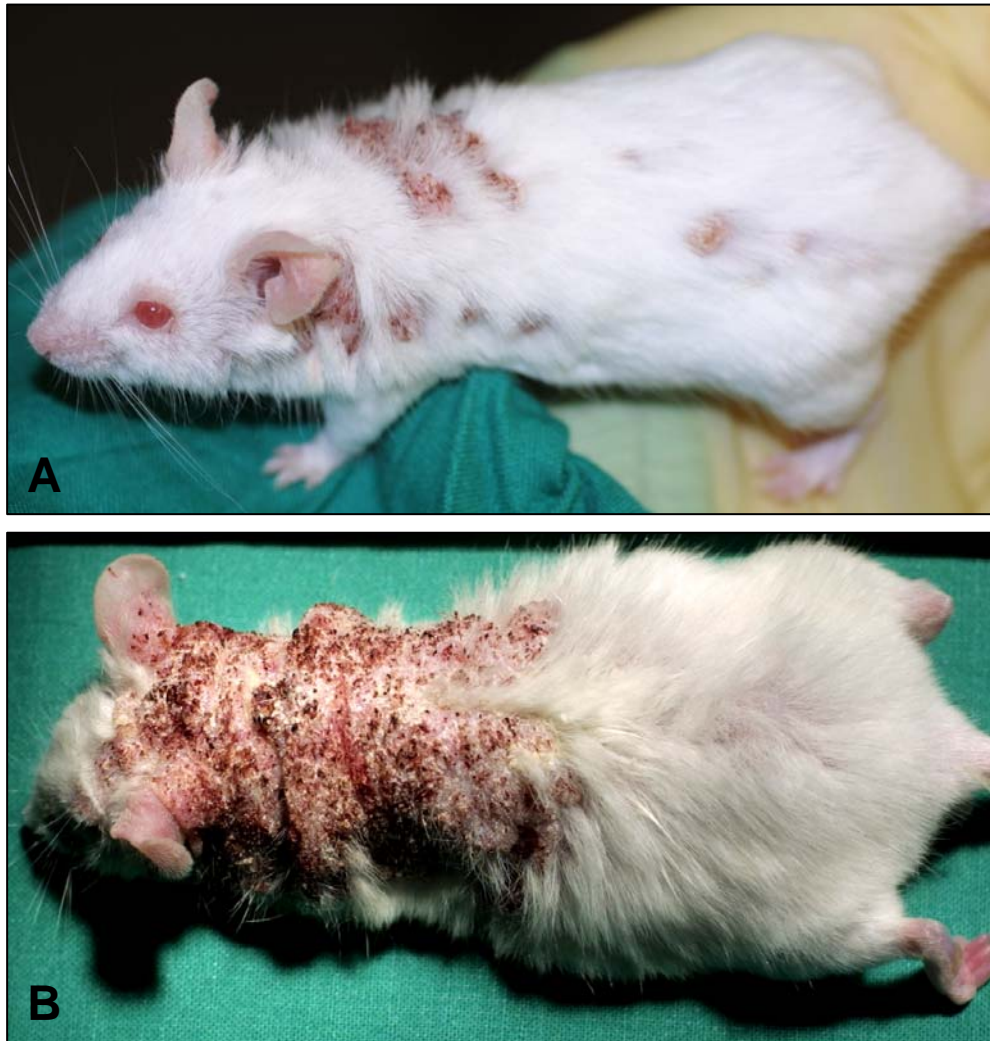
**Abb. 13 HPV8-E6 positive F0-Maus mit charakteristischen Hautläsionen.**

**A.** Tumor im Frühstadium mit Alopezie und beginnender Hyperkeratose (F0-Maus Nr. 53, Hintergrund: DBA/BL6). Die ersten Hautveränderungen manifestierten sich im Alter von 14 Wochen, diese Aufnahme entstand in der 18. Woche. **B.** Dieselbe Maus in der 45. Woche; unterhalb der Schnauze ist das ulcerierte Gewebe zu sehen.

Die Läsionen der späteren Generationen begannen auch mit Haarverlust und schuppiger Haut bevorzugt im vorderen dorsalen Körperbereich. Im weiteren Verlauf wurden die Hautveränderungen stark hyperkeratotisch und breiteten sich sowohl diffus als auch multifokal über den gesamten Körper aus (Abb.14). In einem Fall bildeten sich die Hornmassen zu einem 1,5 x 1 cm großen Cornu cutaneum aus.

Das makroskopische Erscheinungsbild und die Lokalisation der Hautläsionen ist nahezu identisch mit den bereits beschriebenen Hauttumoren der HPV8-GFR transgenen Mäuse (Schaper, 2003). Einmal entstandene Hautläsionen zeigten einen

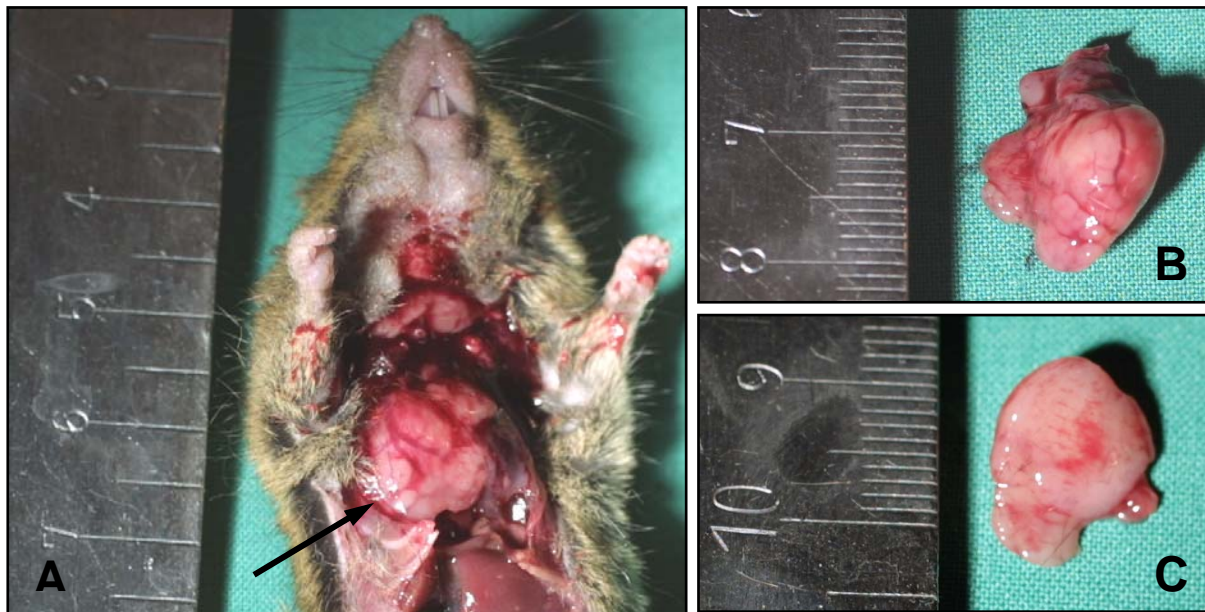
kontinuierlichen Progress und sind nicht wieder verheilt. Insgesamt entwickelten von der F0- (ohne Mosaiktiere) bis zur F5-Generation 95 von 98 transgenen Mäusen (97%) Tumoren, wenn sie über einen Zeitraum von mindestens 51 Wochen beobachtet wurden. Multifokal auftretende Papillome konnten in ca. 70% der Tiere mit Hautläsionen beobachtet werden. Keine der HPV8-E6 negativen Geschwistertiere entwickelten Hauttumoren innerhalb eines Beobachtungs-Zeitraums von bis zu 85 Wochen.



**Abb.14 HPV8-E6 positive Mäuse mit charakteristischen Hautläsionen.**

**A.** Papillome die sich multifokal über den gesamten Körper ausgebreitet haben (F2-Maus; Rückkreuzung in FVB/N). Die ersten Papillome entstanden im Alter von 9 Wochen. Foto wurde in der 17. Woche aufgenommen. **B.** Starke Hyperkeratose die sich panzerförmig dorsoventral und -cranial bis an beide Ohren reichend, diffus ausgebreitet hat (F2-Maus; Rückkreuzung in FVB/N). Die Läsionen traten im Alter von 4 Wochen auf. Die Aufnahme wurde in der 14. Woche aufgenommen.

Der einzige erkennbare makroskopische Unterschied zwischen den HPV8-E6 und den HPV8 transgenen Mäusen mit der gesamten frühen Region des Virus war die Bildung von Thymustumoren im vorderen Mediastinum, die in keiner HPV8-GFR Maus diagnostiziert wurden, jedoch in 72% der HPV8-E6 Mäuse mit Hautläsionen vorkamen. Die Größe der Thymustumoren variierte von leichter Drüsenvergrößerung mit 0,4cm Durchmesser bis stark vergrößert (1,5cm x 1,5cm x 1cm; Abb.15). In gesunden Mäusen hat der Thymus eine Größe von ca. 0,2cm x 0,2cm.



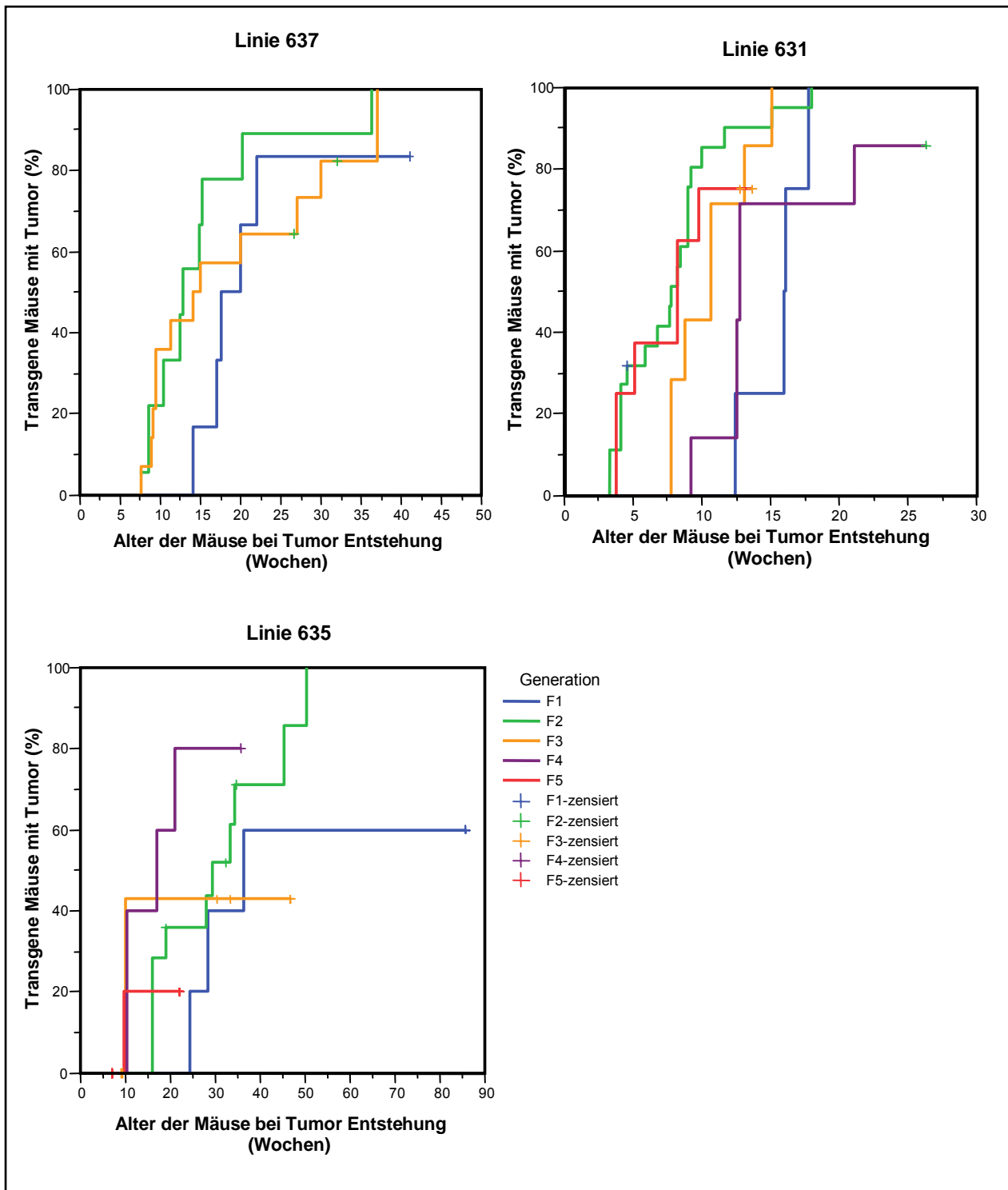
**Abb.15 Bildung von Thymustumoren in HPV8-E6 transgenen Mäusen.**

**A.** Der Pfeil zeigt auf einen 1,5cm x 1,5cm x 1cm großen Tumor des Thymus einer HPV8-E6 Maus (F2, Linie 637). **B.** Übersicht des herauspräparierten Tumors und Querschnitt **(C)**.

#### **4.2.3.2 Zeitlicher Verlauf der Tumorentwicklung in HPV8-E6 transgenen Mäusen**

Der zeitliche Verlauf der Tumorentwicklung in den drei transgenen Mauslinien (631, 635 und 637) ist in Kaplan Meyer Tafeln wiedergegeben (Abb.16). Positive Mäuse, die aufgrund unbekannter Gründe verstorben sind bevor sie einen Tumor entwickelt haben, wurden nicht berücksichtigt. Die transgenen HPV8-E6 Mäuse der F1-Generation der Linien 631 und 637 entwickelten die ersten Hautläsionen nach 12 und 14 Wochen und Mäuse der Linie 635 nach 25 Wochen. In allen Linien verringerte sich das Alter, in dem die Mäuse Tumoren entwickelten, um ca. 7-9 Wochen von der F1- zur F2-Generation. In Linie 635 zeigte sich auch eine

Verringerung des Alters bei Tumorbeginn in der F3, F4 und F5 Generation relativ zur F2 Generation.



**Abb. 16 Zeitlicher Verlauf der Tumorentwicklung in den drei transgenen HPV8-E6 Mauslinien.** Die Mäuse wurden alle drei Tage untersucht, um auftretende Hautveränderungen zu protokollieren. Zensiert wurden Mäuse, die aus unbekanntnen Gründen verstorben sind, bevor sie einen Tumor entwickelt haben.



Für diese beiden Linien wurde kein signifikanter Trend für ein geringeres Alter bei Tumorentwicklung hin zu späteren Generationen ermittelt (Log Rank Test:  $p < 0,07$  und  $p < 0,11$ ). In der verbleibenden Linie 631 nahm das Alter der Tiere bei der Tumorentstehung in der F3- und F4-Generation zu, erreichte aber nicht den Wert der F1 Generation und nahm in der F5 Generation wieder ab. Das mittlere Alter bei Beginn der Tumorentwicklung in den einzelnen Linien und Generationen ist in Wochen in Tabelle 6 angegeben. In allen Linien konnte generell eine Tendenz zur Verringerung des mittleren Alters bei der Tumorentstehung von der F1 zur F2 Generation beobachtet werden.

Generation	Linie 635	Linie 631	Linie 637	Alle Linien
<b>F1</b>	<b>36,2</b> (19,7-52,7; 8,4)	<b>15,9</b> (12,3-19,6; 1,9)	<b>17,7</b> (14,2-21,1; 1,7)	<b>27</b>
<b>F2</b>	<b>29,2</b> (20,9-37,4; 4,2)	<b>7,8</b> (5,8-9,9; 1,1)	<b>12,5</b> (11,7-13,4; 0,4)	<b>19</b>
<b>F3</b>	<b>31</b> (17,6-44,4; 6,8)	<b>10,7</b> (8,5-12,8; 1,1)	<b>14,1</b> (7,6-20,6; 3,3)	<b>21</b>
<b>F4</b>	<b>17,1</b> (2,4-31,8; 7,5)	<b>12,8</b> (12,5-13,1; 0,2)	-	<b>15</b>
<b>F5</b>	<b>19,6</b> (15,2-24; 2,2)	<b>8,3</b> (4,1-12,5; 2,1)	-	<b>14</b>

**Tab.6 Mittleres Alter in Wochen von HPV8-E6 positiven Mäusen bei Tumor-Entstehung nach Linie und Generation.** In Klammern ist jeweils die Spannweite (95% Confidence Interval = CI) und die Standardabweichung angegeben.

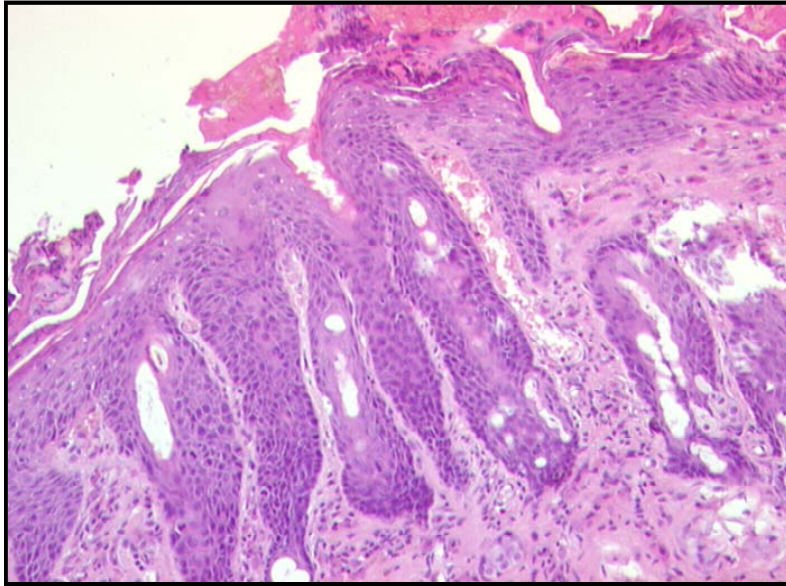
#### 4.2.3.3 Mikroskopische Untersuchungen

Insgesamt 47 HPV8-E6 Mäuse mit Tumoren wurden histologisch aufgearbeitet. Die Läsionen waren durch Papillomatose, Hyperkeratose, Dyskeratose und Parakeratose gekennzeichnet (Abb.17). In der Epidermis bildeten sich Hohlräume, die mit lamellenartigen, konzentrischen Keratinmassen gefüllt waren. In den oberen Schichten waren intrazytoplasmatische Keratohyalin-Körnchen anwesend und in einigen Bereichen traten Koilozyten auf. Diese Hautveränderungen wurden häufig auch im Epithel gefunden, welches die Haarfollikel umgibt. Insgesamt wurden 26 (55%) der 47 untersuchten Tumoren als Papillom ohne dysplastische Veränderung eingestuft.



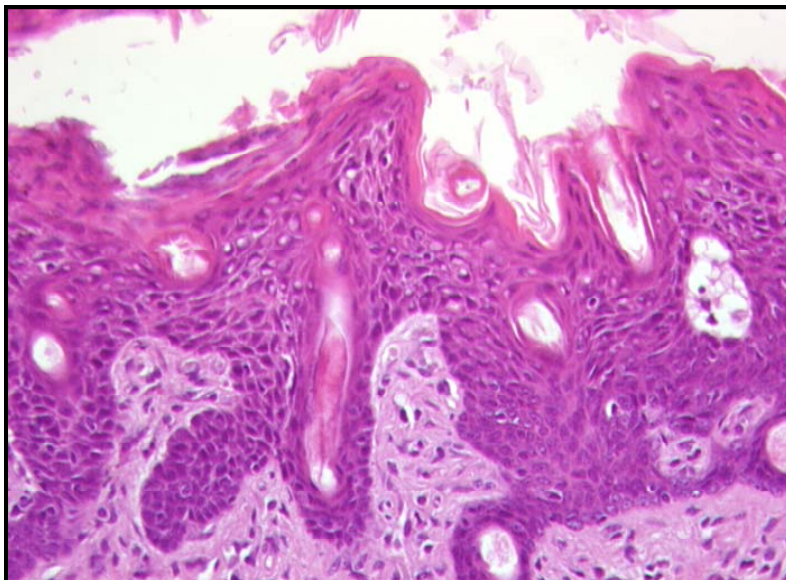
**Abb.17 Schnitt durch ein Papillom einer HPV8-E6 transgenen Maus.** Starke Hyperkeratose und Dyskeratose mit den für Papillome typischen Hornperlen (Pfeil), (Vergrößerung: 40fach).

Bei 26 Mäusen (55%) wurden unterschiedliche Grade der Dysplasie in den Papillomen diagnostiziert. Bei 6 Mäusen (13%) trat eine leichte Dysplasie auf. Diese Tumoren zeigten atypische Veränderungen in der basalen Schicht mit erhöhter Anzahl an mitotischen Zellen, milder Hyperchromatose und Anisonukleose (Abb.18).



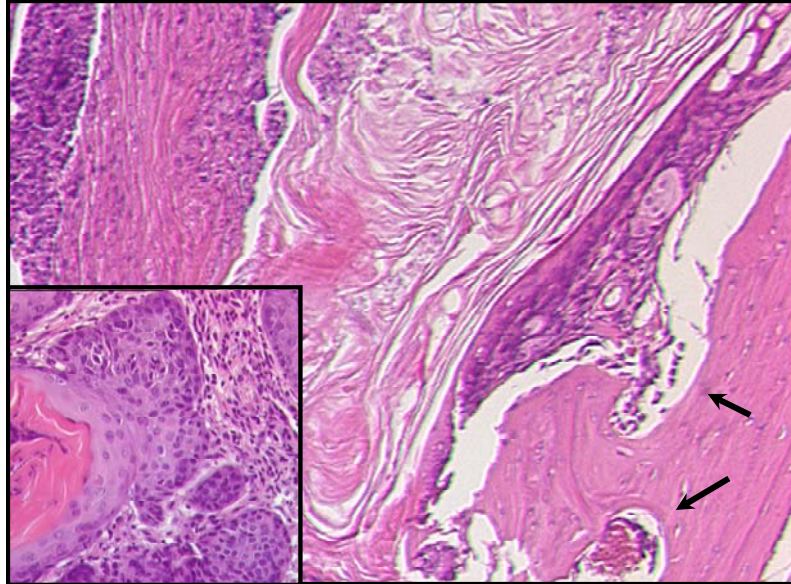
**Abb.18 Schnitt durch ein Papillom mit leichter Dysplasie einer HPV8-E6 transgenen Maus.** Zellen der unteren Epidermisschichten weisen milde Atypien auf (Vergrößerung; 40fach)

In 9 Fällen (19%) mit mäßiger Dysplasie wurden die atypischen Zellen auch in den mittleren Schichten des Epithels in erhöhter Anzahl gesehen, während die Schichtung der oberen Epidermis erhalten blieb. In den drei Fällen (6%) mit schwerer Dysplasie ging die Schichtung des Epithels verloren, die Zellen waren stark atypisch mit hyperchromatischen und pleomorphen Kernen (Abb.19).



**Abb.19 Schnitt durch ein Papillom mit schwerer Dysplasie einer HPV8-E6 transgenen Maus.** Stark verdickte Epidermis mit deutlich atypischen und hyperchromatischen Kernen. (Vergrößerung 40fach).

In drei Fällen (6%) wurden Plattenepithelkarzinome mit einem infiltrativen Wachstum der Tumorzellen ins Bindegewebe und in einem der drei Fälle sogar ins Knochengewebe des Schädels beobachtet (Abb.20). Die histologischen Veränderungen sind in Tabelle 7 zusammengefasst.



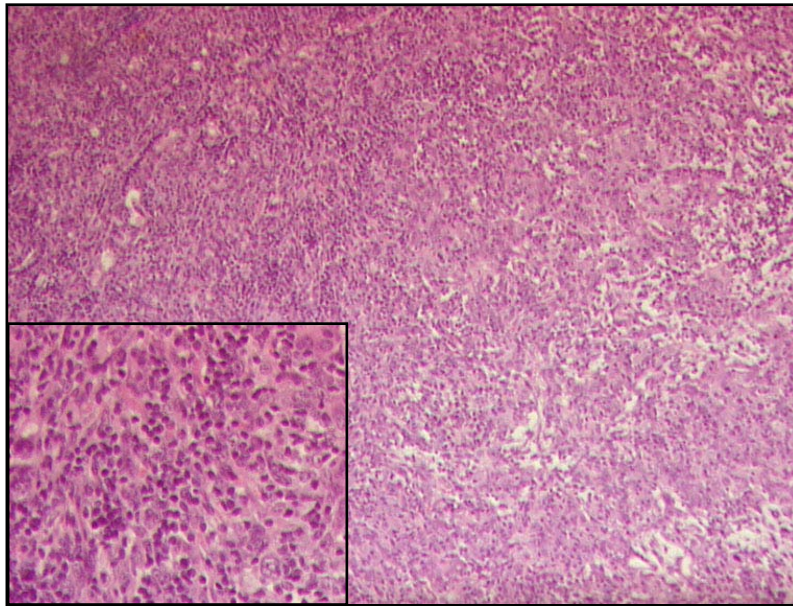
**Abb.20 Schnitt durch ein Plattenepithelkarzinom einer HPV8-E6 transgenen Maus.** Im Bildausschnitt unten links, infiltratives Wachstum von Tumorzellen ins Bindegewebe. Im großen Bild invadieren die Tumorzellen in den Schädelknochen (Pfeile), (Vergrößerung: 40fach).

Histologische Veränderung	631 FVBN	635 FVBN	637 FVBN	F <sub>0</sub> Mäuse (ohne Nachkommen)	Alle Linien
Papillom	14	5	6	1 (E6)	26
Papillom mit leichter Dysplasie	3	2	1	-	6
Papillom mit mittlerer Dysplasie	5	3	-	1 (E6/E7)	9
Papillom mit starker Dysplasie	-	-	1	1 (E6) 1 (E6/E7)	3
Plattenepithelkarzinom	1	1	1	-	3
<b>Insgesamt</b>	<b>23</b>	<b>11</b>	<b>9</b>	<b>4</b>	<b>47</b>

**Tab.7 Histologie der Tumoren in drei HPV8-E6 Mauslinien und von F<sub>0</sub>-Mäusen, die sich nicht vermehren konnten.**

#### 4.2.3.4 Histologische Untersuchung der Thymus Veränderungen

Wie schon erwähnt war der einzige erkennbare makroskopische Unterschied zwischen den HPV8-E6 und den HPV8-GFR Mäusen das Vorkommen von Thymomen. In lymphatisches Gewebe eingebaut fanden sich vergrößerte, teils konfluierende Epithelinseln mit Aufbau aus kohäsiven Zellverbänden. Die Epithelien zeigen vergrößerte Kerne und die Tumoren waren von einer fibrösen Kapsel umgeben (Abb.21).



**Abb.21 Schnitt durch einen Thymustumor einer HPV8-E6 transgenen Maus.**

Vor einem lymphozytären Hintergrund stellen sich kohäsiv gelagerte Epithelzellverbände dar. (Vergrößerung: 40fach).

#### 4.2.3.5 Tumorentwicklung in den HPV8-E6/E7 F0-Mäusen

Bei den beiden HPV8-E6/E7 F0-Mäusen handelte es sich um weibliche Mosaiktiere, die nur negative Nachkommen warfen, also in der Keimbahn negativ für HPV8-E6/E7 waren (Nr.24 und 28). Bei der Maus Nr.24 traten die ersten Hautveränderungen im Alter von 8,4 Wochen auf und bei der Maus Nr.28 im Alter von 22,5 Wochen und waren von den Hautläsionen der HPV8-E6 F0-Mäuse nicht zu unterscheiden. Die Maus Nr.24 wurde 23 Wochen und Nr.28 29 Wochen nach dem Auftreten der Hautveränderungen euthanasiert. Bei der histologischen Untersuchung wurde bei

der Maus Nr.28 ein Papillom mit mittlerer Dysplasie und bei der anderen ein Papillom mit starker Dysplasie diagnostiziert (Tab.7).

#### 4.2.4. HPV8-E7 transgene Mäuse

Im Gegensatz zu den HPV8-E6 und -E6/E7 transgenen Mäusen zeigte keine einzige der 6 HPV8-E7-positiven F0-Mäuse irgendwelche Hautveränderungen. Es wurden 5 Linien etabliert, wovon zwei (Linie 29 und 9) bis zur F5 Generation in den FVB/N Hintergrund zurück gekreuzt wurden. Die Mäuse wurden über einen Beobachtungszeitraum von maximal 129 Wochen alle drei Tage auf Auffälligkeiten hin untersucht. Insgesamt zeigten auch die 119 HPV8-E7 positiven Mäuse der folgenden Generationen keinerlei Hautläsionen. Die positiven Tiere unterschieden sich auch nicht in der Sterblichkeitsrate von den negativen Geschwistertieren.

Um zu überprüfen, ob in den positiven Tieren auch E7 mRNA in der Haut vorhanden ist, wurde mittels Lightcycler eine quantitative RT-PCR durchgeführt. Die Präsenz der E7 mRNA konnte in allen Linien detektiert werden. In den verschiedenen Linien unterscheiden sich die Spiegel an E7 mRNA von 0,01 bis 0,07, wobei in Linie 9 die höchsten Werte gemessen wurden (Tab.8).

Nr.	9	10	14	29	57
Gen.	F0	F0	F0	F0	F0
Hintergr.	(DBA/BL6)	(DBA/BL6)	(DBA/BL6)	(DBA/BL6)	(DBA/BL6)
<b>E7</b>	0,07±0,03	0,01±0,01	0,02±0,01	0,03±0,02	0,03±0,02

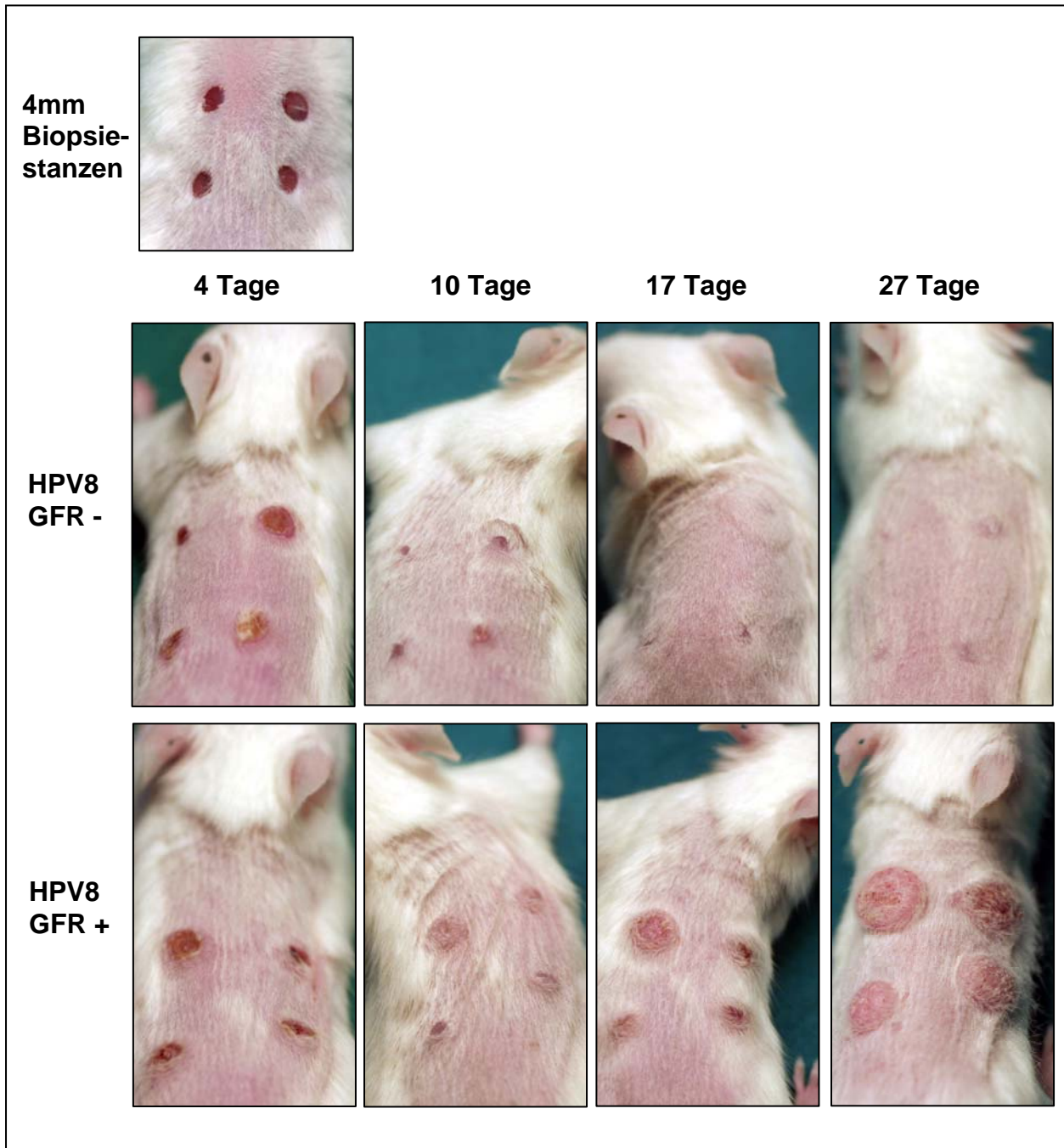
**Tab.8 Expressionsspiegel des E7 Gens in der Haut von HPV8-E7 transgenen Mäusen, die mit  $\beta$ -aktin mRNA Spiegeln abgeglichen wurden.** Es wurden zwei unabhängige Extraktionen von verschiedenen Proben mit Echtzeit RT-PCR analysiert.

### 4.3. Wundheilungsexperimente mit HPV8 transgenen Mäusen

Aufgrund unserer Beobachtungen, dass die Hautläsionen meistens zuerst an Stellen auftraten, an denen sich die Mäuse gekratzt haben, wurden den Mäusen im Alter von 4 Wochen, wenn sie noch keine spontanen Hautveränderungen aufweisen, mit Biopsiestanzen 4mm große Wunden gesetzt. Nach etwa 10 Tagen waren die Wunden bei den HPV8-negativen Geschwistertieren schon fast verheilt, wohingegen bei den HPV8-GFR positiven Mäusen die Papillomatose langsam begann (Abb.22). Nach 17 Tagen waren die Hautveränderungen der Transgen-positiven Tiere deutlich sichtbar und nach 27 Tagen prominent. Die Papillomatose ließ sich somit mit einer Wunde von 4mm Durchmesser in HPV8-GFR positiven Mäusen gezielt induzieren. Insgesamt wurden 26 Tiere mit 4mm Biopsiestanzen verwundet, wovon alle 14 positiven Tiere Hautveränderungen an der Stelle der Wunde entwickelten und 12 negative Tiere verheilten.

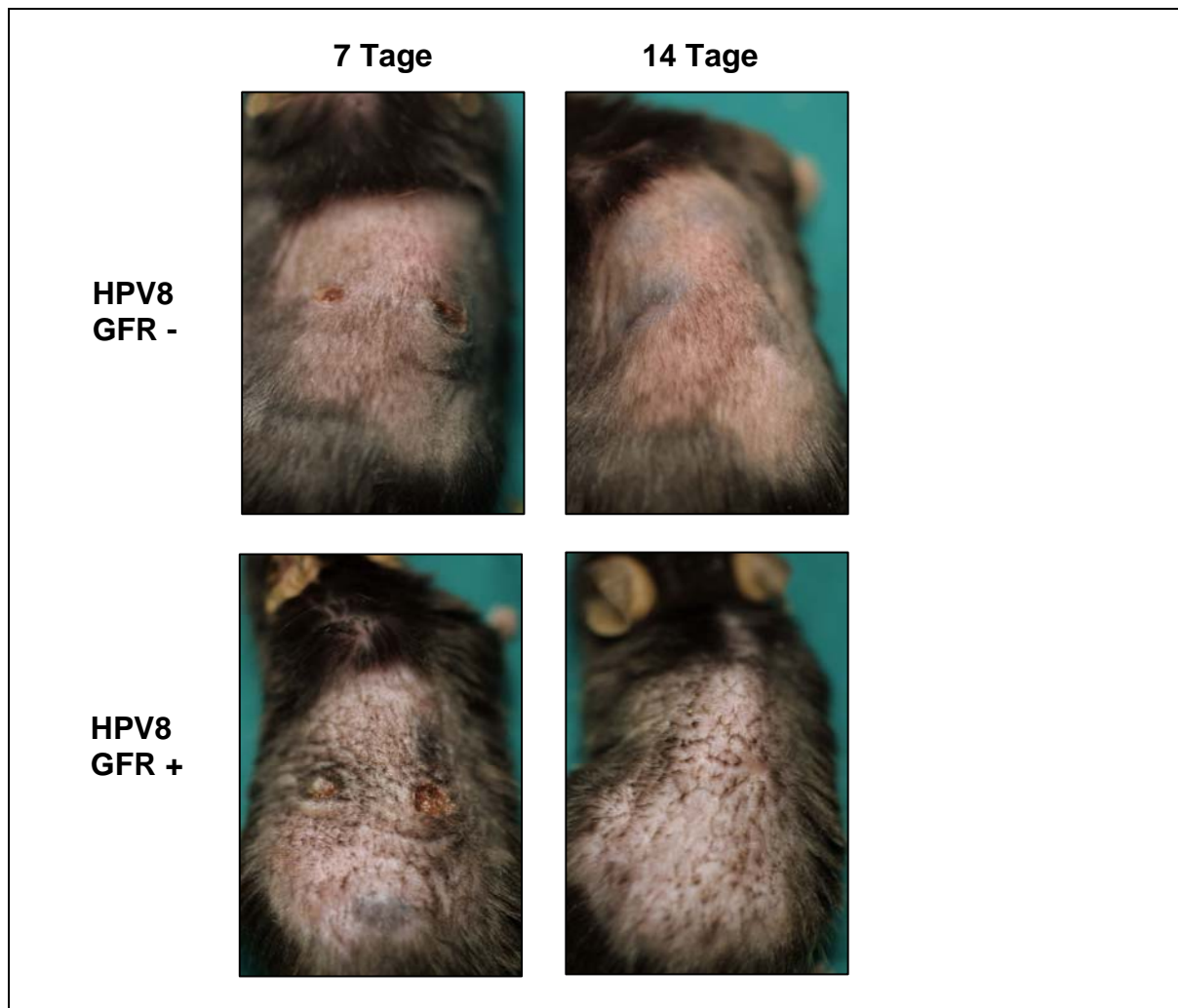
Dieselben Versuche wurden auch mit HPV8-GFR Tieren durchgeführt, die in den BL6 Hintergrund gekreuzt worden waren. Es wurden bei 9 Mäusen 4mm große Wunden gesetzt und keines der 6 HPV8-positiven Tiere bildete Papillome aus. Die Wunden der positiven Tiere verheilten genauso schnell wie die der drei negativen Geschwistertiere (Abb.23).

Bei sechs 5 Wochen alten HPV8-E6 transgenen Mäusen führte die Verwundung in allen Fällen zur Induktion der Papillomatose. Im Gegensatz dazu entwickelte keine der 5 verwundeten HPV8-E7 Mäuse Hautläsionen.



**Abb.22 Verwundung von HPV8-GFR Mäusen.** HPV8-GFR positive FVB/N Mäuse und negative Geschwistertiere wurden im Alter von 4 Wochen mit 4mm Biopsiestanzen verwundet. Nach 4 Tagen ist eine deutliche Schorfbildung sowohl bei der positiven als auch bei der negativen Maus sichtbar. Nach 10 Tagen war die Wunde bei dem negativen Tier gut verheilt, aber bei dem positiven Tier ging sie langsam in ein Papillom über. Nach 17 Tagen ist die Induktion der Papillomatose in der positiven Maus ausgeprägt, und nach 27 Tagen prominent.



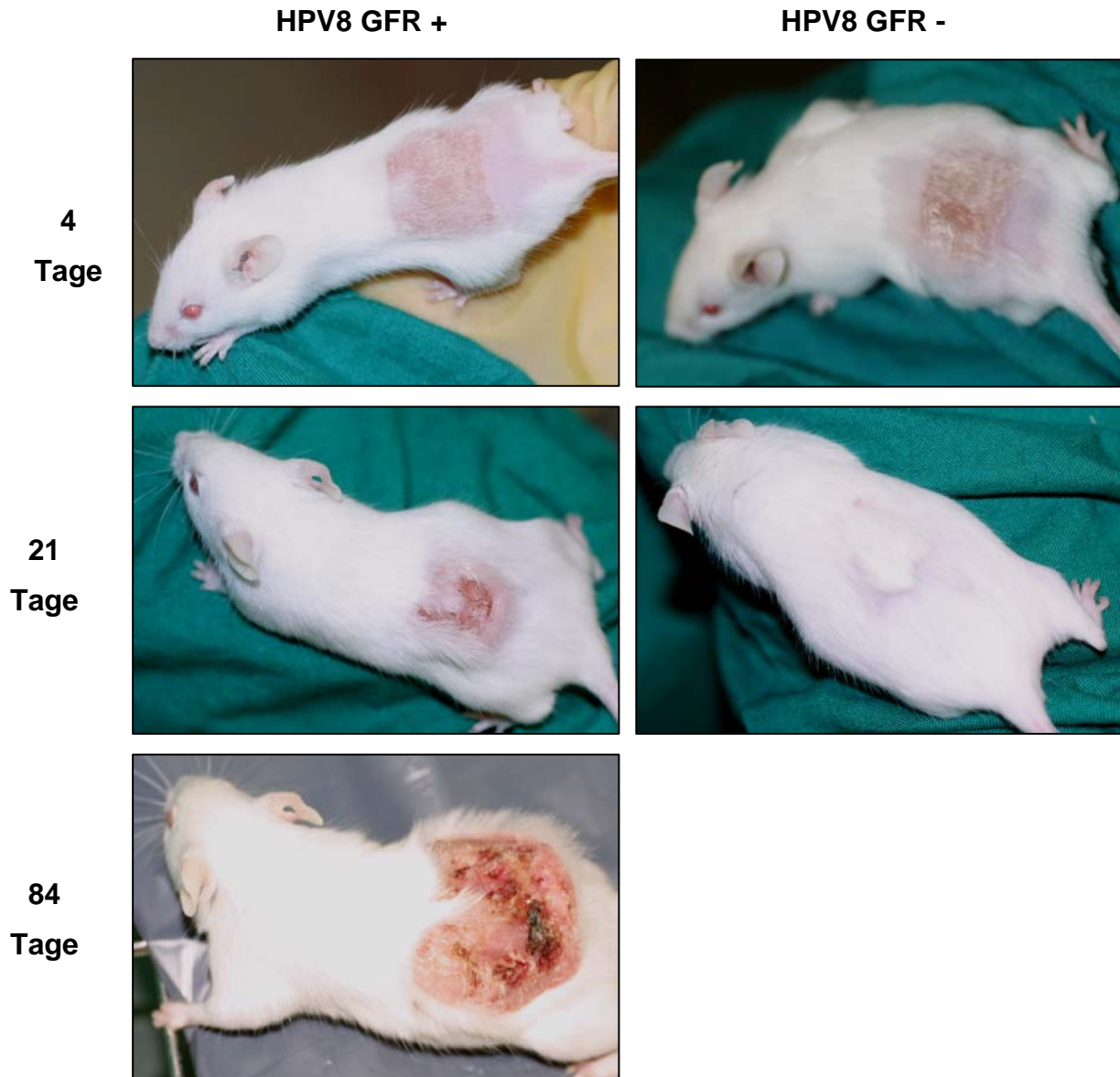


**Abb.23 Verwundung von HPV8-GFR BL6 Mäusen.** HPV8-GFR positive BL6 Mäuse und negative Geschwistertiere wurden im Alter von 7 Wochen mit 4mm Biopsiestanzen verwundet. Nach 7 Tagen ist eine deutliche Schorfbildung sowohl bei der pos. Als auch bei der negativen Maus sichtbar. Nach 14 Tagen war die Wunde bei beiden Tieren komplett verheilt.

#### 4.4. Bestrahlung der HPV8 transgenen Mäuse mit UV-Licht

Um einen möglichen Synergismus von HPV und UV-Licht bei der Hautkarzinogenese zu untersuchen, sollten HPV8 transgene Mäuse mit verschiedenen Dosen von UVA und UVB bestrahlt werden. Ehe mit den eigentlichen Bestrahlungsexperimenten begonnen werden konnte, wurde die minimale erythemale Dosis (MED) bestimmt. Die Dosis sollte so gewählt werden, dass ein Sonnenbrand nach der Bestrahlung sichtbar wurde. Dafür wurden HPV8 Transgen-negative Tiere mit verschiedenen Dosen von UVA (2,5 – 12J/cm<sup>2</sup>) und UVB (0,25 – 1J/cm<sup>2</sup>) bestrahlt. Bei einer Bestrahlungsintensität von 12J/cm<sup>2</sup> UVA konnte nach 24 Stunden eine leichte Rotfärbung der Haut wahrgenommen werden. Für UVB reichten 0,5J/cm<sup>2</sup> aus, um einen Sonnenbrand zu verursachen.

Um zu überprüfen, ob die Sonnenlicht Exposition in jungem Alter vermehrt zur Entwicklung von aktinischen Keratosen und damit assoziierten Hauttumoren später im Leben beiträgt (Bouwes Bavinck und Berkhout, 1997), wurden 3 Wochen alte HPV8-GFR, -E6 und -E7 Mäuse, die noch keine Hautveränderungen zeigten, gleichzeitig mit UVA und UVB bestrahlt. Die HPV8-GFR FVB/N Mäuse wurden im ersten Versuchsanlauf mit einer Dosis von 10J/cm<sup>2</sup> UVA und 1J/cm<sup>2</sup> UVB bestrahlt. Nach 4 Tagen war ein deutliches Erythem auf der bestrahlten Fläche zu erkennen (Abb.24), das nach ca. 3 Wochen bei den HPV8 negativen Geschwistertieren völlig verheilte. Bei den HPV8 positiven Tieren verheilte das Erythem nur ansatzweise und ging anschließend nach etwa 2-3 Wochen in ein Papillom über, dass die gesamte bestrahlte Fläche einnahm. Nach 12 Wochen hat sich das Papillom über die Grenzen der bestrahlten Fläche ausgebreitet.



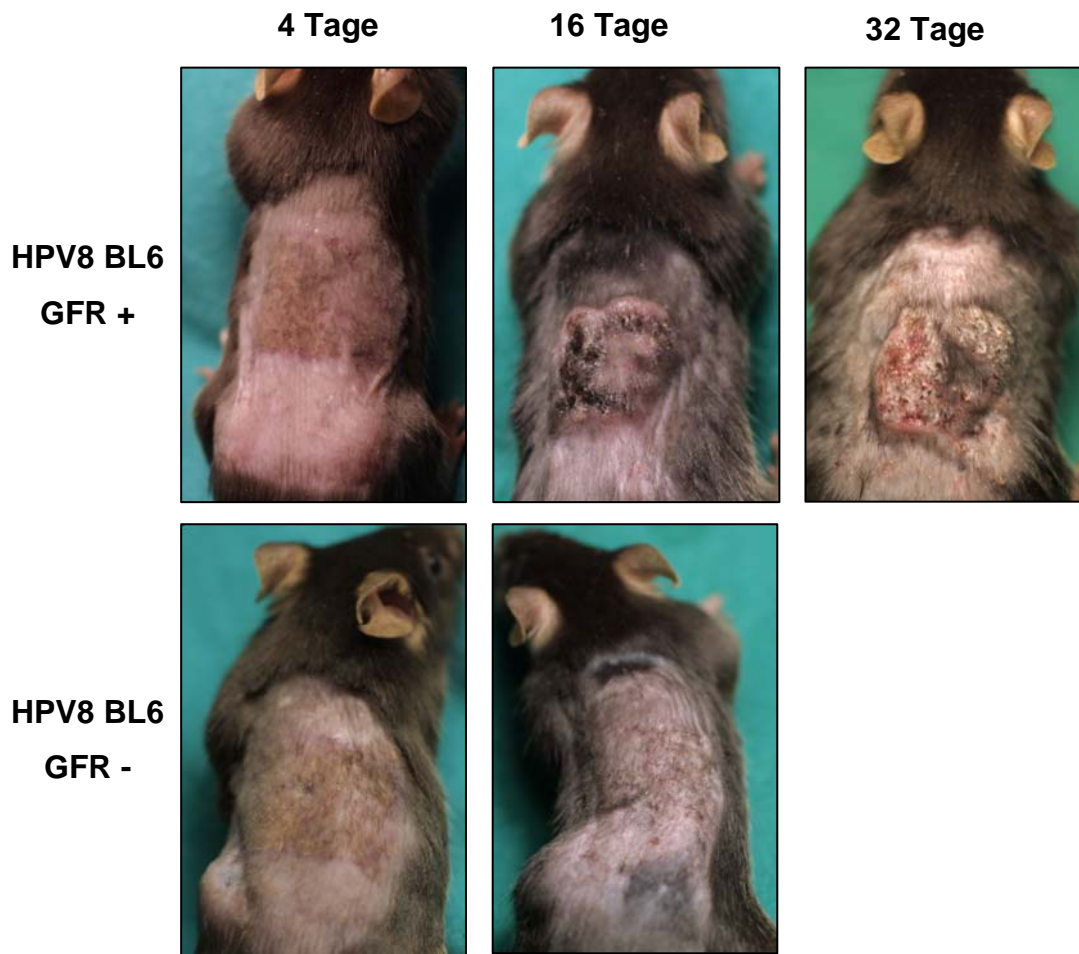
**Abb.24 UVA/B Bestrahlung von HPV8-GFR FVB/N Mäusen.** HPV8-GFR positive Mäuse und negative Geschwistertiere wurden im Alter von 3 Wochen mit  $10\text{J}/\text{cm}^2$  UVA und  $1\text{J}/\text{cm}^2$  UVB bestrahlt. Nach drei Wochen ist bei dem transgen-positiven Tier ein Papillom entstanden, wo hingegen beim HPV8 negativen Geschwister tier die bestrahlte Fläche vollkommen verheilte.

Eine einzige Behandlung mit UV-Licht war somit ausreichend, um in den HPV8-GFR positiven FVB/N Mäusen nach 3 Wochen Papillomatose zu induzieren. Die Dosis, die ausreicht um die Entstehung von Papillomen zu induzieren, lag bei  $2,5\text{J}/\text{cm}^2$  UVA und  $0,25\text{J}/\text{cm}^2$  UVB. Bei einer Dosis von  $1\text{J}/\text{cm}^2$  UVA und  $0,1\text{J}/\text{cm}^2$  UVB entwickelten sich keine Papillome auf der bestrahlten Fläche (Tab.9).

HPV8-GRF pos.(+) o. neg.(-)	UV-Dosis J/cm <sup>2</sup> UVA/UVB	Alter (Tage)	Anzahl	Tumoren bei x/y	FVB/N o. BL6
+	1/ 0,1	37	3	0/3	FVB/N
-	1/ 0,1	37	1	0/1	FVB/N
+	2,5/ 0,25	37	6	5/6	FVB/N
-	2,5/ 0,25	37	2	0/2	FVB/N
+	5/ 0,5	70	3	3/3	FVB/N
-	5/ 0,5	70	1	0/1	FVB/N
+	10/1	24	12	12/12	FVB/N
-	10/1	24	4	0/4	FVB/N
+	10/1	56	9	9/9	BL6
-	10/1	56	3	0/3	BL6
+	0,36 UVB	28	6	6/6	FVB/N
-	0,36 UVB	28	2	0/2	FVB/N
+	10 UVA	28	6	0/6	FVB/N
-	10 UVA	28	2	0/2	FVB/N

**Tab.9 Papillomatose induzierende Wirkung unterschiedlicher UVA/B Dosen in HPV8-GFR transgenen Mäusen.**

Um die Rolle des genetischen Hintergrunds der HPV8-GFR Mäuse bei der Induktion der Papillomatose zu testen, wurden dieselben Bestrahlungs-Versuche auch mit BL6 Tieren durchgeführt. Die Papillomatose ließ sich wie in der Linie 9 FVB/N in den HPV8-GFR transgenen BL6 Mäusen mit einer einzigen Behandlung induzieren. Bei allen positiven Mäusen entstand nach 16 Tagen auf der bestrahlten Fläche ein Papillom wohingegen die bestrahlte Fläche der HPV8 negativen Tiere verheilte (Abb.25, Tab.9).



**Abb.25 UVA/B Bestrahlungen von HPV8-GFR BL6 Mäusen.** HPV8-GFR positive BL6 Mäuse und negative Geschwistertiere wurden im Alter von 8 Wochen mit  $10\text{J}/\text{cm}^2$  UVA und  $1\text{J}/\text{cm}^2$  UVB bestrahlt. Nach 4 Tagen ist ein deutlicher Sonnenbrand sichtbar der nach 16 Tagen bei den transgen negativen Tieren fast komplett verheilte, jedoch bei den positiven zu einem Papillom übergang.

Ferner wurden HPV8-GFR FVB/N Mäuse und negative Geschwistertiere mit  $0,36\text{J}/\text{cm}^2$  UVB bestrahlt, um zu testen, ob die Bestrahlung mit UVB alleine Papillomatose induzieren kann. Nach 6 Wochen entstanden 2-3 vereinzelte Papillome innerhalb der bestrahlten Fläche, die sich dann diffus weiter ausbreiteten (Tab.9). Die HPV8-GFR FVB/N Mäuse wurden außerdem nur mit UVA bestrahlt, um zu überprüfen, ob die UVA Strahlung für die Initiation der Papillomatose ausreicht. Die bestrahlten Flächen wiesen nach 8 Wochen Beobachtungszeit keine Papillome auf. Danach entstanden die üblichen spontanen Papillome sowohl in den bestrahlten als auch in den unbestrahlten HPV8 positiven Geschwistertieren.

Die Induktion der Papillomatose über die gesamte bestrahlte Fläche wurde auch bei bestrahlten HPV8-E6 positiven Mäusen beobachtet. Bei den HPV8-E7 positiven Mäusen aus drei verschiedenen Linien (Linie 9, 29, 57) hatte die UVA und UVB Bestrahlung mit  $10\text{J}/\text{cm}^2$  bzw.  $1\text{J}/\text{cm}^2$  keine Papillom induzierende Wirkung. Es entstanden keinerlei Hautläsionen, das Erythem verheilte genauso schnell wie bei den negativen Geschwistertieren (Tab.10).

HPV8-E6 o. E7 Mäuse	UV-Dosis $\text{J}/\text{cm}^2$ UVA/UVB	Alter (Tage)	Anzahl	Tumoren bei x/y
E6	5/ 0,5	46	3	3/3
-	5/ 0,5	46	1	0/1
E6	10/1	37	12	12/12
-	10/1	37	4	0/4
E7	10/1	67	9	0/9
-	10/1	67	3	0/3
E6	0,36 UVB	71	3	3/3
-	0,36 UVB	71	1	0/1

**Tab.10 Papillomatose induzierende Wirkung unterschiedlicher UVA/B Dosen in HPV8-E6 und -E7 transgenen Mäusen.**

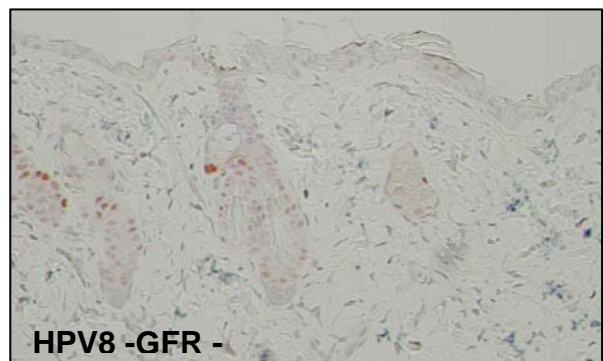
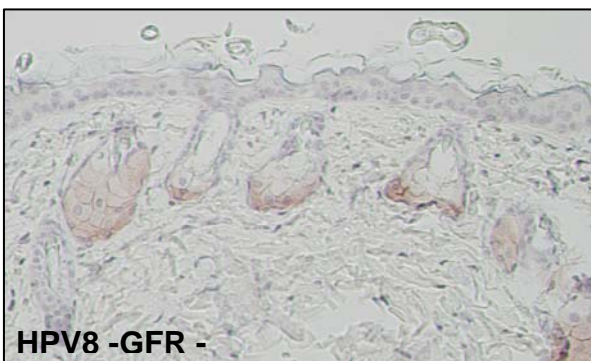
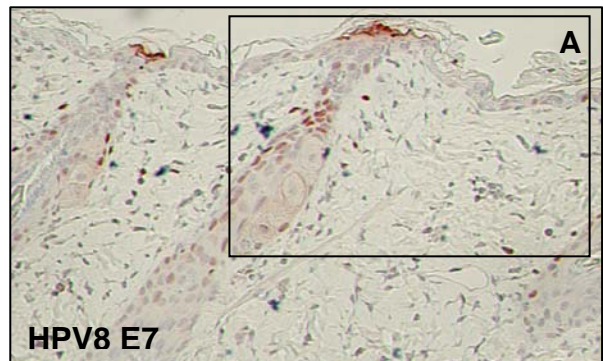
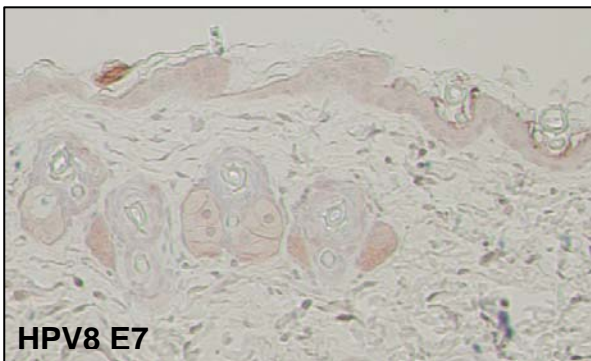
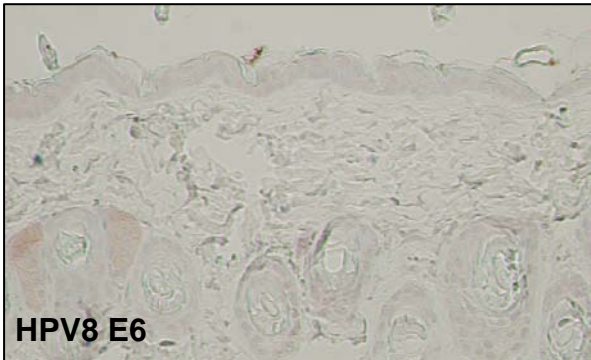
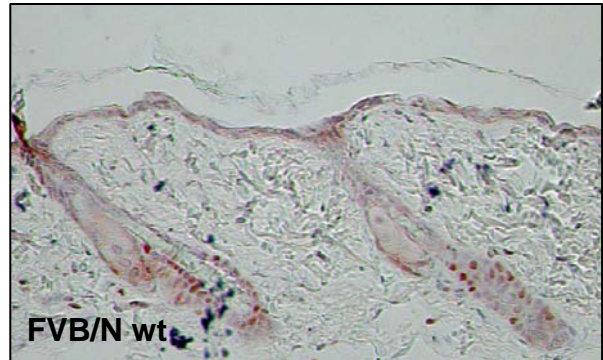
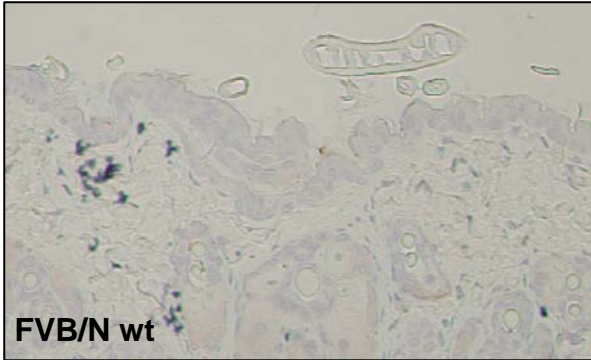
Spontane und durch UVA und UVB Bestrahlung induzierte Papillome derselben Maus wurden histologisch untersucht und miteinander verglichen. Der Vergleich von insgesamt 5 verschiedenen, UV-induzierten Papillomen mit spontanen Hautveränderungen ergab in drei Fällen eine völlige Übereinstimmung. Sie wurden als Papillome ohne Dysplasie eingestuft. In einem Fall war die UV-induzierte Hautläsion ein Papillom mit leichter Dysplasie und die spontane Veränderung ein Papillom. In einem weiteren Fall zeigt die spontane Hautveränderung einen höheren Dysplasie Grad als die UV-induzierte.

#### 4.4.1. p53 Färbungen UV bestrahlter Haut von HPV8 transgenen Mäusen

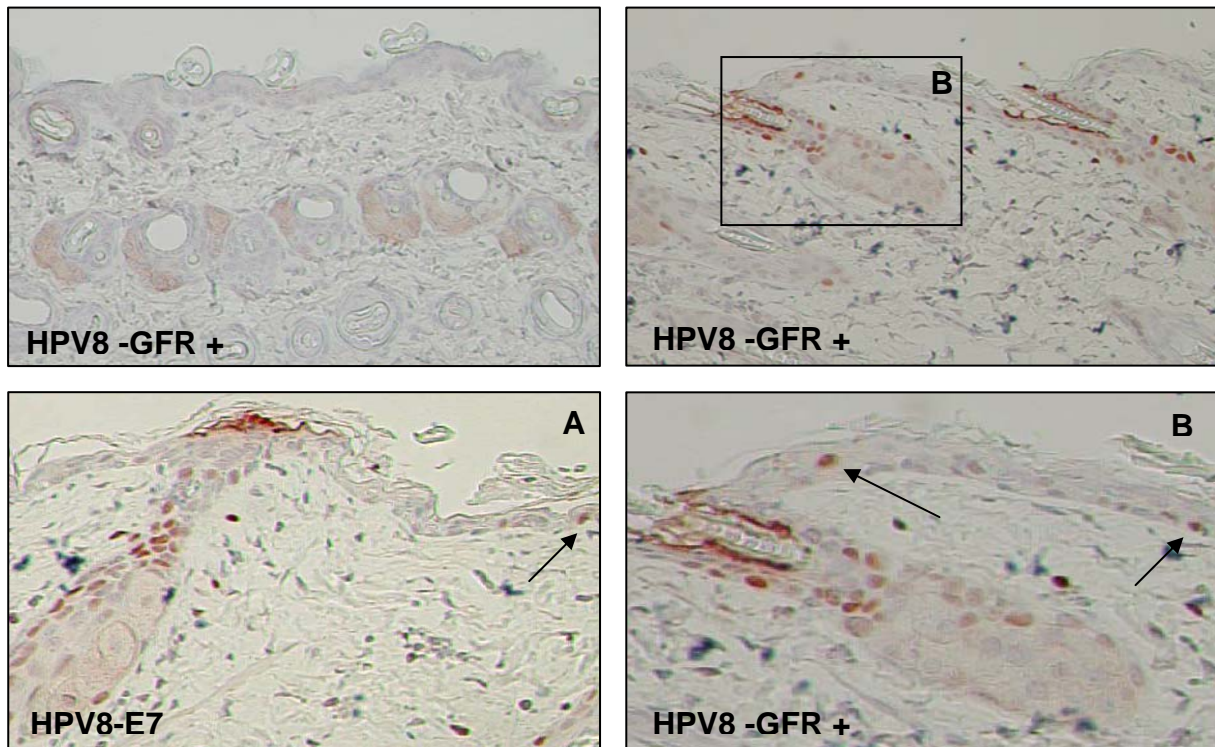
Auf Grund der Tatsache, dass die E6 Proteine der kutanen HPV Typen p53 nicht degradieren, sollte untersucht werden, ob die frühen Gene von HPV8 auf indirekte Weise in der Lage sind, die Expression von p53 zu inhibieren. HPV8-GFR FVB/N Mäuse und negative Geschwistertiere wurden mit einer Dosis von  $10\text{J}/\text{cm}^2$  UVA und  $1\text{J}/\text{cm}^2$  UVB bestrahlt. Nach 24 Stunden wurde die bestrahlte Haut entnommen, in Formalin eingelegt und am darauf folgenden Tag in Paraffin eingebettet. Als Positivkontrolle wurde eine FVB/N Wildtyp Maus verwendet, in der sich die p53 Expression durch Bestrahlung mit UVA und UVB erwartungsgemäß induzieren ließ. Auch in der Epidermis der HPV8-E6 und -E7 transgenen Tiere sind die Kerne der Epidermiszellen nach UV-Bestrahlung p53 positiv. Zwischen der Kontrolle und den transgenen Tieren ist kein wesentlicher Unterschied in der Intensität der Färbung zu erkennen. Die Kerne der UV A/B bestrahlten Epidermis sind zu gleichen Anteilen sowohl in der Wildtyp Maus als auch in den transgenen Mäusen p53 positiv. Der direkte Vergleich zwischen bestrahlter Haut von HPV8-GFR positiven und negativen Mäusen zeigt ebenfalls keine Unterschiede in der Intensität der Färbung (Abb.26).

UV -

UV +





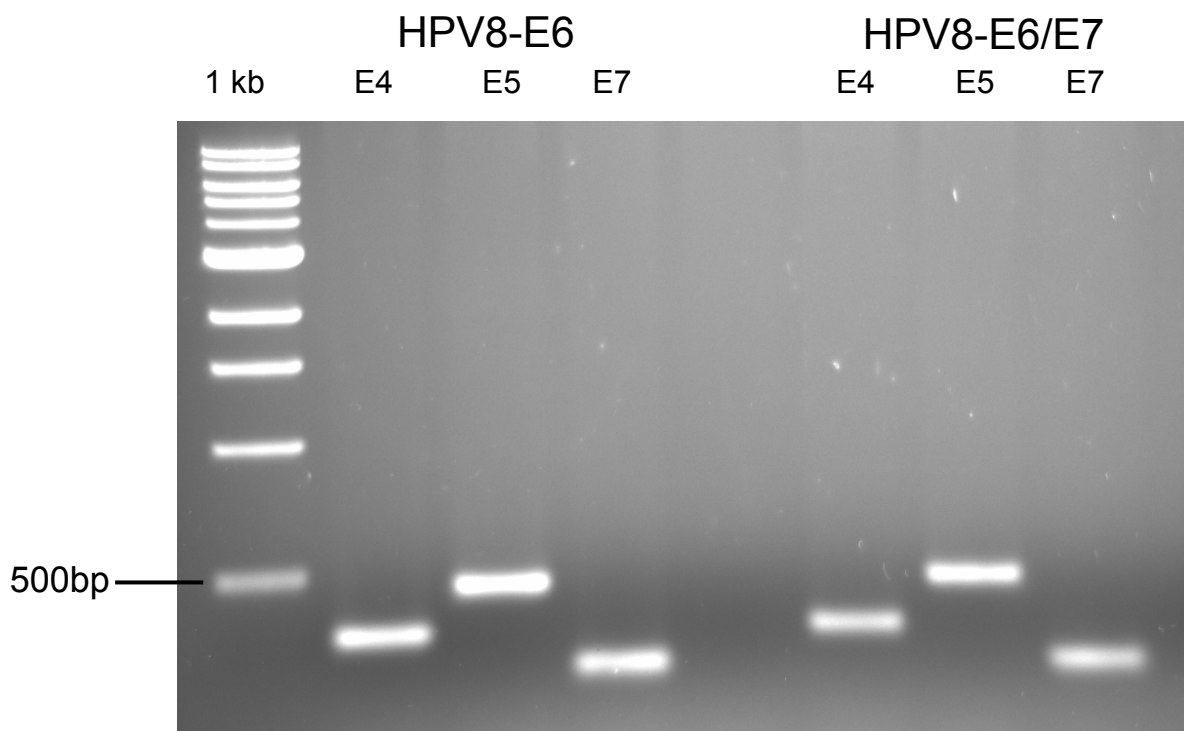


**Abb.26 Immunhistochemischer Nachweis von p53 in UV bestrahlter und unbestrahlter Haut HPV8 transgener Tiere.** Schnitte der UV bestrahlten und unbestrahlten Haut eines Wildtyp Tieres (FVB/N wt) und HPV8 transgener Mäuse wurden immunhistochemisch mit einem polyklonalen, gegen p53 gerichteten Antikörper inkubiert und anschließend gefärbt. Alle Schnitte der unbestrahlten Haut zeigen erwartungsgemäß keine Expression von p53, wohingegen in den bestrahlten Schnitten p53 in den Kernen der Epidermiszellen sichtbar ist. Bei den einzelnen transgenen Tieren und dem Wildtyp sind gleichwertige Spiegel an p53 in der bestrahlten Haut erkennbar (Vergrößerung 40x). **A, B** Ausschnitte in denen p53 positive Kerne der interfollikulären Epidermis zu erkennen sind (Pfeile).

#### 4.5. DNA Sequenzanalysen der Gene p53 und H-ras aus HPV8 Tumoren

##### 4.5.1. p53-Mutationsanalyse von HPV8-E6 und E6/E7 Tumoren

In menschlichen Hauttumoren wurden häufig Mutationen in den Exons 5, 7 und 8 des p53 Gens gefunden (Basset-Seguín *et al.*, 1994). Aufgrund dieser Tatsache sollten die Tumoren der HPV8-E6 Mäuse auf typische Punktmutationen in sogenannten Hot-Spots in den Exons 4-9 untersucht werden. Die DNA wurde aus zwei Papillomen und aus zwei Papillomen mit leichter bzw. mäßiger Dysplasie von HPV8-E6 Mäusen sowie aus einer schweren Dysplasie einer HPV8-E6/E7 Maus extrahiert. Von jeder Probe wurden die p53 Exons 4, 5, 7 und 8/9 amplifiziert und sequenziert. Stellvertretend ist in Abb.27 die gelelektrophoretische Überprüfung der Amplifikate der Exons 4, 5 und 7 von zwei Tumoren dargestellt.



**Abb. 27. Gelelektrophoretische Überprüfung der p53-spezifischen PCR der Exons 4, 5 und 7.** Die Banden entsprechen der zu erwartenden Größe von 352 bp für Exon 4 (E4), 469 bp für Exon 5 (E5) und 271 bp für Exon 7 (E7). Bei der HPV8-E6 Tumorprobe handelte es sich um ein Papillom mit mittlerer Dysplasie und der Hauttumor der HPV8-E6/E7 Maus wurde als Papillom mit schwerer Dysplasie eingestuft.

In keinem Tumorgewebe konnten p53 Mutationen in den untersuchten Exons identifiziert werden. In den Elektropherogrammen konnte auch kein Hinweis für eine Heterozygotie gefunden werden, die vorkommt, wenn nur ein Allel des Gens mutiert ist oder wenn die DNA aus inhomogenem Tumorgewebe extrahiert wurde. Es wurden allerdings eine Punktmutation an Position 82469 und zwei Punktmutationen an Position 84444 (AN: AL731687) festgestellt. Diese drei Mutationen liegen in den Introns des p53 Gens.

#### **4.5.2. H-ras Mutationsanalyse der PEK von HPV8-GFR und HPV8-E6 Mäusen**

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass in Hauttumoren in allen drei Genen der ras Familie (H-ras, K-ras und N-ras) Mutationen vorkommen (Ananthaswamy und Pierceall, 1990). Die meisten ras Mutationen in humanen Tumoren liegen in den Codons 12, 13 und 61 (Bos, 1989). Bei Mäusen, die mit DMBA behandelt wurden, konnten in 95%-100% der entstandenen Papillome Mutationen im Codon 61 des H-ras Gens von CAA -> CTA gefunden werden (Bailleul *et al.*, 1989; Andrews *et al.*, 1990; Gill *et al.*, 1992).

Um H-ras Mutationen in den Tumoren der HPV8 transgenen Mäuse zu identifizieren, wurden die H-ras Exons 2 und 3 von genomischer Maus DNA aus PEK und benignen Tumoren amplifiziert und sequenziert. Insgesamt wurden jeweils 2 Tumorproben von 10 PEK von HPV8-GFR Mäusen untersucht und in 4 konnte eine Punktmutation von CAA zu CTA in Codon 61 festgestellt werden. Bei zwei der vier Mäuse war ein mutiertes Codon 61 nur in einer Tumorprobe nachweisbar (Tab.11). Im Elektropherogramm (Abb.28, B) ist die wt Sequenz des Codons 61 in einem geringeren Anteil als die Punktmutation zu erkennen.

Außerdem wurden noch 6 Papillome (zwei Papillome mit leichter, zwei mit mäßiger, zwei mit schwerer Dysplasie) und 2 PEK von HPV8-E6 Mäusen auf H-ras Mutationen untersucht. In keiner dieser Proben wurden Mutationen in den Codons 12, 13 oder 61 gefunden.

Mausnr.	Codon 12+13	Codon 61
9-3-3-10-9-2 Tumorprobe 1 Tumorprobe 2	wt wt	CAA → CTA wt
9-3-8-2 Tumorprobe 1 Tumorprobe 2	wt wt	CAA → CTA wt
85-25-12	wt	wt
9-3-6-12	wt	wt
9-30-3-3	wt	CAA → CTA
9-3-6-4	wt	wt
85-1-6-65-14	wt	wt
9-3-6-4-22-11	wt	wt
85-25-7-7	wt	CAA → CTA
9-3-3-10-8-5	wt	wt

Tab.11 Sequenzanalyse der Codons 12, 13 und 61 des H-ras Gens von 10 PEK von HPV8-GFR Mäusen.

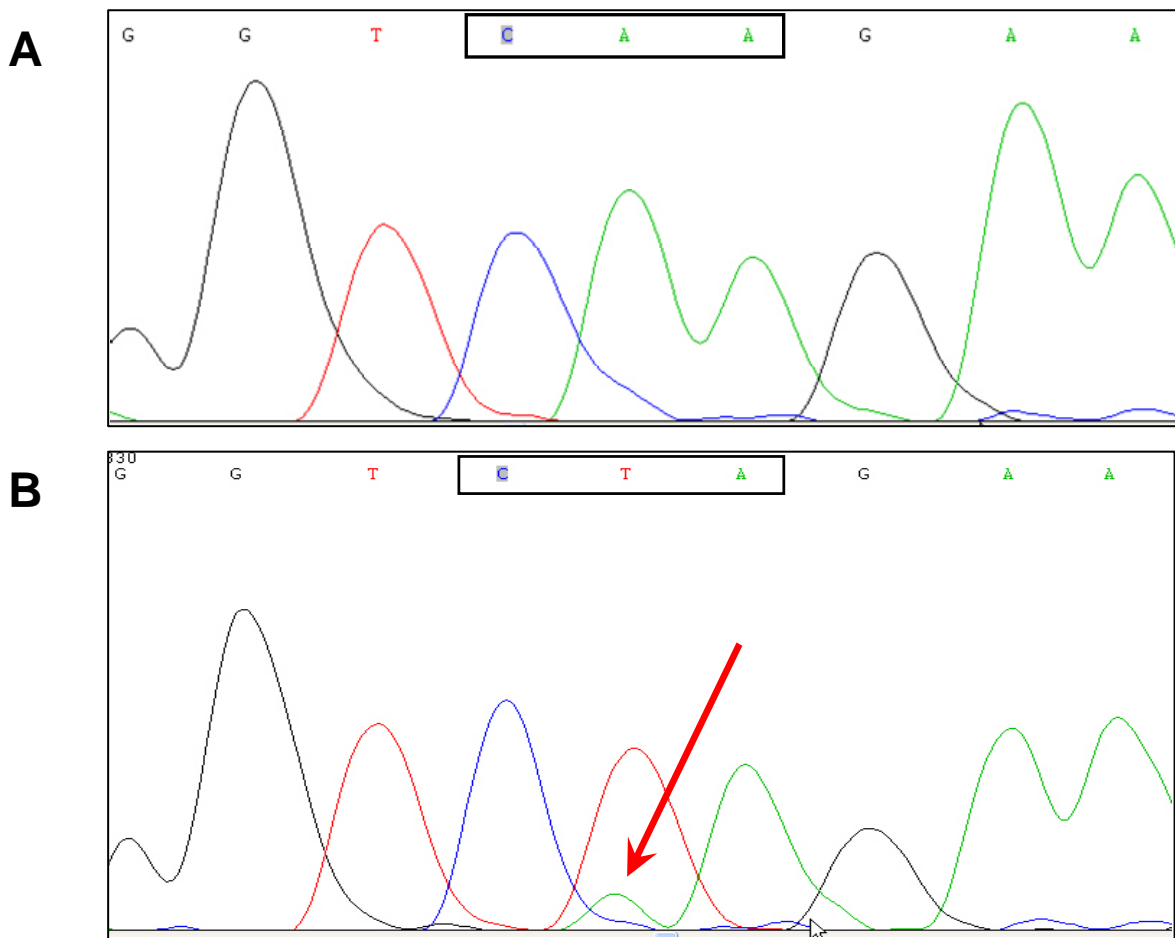


Abb.28 Ausschnitt der Elektropherogramme des Codons 61 des H-ras Gens. (A) Codon 61 Wildtyp Sequenz (CAA) und (B) mit Punktmutation nach CTA. Die wt Sequenz ist in einem geringeren Anteil im Tumorgewebe enthalten (roter Pfeil).

## 5. Diskussion

Epidemiologische Studien konnten zeigen, dass  $\beta$ -HPV auch in NMHK der Normalbevölkerung und vermehrt bei immunsupprimierten Organ-Transplantatempfängern vorkommen und nicht nur auf EV-Patienten begrenzt sind. Die Hochrisiko  $\beta$ -HPV Typen 5 und 8 dominieren zwar nicht in NMHK der nicht-EV Patienten und liegen in geringer Kopienanzahl vor (Pfister, 2003), jedoch konnte das Vorhandensein von Antikörpern gegen HPV8 Kapside mit PEK (Feltkamp *et al.*, 2003; Masini *et al.*, 2003) und mit der Entwicklung prämaligener, aktinischer Keratosen (Bouwes Bavinck *et al.*, 2000) assoziiert werden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass HPV8 an der Entstehung von NMHK in der Normalbevölkerung beteiligt ist.

Durch die Etablierung eines transgenen Mausmodells mit der gesamten frühen Region von HPV8 konnten wir zeigen, dass die Expression viraler Gene *in vivo* für die Entwicklung von NMHK in Mäusen ausreichend ist (Schaper, 2003). Die HPV8 Gene stehen unter der Kontrolle des Keratin-14 Promotors, der eine gezielte Expression dieser Gene im Stratum basale und Stratum spinosum der adulten Haut und sich entwickelnden Haarfollikeln von Mäuseembryos erlaubt (Byrne *et al.*, 1994; Helfrich *et al.*, 2004; Sethi and Palefski, 2004). Die HPV8-transgenen Mäuse wurden in den FVB/N und BL6 Hintergrund gekreuzt. FVB/N-Mäuse wurden ausgewählt, da vorherige Studien zeigten, dass dieser Inzucht-Mausstamm eine Prädisposition zur epidermalen Karzinogenese aufweist (Hennings *et al.*, 1993; Brown und Balmain, 1995; Coussens *et al.*, 1996). Die frühen HPV Gene werden als polycistronische mRNAs transkribiert und anschließend alternativ gespleißt (Fuchs and Pfister, 1994; Haller *et al.*, 1995). Die relativen Expressions-Spiegel der HPV8 Gene E2, E6 und E7 waren in den drei unabhängig erzeugten Linien 9, 85 und 61 ähnlich, ebenso die absoluten Spiegel relativ zu der Menge an  $\beta$ -Aktin RNA. Diese Resultate stehen im Gegensatz zu den Keratin-14 Promotor HPV16 transgenen Mäusen, in denen E6 und E7 viel stärker als E2 exprimiert werden (Sethi and Palefski, 2004). Die ähnliche Expression der HPV8 Gene in den Linien 9, 85 und 61 sowohl im FVB/N als auch im BL6 Hintergrund entspricht einem vergleichbaren Auftreten von Papillomen und Dysplasien. Während Tumore nie in den transgen-negativen Mäusen beobachtet wurden, traten Papillome singularär und zu 80% multifokal bei nahezu allen (99,4%) HPV8-positiven Mäusen auf, wenn sie über einen Zeitraum von 120 Wochen beobachtet wurden. Das multifokale Auftreten der Papillome weist darauf hin, dass sie aus unabhängigen Vorläuferzellen entstanden sind. Etwa 20% der Papillome

zeigten schließlich Anzeichen einer milden oder starken Dysplasie, wie gestörte Schichtung der Epidermis, suprabasale und atypische Mitosefiguren, Hyperchromatose und Anisonukleose. Das regelmäßige Auftreten der Papillomatose, gefolgt von einer Weiterentwicklung zur Dysplasie in einem großen Anteil der HPV8-transgenen FVB/N und BL6 Mäuse ist bemerkenswert und steht im Gegensatz zu den meisten anderen HPV transgenen Mäusemodellssystemen, die in den letzten 14 Jahren entwickelt wurden, um HPV-assoziierte Krankheiten in vivo zu erforschen. Diese Modelle verwenden verschiedene Keratin Promotoren, um die HPV Onkoproteine zielgerichtet in unterschiedlichen Epithelschichten zu exprimieren. Abgesehen von zwei transgenen Mausmodellen für das kutane HPV1 und das EV-assoziierte HPV38-E6/E7 wurden die meisten Modelle mit genitalen HPV-Typen etabliert (Tab.12). Die frühe Genomregion von HPV1, das gutartige Plantarwarzen verursacht, führte unter der Kontrolle des Keratin-6 Promotors in CBA/C57B1 Mäusen nur zu einer vorübergehenden Hyperproliferation (Tinsley *et al.*, 1992). Transgene FVB/N Mäuse mit HPV38-E6/E7 unter der Kontrolle des bovinen K10 Promotors entwickelten spontan keine Tumoren. Allerdings führte die Behandlung von HPV38 Mäusen mit dem Karzinogen DMBA und dem Tumorpromotor TPA zu einer höheren Inzidenz an Papillomen, Keratoakanthomen und PEK als in nicht transgenen Tieren (Dong *et al.*, 2005). Transgene IRCxFVB Mäuse mit den E6/E7 Genen des mit Zervix Karzinom assoziierten HPV18 unter der Kontrolle des Keratin-1 Promotors entwickelten Papillome, die bis zu 12 Monate gutartig blieben (Greenhalgh *et al.*, 1994). Das vom K14-Promotor regulierte E6 Onkogen des *Mastomys natalensis* PV, das Keratoakanthome in seinem natürlichen Wirt verursacht, störte nicht die normale Differenzierung der Haut an sich, aber begünstigte die bösartige Weiterentwicklung von chemisch induzierten Tumoren (Helfrich *et al.*, 2004). Nur die hohe Penetranz von Papillomatose und Dysplasie in den transgenen K14-HPV16 Mäusen (Arbeit *et al.*, 1994) ist mit den HPV8 Transgenen vergleichbar.

HPV-Typ /Gen	Promotor	Expression	Phänotyp	Referenz
HPV1 / komplette frühe Region	boviner Keratin 6	suprabasale Expression in Epidermis	transiente Hyperproliferation der Epidermis und abnorme Differenzierung der Keratinozyten	Tinsley <i>et al.</i> , 1992
HPV16 / komplette frühe Region	humaner Keratin 14	basal in Plattenepithelien	Hyperplasie, Papillomatose und Dysplasie an epidermalen und mukosalen Lokalisationen; PEK nach 12 Monaten	Arbeit <i>et al.</i> , 1994
HPV16 / E6/E7	boviner Keratin 6	suprabasale Expression in Epidermis	epidermale Dysplasie, Hyperkeratose und fokale Parakeratose	Searle <i>et al.</i> , 1994
HPV16 / E6/E7	boviner Keratin 10	suprabasale Expression in Epidermis	erhöhte Proliferationsrate der basalen und suprabasalen Keratinozyten, Papillombildung nach 14 Monaten	Auewarakul <i>et al.</i> , 1994
HPV16 / E6	humaner Keratin 14	basal in Plattenepithelien	epidermale Hyperplasie, Hyperproliferation, meistens maligne Haut Tumoren	Song <i>et al.</i> , 1999
HPV16 / E7	humaner Keratin 14	basal in Plattenepithelien	epidermale Hyperplasie und Hyperkeratose, meistens benigne Haut Tumoren	Herber <i>et al.</i> , 1996
HPV18 / E6/E7	humaner Keratin 1	basale und suprabasale Expression in Epidermis	Hyperproliferation, nach 12 Monaten Bildung von Papillomen	Greenhalgh <i>et al.</i> , 1994
MnPV / E6	humaner Keratin 14	basal in Plattenepithelien	keine spontanen Hautveränderungen, bevorzugte Bildung von PEK erst nach chemisch induzierter Mutagenese	Helfrich <i>et al.</i> , 2004
HPV8 / komplette frühe Region	humaner Keratin 14	basal in Plattenepithelien	Hyperplasie, Papillomatose, Dysplasie der Epidermis und Entwicklung von PEK	Schaper, 2003
HPV38 / E6/E7	boviner Keratin 10	suprabasale Expression in Epidermis	keine spontanen Hautveränderungen, bevorzugte Bildung von PEK erst nach chemisch induzierter Mutagenese	Dong <i>et al.</i> , 2005

**Tab.12: HPV E6/E7-exprimierende transgene Mausmodelle**

Plattenepithelkarzinome traten in 6% der in FVB/N zurück gekreuzten HPV8 transgenen Mäuse auf. Somit konnte gezeigt werden, dass die Expression eines EV-assoziierten HPV zur Krebsentwicklung führt ohne zusätzliche Behandlung durch physikalische oder chemische Karzinogene. Sowohl die HPV16 als auch die HPV8 transgenen BL6 Mäuse entwickelten keine PEK. Allerdings erlaubt die niedrige Anzahl an BL6 Mäusen, die bis jetzt analysiert werden konnten, noch keinen endgültigen Vergleich mit FVB/N hinsichtlich der Anfälligkeit für maligne Transformation. Die genauen Faktoren, die für die spezifische Empfindlichkeit zur malignen Progression der FVB/N Keratinozyten verantwortlich sind, müssen noch aufgeklärt werden. Bekannt ist allerdings, dass die Prädisposition zur malignen Entartung nicht dominant vererbt wird, denn Nachkommen von FVB/N-BL6 Kreuzungen haben eine niedrigere Frequenz bösartiger Konversion von Papillomen. Außerdem konnte durch Transplantation von Keratinozyten verschiedener Mausstämme (SENCARA/Pt, BALB/c, BL6 und FVB/N), die mit HPV16-E6/E7 Retroviren infiziert waren, gezeigt werden, dass FVB/N-Keratinozyten am häufigsten Karzinome in Nacktmäusen bildeten (Woodworth *et al.*, 2004). Somit liegt die Ursache für die höhere Suszeptibilität in den Keratinozyten selbst und wird nicht durch äußere Einflüsse verursacht. Durch die Induktion von Haut Tumoren in HPV8-Mäusen mit verschiedenen genetischen Hintergründen haben wir ein nützliches Modell um die Genetik der Prädisposition für Hautkrebs zu erforschen.

Es ist bemerkenswert, dass die HPV8 induzierte Karzinogenese trotz der relativ großen Mengen an E2 spezifischer mRNA stattfindet, ganz im Gegensatz zu den Ergebnissen der HPV16 transgenen Mäuse. Der selektive Vorteil des häufigen Verlustes von E2 in den zervikalen Karzinomen, die durch HPV16 oder 18 verursacht werden, wurde durch die Induktion der Seneszenz oder der Apoptose und durch eine E2 vermittelte Suppression des viralen E6/7 Promotors erklärt, die in den transgenen Mäusen allerdings nicht relevant ist (Tan *et al.*, 1994; Desaintes *et al.*, 1997; Wells *et al.*, 2000). Interessanterweise gehen Keratinozyten, die HPV8 E2 exprimieren, nicht in die Apoptose (Oldak *et al.*, 2004), was bedeuten könnte, dass die Expression zumindest keinen hemmenden Effekt auf die Karzinogenese hat.

Da die HPV8-GFR transgenen Mäuse alle frühen Gene von HPV8 gleichzeitig exprimieren, sollten im Rahmen dieser Dissertation die Gene auch einzeln im transgenen Mausmodell untersucht werden, um deren Rolle in der Karzinogenese zu charakterisieren. Es wurden HPV8-E6, -E6/E7 und -E7 transgene Mäuse unter der Kontrolle des Keratin-14 Promotors generiert. Alle HPV8-transgenen Mäuse wurden



durch Mikroinjektion von DNA erzeugt, die keine Homologie zu Maus DNA Sequenzen hat und an einer zufälligen Stelle im Maus Genom integriert. Es kann folglich erwartet werden, dass jede transgene F0-Maus, ein individuelles Integrationsmuster aufweist (Gordon und Ruddle, 1983; Palmiter und Brinster, 1985). Aufgrund der Tatsache, dass 5 von 7 HPV8-E6 positiven Mäusen der F0-Generation später im Leben Tumoren entwickelten, ist die Möglichkeit der Tumorinduktion durch insertionsbedingte Mutagenese vernachlässigbar. Der Ort der Entstehung, die Häufigkeit und das allgemeine Aussehen der HPV8-E6 induzierten Haut Tumore sind nahezu identisch mit den HPV8-GFR transgenen Tieren. Auch das multifokale Auftreten der Tumore in 70% der Fälle ist vergleichbar mit dem Verhältnis von singulär und multifokal aufgetretenen HPV8-GFR induzierten Hautveränderungen. Bei 97% der HPV8-E6 Transgenen entstanden Hautveränderungen, wobei dieser Anteil an Mäusen mit Tumoren schon nach 51 Wochen zu beobachten war. Wie zuvor für die HPV8-GFR Mäuse beschrieben, war auch bei den HPV8-E6 Mäusen eine Reduktion des Alters bei Tumor Beginn von der F1- zur F2-Generation zu beobachten, die sich aber in späteren Generationen wieder ausglich. Die histologischen Untersuchungen ergaben keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Tumoren HPV8-E6 und den HPV8-GFR transgener Mäuse. In beiden Fällen überwiegen die Papillome mit 50-55%, gefolgt von den Papillomen mit leichter bzw. mittlerer Dysplasie (21% bzw. 13% (HPV8-E6) und 16% bzw. 19% (HPV8-E6)). Papillome mit starker Dysplasie und PEK kamen in beiden transgenen Mausstämmen in 3% bzw. 6% der Fälle vor. PEK kamen in allen drei HPV8-E6 Linien vor.

Der einzige auffällige Unterschied zwischen HPV8-E6 und HPV8-GFR transgenen Tieren war das Auftreten von Thymus Hyperplasien in 72% der HPV8-E6 positiven Mäuse mit Hautveränderungen. Bei sieben HPV8-E7 transgenen Mäusen, die obduziert wurden, um eventuelle Veränderungen in anderen Organen als der Haut zu finden, war der Thymus unauffällig. Es konnte gezeigt werden, dass das endogene Keratin-14 Gen und einige K14 Promotor gesteuerte transgene Konstrukte im kortikalen Epithel der Thymusdrüse exprimiert werden (Laufer *et al.*, 1996, McGargill *et al.*, 2000, Capone *et al.*, 2001). Transgene Mäuse die HPV16 E6/E7 Gene unter der Kontrolle des Keratin 5 Promotors exprimieren, auch ein Promotor der die Expression zielgerichtet in den Basalzellen von Plattenepithelien ermöglicht, entwickelten alle Thymus Hyperplasien (Carrarsi *et al.*, 2001). Warum in unserem

Falle die HPV8-GFR Mäuse keine Thymus Hyperplasien entwickeln und welche Rolle dabei die Expression von E2 spielt, muss noch weiter erforscht werden.

Die zwei HPV8-E6/E7 transgenen Tiere bekamen Hautveränderungen nach der gleichen Zeitspanne wie die HPV8-E6 Mäuse. Aufgrund dieser Beobachtungen kann man nicht von einer beschleunigenden Wirkung des E7 Proteins sprechen. Die Tumore hatten allerdings schon einen hohen Grad der Dysplasie erreicht. Auf der Basis von nur 2 Tieren, kann jedoch höchstens spekuliert werden, dass E7 womöglich die Progression zu höher gradigen Dysplasien fördert. Allerdings kann diese Spekulation nicht durch den Vergleich mit HPV8-GFR Tieren gestützt werden, die auch E7 exprimieren.

Die HPV8-E7 transgenen Mäuse zeigten in keiner der 5 Linien nach 130 Wochen Hautveränderungen, obwohl die Expression der E7-mRNA in allen Linien nachgewiesen werden konnte. Diese Beobachtungen sind ein starkes Indiz dafür, dass das E7-Protein alleine in vivo in den transgenen Mäusen nicht onkogen ist. In vorangegangenen Experimenten wurden zur Klärung des transformierenden Potentials der frühen HPV8 Genprodukte rekombinante Retroviren erzeugt, womit primäre Hautkeratinozyten infiziert und anschließend in raft-Kulturen auf die Effekte der Überexpression überprüft wurden. In der E7 raft-Kultur waren atypische Keratinozyten zu erkennen, die in die unterliegende Dermis invadierten (Akgül *et al.*, 2005b). Diese Ergebnisse stehen im starken Gegensatz zu den in vivo Daten für die HPV8-E7 transgenen Mäuse. Ein Grund für diese Diskrepanz könnte an dem verwendeten Promotor liegen, denn möglicherweise kommen die transformierenden Eigenschaften des E7-Proteins erst in höheren Schichten der Epidermis zur Geltung. Ein weiterer Grund könnte sein, dass das E7-Protein in humanen Keratinozyten andere Funktionen entfaltet als in den murinen Keratinozyten.

Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass in der murinen Epidermis das E6-Protein von HPV8 das Hauptonkogen ist. Es ist notwendig und ausreichend um eine spontane Tumorentwicklung bis hin zum Karzinom zu induzieren. Die Hypothese, dass E2 als zusätzlich unterstützender Faktor in der HPV8 bedingten Karzinogenese mit E6 und E7 kooperiert (Dong *et al.*, 2005), ist deshalb nicht zu vertreten. Es ist bekannt, dass kutane HPV (z.B. HPV5) in der Lage sind, die Apoptose zu inhibieren, indem die E6-Proteine die Degradierung von Bak verursachen (Jackson *et al.*, 2000). Diese antiapoptotische Funktion der kutanen E6 Proteine kann dazu führen, dass Zellen mit somatischen Mutationen, die durch fehlerhafte Reparatur oder oxidative Schäden entstanden sind, nicht eliminiert werden und zu Krebszellen entarten. Das

Bak Protein konnte in HPV-negativen, aber nicht in HPV-positiven PEK detektiert werden, was darauf hinweist, dass HPV-assoziierte Tumoren ein höheres proliferatives Potential besitzen. Außerdem beinhalteten die HPV-negativen Tumoren viel mehr apoptotische Zellen als die HPV-positiven.

Vorherige Beobachtungen an den HPV8-GFR Mäusen haben gezeigt, dass in allen Linien Papillome bei den männlichen Mäusen früher auftraten, was vermutlich an ihren häufigen Rankämpfen liegt, in denen sie sich oft verletzen (Hetherington, 2000). Vor allem die dorsalen und caudalen Regionen sind betroffen, in denen Papillome im Allgemeinen am häufigsten entstehen. Diese Beobachtungen deuteten darauf hin, dass zelluläre Prozesse während der Wundheilung die Tumorentwicklung beschleunigen könnten. Durch das gezielte Setzen von Wunden konnte gezeigt werden, dass es bei HPV8-GFR und -E6 Tieren, die in den FVB/N Hintergrund zurückgekreuzt wurden, zu einer Induktion der Papillomatose kommt. Bei HPV8-GFR BL6 Mäusen dagegen verheilte die Wunde genau so schnell wie bei den Wildtyp Tieren. Ein mögliches Indiz dafür, dass die Keratinozyten der HPV8 positiven FVB/N Mäuse nicht nur susceptibler für die maligne Konversion sind, sondern auch für die Initiation der Papillomatose.

Es konnte eindrucksvoll gezeigt werden, dass sowohl in FVB/N als auch BL6 transgenen Mäusen eine einzige Bestrahlung mit UVA und UVB ausreicht, um die Papillomatose in HPV8-GFR und -E6 transgenen Tieren zu induzieren. Die Zeitspanne nach der Bestrahlung bis zum Entstehen der Papillome war in beiden Maushintergründen nahezu gleich. Eine UVB Dosis von  $0,36 \text{ J/cm}^2$  erwies sich als schwacher Induktor der Papillomatose. Allerdings induzierte eine niedrigere Dosis UVB in Verbindung mit UVA die Entstehung von Papillomen über die gesamte bestrahlte Fläche. Beide Strahlungen scheinen synergistisch die Induktion der Papillomatose zu induzieren. Die immunhistochemischen Färbungen von p53 ergaben, dass in der bestrahlten Haut der HPV8-GFR, -E6 und -E7 transgenen Tiere das p53 Protein genau wie in der bestrahlten Haut der FVB/N Wildtyp Mäuse exprimiert wird. Zelluläre Prozesse der Wundheilung, ausgelöst durch UV-Licht oder das Setzen von Wunden, in Interaktion mit dem HPV8-E6 Protein sind der Auslöser für die Initiation der Papillomatose. Eine Regression der spontanen oder induzierten Papillome wurde in keiner der HPV8 transgenen Mäuse beobachtet.

Genau wie die HPV8-GFR Mäuse wurden auch die HPV8-E6 Mäuse zunächst nicht mit UV Licht bestrahlt. Deshalb war es auch nicht überraschend, p53 Wildtyp Gen in allen untersuchten Tumoren zu finden. Obwohl das p53 Protein von HPV8-E6 im

Gegensatz zu HPV16-E6 nicht inhibiert wird, war das p53 Wildtyp Gen offensichtlich nicht in der Lage, die Krebsentwicklung zu verhindern. Lediglich 3 Punktmutationen in den Introns konnten durch Sequenzanalysen ermittelt werden. Höchstwahrscheinlich haben diese Mutationen keinerlei Auswirkungen. Man kann zwar nicht ausschließen, dass nicht-kodierende RNAs aus den Introns z.B. als mikroRNAs über regulatorische Funktionen verfügen (Mattick, 2003), aber über die Regulation des p53 Gens durch nichtkodierende RNAs ist noch nichts bekannt.

In humanen Keratinozyten, die mit HPV38-E6 und E7 immortalisiert wurden, konnten auch keine p53 Mutationen gefunden werden. Allerdings konnte gezeigt werden, dass p53 in diesen Zellen stabilisiert wird, was wiederum selektiv die Transkription von  $\Delta Np73$  aktiviert. Bei  $\Delta Np73$  handelt es sich um eine Isoform des p53 verwandten Proteins p73, das in der Lage ist, die Apoptose induzierende Kapazität von p53 zu inhibieren (Accardi *et al.*, 2006). Möglicherweise ist auch HPV8 über den gleichen oder einen ähnlichen Mechanismus in der Lage, die Keratinozyten in den transgenen Mäusen zu transformieren. Allerdings würde dieser Mechanismus nicht ausreichen, um das karzinogene Potential von HPV8 vollständig zu erklären, denn in den HPV38 transgenen Mäusen entstanden spontan keine Tumoren. Ein direkter Vergleich zwischen HPV38-E6/E7 und HPV8-GFR und -E6 transgenen Mäusen ist aufgrund der unterschiedlichen Promotoren nur bedingt möglich. Die E6/E7 Onkogene von HPV38 werden in suprabasalen Schichten der Epidermis und die HPV8 Onkogene in der Basalschicht exprimiert. Interessant wären HPV38-E6/E7 transgene Tiere mit vorgeschaltetem humanen K14 Promotor, um die Frage zu klären, ob beide HPV Typen in vivo die gleiche Relevanz in der Karzinogenese haben.

In 40% der untersuchten PEK von HPV8-GFR transgenen Mäusen konnte eine Mutation im Codon 61 des H-ras Gens identifiziert werden, die eine ständige Aktivierung der ras-vermittelten Signaltransduktion zur Folge hat. In den anderen 60% der PEK scheint diese Aktivierung nicht die Ursache für die Progression bis zum PEK gewesen zu sein. In keiner der gutartigen Läsionen konnte eine H-ras Mutation detektiert werden. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Daten aus den Maus Modellen für die Hautkarzinogenese mit DMBA und TPA, bei denen in 95%-100% der Papillome Mutationen im Codon 61 des H-ras Gens gefunden wurden (Bailleul *et al.*, 1989; Andrews *et al.*, 1990; Gill *et al.*, 1992). Die H-ras Mutationen sind somit das Ergebnis einer Interaktion des Karzinogens mit der DNA. Folglich ist die ras Aktivierung ein frühes Ereignis in der chemisch aber nicht in der HPV8

---

induzierten Karzinogenese. Etwa 10-20% der humanen PEK enthalten Mutationen in den Codons 12, 13 und 61 von H-ras (Boukamp, 2005).

Das krebserzeugende Potential von HPV8 in den transgenen Mäusen war überraschend, wenn man das Fehlen einiger biochemischer Aktivitäten von E6 und E7 bedenkt, die als Hauptursache für die Onkogenese durch HPV16 angesehen werden. Dies weist offenbar auf andere, in hohem Grade Tumor induzierende und bis jetzt unbekannte Eigenschaften der frühen Proteine von HPV8 hin.

Die im Vergleich zum Menschen schnelle Entwicklung der Hauttumoren in den Mäusen hängt zweifellos mit der dauerhaften Expression der frühen Gene von HPV8 in allen proliferationskompetenten Keratinozyten zusammen, die vom K14 Promotor reguliert wird. In der menschlichen Haut werden die frühen Gene von HPV8 nur schwach von ihrem natürlichen Promotor exprimiert, außerdem kann die episomale DNA durch die Zellteilung verloren gehen, und mit HPV8 infizierte Zellen können zum Teil durch das Immunsystem beseitigt werden. Diese Unterschiede können eine viel langsamere und weniger effiziente Onkogenese beim Menschen erklären. Es konnte jedoch klar gezeigt werden, dass HPV8-E6 das volle Potential für die Induktion von Krebs hat. Folglich kann eine HPV8 Infektion, die über Dekaden, obgleich auf einem niedrigen Niveau, fortbesteht, in Interaktion mit zellulären Prozessen der Wundheilung, hervorgerufen durch Sonnenbrand oder Verwundung, eine relevante Ursache von Hautkarzinogenese beim Menschen sein.

## 6. Literaturverzeichnis

**Accardi R, Dong W, Smet A, Cui R, Hautefeuille A, Gabet AS, Sylla BS, Gissmann L, Hainaut P, Tommasino M.** Skin human papillomavirus type 38 alters p53 functions by accumulation of deltaNp73. *EMBO Rep* 2006;**7**:334-40.

**Adjei AA.** Blocking oncogenic Ras signaling for cancer therapy. *J Natl Cancer Inst* 2001;**93**:1062-74.

**Akgül B, Karle P, Adam M, Fuchs PG, Pfister HJ.** 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* 2003;**308**:279-90.

**Akgül B, Lemme W, Garcia-Escudero R, Storey A, Pfister HJ.** UV-B irradiation stimulates the promoter activity of the high-risk, cutaneous human papillomavirus 5 and 8 in primary keratinocytes. *Arch Virol* 2005/a;**150**:145-51.

**Akgül B, Garcia-Escudero R, Ghali L, Pfister HJ, Fuchs PG, Navsaria H, Storey A.** The E7 protein of cutaneous human papillomavirus type 8 causes invasion of human keratinocytes into the dermis in organotypic cultures of skin. *Cancer Res* 2005/b;**65**:2216-23.

**Ananthaswamy HN, Pierceall WE.** Molecular mechanisms of ultraviolet radiation carcinogenesis. *Photochem Photobiol* 1990;**52**:1119-36.

**Andrews DF 3rd, Collins SJ, Reddy AL.** Absence of the c-Ha-ras codon 61 point mutation in murine solid tumors induced by subcutaneously applied 7,12-dimethylbenzanthracene. *Cancer Lett* 1990;**54**:139-45.

**Arbeit JM, Munger K, Howley PM, Hanahan D.** Progressive squamous epithelial neoplasia in K14-human papillomavirus type 16 transgenic mice. *J Virol* 1994;**68**:4358-68.

**Armstrong BK, Kricger A.** The epidemiology of UV induced skin cancer. *J Photochem Photobiol B* 2001;**63**:8-18.

**Auewarakul P, Gissmann L, Cid AA.** Targeted expression of the E6 and E7 oncogenes of human papillo mavirus type 16 inthe epidermis of transgenic mice elicits generalized epidermal hyperplasia involving autocrine factors. *Mol Cell Biol* 1994;**14**:8250-58

**Ausubel, F. M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, und K. Struhl** (editors). *Current Protocols in Molecular Biology*: John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994.

**Bailleul B, Brown K, Ramsden M, Akhurst RJ, Fee F, Balmain A.** Chemical induction of oncogene mutations and growth factor activity in mouse skin carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 1989;**81**:23-7.

**Baker C, Calef C.** Maps of papillomavirus mRNA transcripts. Aus: Human papillomaviruses: a compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. HPV Database, *Los Alamos National Laboratory*, Los Alamos, USA, 1995.

**Band V, De Caprio JA, Delmolino L, Kulesa V, Sager R.** Loss of p53 protein in human papillomavirus type 16 E6-immortalized human mammary epithelial cells. *J Virol* 1991;**65**:6671-6.

**Barbosa MS, Edmonds C, Fisher C, Schiller JT, Lowy DR, Vousden KH.** The region of the HPV E7 oncoprotein homologous to adenovirus E1a and SV40 large T antigen contains seperate domains for Rb binding and casein kinase II phosphorylation. *Embo J* 1990;**9**:153-60.

**Basset-Seguín, N, Moles, J, Mils, V, Dereure, O und Guilhou, J.** p53 tumor suppressor gene and skin carcinogenesis. *J Invest Dermatol* 1994;**103**:102-6.

**Berkhout RJ, Bouwes Bavinck JN, ter Schegget J.** Persistence of human papillomavirus DNA in benign and (pre)malignant skin lesions from renal transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2000;**38**:2087–96.

**Birnboim HC, Doly J.** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 1979;**7**:1513-23.

**Bos JL.** ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989;**49**:4682-9.

**Botteri FM, van der Putten H, Wong DF, Sauvage CA, Evans RM.** Unexpected thymic hyperplasia in transgenic mice harbouring a neuronal promoter fused with simian virus 40 large T antigen. *Mol Cell Biol* 1987;**7**:3178-84.

**Boukamp P.** Non-melanoma skin cancer: what drives tumor development and progression? *Carcinogenesis* 2005;**26**:1657-67.

**Bouvard V, Storey A, Pim D, Banks L.** Characterization of the human papillomavirus E2 protein: evidence of trans-activation and trans-repression in cervical keratinocytes. *EMBO* 1994;**13**:5451-9.

**Bouwes Bavinck JN und Berkhout RJ.** HPV infections and immunosuppression. *Clin Dermatol* 1997;**15**: 427-37.

**Bouwes Bavinck JN, Stark S, Petridis AK, et al.** The presence of antibodies against virus-like particles of epidermodysplasia verruciformis-associated humanpapillomavirus type 8 in patients with actinic keratoses. *Br J Dermatol* 2000;**142**:103-9.

**Brash DE, Rudolph JA, Simon JA, et al.** A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci* 1991;**88**:10124-8.



**Brinster, R L, Allen, J M, Behringer, R R, Gelinas, R E und Palmiter, R D.** Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;**85**:836-40.

**Brown K, Balmain A.** Transgenic mice and squamous multistage skin carcinogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 1995;**2**:113-24.

**Byrne C, Tainsky M, Fuchs E.** Programming gene expression in developing epidermis. *Development* 1994;**120**:2369-83.

**Caldeira S, Zehbe I, Accardi R, Malanchi I, Dong W, Giarre M, de Villiers EM, Filotico R, Boukamp P, Tommasino M.** The E6 and E7 proteins of the cutaneous human papillomavirus type 38 display transforming properties. *J Virol* 2003;**77**:2195-206.

**Capone M, Romagnoli P, Beermann F, MacDonald HR, van Meerwijk JP.** Dissociation of thymic positive and negative selection in transgenic mice expressing major histocompatibility complex class I molecules exclusively on thymic cortical epithelial cells. *Blood* 2001;**97**:1336-42.

**Carraresi L, Tripodi SA, Mulder LC, Bertini S, Nuti S, Schuerfeld K, Cintorino M, Bensi G, Rossini M, Mora M.** Thymic hyperplasia and lung carcinomas in a line of mice transgenic for keratin 5-driven HPV16 E6/E7 oncogenes. *Oncogene* 2001;**20**:8148-53.

**Chellappan S, Kraus VB, Kroger B, Münger K, Howley PM, Phelps WC, Nevins JR.** Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;**89**:4549-53.

**Chow L, Broker T.** Papillomavirus DNA replication. *Intervirology*, 1994;**37**:150-8.

**Chung CT, Miller RH.** A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial cells. *Nuc Acid Res* 1988;**16**:3580.

**Clemens KE, Brent R, Gyruris J, Münger K.** Dimerization of the human papillomavirus E7 oncoprotein in vivo. *Virology* 1995;**214**:289-93.

**Clifford GM, Smith JS, Plummer M, et al.** Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2003;**88**:63-73.

**Cossart YE, Thompson C, Rose B.** Virology. In: Mindel A, (Hrsg.). Genital warts - human papillomavirus infection. London: Edward Arnold, 1995:1-34.

**Coussens LM, Hanahan D, Arbeit JM.** Genetic predisposition and parameters of malignant progression in K14-HPV16 transgenic mice. *Am J Pathol* 1996;**149**:1899–917.

**De Gruijl FR, Forbes PD.** UV-induced skin cancer in a hairless mouse model. *Bioessays* 1995;**17**:651-60.

**De Gruijl FR, van Kranen HJ, Mullenders LH.** UV-induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer. *J Photochem Photobiol B* 2001;**63**:19-27.

**De Gruijl FR.** Photocarcinogenesis: UVA vs. UVB radiation. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2002;**15**:316-20.

**De Oliveira WR, Festa Neto C, Rady PL, Tyring SK.** Clinical aspects of epidermodysplasia verruciformis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2003;**17**:394-8.

**De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H.** Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004;**324**:17–27.

**DePinho RA.** The age of cancer. *Nature* 2000;**408**:248–54.

**Desaintes C, Demeret C, Goyat S, Yaniv M, Thierry F.** Expression of the papillomavirus E2 protein in HeLa cells leads to apoptosis. *EMBO J* 1997;**16**:504–14.

**Dong W, Kloz U, Accardi R, Caldeira S, Tong WM, Wang ZQ, Jansen L, Durst M, Sylla BS, Gissmann L, Tommasino M.** Skin hyperproliferation and susceptibility to chemical carcinogenesis in transgenic mice expressing E6 and E7 of human papillomavirus type 38. *J Virol* 2005;**79**:14899-908.

**Doorbar J, Ely S, Sterling J, McLean C, Crawford L.** Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* 1991;**352**:824-7.

**Dyson N, Howley PM, Münger K, Harlow E.** The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind the retinoblastoma gene product. *Science* 1989;**243**:934-7.

**Dyson N, Guida P, Münger K, Harlow E.** Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same of cellular proteins. *J Virol* 1992;**66**:6893-902.

**Elbel M, Carl S, Spaderna S, Iftner T.** 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* 1997;**239**:132-49.

**Ensser A und Pfister H.** Epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomaviruses present a Subgenus-specific organization of the regulatory genome region. *Nucleic Acids Res* 1990;**18**:3919-22.

**Fehrmann F, Laimins LA.** Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene* 2003;**22**:5201-7.

**Feltkamp MC, Broer R, di Summa FM, et al.** Seroreactivity to epidermodysplasia verruciformis-related human papillomavirus types is associated with nonmelanoma skin cancer. *Cancer Res* 2003;**63**:2695–700.

**Firzlaff JM, Galloway DA, Eisenman RN, Lüscher B.** The E7 protein of human papillomavirus type 16 is phosphorylated by casein kinase II. *New Biol* 1989;**1**:44-53.

**Fuchs PG und Pfister H.** Papillomavirus and Epidermodysplasia verruciformis. *Papillomavirus Report* 1990;1:1-4.

**Fuchs PG, Horn S, Iftner T, et al.** Molecular biology of epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomaviruses. In: Doerfler W, Böhm P, editors. *Virus strategies*. Weinheim: Verlag Chemie; 1993. p. 517–29.

**Fuchs PG, Pfister H.** Transcription of papillomavirus genomes. *Intervirology* 1994;37:159–67.

**Gardiol D, Kühne C, Glaunsinger B, Lee SS, Javier R, Banks L.** Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the discs large tumour suppressor for proteasome-mediated degradation. *Oncogene* 1999;18:5487-96.

**Gewin L, Galloway DA.** E box-dependent activation of telomerase by human papillomavirus type 16 E6 does not require induction of c-myc. *J Virol* 2001;75:7198-201.

**Gill RD, Beltran L, Nettikumara AN, Harvey RG, Kootstra A, DiGiovanni J.** Analysis of point mutations in murine c-Ha-ras of skin tumors initiated with dibenz[a,j]anthracene and derivatives. *Mol Carcinog* 1992;6:53-9.

**Giroglou T, Florin L, Schafer F, Streeck RE, Sapp M.** Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol* 2001;75:1565-70.

**Gonzales SL, Stremlau M, He X, Basile JR, Münger K.** Degradation of the retinoblastoma tumor suppressor by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is important for functional inactivation and is separable from proteasomal degradation of E7. *J Virol* 2001;75:7583-91.

**Gordon JW, Ruddle FH.** Gene transfer into mouse embryos: production of transgenic mice by pronuclearinjection. *Methods Enzymol* 1983;101:411–33.

**Goodwin EC, Naeger LK, Breiding DE, Androphy EJ, DiMaio D.** Transactivation-competent bovine papillomavirus E2 protein is specifically required for efficient repression of human papillomavirus oncogene expression and for acute growth inhibition of cervical carcinoma cell lines. *J Virol* 1998;**72**:3925-34.

**Greenhalgh DA, Wang XJ, Rothnagel JA, Eckhardt JN, Quintanilla MI, Barber JL, Bundman DS, Longley MA, Schlegel R, Roop DR.** Transgenic mice expressing targeted HPV-18 E6 and E7 oncogenes in the epidermis develop verrucous lesions and spontaneous, rasHa-activated papillomas. *Cell Growth Differ* 1994;**5**:667–75.

**Gross GE, Barraso R.** Human papillomavirus infection: a clinical atlas. Ullstein-Mosby, Wiesbaden, Berlin, 1997.

**Grossman SR, Mora R, Laimins LA.** Intracellular localization and DNA-binding properties of human papillomavirus type 18 E6 protein expressed with a baculovirus vector. *J Virol* 1989;**63**:366-74.

**Haller K, Stubenrauch F, Pfister H.** Differentiationdependent transcription of the epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus type 5 in benign lesions. *Virology* 1995;**214**:245–55.

**Harwood CA, Suretheran T, McGregor JM, et al.** Human papillomavirus infection and non-melanoma skin cancer in immunosuppressed and immunocompetent individuals. *J Med Virol* 2000;**61**:289–97.

**Hawley-Nelson P, Vousden KH, Hubbert NL, Lowy DR, Schiller JT.** HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO* 1989;**8**:3905-10.

**Helfrich I, Chen M, Schmidt R, Furstenberger G, Kopp-Schneider A, Trick D, Grone HJ, zur Hausen H, Rösl F.** Increased incidence of squamous cell carcinomas in *Mastomys natalensis* papillomavirus E6 transgenic mice during two-stage skin carcinogenesis. *J Virol* 2004;**78**:4797–805.

**Hennings H, Glick AB, Lowry DT, Krsmanovic LS, Sly LM, Yuspa SH.** FVB/N mice: an inbred strain sensitive to the chemical induction of squamous cell carcinomas in the skin. *Carcinogenesis* 1993;**11**:2353–8.

**Herber R, Liem A, Pitot H, Lambert PF.** Squamous epithelial hyperplasia and carcinoma in mice transgenic for the human papillomavirus type 16 E7 oncogene. *J Virol* 1996;**70**:1873-81.

**Hetherington CM.** Mouse care and husbandry. In: Jackson IJ, Abbott CM, (Hrsg.). Mouse genetics and transgenics: a practical approach. New York, Oxford University Press, 2000;1–25.

**Hogan B, Costantini F, Lacy E.** Manipulating the mouse embryo. A Laboratory manual. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1994.

**Hou SY, Wu SY, Zhou T, Thomas MC, Chiang CM.** Alleviation of human papillomavirus E2-mediated transcriptional repression via formation of a TATA binding protein (or TFIID)-TFIIB-RNA polymerase II-TFIIF preinitiation complex. *Mol Cell Biol* 2000;**20**:113-25.

**Howley PM.** Papillomavirinae: The viruses and their replication. Fields Virology. 3'd Edition; Raven Press, Philadelphia 1996;2045-76.

**Hudson JB, Bedell MA, McCance DJ, Laimins LA.** immortalization and altered differentiation of human keratinocytes in vitro by the E6 and E7 open reading frames of human papillomavirus type 18. *J Virol* 1990;**64**:519-26.

**Iftner T, Bierfelder S, Csapo Z, Pfister H.** Involvement of human papillomavirus type 8 genes E6 and E7 in transformation and replication. *J Virol* 1988;**62**:3655–61.

**Iftner T, Oft M, Böhm S, Wilczynski SP, Pfister H.** Transcription of the E6 and E7 genes of human papillomavirus type 6 in anogenital condylomata is restricted to undifferentiated cell layers of the epithelium. *J Virol* 1992;**66**:4639-46.

**Jablonska S, Dabrowski J, Jakubowicz K.** Epidermodysplasia verruciformis as a model in studies on the role of papovaviruses in oncogenesis. *Cancer Res* 1972;**32**:583-9.

**Jablonska S.** Epidermodysplasia verruciformis. In: Friedmann RJ, Rigel DS, Kopf AW, Harris MN, Baker D (Hrsg). *Cancer of the skin*. Philadelphia: WB Saunders; 1991:101-13.

**Jablonska S, Majewski S.** Epidermodysplasia verruciformis: immunological and clinical aspects. *Curr Top Microbiol Immunol* 1994;**186**:157-75.

**Jackson S, Harwood C, Thomas M, Banks L, Storey A.** Role of Bak in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins. *Genes Dev* 2000;**14**:3065–73.

**Jackson S, Storey A.** E6 proteins from diverse cutaneous HPV types inhibit apoptosis in response to UV damage. *Oncogene* 2000;**19**:592-8

**Jewers RJ, Hildebrandt P, Ludlow JW, Kell B, McCance DJ.** Regions of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein required for immortalization of human keratinocytes. *J Virol* 1992;**66**:1329-35.

**Jones DL, Alani RM, Munger K.** The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. *Genes Dev* 1997;**11**:2101-11.

**Jones DL, Münger K.** Analysis of the p53-mediated G1 growth arrest pathway in cells expressing the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *J Virol* 1997;**71**:2905-12.

**Joyce JG, Tung JS, Przysiecki CT, et al.** The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J Biol Chem* 1999;**274**:5810-22.

**Kiyono T, Nagashima K, Ishibashi M.** The primary structure of major viral RNA in a rat cell line transfected with type 47 human papillomavirus DNA and the transforming activity of its cDNA and E6 gene. *Virology* 1989;**173**:551-65.

**Kiyono T, Hiraiwa A, Ishibashi M.** Differences in transforming activity and coded amino acid sequence among E6 genes of several papillomaviruses associated with epidermodysplasia verruciformis. *Virology* 1992;**186**:628–39.

**Kiyono T, Hiraiwa A, Ishii S, Takahashi T, Ishibashi M.** Inhibition of p53 mediated transactivation by E6 of type 1, but not type 5, 8, or 47, human papillomavirus of cutaneous origin. *J Virol* 1994;**68**:4656–61.

**Kiyono T, Hiraiwa A, Fujita M, Hayashi Y, Akiyama T, Ishibashi M.** Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;**94**:11612-6.

**Koch-Paiz CA, Amundson SA, Bittner ML, Meltzer PS, Fornace AJ Jr.** Functional genomics of UV radiation responses in human cells. *Mutat Res* 2004;**549**:65-78.

**Konkel DA, Tilgham SM, Leder P.** The Sequence of the chromosomal mouse beta-globin major gene: homologies in capping, splicing and Poly(A) sites. *Cell* 1978;**15**:1125-32.

**Laufer TM, DeKoning J, Markowitz JS, Lo D, Glimcher LH.** Unopposed positive selection and autoreactivity in mice expressing class II MHC only on thymic cortex. *Nature* 1996;**383**:81–5.

**Lee SS, Glaunsinger B, Mantovani F, Banks L, Javier RT.** Multi-PDZ domain protein MUPP1 is a cellular target for both adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus type 18 E6 oncoproteins. *J Virol* 2000;**74**:9680-93.

**Lewandowsky F, Lutz W.** Ein Fall einer bisher nicht beschriebenen Hauterkrankung (Epidermodysplasia verruciformis). *Arch Dermatol Syphilol* 1922;**141**:193-203.



**Livneh Z, Cohen-Fix O, Skaliter R, Elizur T.** Replication of damaged DNA and the molecular mechanism of ultraviolet light mutagenesis. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1993;**28**:465-513.

**Majewski S, Jablonska S.** Epidermodysplasia verruciformis as a model of human papillomavirus-induced genetic cancer of the skin. *Arch Dermatol* 1995;**131**:1312-8.

**Majewski S, Jablonska S.** Do epidermodysplasia verruciformis human papillomaviruses contribute to malignant and benign epidermal proliferations? *Arch Dermatol* 2002;**138**:649-54.

**Masini C, Fuchs PG, Gabrielli F, et al.** Evidence for the association of human papillomavirus infection and cutaneous squamous cell carcinoma in immunocompetent individuals. *Arch Dermatol* 2003;**139**:890-4.

**Massimi P, Pim D, Storey A, Banks L.** HPV-16 E7 an adenovirus E1a complex formation with TATA box binding protein is enhanced by casein kinase II phosphorylation. *Oncogene* 1996;**12**:2325-30.

**Mattick JS.** Challenging the dogma: the hidden layer of non-protein-coding RNAs in complex organisms. *Bioessays* 2003;**25**:930-9.

**McBride AA, Romanczuk H, Howley PM.** The papillomavirus E2 regulatory proteins. *J Biol Chem* 1991;**266**:18411-14.

**McGargill MA, Derbinski JM, Hogquist KA.** Receptor editing in developing T cells. *Nat Immunol* 2000;**1**:336-41.

**Mullis, K.B. und F.A. Fallona.** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods Enzym* 1987;**155**:335-50.

**Münger K, Phelps WC, Bubb V, Howley PM, Schlegel R.** The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol* 1989;**63**:4417-21.

**Münger K, Basile JR, Duensing S, et al.** Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene* 2001;**20**:7888-98.

**Munoz NF, Bosch X, de Sanjose S, et al.** Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003;**348**:518-27.

**Nakagawa S, Huibregtse JM.** Human scribble (Vartul) is targeted for ubiquitin-mediated degradation by the high-risk papillomavirus E6 proteins and the E6AP ubiquitin-protein ligase. *Mol Cell Biol* 2000;**20**:8244-53.

**Nataraj AJ, Trent JC, Ananthaswamy HN.** P53 gene mutations and photocarcinogenesis. *J Photochem Photobiol B* 1995;**62**:218-30.

**Nomine Y, Masson M, Charbonnier S, Zanier K, Ristriani T, Deryckere F, Sibling AP, Desplancq D, Atkinson RA, Weiss E, Orfanoudakis G, Kieffer B, Trave G.** Structural and functional analysis of E6 oncoprotein: insights in the molecular pathways of human papillomavirus-mediated pathogenesis. *Mol Cell* 2006;**21**:665-78.

**Oldak M, Smola H, Aumailley M, Rivero F, Pfister H, Smola-Hess S.** The human papillomavirus type 8 E2 protein suppresses B4-Integrin expression in primary human keratinocytes. *J Virol* 2004;**78**:10738-46.

**Orth G.** Epidermodysplasia verruciformis. In: Salzmann NP, Howley PM, (Hrsg). *The Papovaviridea, the papillomaviruses*. New York: Plenum, 1987:199-243.

**Palmiter RD, Brinster RL.** Transgenic mice. *Cell* 1985;**41**:343-5.

**Parkin DM, Bray FI, Devesa SS.** Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur J Cancer* 2001;**37**:4-66.

**Persson AE, Edstrom DW, Backvall H, et al.** The mutagenic effect of ultraviolet-A1 on human skin demonstrated by sequencing the p53 gene in single keratinocytes. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2002;**18**:287-93.

**Pfister H.** Biology and biochemistry of papillomaviruses. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1984;**99**:111-81.

**Pfister H, Fuchs PG.** Papillomaviruses: Particles, genome organization and proteins. In: Syrjänen, K; Gissmann, L.; Koss, L.G. (eds.). Papillomavirus and human disease. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1987;1-18.

**Pfister H.** Human papillomaviruses and skin cancer. *Semin Cancer Biol* 1992/a;**3**:263-71.

**Pfister H.** Papillomaviren, Krebs und Immunsuppression. *AIFO* 1992/b;**3**:115-24.

**Pfister H, Fuchs PG.** Anatomy, taxanomy and evolution of papillomaviruses. *Intervirology* 1994;**37**:143-9.

**Pfister H.** Human papillomavirus and skin cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003;**31**:52–6.

**Phelps WC, Münger K, Yee CL, Barres JA, Howley PM.** Structurefunction analysis of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *J Virol* 1992;**66**:2418-27.

**Purdie KJ, Pennington J, Proby CM, et al.** The promoter of a novel human papillomavirus (HPV77) associated with skin cancer displays UV responsiveness, which is mediated through a consensus p53 binding sequence. *EMBO J* 1999;**18**:5359-69.

**Ramoz N, Taieb A, Rueda LA, Montoya LS, Bouadjar B, Favre M, et al.** Evidence for a nonallelic heterogeneity of epidermodysplasia verruciformis with two susceptibility loci mapped to chromosome regions 2p21-p24 and 17q25. *J Invest Dermatol* 2000;**114**:1148-53.

**Ramoz N, Rueda LA, Bouadjar B, Montoya LS, Orth G, Favre M.** Mutations in two adjacent novel genes are associated with epidermodysplasia verruciformis. *Nat Genet* 2002;**32**:579-81.

**Rees J.** Genetic alterations in non-melanoma skin cancer. *J Invest Dermatol* 1994;**103**:747-50.

**Romeis, B.** Mikroskopische Technik. Urban und Schwarzenberg Verlag, München, 1989.

**Ruhland A, de Villiers EM.** Opposite regulation of the HPV 20-URR and HPV 27-URR promoters by ultraviolet irradiation and cytokines. *Int J Cancer* 2001;**91**:828–34.

**Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis.** Molecular cloning: a laboratory manual, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y, 1989.

**Sato H, Watanabe S, Furuno A, Yoshiike K.** Human papillomavirus type 16 E7 protein expressed in Escherichia coli and monkey COS-1 cells: immunofluorescence detection of the nuclear E7 protein. *Virology* 1989;**170**:311-5.

**Schaper ID.** Etablierung eines transgenen Mausmodells für kutane Karzinogenese durch Epidermodysplasia verruciformis-assoziierte humane Papillomviren. Doktorarbeit am Institut für Virologie, Universität zu Köln, 2003.

**Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM.** The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 1990;**63**:1129–36.

**Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM.** The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 1993;**75**:495-505.

**Schmitt A, Harry JB, Rapp B, Wettstein FO, Iftner T.** 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* 1994;**68**:7051-9.

**Searle PF, Thomas DP, Faulkner KB, Tinsley JM.** Stomach cancer in transgenic mice expressing human papillomavirus type 16 early region genes from a keratin promoter. *J Gen Virol* 1994;**75**:1125-37.

**Seo YS, Lusk M, Hurwitz J.** Bovine papilloma virus (BPV)-encoded E1 protein contains multiple activities required for BPV DNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;**90**:702-6.

**Setlow RB, Grist E, Thompson K, Woodhead AD.** Wavelengths effective in induction of malignant melanoma. *Proc Natl Acad Sci* 1993;**90**:6666-70.

**Sethi N, Palefsky J.** Transcriptional profiling of dysplastic lesions in K14-HPV16 transgenic mice using laser microdissection. *FASEB J* 2004;**18**:1243-5.

**Shafti-Keramat S, Handisurya A, Kriehuber E, Meneguzzi G, Slupetzky K, Kirnbauer R.** Different heparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses. *J Virol* 2003;**77**:13125-35.

**Shah KV, Howley PM.** Papillomaviruses. Fields Virology. 3<sup>rd</sup> Edition; Raven Press, Philadelphia 1999;2077-109.

**Smotkin D, Wettstein, FO.** The major human papillomavirus protein in cervical cancers is a cytoplasmic phosphoprotein. *J. Virol* 1987;**61**:1686-9.

**Song S, Pitot HC, Lambert PF.** The human papillomavirus type 16 E6 gene alone is sufficient to induce carcinomas in transgenic animals. *J Virol* 1999;**73**:5887-93.

**Spencer JM, Kahn SM, Jiang W, DeLeo VA, Weinstein IB.** Activated ras genes occur in human actinic keratoses, premalignant precursors to squamous cell carcinomas. *Arch Dermatol* 1995;**131**:796-800.

**Steger G, Pfister H.** In vitro expressed HPV8 E6 protein does not bind p53. *Arch Virol* 1992;**125**:355–60.

**Steger G, Ham J, Thierry F, Yaniv M.** The E2 proteins of papillomaviruses as transcription and replication factors. *In: Virus strategies, VCH, Weinheim; Doerfler, W. und Böhm, P (ed)* 1993;263-78.

**Steger G, Corbach S.** Dose-dependent regulation of the early promoter of human papillomavirus type 18 by the viral E2 protein. *J Virol* 1997;**71**:50-8.

**Steger G, Schnabel C, Schmidt HM.** The hinge region of the human papillomavirus type 8 E2 protein activates the human p21<sup>WAF1/CIP1</sup> promoter via interaction with Sp1. *J Gen Virol* 2002;**83**:503-10.

**Sterenborg HJ, van der Leun JC.** Tumorigenesis by a long wavelength UV-A source. *Photochem. Photobiol* 1990;**51**:325-30.

**Strickland PT.** Photocarcinogenesis by near-ultraviolet (UVA) radiation in Sencar mice. *J Invest Dermatol* 1986;**87**:272-5.

**Tan TM, Gloss B, Bernard HU, Ting RC.** Mechanism of translation of the bicistronic mRNA encoding human papillomavirus type 16 E6-E7 genes. *J Gen Virol* 1994;**75**:2663–70.

**Tanigaki T, Kanda R, Yutsudo M, Hakura A.** Epidemiologic aspects of epidermodysplasia verruciformis (L-L 1922) in Japan. *Jpn J Cancer Res* 1986;**77**:896-900.

**Thomas M, Banks L.** Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types. *J Gen Virol* 1999;**80**:1513-7.

**Thomas M, Laura R, Hepner K, Guccione E, Sawyers C., Lasky L, Banks L.** Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the MAGI-2 and MAGI-3 proteins for degradation. *Oncogene* 2002;**21**:5088-96.

**Tinsley JM, Fisher C, Searle PF.** Abnormalities of epidermal differentiation associated with expression of the human papillomavirus type 1 early region in transgenic mice. *J Gen Virol* 1992;**73**:1251–60.

**Ustav M, Stenlund A.** Transient replication of BPV1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames. *EMBO J* 1991;**10**:449-57.

**Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al.** Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999;**189**:12-9.

**Watanabe S, Sato H, Furuno A, Yoshiike K.** Changing the spacing between metal-binding motifs decreases stability and transforming activity of the human papillomavirus type 18 E7 oncoprotein. *Virology* 1992;**190**:872-5.

**Wells SI, Francis DA, Karpova AY, Dowhanick JJ, Benson JD, Howley PM.** Papillomavirus E2 induces senescence in HPV-positive cells via pRB- and p21(CIP)-dependent pathways. *EMBO J* 2000;**19**:5762–71.

**Werness BA, Levine AJ, Howley PM.** Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990;**248**:76-9.

**Wilson VG, West M, Woytek K, Rangasamy D.** Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. *Virus Genes* 2002;**24**:275-90.

**Woodworth CD, Michael E, Smith L, Vijayachandra K, Glick A, Hennings H, Yuspa SH.** Strain-dependent differences in malignant conversion of mouse skin tumors is an inherent property of the epidermal keratinocyte. *Carcinogenesis* 2004;**25**:1771-8.

**Yamashita T, Segawa K, Fujinaga Y, et al.** Biological and biochemical activity of E7 genes of the cutaneous human papillomavirus type 5 and B. *Oncogene* 1993;**8**:2433–41.

**Yang L, Mohr I, Clark R, Botchan M.** The E1 protein of bovine papillomavirus 1 is an ATP-dependent DNA helicase. *Proc Natl Acad Sci* 1993;**90**:5086-90.

**Yanish-Perron, C., Vieira, J. und Messing, J.** Improved M13 bacteriophage cloning vectors and host strains: Nucleotidesequence of M13mp18 and pUC19-Vectors. *Gene* 1985;**33**:103-119.

**Yao JM, Breiding DE, Androphy EJ.** Functional interaction of the bovine papillomavirus E2 transactivation domain with TFIIB. *J Virol* 1998;**72**:1013-9.

**Ziegler A, Leffell DJ, Kunala S, et al.** Mutation hotspots due to sunlight in the p53 gene of nonmelanoma skin cancer. *Proc Natl Acad Sci* 1993;**90**:4216-20.

**zur Hausen H, De Villiers EM.** Human Papillomaviruses. *Annual Review of Microbiology* 1994;**48**:427-47.

**zur Hausen H.** Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2000;**92**:690-8.

**zur Hausen H.** Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature Rev* 2002;**2**:342-50.



## 7. Abkürzungsverzeichnis

AEC	3-amino-9-Ethylcarbazol
AN	Accession number
ATP	Adenosin-Triphosphat
BL6	C57BL/6J (Mausstamm mit schwarzem Fell)
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
BZK	Basal-Zell-Karzinom; Basal-cell-carcinoma
Cdk	Cylin-abhängige Kinase
DBA	Dilute braun (Mausstamm mit braunem Fell)
DMBA	Dimethylbenzanthrazen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EV	Epidermodysplasia verruciformis
FVB/N	Friend leukaemia virus B strain (Mausstamm mit weißem Fell und roten Augen; albino)
g	Erdbeschleunigung
GFR	gesamte frühe Region (des HPV8 Genoms)
hCG	humanes Choriogonadotropin
HPV	Humanes Papillomvirus
Hz	Hertz
kB	Kilobase
kD	Kilodalton
LB-Medium	Luria Bertanie Medium
min	Minute
mM	Millimolar
m-RNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger RNA)
MW	Molekulargewicht (molecular weight)
NCR	non-coding-region
NGS	Normales Ziegenserum (normal goat serum)

---

NMHK	nicht-melanozytärer-Hautkrebs; non melanoma skin cancer
nt	Nukleotid
OD	Optische Dichte
ORF	open-reading-frame
ori	origin of replication
PCR	Polymerase chain reaction; Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PEK	Plattenepithel-Karzinom; squamous-cell-carcinoma
pmol	Picomol
PMSG	Pregnant-Mare-Serum-Gonadotropin
pRb	Retinoblastom-Protein
PV	Papillomvirus
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
SOC-Medium	super optimal broth + glucose medium
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Azetat
TSB	Transformation and Storage Buffer
U	Units (Einheiten)
μmol	Mikromol

## 8. Zusammenfassung

Das kutane humane Papillomvirus 8 (HPV8) gehört zu den Hoch-Risiko Typen bei Epidermodysplasia verruciformis (EV)-Patienten. Mit Hilfe sensitiver Detektionstechniken konnte dieser EV-HPV auch in gesunder Haut und in nicht-melanozytärem Hautkrebs der Normalbevölkerung gefunden werden, vor allem bei immunsupprimierten Organ Transplantatempfängern. Durch die Etablierung transgener Mäuse mit der gesamten frühen Region (GFR) von HPV8 unter der Kontrolle des humanen Keratin-14 Promotors, welcher die Expression dieser Gene in basalen Hautkeratinozyten aktiviert, konnten wir das onkogene Potential von HPV8 in vivo demonstrieren.

Da im HPV8-GFR Mausmodell alle frühen Gene von HPV8 gleichzeitig exprimiert werden, sollten im Rahmen dieser Dissertation die Gene E6 und E7 einzeln im transgenen Mausmodell untersucht werden, um deren Rolle in der Karzinogenese zu charakterisieren. Dabei stellte sich heraus, dass das E6 Protein alleine in der Lage ist singuläre oder multifokale gutartige Tumoren spontan zu induzieren. Diese Tumoren sind durch Papillomatose, Akanthose, Hyperkeratose und unterschiedliche Grade epidermaler Dysplasie gekennzeichnet und entarten in 6% der Fälle zu Plattenepithelkarzinomen, vergleichbar mit den Ergebnissen der HPV8-GFR Mäuse. Im Gegensatz dazu zeigten die HPV8-E7 transgenen Mäuse keinen offensichtlichen Phänotyp. Um synergistische Effekte des UV-Lichtes und der Wundheilung in diesen transgenen Tieren zu evaluieren, wurde die Haut der HPV8 Mäuse mit UVA und UVB bestrahlt oder mit Biopsiestanzen verwundet. Die UVA/B Bestrahlung und die Verwundung induzierten in den HPV8-GFR und -E6 transgenen Mäusen zwei bis drei Wochen nach der Behandlung Papillomatose. Die Bestrahlung mit UVA hatte keine induzierende Wirkung und die Bestrahlung mit UVB alleine erwies sich als schwacher Induktor der Papillomatose. In 40% der untersuchten PEK konnten Mutationen im Codon 61 des H-ras Gens identifiziert werden. Mutationen im p53 Gen wurden weder in benignen noch in malignen Tumoren von HPV8 positiven Mäusen gefunden. Immunhistochemische Färbungen von p53 zeigten gleiche Spiegel von p53 in der Epidermis HPV8 positiver und negativer Mäuse nach UV Bestrahlung.

In der murinen Epidermis ist das E6 Protein von HPV8 das Hauptonkogen, notwendig und ausreichend, um eine spontane Tumorentwicklung bis hin zum Karzinom zu induzieren. Eine HPV8 Infektion, die über Dekaden, obgleich auf einem

niedrigen Niveau, fortbesteht, könnte in Interaktion mit Prozessen der Wundheilung, eine relevante Ursache von Hautkarzinogenese beim Menschen sein.

## 9. Abstract

The cutaneous human papillomavirus 8 (HPV8) belongs to the high risk types associated with epidermodysplasia verruciformis (EV) patients. Sensitive detection techniques also found EV-HPVs in healthy skin and in non melanoma skin cancer of the general population. They are particularly prevalent in immunosuppressed organ transplant recipients. By generating transgenic mice with the complete early region (GFR) of HPV8 under control of the human keratin-14 promoter, which activates the expression of these genes in the basal keratinocytes, we could demonstrate the oncogenic capacity of HPV8 *in vivo*.

In order to further characterize the role of the early genes in carcinogenesis we expressed the genes E6 and E7 separately in transgenic mice, showing that the E6 protein alone is able to spontaneously induce singular or multifocal benign tumors. These tumors are characterized by papillomatosis, acanthosis, hyperkeratosis and varying degrees of epidermal dysplasia. In 6% of the cases the tumors became malignant, comparable with the results of the HPV8-GFR mice. In contrast the HPV8-E7 transgenic mice showed no obvious phenotype.

In order to evaluate synergistic effects of UV light and wound healing in these transgenic animals, the skin of HPV8 mice was irradiated with UVA and UVB or wounded with punch biopsies. The UVA/B irradiation and the wounding induced papillomatosis in the HPV8-GFR and -E6 transgenic mice two to three weeks after the treatment. The irradiation with UVA did not have an inducing effect and the irradiation with UVB alone led to a weak induction of papillomatosis. In 40% of the examined squamous cell carcinomas (SCC) mutations in Codon 61 of the H-ras gene could be identified. In the HPV8 positive mice, mutations in the p53 gene were not found neither in benign nor in malignant tumors. Immunohistochemical stainings of p53 showed similar levels of p53 in the epidermis of HPV8 positive and negative mice after UV irradiation.

In the murine epidermis the E6 protein of HPV8 is the major oncogene, necessary and sufficient to induce spontaneous tumor development up to SCC. A HPV8 infection persisting over decades, although at a low level, in interaction with wound healing processes, may be a relevant cause of skin carcinogenesis in man.

## 10. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Herbert Pfister, für seine Unterstützung und wissenschaftliche Betreuung bedanken, die zur Durchführung dieser Promotionsarbeit geführt hat.

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

Bei Frau Alexandra van Mil möchte ich mich ganz herzlich für die technische Assistenz bedanken.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Virologie der Universität zu Köln, besonders meinen Laborkollegen Baki Akgül, Sönke Weißenborn, Regina Pfefferle, Nadine Sichtig und Nadine Schröer, sei für die sehr gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima gedankt. Außerdem möchte ich mich bei Dirk Wessler bedanken, der sich hervorragend um die Mäuse gekümmert hat.

Bei Thorsten Eitelgörge möchte ich mich besonders für seine Hilfeleistungen bei Computerproblemen bedanken.

Priv.-Doz. Dr. med. Hans-Udo Kasper und Frau Dr. Catherin Niemann danke ich für die fachliche Unterstützung.

Diese Arbeit wurde vom Zentrum für Molekulare Medizin Köln (ZMMK) gefördert.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich stets unterstützt haben und denen ich diese Promotionsarbeit widme.

## 11. Vorträge und Poster

### Vorträge

**Human Papillomavirus Type 15-E7 Protein may effect translation.** Marcuzzi GP, Fuchs PW, Pfister HJ. 20. Internationale Papillomvirus-Konferenz in Paris, 2002.

**The human Papillomavirus 8 E6 gene alone is capable to induce skin tumors in transgenic mice.** Marcuzzi GP, Kasper HU, Smyth N, Pfister HJ. 22. Internationale Papillomvirus-Konferenz in Vancouver, Kanada, 2005.

**Spontaneous and UV-induced tumor development in human Papillomavirus 8 transgenic mice.** Marcuzzi GP, Kasper HU, Smyth N, Pfister HJ. DNA Tumor Virus Meeting 2005 in Cambridge, England.

**Spontaneous tumor development in human papillomavirus 8 transgenic mice and rapid induction by UV-light and wound healing.** Marcuzzi GP, Kasper HU, Smola-Hess S, Pfister HJ. Jahrestagung 2006 der Gesellschaft für Virologie in München.

**Rapid induction of tumor development in human papillomavirus 8 transgenic mice by UV-light exposure and wounding.** Marcuzzi GP, Kasper HU, Sigrun Smola-Hess, Pfister H. 23. Internationale Papillomvirus-Konferenz in Prag, Tschechien, 2006.

**Expresson of matrix metalloproteinases 2, 9, 13 and 14 in skin tumours of human papillomavirus type 8 transgenic mice.** Lindemann R, Akgül B, Marcuzzi GP, Zigrino P, Pfister H, Mauch C. 31. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung ADF, 2004, Dresden.

---

**Poster**

**Human Papillomavirus Type 15-E7 Protein may effect translation.** Marcuzzi GP, Fuchs PW, Pfister HJ. Jahrestagung 2003 der Gesellschaft für Virologie in Berlin.

**The human Papillomavirus 8 E6 gene alone is capable to induce skin tumors in transgenic mice.** Marcuzzi GP, Kasper HU, Smyth N, Pfister HJ. Jahrestagung 2005 der Gesellschaft für Virologie in Hannover.

**Development of benign and malignant skin tumors in human papillomavirus type 8 transgenic mice and expresson of matrix metalloproteinases 2, 9, 13 and MT1-MMP.** Lindemann R, Akgül B, Marcuzzi GP, Zigrino P, Mauch C, Pfister H. Jahrestagung 2004 der Gesellschaft für Virologie in Tübingen.

**The human papillomavirus type 8 E2 Protein induces the development of papillomas and severe dysplasia in transgenic mice.** Pefferle R, Marcuzzi GP, Akgül B, Kasper HU, Pfister H. Jahrestagung 2006 der Gesellschaft für Virologie in München.



## 12. Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig 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 der 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 Prof. Dr. Dr. h.c. Herbert Pfister betreut worden.

Köln, den 27. September 2006

### Teilpublikationen:

**Schaper ID\*, Marcuzzi GP\*, Weissenborn SJ, Kasper HU, Dries V, Smyth N, Fuchs P, Pfister H.** Development of skin tumors in mice transgenic for early genes of human papillomavirus type 8. *Cancer Res* 2005 Feb 15;65(4):1394-400.

\*Erstautoren

**Akgül B, Pfefferle R, Marcuzzi GP, Zigrino P, Krieg T, Pfister H, Mauch C.** 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* 2006 Jan;15(1):35-42.

### 13. Lebenslauf

#### Persönliche Daten:

Name, Vorname: Marcuzzi, Gian Paolo  
Geburtstag/-ort: 05.08.1974 / Köln  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: italienisch

#### Schulbildung:

1981-1985 Grundschule Westerwaldstraße, Köln  
1985-1994 Gymnasium Thusneldastraße, Köln  
06. 1994 Allgemeine Hochschulreife

#### Hochschulausbildung:

1994 - 2001 Studium der Biologie (Diplom) an der Universität zu Köln  
2000 - 2001 Diplomarbeit am Institut für Virologie der Universität zu Köln Thema: "Untersuchungen zu Interaktionen der zelltransformierenden E7 Proteine hautspezifischer Papillomviren mit zellulären Faktoren."  
10.2001 Diplom in Biologie  
03.2002-09.2006 Dissertation am Institut für Virologie der Universität zu Köln Thema: "Analyse des onkogenen Potentials der frühen Gene E6 und E7 des humanen Papillomvirus Typ 8 durch die Etablierung transgener Mausmodelle."