

Aus dem Institut für Medizinische Virologie und Epidemiologie der
Viruskrankheiten der Universität Tübingen
Sektion Experimentelle Virologie
Leiter: Professor Dr. T. Iftner

**Viruslast und virale Genexpression in
papillomvirusassoziierten Hauttumoren nicht-
immunsupprimierter Patienten**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen**

Vorgelegt von
Christoph Braun
aus Blaubeuren
2003

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. T. Iftner

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. Möhrle

Für meine Eltern
Werner und Christa Braun

Inhalt

INHALT	1
1 ZUSAMMENFASSUNG.....	4
2 EINLEITUNG	6
2.1 Humane Papillomviren.....	6
2.2 Papillomviren als Krebsursache.....	7
2.3 Nicht-melanozytärer Hautkrebs (NMSC)	10
2.4 Die HPV-Infektion als Risikofaktor für NMSC.....	10
2.5 Ziel der Arbeit.....	17
3 MATERIAL	18
3.1 Tumormaterial.....	18
3.2 Bakterien.....	18
3.3 Nukleinsäuren	18
3.3.1 Plasmide.....	18
3.3.2 Synthetisch hergestellte Oligonukleotide	20
3.3.3 Sonstige Nukleinsäuren und Nukleotide.....	22
3.4 Enzyme.....	22
3.4.1 Restriktionsendonukleasen	22
3.4.2 Sonstige Enzyme.....	22
3.5 Reagenziensysteme.....	23

3.6	Reagenzien	23
3.7	Medien für die Bakterienkultur	23
4	METHODEN	25
4.1	Bakterienkultur	25
4.1.1	Bakterienkultur zur Plasmidisolierung	25
4.1.2	Transformation von Bakterien	25
4.2	DNA-Methoden.....	25
4.2.1	Standardmethoden	25
4.2.2	Klonierung eines PCR-Produkts von HPV 27	26
4.2.3	Präparative Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	26
4.2.4	Isolierung von DNA aus Gewebe.....	26
4.3	Quantitative Realtime-PCR mit dem Roche-Lightcycler	27
4.3.1	Funktionsprinzip des Geräts	27
4.3.2	Messprinzipien	27
4.3.3	Primer- und Sondendesign	28
4.3.4	Evaluierung der Reaktionsbedingungen.....	29
4.3.5	PCRs zur Bestimmung der HPV-Kopienzahlen.....	32
4.3.6	Bestimmung der β -Globin Kopienzahl	33
4.3.7	Auswertung mit der Lightcycler Data Analysis Software (LCDA).....	34
4.4	<i>In Situ</i> Hybridisierung	37
4.4.1	Vorbereitung der Gewebeschnitte	37
4.4.2	Herstellung radioaktiv markierter RNA-Hybridisierungssonden mittels <i>in vitro</i> Transkription.....	38
4.4.3	Radioaktive RNA-RNA <i>In Situ</i> Hybridisierung.....	40
4.4.4	H.E.-Gegenfärbung	43
5	ERGEBNISSE	44
5.1	Quantitative Realtime PCR zur Bestimmung der Viruslast	44

5.1.1	Bewertungskriterien der PCR	44
5.1.2	Einfluss der β -Globin Normalisierung.....	47
5.1.3	Viruslast in HPV33-positiven kutanen und genitalen Präkanzerosen und Karzinomen.....	48
5.1.4	Viruslast in HPV4-positiven benignen und malignen Hauttumoren	51
5.1.5	Viruslast in HPV27-positiven benignen und prämaligen Hautveränderungen.....	52
5.1.6	Viruslast in HPV1-positiven Hautveränderungen	53
5.2	RNA <i>In Situ</i> Hybridisierung	55
5.2.1	<i>In Situ</i> Hybridisierung HPV33-positiver aktinischer Keratosen.....	55
5.2.2	<i>In Situ</i> Hybridisierung eines HPV1-pos. Plattenepithelkarzinoms und einer HPV1-pos. Warze	58
6	DISKUSSION.....	61
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	68
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	71
9	DANKSAGUNG	79
10	LEBENS LAUF	80

1 Zusammenfassung

Humane Papillomviren (HPV) stellen eine wesentliche Ursache menschlicher Krebserkrankungen dar. Für anogenitale Tumoren konnten eine Vielzahl epidemiologischer, tierexperimenteller und molekularbiologischer Daten die kausale Rolle des Virus für die Karzinogenese sichern. Kontrovers diskutiert wird momentan ein Zusammenhang zwischen HPV und nichtmelanozytärem Hautkrebs (NMSC). Diese Tumoren stellen die häufigsten Tumoren der kaukasischen Rasse dar. Die Tatsache, dass sich mit sensitiven Detektionsmethoden in einem hohen Prozentsatz dieser epithelialen Hauttumoren HPV-DNA nachweisen lässt, scheint einen Zusammenhang zwischen der Infektion und der Karzinomentstehung nahezu legen.

In einer Studie unserer Arbeitsgruppe wurden 703 benigne und maligne Hauttumoren Immunkompetenter auf HPV-DNA untersucht. In über 55% der untersuchten Präkanzerosen und Karzinome fand sich HPV-DNA. Erstmals konnte hierbei mit dem genitalen „High-Risk“-Typ HPV 33 ein einzelner HPV-Typ als signifikant mit Karzinomen und Präkanzerosen assoziiert identifiziert werden.

Um die Frage eines Zusammenhangs des positiven HPV-Nachweises mit der Karzinogenese weiterzuverfolgen, wurden in der vorliegenden Arbeit Viruslastbestimmungen für verschiedene Tumoren mittels quantitativer Realtime PCR durchgeführt. Gleichzeitig wurden HPV33-positive zervikale Präkanzerosen und Zervixkarzinome vergleichend mituntersucht. Eine kleine Auswahl der HPV-positiven Hautveränderungen wurde zusätzlich auf eine Transkription viraler Gene mittels *In Situ* Hybridisierung untersucht.

Auf diese Weise konnten für die HPV33-positiven aktinischen Keratosen Viruskopienzahlen gefunden werden, die teilweise denen zervikaler Präkanzerosen entsprachen. Für die HPV33-positiven Hautkarzinome fanden sich jedoch sehr geringe Virusmengen in einer Größenordnung von weniger als 1 Viruskopie auf 150 Zellen. Weitere Viruslastmessungen wurden vergleichend für benigne, mit verschiedenen kutanen HPV-Typen assoziierte Tumoren, deren

virale Ätiologie als gesichert gelten kann, durchgeführt. Hier lag die Kopienzahl in der Regel bei $10^3 - 10^6$ Kopien pro Zelle.

Die in dieser Arbeit gefundenen, äußerst geringen HPV-Kopienzahlen in malignen, epithelialen Hauttumoren wurden schon in früheren Arbeiten anderer Arbeitsgruppe beobachtet. Die höheren Kopienzahlen in den HPV33-positiven aktinischen Keratosen stellen jedoch eine interessante Beobachtung dar, zumal die Virusmengen in zervikalen Präkanzerosen durchaus in ähnlichen Größenordnungen liegen. Sicherlich kann aus den Daten der Viruslast nicht direkt auf Mechanismen geschlossen werden, die für eine eventuelle Beteiligung des Virus bei der Entstehung von Hautkrebs eine Rolle spielen. Jedoch bieten diese Ergebnisse Ansatzpunkte für weitere Experimente und können im Kontext mit zukünftigen Forschungsergebnissen zur Klärung der Frage, ob und auf welche Weise Humane Papillomviren zur Hautkrebsentstehung führen, beitragen.

2 Einleitung

Viren als Ursache für maligne Tumoren stellen in letzter Zeit ein zentrales Thema der Krebsforschung dar. Schätzungen zufolge gelten in 15% der Tumorerkrankungen Viren zumindest als Mitverursacher (Wilmanns et al., 2000; zur Hausen, 2001). Als gesichert krebsverursachend gelten momentan Infektionen mit Hepatitis B- und C-Viren (Hepatozelluläres Karzinom), dem Epstein-Barr-Virus (Burkitt-Lymphom, Nasopharynxkarzinom), dem Humanen Herpes Virus 8 (Kaposi-Sarkom), dem Humanen T-Zell Leukämie Virus (adulte T-Zell Leukämien) sowie verschiedenen High-Risk Typen des Humanen Papillomvirus (anogenitale Karzinome, oropharyngeale Tumoren). Durch die modernen molekularbiologischen Techniken konnten für viele dieser Tumoviren Mechanismen nachgewiesen werden, welche zur Tumorentstehung beitragen. Diese führen über Aktivierung von Onkogenen, Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen und/oder Verhinderung der Apoptose zur malignen Transformation der Zelle (Wagener, 1995; zur Hausen, 2001).

In der Praxis bieten sich für virusassoziierte Tumoren interessante Präventions- und Therapieoptionen an. Sei es durch antivirale Vakzinen oder durch eine spezifische antivirale Chemotherapie.

2.1 Humane Papillomviren

Die Papillomviren gehören zusammen mit den Polyomaviren zur Familie der Papovaviren. Es handelt sich um 55 nm große, nichtumhüllte, ikosaedrische Viren, deren Genom als ca. 7900 bp großes, doppelsträngiges, zirkuläres DNA-Molekül vorliegt. Es existieren weit über 100 verschiedene Typen, die sich, basierend auf Unterschieden in der Nukleinsäuresequenz definierter Genomabschnitte, in Untergruppen einteilen lassen. Die Genomstruktur ist zwischen den einzelnen Virustypen hochkonserviert und besteht aus 3 Segmenten unterschiedlicher Länge und Funktion: Die NCR (non coding region) enthält

Steuersequenzen für Transkription und Replikation. Die frühe Region kodiert für regulatorische Gene, die für die Virusvermehrung aber auch bei der malignen Entartung eine wesentliche Rolle spielen. Die späte Region enthält die beiden Strukturgene des Virus, deren Genprodukte das virale Kapsid aufbauen.

Papillomviren infizieren ausschließlich epitheliale Gewebe, wobei sie je nach Virustyp eine teilweise oder ausschließliche Präferenz für entweder anogenitale Haut und Schleimhaut oder für die verhornende Haut außerhalb des Anogenitaltraktes aufweisen. Eine Infektion kann sowohl durch direkten Kontakt von Epitheloberflächen (z.B. auch Sexualkontakt) als auch über kontaminierte Gegenstände stattfinden. Auch eine vertikale Transmission des Virus kommt vor. Neben einem hohen Prozentsatz an inapparent verlaufenden Infektionen manifestiert sich die Papillomvirusinfektion meist in Form von benignen Haut- oder Schleimhauttumoren wie vulgären oder plantaren Warzen oder spitzen Kondylomen (Stubenrauch und Iftner, 1999; McCance, 2000).

2.2 Papillomviren als Krebsursache

Außer für oben genannte benigne Veränderungen spielen bestimmte Papillomviren auch bei der Entstehung maligner Tumoren eine Rolle. Bereits in den 30er Jahren dieses Jahrhunderts wurde eine karzinogene Wirkung des Cottontail Rabbit Papillomavirus (CRPV) vermutet (Shope and Hurst, 1933; Rous and Beard, 1935; zur Hausen, 1996). Eine Infektion mit CRPV führt beim Hauskaninchen zur Ausbildung primär benigner Papillome, die in 84% der Fälle zu invasiven Karzinomen progredieren (Syverton, 1952).

Die ersten menschlichen malignen Tumoren, die mit Papillomviren in Verbindung gebracht wurden, waren Plattenepithelkarzinome der Haut bei Personen, die an der seltenen Erbkrankheit Epidermodysplasia verruciformis litten (Orth, 1987). Die Betroffenen entwickeln in der Jugend flache Warzen und makulöse Veränderungen. Bis zu 60% der Patienten zeigen nach längerem Krankheitsverlauf auch Plattenepithelkarzinome der Haut, bevorzugt an sonnenexponierten Körperstellen (Lutzner, 1978; Jablonska und Orth, 1985).

Sowohl in den makulösen Läsionen als auch in den Karzinomen lässt sich in über 90% der Fälle HPV-DNA nachweisen. Hierbei handelt es sich um sogenannte EV-assoziierte HPV Typen, vor allem HPV 5, seltener HPV 8, 14, 17, 20, 47 (Orth, 1987; Pfister, 1992).

Eine ungleich höhere klinische Relevanz besitzt die Beteiligung bestimmter Papillomvirustypen bei der Entstehung anogenitaler Karzinome und hier vor allem des Zervixkarzinoms. Weltweit erkranken jährlich 500 000 Frauen neu an einem Zervixkarzinom. In der Deutschland liegt die Neuerkrankungsrate bei 16 pro 100000 Frauen, was ungefähr 6700 neuen Fällen pro Jahr entspricht. Die 5 Jahres Überlebensrate liegt bei 50-60%. (IARC, 2001). Die Papillomvirusinfektion gilt inzwischen als „zwingend notwendige“ Voraussetzung für die Entstehung des Zervixkarzinoms. Für keinen anderen menschlichen malignen Tumor konnte bisher eine ähnlich zwingende Abhängigkeit zwischen Karzinogen und Tumorentstehung nachgewiesen werden. Mit modernen molekularbiologischen Techniken lässt sich in über 95% der Zervixkarzinome HPV-DNA nachweisen (Bosch et al., 2002). Virustypen, welche häufig in Karzinomen der Zervix nachgewiesen werden können, werden als sogenannte genitale „High-Risk“ Viren bezeichnet. Dies sind vor allem HPV 16, seltener HPV 18, 45, 31, 33, 35, 51, 52, 58 ,59 (Munoz et al., 2000). Eine persistente Infektion mit diesen karzinogenen Viren kann über einen Zeitraum von Jahren oder Jahrzehnten über dysplastische Vorstufen (Zervikale Intraepitheliale Neoplasien, CIN1-CIN3) zur Entwicklung eines Karzinoms führen. Epidemiologische Studien haben aber auch gezeigt, dass der Großteil der transienten Infektionen spontan ausheilt und nicht zur Entwicklung eines Karzinoms führt (Woodman et al., 2001; Ho et al., 1998).

Mit Hilfe von Experimenten an Zellkulturen und transgenen Tieren ist es gelungen, das karzinogene Potential der High-Risk Viren auch experimentell zu bestätigen: High-Risk Viren sind in der Lage humane Keratinozyten in Zellkultur zu immortalisieren, während dies für genitale Low-Risk Typen (HPV 6 und 11) nicht der Fall ist (Woodworth et al., 1989). Als virale Onkogene konnten das E6- und das E7-Gen der High-Risk Typen identifiziert werden. Die offenen Leserahmen (ORF) der Onkogene sind in allen Zervixkarzinom-Zelllinien,

transformierten Zellen und HPV-assoziierten malignen Tumorgeweben intakt (Stoler et al., 1992). Funktionell bewirken die viralen Onkoproteine eine Deregulation zellulärer Mechanismen, welche normalerweise eine geregelte Zellteilung sichern (Stubenrauch und Iftner, 1999). Dies wird durch Interaktion von E6 und E7 mit den Zellzyklus regulierenden Molekülen erreicht: Bindung von E7 an das Retinoblastom-Tumorsuppressorprotein (pRB) bewirkt eine Freisetzung von E2F Transkriptionsfaktoren, welche eine Transkription S-Phase-einleitender Gene bewirken (Dyson et al., 1989). Das E6-Protein der High-Risk HPV bindet an das p53-Tumorsuppressorprotein und bewirkt dessen Degradation (Scheffner et al., 1990). Es kommt zur Abnahme der p53-Aktivität, welches normalerweise bei Schädigung der DNA einen G1-Arrest oder den programmierten Zelltod (Apoptose) bewirken kann. Daneben interagieren die viralen Onkoproteine mit einer Reihe weiterer zellulärer Mechanismen, deren jeweilige Relevanz für die Karzinogenese noch unklar ist (Mantovani and Banks, 2000; Münger et al., 2001). In der persistent infizierten und immortalisierten Zelle können sich nun eine Reihe von Mutationen weiterer zellulärer Kontrollgene anhäufen, so dass es letztlich zu invasiv wachsenden und metastasierenden Tumoren kommt.

Neben dem Zervixkarzinom scheinen Papillomviren auch bei einer Reihe weiterer anogenitaler und extragenitaler Malignome eine ursächliche Rolle zu spielen. Im speziellen sind dies Vagina- und Vulvaneoplasien (Daling et al., 2002; van Beurden, 1995; Pinto, 1999), Analneoplasien (Palevsky et al., 1991) und Peniskarzinome (McCance et al., 1986). Außerhalb der Haut und Schleimhaut des Anogenitalbereichs ist wohl auch ein Teil der Plattenepithelkarzinome der Schleimhaut des Kopf-Hals Bereichs ätiologisch mit HPV assoziiert (Gillison et al., 2000). Das HPV-Typenspektrum deckt sich auch in diesen nicht-zervikalen Karzinomen mit den für die Zervix als „High-Risk“ definierten HPV-Typen.

Auf den in der Literatur sehr kontrovers diskutierten Zusammenhang zwischen HPV-Infektion und nicht-melanozytärem Hautkrebs (NMSC) soll im folgenden eingegangen werden.

2.3 Nicht-melanozytärer Hautkrebs (NMSC)

Maligne epitheliale Tumoren der Haut stellen die häufigsten bösartigen Neubildungen der kaukasischen Rasse dar (Marks, 1995). Die Inzidenz in Deutschland steigt seit Beginn der 70er kontinuierlich an und beträgt jährlich ca. 70 / 100000. Damit machen diese Tumoren 16% aller klinisch in Erscheinung tretenden Malignome aus. Ungefähr 40 000 neuen Fällen von NMSC pro Jahr steht jedoch die relativ geringe Zahl von nur 300 Todesfällen entgegen, in welcher sich das geringe Metastasierungspotential der Tumoren widerspiegelt (Zahlen basieren auf Krebsregister des Saarlands; Garbe, 1997). Unter dem Überbegriff NMSC werden im wesentlichen 2 Tumorentitäten zusammengefasst: Basalzellkarzinome (= Basaliome, BCC) und Plattenepithelkarzinome (= Spinaliome, SCC), wobei die ersteren ungefähr 10 mal häufiger auftreten. Ursächlich spielt UV-Strahlung in Kombination mit einem hellen Hauttyp die entscheidende Rolle: Die Tumoren treten fast immer an chronisch sonnenexponierten Körperteilen (v.a. Gesicht, alopezische Kopfhaut, Unterlippe, Handrücken) auf. Weitere bekannte Risikofaktoren, die ätiologisch seltener eine Rolle spielen, sind Röntgenstrahlung, chronisch-entzündliche Hautschäden, straffe Narben, Teer und Arsen. Während Basaliome häufig *de novo* auf gesunder Haut entstehen, entwickeln sich Plattenepithelkarzinome sehr häufig auf dem Boden von Präkanzerosen. Meist handelt es sich um sogenannte aktinische oder solare Keratosen, welche sich auf chronisch sonnenexponierter, degenerativ veränderter Altershaut entwickeln (Marks, 1996, Braun-Falco et al., 1996).

2.4 Die HPV-Infektion als Risikofaktor für NMSC

Der erste Hinweis auf einen ursächlichen Zusammenhang zwischen HPV-Infektion und der Entwicklung maligner epithelialer Hauttumoren ergab sich schon sehr früh aus der schon weiter oben beschriebenen Beobachtung, dass das Cottontail Rabbit Papillomavirus (CRPV) in der Lage ist, Hautkarzinome bei Kaninchen zu induzieren (Rous and Beard, 1935).

Auch auf den Zusammenhang zwischen bestimmten HPV-Typen und der Hautkarzinomentwicklung bei Personen, die an der seltenen Erbkrankheit

Epidermodysplasia verruciformis leiden, wurde weiter oben schon eingegangen (Orth, 1987).

Durch die Fortschritte auf dem Gebiet der Transplantationschirurgie und der Fortentwicklung der immunsuppressiven Therapie der transplantierten Patienten ist ein neues Risikokollektiv für HPV-assoziierte Karzinome der Haut entstanden: Nach Organtransplantation medikamentös immunsupprimierte Patienten entwickeln kurze Zeit nach Beginn der immunsuppressiven Therapie oft multiple virale Warzen und nach einer Latenzphase auch sehr häufig Plattenepithelkarzinome (Glover et al., 1994; Hardie, 1995). Die kumulative Inzidenz für SCC beträgt 10 Jahre nach Beginn der Immunsuppression 10-40% und nach 20 Jahren 40-70%, wobei Länder mit stärkerer Sonneneinstrahlung die höheren Inzidenzen aufweisen (Birkeland et al., 1995; Bouwes Bavinck et al., 1996). In bis zu 84% dieser Plattenepithelkarzinome kann HPV-DNA nachgewiesen werden (Harwood et al., 2000; Berkout et al., 2000). Das Spektrum der detektierten HPV-Typen ist sehr groß und die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen unterscheiden sich je nach verwendeter Detektionsmethode beträchtlich. Sehr häufig werden vor allem EV-assoziierte Typen detektiert, was wohl auch damit zusammenhängt, dass viele Arbeitsgruppen Primer einsetzen, die vorwiegend für die spezifische Detektion von EV-Typen entwickelt wurden. Daneben finden sich aber auch sowohl bekannte kutane Typen als auch viele bisher unbekannte kutane oder EV-Typen (Bouwes Bavinck et al., 2001). Diese Ergebnisse scheinen einen direkten kausalen Zusammenhang von HPV-Infektion und Hautkrebsentstehung bei Immunsupprimierten nahelegen. Es muss jedoch klar sein, dass die bloße Anwesenheit viraler DNA in den Karzinomen keineswegs beweisend für einen Zusammenhang sein kann.

In jüngster Zeit wurden auch einige größere Studien mit Tumoren immunkompetenter (d.h. nicht iatrogen oder aus einem anderen bekannten Grund immunsupprimierter) Krebspatienten durchgeführt (Harwood and Proby, 2002). Sowohl die HPV-Prävalenz als auch das detektierte Typenspektrum unterscheiden sich in den einzelnen Studien zum Teil recht beträchtlich, worin vor allem die unterschiedliche Spezifität und Sensivität der verwendeten Primer-

Systeme zum Ausdruck kommt (Meyer et al., 2000). Harwood et al. konnten in 27% der SCC, 37% der BCC und 54% der Präkanzerösen Immunkompetenter HPV-DNA nachweisen, wobei es sich meist um EV-assoziierte Typen handelte (Harwood et al., 2000). In einer anderen größeren Studie wurde in 44% der BCC HPV-DNA detektiert, wobei ebenfalls EV-HPV dominierten (Wieland et al., 2000). Andere Arbeitsgruppen hingegen finden auch genitale Low- und High-Risk Typen in Präkanzerösen der Haut Immunkompetenter (Lampert et al., 2000; Derancourt et al., 2001). Hinweise existieren auch für ein kombiniertes Auftreten kutaner SCC der Finger und genitaler SCC im selben Individuum, wobei eine genital-kutane Eigeninfektion diskutiert wird (Forslund et al., 2000; Zabawski et al., 2001). Stellt man die Ergebnisse bei Immunkompetenten denen Immunsupprimierter gegenüber, so fällt neben der geringeren HPV-Prävalenz in NMSC vor allem der sehr viel geringere Anteil an Mischinfektionen mit 2 oder mehr HPV-Typen auf. Mit der Entwicklung sensitiver „Breitspektrum“-PCR-Systeme, die verschiedene degenerierte Primerkombinationen verwenden, um möglichst viele verschiedene HPV-Typen zu erkennen, hat sich ein weiterer Aspekt der ohnehin schon komplizierten Thematik offenbart, der die Interpretation der epidemiologischen Daten bezüglich HPV und NMSC nicht gerade leichter macht: PCR-Untersuchungen mit normaler Haut (Astori G., 1998), Haarfollikeln ausgezupfter Haare (Boxman et al., 1997) und Hautbiopsien aus anderen, nichtviralen, hyperproliferativen Hautläsionen wie Psoriasis (Favre et al., 2000; Weissenborn et al., 1999) ergaben in hohen Prozentsätzen ebenfalls positive Ergebnisse für HPV-DNA. Sehr häufig werden auch hier Virustypen gefunden, die sich der EV-Klasse zuordnen lassen. Antonsson et al. untersuchten oberflächliche Hautabstriche Immunkompetenter und Immunsupprimierter auf HPV DNA und konnten überraschenderweise bei 80% der Immunkompetenten und 94% der Immunsupprimierten HPV-DNA nachweisen, wobei neben bereits bekannten HPV-Typen eine Vielzahl neuer EV-HPV und kutaner HPV-Typen identifiziert werden konnten (Antonsson et al., 2000). Eine jüngere Studie von Forslund et al., bei der die Haut der Probanden vor der Abstrichentnahme mit adhesivem Tape behandelt worden war (*stripped skin*) und sich die Abstriche daraufhin in 97% als HPV-negativ

erwiesen, scheint darauf hinzudeuten, dass hier oft eher oberflächliche Kontaminationen vorliegen dürften, welche deutlich von der inapparenten Infektion abgegrenzt werden sollten (Forslund et al., unveröffentlicht). Die Bedeutung einer Nachweise dieser EV-HPV Typen in einer Tumorbiopsie für die Karzinogenese muss somit als eher gering eingestuft werden; zumindest bis genauere Mechanismen der Interaktion dieser Viren mit den Wirtszellen definiert werden können.

Bisher ist nur wenig über die molekularen Mechanismen, die bei der Karzinogenese der Haut durch kutane HPV eine Rolle spielen könnten, bekannt. Es scheint so, dass das Virus im Gegensatz zu genitalen Karzinomen lediglich einen Kofaktor neben dem Hauptkarzinogen UV-Strahlung darstellen kann. Der für die Entstehung von Zervixkarzinomen wichtige Mechanismus der Degradation und Wirkungsabschwächung des apoptoseinduzierenden Tumorsuppressorproteins p53 durch das E6-Onkoprotein der genitalen High-Risk HPV scheint an der Haut keine Rolle zu spielen (Elbel et al., 1997), zumal sich bereits in 90% der kutanen SCC UV-induzierte p53-Mutationen, die bereits allein zum Funktionsverlust des Proteins führen können, finden lassen (Brash et al., 1991). Einen interessanten und womöglich für die Tumorentstehung wesentlichen Mechanismus der Interaktion zwischen viralen und zellulären Proteinen konnten Jackson et al. zeigen: Das E6-Protein verschiedener kutaner und EV-HPV ist in der Lage, die Degradation des UV-induzierten und die Apoptose vermittelnden Proteins Bak zu bewirken. Dieser antiapoptotische Mechanismus könnte zum Überleben durch UV-Strahlung genetisch geschädigter Zellen beitragen (Jackson et al., 2000).

Neue, interessante Ergebnisse ergab eine Studie unserer Arbeitsgruppe, in der 279 benigne virale Warzen, 134 Präkanzerosen und 93 Hautkarzinome (SCC und BCC) Immunkompetenter auf die Anwesenheit von HPV-DNA untersucht wurden (Iftner et al., unveröffentlichte Ergebnisse). Hierzu wurden degenerierte Primer verwendet, wobei das Amplicon im Gegensatz zu den Systemen der meisten anderen Gruppen aus dem E1 Gen gewählt wurde. Die Zielsequenz dieser Primer ist zwischen den einzelnen Papillomviren hochkonserviert. Die Virustypenbestimmung erfolgte in einem zweiten Schritt durch direkte

Sequenzierung des PCR-Produkts. Das Assay-Design erlaubt die Detektion von mindestens 57 verschiedenen HPV-Typen aus der genitalen, der kutanen und der EV-assoziierten Gruppe bei guter Sensitivität. 90% der Warzen, 59% der Präkanzerosen und 53% der Karzinome waren HPV-positiv. Von den mituntersuchten 119 Biopsien histologisch normaler Haut konnte nur in 3,4% HPV-DNA nachgewiesen werden (Tabelle 1).

Tabelle 1: Hautstudie mit 703 Biopsien benigner und maligner Hautveränderungen von immunkompetenten Patienten (Iftner et al., unveröffentlicht)

HPV-Status	Virale Erkrankungen	Erkrankungen mit fraglich viraler Ätiologie				Normale Haut
	Warzen und Kondylome	aktinische Keratosen	Morbus Bowen	SCC	BCC	
HPV-DNA positiv	252 (90,3%)	59 (55,6%)	21 (75%)	44 (58,6%)	5 (27,7 %)	4 (3,4%)
HPV-DNA negativ	27 (9,7%)	47 (44,4%)	7 (25%)	31 (41,4%)	13 (72,2%)	115 (96,6%)
Total	279	106	28	75	18	119

Das Typenspektrum in den benignen viralen Warzen entsprach weitgehend den bisher in solchen Läsionen nachgewiesenen Virustypen HPV 1, 2, 4, 10 und 27. Neben den Typen, die auch in den benignen Tumoren gefunden wurden, wiesen die Präkanzerosen (aktinische Keratosen, Morbus Bowen) und die Karzinome (BCC und SCC) auch häufig Infektionen mit genitalen High-Risk Typen und EV-assoziierten Typen auf (Tabellen 2 und 3). Die Diskrepanz zwischen der geringen gefundenen HPV-Prävalenz in der normalen Haut und den oben erwähnten Studien, bei denen HPV in einem hohen Prozentsatz in normaler Haut gefunden wird, könnte mit der oben beschriebenen Oberflächenkontamination durch ubiquitär vorkommende HPV zusammenhängen und wäre somit durch unterschiedlich wirksame Desinfektionsmaßnahmen der Haut vor Biopsieentnahme zu begründen.

Das Studiendesign erlaubt es erstmals, mit der Gruppe der benignen Tumoren als Kontrollgruppe, Odds-Ratios (relatives Risiko) für einzelne Virustypen oder Virusgruppen zu berechnen und so eventuelle High-Risk Typen für die Karzinomentstehung der Haut zu definieren. Einschränkend muss gesagt

werden, dass die Gruppen der Fälle und der Kontrollen sich in punkto Alter und kumulativer Sonnenexposition, welche die Hauptrisikofaktoren für aktinische Keratosen und epithelialen Hautkrebs darstellen, stark unterscheiden. So konnte der genitale High-Risk Typ HPV 33 als signifikanter Risikofaktor für NMSC (Odds Ratio=39; 95% CI: 4,8-312) und kutane Präkanzerosen (Odds Ratio= 21; 95% CI: 2,5-173) identifiziert werden. Auch die genitalen High-Risk Typen HPV 16, 31, 33, 35 und 51 als Gruppe zeigten eine signifikante Häufung in Karzinomen (Odds Ratio=8; 95% CI: 3-21) und Präkanzerosen (Odds Ratio=6; 95% CI: 2,3-15). Das ebenfalls sehr häufig in SCC nachgewiesene HPV 4 stellt sich nach Betrachtung der Kontrollgruppe, in der es ebenfalls recht häufig detektiert wurde, als nicht signifikant mit Karzinomen assoziiert dar.

Tabelle 2: Prävalenz einzelner HPV-Typen in prämaligen und malignen epithelialen Hauttumoren. Die Prozentangaben beziehen sich auf alle untersuchten (HPV-positiven und HPV-negativen) Läsionen derselben Entität (Iftner et al., unveröffentlicht).

	HPV-Typ	Aktinische Keratosen	Morbus Bowen	SCC	BCC
kutan	HPV 1	6%	7%	2,5%	-
	HPV 2	-	3,5%	1%	-
	HPV 3	-	3,5%	-	-
	HPV 4	2%	-	13%	-
	HPV 7	1%	-	-	-
	HPV 10	1%	-	-	-
	HPV 27	6%	3,5%	-	5,5%
	HPV 57	1%	-	1%	-
EV	HPV 5	1%	-	-	-
	HPV 8	2%	-	1%	-
	HPV 17	-	-	1%	-
	HPV 19	1%	-	-	-
	HPV 22	-	-	1%	-
	HPV 36	2%	3,5%	1%	-
Mukosa	HPV 6	3%	14%	-	-
	HPV 16	1%	7%	1%	5,5%
	HPV 31	-	-	1%	-
	HPV 33	7%	-	9,5 %	11%
	HPV 35	-	7%	-	-
	HPV 34	-	3,5%	-	-
	HPV 73	1%	-	-	-
	HPV X*	2%	-	2,5%	5,5%
HPV-Mix**	20%	18%	20%	-	

* positiver HPV-Test, jedoch keine reproduzierbare Sequenz in der Sequenzierung

** mehrere überlagerte Sequenzen in der Sequenzierung

Tabelle 3: Nachweishäufigkeit der HPV-Typen 1, 4, 27 und 33 in den von Iftner et al. untersuchten Hauttumoren unterschiedlicher Dignität in absoluten Zahlen.

HPV-Typ	Plantarwarzen	Vulgäre Warzen	Aktinische Keratosen	Morbus Bowen	SCC	BCC
HPV 1	40	31	6	2	2	0
HPV 4	7	13	2	0	10	0
HPV 27	19	12	6	1	0	1
HPV 33	1	0	7	0	7	2
andere HPV	38	63	38	18	25	2
HPV-negativ	11	14	47	7	31	13
Total	116	133	106	28	75	18

2.5 Ziel der Arbeit

Die recht überraschenden Ergebnisse oben beschriebener Studie, bei der High-Risk genitale Papillomviren und insbesondere HPV 33 als Risikofaktor für Karzinome und Präkanzerosen der Haut Immunkompetenter identifiziert werden konnten, werfen eine Reihe interessanter Fragen auf, zu deren Beantwortung die vorliegende Arbeit beitragen will: Der erste und in dieser Arbeit zentral bearbeitete Punkt beschäftigt sich mit der Viruslast in den Tumoren. Hierzu wurde mit der quantitativen Realtime-PCR ein relativ neues Verfahren verwendet, welches unter Einsatz geringster DNA Mengen eine genaue und sehr sensitive Bestimmung von DNA Kopienzahlen erlaubt. Neben den HPV 33 enthaltenden aktinischen Keratosen und Plattenepithelkarzinomen, sollten zum Vergleich HPV33-positive zervikale Präkanzerosen und Karzinome mituntersucht werden. Daneben sollten zusätzlich Viruslastbestimmungen für eine Reihe weiterer häufig auftretender Papillomvirustypen durchgeführt werden. Einen zweiten Punkt stellt die Frage nach der transkriptionellen Aktivität der Viren in den jeweiligen Geweben dar, welche mit Hilfe der *In Situ* Hybridisierung untersucht werden sollte. Ein Nachweis der Expression viraler Onkogene könnte einen zentralen Hinweis auf eine Beteiligung des HPV bei der Karzinogenese liefern.

3 Material

3.1 Tumormaterial

Das Tumormaterial stammt von nicht immunsupprimierten Patienten im Alter zwischen 5 und 98 Jahren aus 3 verschiedenen geographischen Regionen; aus dermatologischen Praxen und Universitätskrankenhäusern Nord- und Süddeutschlands und aus einem Zentrum für Krebserkrankungen in Südkalifornien, USA. Alle prämaligen und malignen Tumoren sind histologisch verifiziert. Für die Viruslastbestimmungen wurden größtenteils die DNA-Präparationen benutzt, die bereits für den Virusnachweis und die Virustypisierung verwendet worden waren (Iftner et al., Manuskript in Bearbeitung).

3.2 Bakterien

Escherichia coli DH5 α : bezogen von Clontech, Heidelberg
verwendet für Plasmidisolierungen

Escherichia coli TOP10F': Bestandteil des TOPO TA Cloning® Kits, Invitrogen
verwendet für Plasmidisolierungen

3.3 Nukleinsäuren

3.3.1 Plasmide

HPV 1 in pBR322:

Das Plasmid besteht aus dem Klonierungsvektor pBR322 (4,3 kb) und dem über eine BamH I Schnittstelle einklonierten gesamten HPV 1 Genom (7,8 kb). Der Vektor enthält ein Ampicillin- und ein Tetracyclin-Resistenzgen.

HPV 4 in pBR322:

Insert: HPV 4 Gesamtgenom (7,35 kb) über BamH I

HPV 33 in pLink322:

Das Plasmid besteht aus dem Vektor pLink322 (3,8 kb) und dem über eine Bgl II Schnittstelle einklonierten HPV 33 Genom (7,9 kb). Der Vektor enthält ein Ampicillin-Resistenzgen.

pCR[®] 2.1-TOPO[®] -Vektor (TOPO TA Cloning[®] Kit, Invitrogen):

Größe: 3,9kb

Die T-Überhänge erlauben eine einfache Klonierung von PCR-Produkten. Der Vektor enthält ein Ampicillin- und ein Kanamycin-Resistenzgen. Des weiteren enthält er den Promotor des Lac-Operons vor der Multiple Cloning Site (MCS) und das die MCS überspannende lacZ α -Gen. An die 3' T-Überhänge des Vektors ist das Enzym Topoisomerase, welches die Ligation katalysiert, kovalent gebunden.

HPV 33-E6/E7 in pBluescribe M13+:

Der E6/E7 Bereich (Nukleotide 7854-857; 909 bp) des HPV 33 Genoms wurde über die Sma I-Schnittstelle in der MCS in den Vektor pBluescribe M13+ (Größe: 3,2kb) (Vector Cloning Systems, San Diego, USA) einkloniert. Der Vektor enthält neben einer Ampicillinresistenz die Bakteriophagen-Transkriptionspromotoren T3 und T7, welche die MCS flankieren (Beyer-Finkler et al., 1990).

HPV 1-E4/E2 in pBluescribe M13+:

Das Insert besteht hier aus dem über Pst I einklonierten E4 Bereich des HPV 1 Genoms (Nukleotide 3223-3525; 302 bp).

3.3.2 Synthetisch hergestellte Oligonukleotide

Für die RTQ-PCR wurden folgende Oligonukleotide als Primer bzw. Hybridization Probes verwendet:

HPV 33:

Amplicon aus E1-Region:

(Nucleotidposition: 2078-2329; Größe: 251 bp)

Primer: PPF1: 5'-AACAAATGTGTAGACATTATAAACGAGC-3'

PPR2: 5'-ATTAAACTCATTCCAAAATATGA-3'

Die Primer PPF1 und PPR2 sind patentrechtlich geschützt mit dem internationalen Aktenzeichen für Patentanmeldung PCT/ EP01/ 02003.

Sonden: 33LC: 5'-*LC Red640*-TTGTATCCATTGTCCTATTGACATTTTACG p

33FL: 5'-TTCCTCCATCATTTGTTTTTTCACATCT-*FL*

HPV 4:

Amplicon 1 aus L2-ORF:

(Nucleotidposition: 3890-4189; Größe: 300 bp)

Primer: CB4F3: 5'-CTGAGATGGTTGGGAAGTGTAATA-3'

CB4R3: 5'-TTGTGCAGGCTGAAGAGTAGTC-3'

Sonden: 4LC: 5'-*LCRed 640*-CCCAGTACCAATACCCAAGCCTCC p

4FL: 5'-ACCCAGTTGACCCCCCACTACCTC-*FL*

Amplicon 2 aus E7-ORF:

(Nucleotidposition: 651-786; Größe: 136 bp)

Primer: E7F1: 5'-CGGTGGTTCCATTTAGAATAGAC-3'

E7R: 5'-GTGCAGCAAACGTCAGC-3'

Sonden: E7LC: 5'-LC Red640-CTACGGACCTTGGAACAACCTTCTTGTAG p

E7FL: 5'-TTACATTGTATGCTGCTGAGCTCGG-FL

HPV 27:Amplicon 1 aus E7-ORF:

(verwendet zur Klonierung des Plasmidstandards; Nucleotidposition: 549-805; Größe: 257 bp):

Primer: 27S: 5'-CCCGACCCAGCCTCGC-3'

27R: 5'-GGGGCACACTAGATTCAGCG-3'

Amplicon 2 aus E7-ORF :

(Nucleotidposition: 556-805; Größe: 250 bp)

Primer: 27F: 5'-CAGCCTCGCGGACATTACATTA-3'

27R: 5'-GGGGCACACTAGATTCAGCG-3'

Sonden: 27LC: 5'-LC Red640-ACCACCCCGTAGGCCTGCACAGCT p

27FL: 5'-TCTGCCGCACTTGCAGCAGGTTGT-FL

HPV 1:

Amplicon aus E1-ORF:

(Nucleotidposition: 1213-1353; Größe: 141 bp)

Primer: 1S: 5'-TATTGATGAATCGACACAGGTAGATC-3'

1A: 5'-AAACTGACGCCAGCCGTA-3'

Sonden: 1LC: 5'-*LC Red*-GCCCCAACTTCCCCAGTATGTTCTT p

1FL: 5'-CTAGCTTTCAAATGTTACCCCCAGC-*FL*

Außer PPF1, PPR2, CB4F3 und CB4R3 (Gibco/BRL, Eggenstein) wurden sämtliche Oligonukleotide von der Firma TIB-Molbiol (Berlin) konzipiert und bezogen.

3.3.3 Sonstige Nukleinsäuren und Nukleotide

- Hefe t-RNA (Boehringer, Mannheim)
- 1kb-Leiter (Gibco/BRL, Eggenstein)
- Desoxyribonucleosidtriphosphate (Gibco/BRL, Eggenstein)
- ³⁵S-UTP (Amersham, Braunschweig)

3.4 Enzyme

3.4.1 Restriktionsendonukleasen

Restriktionsenzyme wurden von folgenden Firmen bezogen:

New England BioLabs; MBI Fermentas, Vilnius, Litauen; Gibco/BRL

3.4.2 Sonstige Enzyme

- DNA-Polymerase Amplitaq Gold™ (Perkin Elmer, Weiterstadt)
- RNase A (Boehringer, Mannheim)
- T3 RNA Polymerase (Promega, Mannheim)
- T7 RNA Polymerase (Promega, Mannheim)

3.5 Reagenziensysteme

- QIAGEN Plasmid Miniprep (Qiagen, Hilden)
- Riboprobe[®] in vitro Transkription System (Promega, Mannheim)
- LightCycler Fast Start Kit Hybridization-Probes (Roche, Mannheim)
- LightCycler Fast Start Kit SYBR-Green (Roche, Mannheim)
- LightCycler Control Kit DNA (Roche, Mannheim)

3.6 Reagenzien

(Bio-)Chemische Reagenzien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Amersham, Braunschweig; Bayer, Leverkusen; Becton Dickinson Labware, Bedford; BioRad, München; Boehringer, Mannheim; Difco, Detroit (USA); Fluka, Buchs (CH); Gibco/BRL, Eggenstein; Invitrogen, San Diego, LKB, Bromma (S); Merck, Darmstadt; Pharmacia, Uppsala (S); Roth, Karlsruhe; Serva, Heidelberg; Sigma, Taufkirchen; Sakura, Zoeterwoude, Niederlande

In der Regel wurden die Chemikalien mit dem Reinheitsgrad "zur Analyse" verwendet

3.7 Medien für die Bakterienkultur

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium), (bezogen auf 1l)

10 g Bacto-Trypton

5 g Bacto-Hefe-Extrakt

8 g NaCl

mit NaOH pH 7,2 einstellen

bei Bedarf Zugabe von 50 - 100 µg/ml Ampicillin

4 Methoden

4.1 Bakterienkultur

4.1.1 Bakterienkultur zur Plasmidisolierung

Zur Vermehrung der für die Lightcycler-PCR als Standards sowie für die *in vitro* Transkription als Matrizen-DNA benötigten Plasmide dienten die *Escherichia coli* Stämme DH5 α und TOP10F'. Die verwendeten Vektoren enthalten ein Gen für Ampicillinresistenz, weshalb die Vermehrung in ampicillinhaltigem Medium erfolgte. Hierzu wurden 3ml LB-Flüssigmedium unter Zusatz von 100 μ g/ml Ampicillin mit einer durch Blau-Weiß Selektion identifizierten Bakterienkolonie bzw. mit in Glycerin bei -80° gelagerten Bakterien angeimpft. Der Ansatz wurde anschließend für 12-16 h bei 37° im Schüttelinkubator bebrütet.

4.1.2 Transformation von Bakterien

Die Transformation von Bakterien erfolgte mit Hilfe des TOPO TA Cloning® Kits (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers (Chemische Transformation).

4.2 DNA-Methoden

4.2.1 Standardmethoden

Folgende Methoden wurden nach Protokollen, die bei Ausubel et al. (1999) und Sambrook and Russel (2001) beschrieben sind, durchgeführt.

- **Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen**
- **Gelelektrophorese von DNA in Agarosegelen**
- **Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**
- **Identifizierung inserttragender Plasmide durch Kultivierung der transformierten Bakterien auf IPTG / X-Gal-enthaltenden LB-Platten.**

4.2.2 Klonierung eines PCR-Produkts von HPV 27

Hierzu wurde aus HPV27-positiver Warzen-DNA (Identifikationsnummer W272) mit Hilfe der Primer 27S und 27R ein 257 bp-Fragment amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde unter Verwendung des TOPO TA Cloning® Kits in den Vektor pCR®2.1-TOPO® kloniert. Hierbei wird die terminale Transferase-Aktivität der Taq-Polymerase ausgenutzt, welche 3'-Adenosinüberhänge produziert. Der TOPO-Vektor besitzt an seinen Enden 3'-Thymidinüberhänge, so dass er mit dem PCR-Produkt religieren kann. Die Ligation wird durch das Enzym Topoisomerase katalysiert, welches kovalent an die Phosphatgruppen der terminalen 3'-Thymidine des Vektor gebunden vorliegt (Shuman, 1994).

4.2.3 Präparative Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Plasmid-DNA wurde nach Pelletierung der Bakterien mit dem QIAGEN-Plasmid-Miniprep-Kit (Qiagen, Hilden) gewonnen. Die DNA wurde in 50µl H₂O aufgenommen und die DNA-Konzentration mit Hilfe eines Spektralphotometers (Eppendorf BioPhotometer) bestimmt. Anschließend wurden 200ng DNA mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut, in einem 1-2% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und an Hand der Fragmentgröße identifiziert.

4.2.4 Isolierung von DNA aus Gewebe

Ein ca. 2 mm³ großes Stück des bei -80° gelagerten Gewebematerials wurde mit 500µl melting buffer (0,1 M EDTA; 0,05 M Tris pH 8; 0,5% SDS) und 4 µl Proteinase K (20 mg/ml) für 24 h bei 55° unter leichtem Schütteln inkubiert.

Das entstandene Gewebehomogenisat wurde anschließend mit einer Mischung aus Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) 2-5 min vermischt. Hierdurch werden Proteine denaturiert und verbleiben in der organischen Phase bzw. an der Phasengrenze. Nach Zentrifugation (14000 rpm für 10 min) und Phasentrennung wurde die wässrige Phase nochmals mit P/C/I behandelt. Die hydrophile DNA bleibt hierbei in der wässrigen Phase gelöst. Anschließend wurde noch ein weiterer Aufreinigungsschritt mit Chloroform/Isoamyl (24:1) durchgeführt. Die DNA-haltige obere Phase wurde daraufhin mit 1/10 ihres

Volumens an 3M Natriumacetat-Lösung und dem 2,5fachen ihres Volumens an 100% Ethanol versetzt und bei -20° über Nacht stehen gelassen.

Die ausgefallene DNA wurde abzentrifugiert (14000rpm für 20min bei 4°), mit 70% Ethanol gewaschen und in 100 μ l sterilem Wasser resuspendiert.

Eine Konzentrations- und orientierende Qualitätsbestimmung der DNA-Präparation wurde mit dem Spektralphotometer durchgeführt.

4.3 Quantitative Realtime-PCR mit dem Roche-Lightcycler

4.3.1 Funktionsprinzip des Geräts

Der Lightcycler ist eine Kombination aus Thermocycler und Fluoreszenzoptik. Im Reaktionsansatz vorhandene Fluoreszenzfarbstoffe werden durch eine LED angeregt. Die daraufhin emittierte Fluoreszenz wird durch eine Kombination von halbdurchlässigen Spiegeln und wellenlängenspezifischen Filtern zu drei Photohybriden (530 nm, 640 nm, 710 nm) geleitet. Diese wandeln das optische Signal in ein elektrisches Signal um, welches direkt einem PC übermittelt wird und „realtime“ auf dem Monitor dargestellt wird.

4.3.2 Messprinzipien

SYBR®Green-Format:

Der Farbstoff SYBR-Green besitzt die Eigenschaft, sich in die „Minor Groove“ von doppelsträngiger DNA einzulagern. Durch diese Bindung wird die emittierte Fluoreszenz bei gleicher Anregungsintensität um ein vielfaches verstärkt. Die Intensität des Fluoreszenzsignals ist direkt proportional zu der Menge an doppelsträngiger DNA. Im Lightcycler wird nun während der PCR-Amplifikation nach jedem Zyklus am Ende der Elongationsphase die Fluoreszenz gemessen. Die Intensität der Fluoreszenz wird graphisch gegen die Zykluszahl aufgetragen. Die entstehende Kurve repräsentiert die Kinetik der PCR mit exponentiellem Wachstum und Übergang in eine Plateuphase. Die Zykluszahl, bei der das Fluoreszenzsignal aus dem Hintergrund in die exponentielle Wachstumsphase übergeht, ist umso kleiner, je höher die Menge an Template-

DNA im Reaktionsansatz war. Durch Vergleich mit Template-DNAs definierter Konzentrationen erhält man eine direkte quantitative Aussage.

Schließt man an die Amplifikation noch ein sogenanntes Schmelzprogramm an, kann ein PCR-Produkt an Hand seines spezifischen Schmelzpunktes identifiziert werden. Die Temperatur wird hierbei sukzessive erhöht und gleichzeitig kontinuierlich die Fluoreszenz gemessen. Schmilzt der DNA-Doppelstrang, fällt die Intensität des SYBR®Green-Fluoreszenzsignals stark ab. Auf diese Weise kann das Verhältnis von spezifischem Produkt zu unspezifischen Amplifikaten und Primer-Dimeren abgeschätzt werden.

Hybridization Probes(HybProbes)- Format:

Hier enthält der PCR-Ansatz zwei fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide, welche in unmittelbarer Nähe zueinander (1-5 Nukleotide Abstand) innerhalb des Amplifikates an die einzelsträngige Ziel-DNA auf dem gleichen Strang hybridisieren. Das 5'-Ende der einen Sonde ist mit einem sogenannten Acceptor-Fluorophor (LC-Red 640 oder 704) markiert, während die andere Sonde am 3'-Ende mit dem Donor-Fluorophor (Fluorescein) markiert ist. Während des Annealings der PCR, wenn beide HybProbes an die DNA gebunden sind, kommt es zum sogenannten Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET). Hierbei überträgt der Donor-Fluorophor, angeregt durch die externe Lichtquelle, seine Energie auf den Acceptor-Fluorophor. Dieser emittiert nun seinerseits wieder Licht einer längeren Wellenlänge, welches gemessen wird und dessen Intensität wiederum der Menge an Ziel-DNA proportional ist.

Die Verwendung von HybProbes ermöglicht die sequenzspezifische Detektion von PCR-Produkten; unspezifische Produkte und Primerdimere werden nicht detektiert.

4.3.3 Primer- und Sondendesign

Die Basensequenzen der zu untersuchenden HPV-Typen wurden aus der Internet-Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) beschafft (www.ncbi.nlm.nih.gov). Die Zugriffsnummern lauten: NC_001356 für HPV 1a, NC_001457 für HPV 4, NC_001584 für HPV 27 und NC_001528 für

HPV 33. Das Design und die Synthese der Primer (außer für HPV 33) und der fluoreszenzmarkierten Sonden erfolgte durch die Firma TIB Molbiol, Berlin.

Prinzipiell sollte beim Design der Sonden berücksichtigt werden, dass der berechnete Schmelzpunkt (T_m) des DNA-Sonden Hybrids 5-10°C höher liegt, als der der Amplifikationsprimer. Hierdurch wird gewährleistet, dass die Hybridisierungssonden auch wirklich quantitativ binden können, aber andererseits die Elongation noch nicht behindern (was bei zu hohem T_m auftreten könnte). Weiterhin sollten HybProbes keine komplementären Sequenzen aufweisen um Sonde-Sonde- oder Sonde-Primer-Hybridisierungen zu vermeiden.

4.3.4 Evaluierung der Reaktionsbedingungen

Die Sensivität und Effizienz einer PCR wird durch Faktoren wie $MgCl_2$ -Konzentration, Primerkonzentration, die Primer an sich und das PCR-Programm beeinflusst. Während sich für Variationen in $MgCl_2$ -Konzentration und Primerkonzentration kaum Unterschiede zeigten, stellten die jeweiligen Amplifikationsprimer meist den limitierenden Faktor der Sensivität dar. Von der Firma TIB-Molbiol wurden immer jeweils 2 Forward- und 2 Reverse-Primer vorgeschlagen. Die möglichen 4 Primerkombinationen wurden im SYBR-Green-Format ausgetestet und die geeignete ausgewählt. Dies sei im folgenden am Beispiel der PCR für den E7-ORF von HPV 4 dargestellt:

Es standen 2 Forward- (F,F1) und 2 Reverse-Primer (R, R2) zur Auswahl. Mit den möglichen 4 Kombinationen wurden in einer Standard Lightcycler-PCR (1 μ M je Primer, 3 μ M $MgCl$, 1X LC-Mastermix SYBR-Green) jeweils ein 100- und ein 10-Kopien Plasmidstandard amplifiziert. Ein nach der Amplifikation durchgeführtes Schmelzprogramm ergab folgende Schmelzkurven:

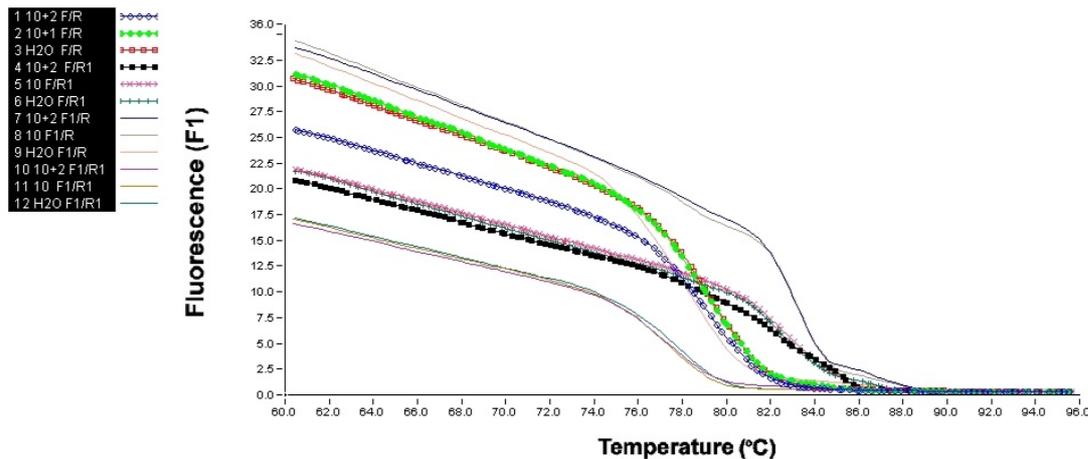


Bild 1: Schmelzkurven nach SYBR-Green Lightcycler PCR

Man sieht während des Temperaturanstiegs nach einem initial langsamen Abfall des Fluoreszenzsignals einen steilen Abfall auf nahezu Null: Doppelsträngige DNA-Stücke schmelzen an einem für sie charakteristischen Schmelzpunkt. Eingelagerte SYBR-Green Moleküle werden freigesetzt und die Fluoreszenz sinkt ab. Die LCDA-Software rechnet nun obiges Fluoreszenz/Temperatur-Diagramm in ein Diagramm um, in dem auf der y-Achse die Fluoreszenzänderung pro Temperaturanstieg oder, mathematisch formuliert, die negative 1. Ableitung der Schmelzkurve ($-dF/dT$) aufgetragen wird. Für die Wendepunkte der Schmelzkurven, an denen der Fluoreszenzabfall am steilsten ist, wird $-dF/dT$ maximal. Aus dem resultierenden Diagramm kann nun das für ein PCR-Produkt charakteristische Schmelzmaximum leicht abgelesen werden. Während PCR-Produkte definierter Länge meist einen recht spitzen Peak zeigen, weisen die in ihren Schmelzpunkten inhomogeneren Nebenprodukte oft breitere Peaks auf. Außerdem besteht eine ungefähre Korrelation zwischen der Fläche unter einem Peak und der Menge an zugeordneter DNA.

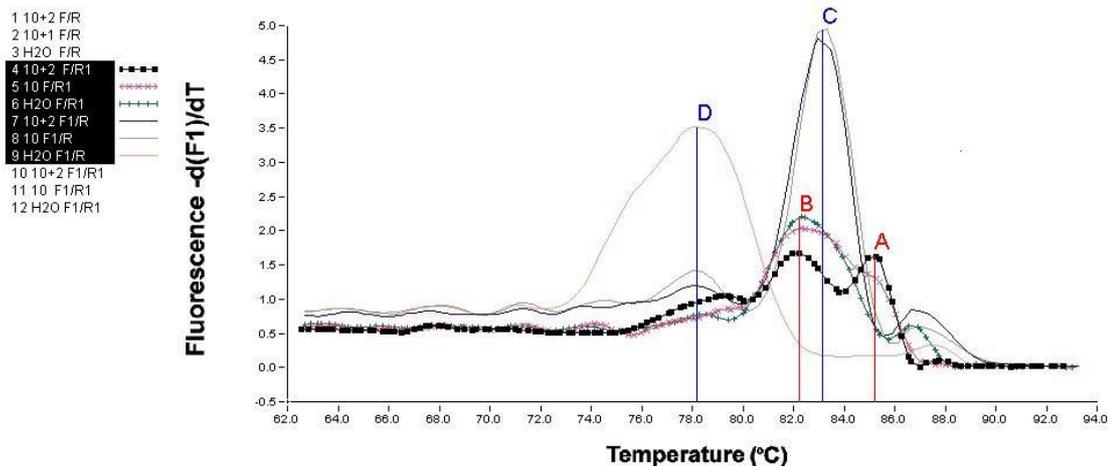


Bild 2: „Melting Peaks“ Darstellung der Schmelzkurven aus Bild 1

Der besseren Übersichtlichkeit wegen, wurden in Bild 2 zwei der vier getesteten Primerkombinationen selektiert. Der für das gewünschte PCR-Produkt spezifische Melting Peak wurde durch Vergleich der Kurven des 100-Kopien Standards und der Negativkontrolle (H₂O) ermittelt: Der spezifische Peak sollte nur beim Standard auftreten. Man erkennt hier für das Primerpaar F / R1 beim 100-Kopien Standard einen Peak bei 85°C (Peak A), der bei der Negativkontrolle nicht vorhanden ist. Für den 10-Kopienstandard ist dieser spezifische Peak noch diskret zu sehen. Sowohl bei den Standards, als auch bei der Negativkontrolle sieht man neben weiteren kleinen unspezifischen Peaks einen großen unspezifischen Peak bei 82°C (Peak B). Den unspezifischen Peaks liegen unspezifische Amplifikate, sogenannte Primer-Dimere, zugrunde. Für das Primerpaar F1 / R zeigt sich ein spezifischer Peak bei 83°C (Peak C). Die Standards zeigen nur kleine unspezifische Peaks, während bei der Negativkontrolle ein breiter Dimer-Peak bei 78°C (Peak D) vorliegt. Mit beiden Primerpaaren wurden 10 Kopien detektiert; mit Paar F1 / R lag das Verhältnis spezifisches Produkt zu unspezifischen Amplifikaten jedoch wesentlich weiter auf der Seite des gewünschten Produkts.

Für die HPV4-Viruslastmessungen aus den Tumor-DNAs wurde deshalb das Primerpaar F1 / R verwendet.

4.3.5 PCRs zur Bestimmung der HPV-Kopienzahlen

Für die HPV-Typen 1, 4, 27 und 33 wurden typenspezifische Lightcycler-PCRs zur Bestimmung der Zahl von Virusgenomkopien durchgeführt. Hierzu wurden jeweils 30ng DNA (basierend auf der photometrisch gemessenen Konzentration) aus den Tumorgeweben pro Reaktion eingesetzt. Gleichzeitig wurden in jedem Lightcyclerlauf Verdünnungen von Plasmiden mitamplifiziert, die die jeweilige Ziel-Sequenz der Primer enthielten. Pro Lauf wurden 4-8 verschiedene Zehnerverdünnungen dieser Plasmidstandards mitgeführt. Als Negativkontrollen dienten ein Ansatz mit Wasser statt Template-DNA und ein Ansatz mit 30 ng humaner Placenta-DNA.

Für die PCRs wurde der LC Faststart Kit Hybridization-Probes (Roche, Mannheim) verwendet:

PCR-Ansatz (HPV 1, 4, 27, 33):

	Volumen	Endkonzentration
steriles Wasser	10,4µl (HPV 27:10µl HPV 33: 9,6µl)	-
Forward Primer (20µM)	1µl (HPV 27: 0,8µl)	1µM (HPV 27: 0,8µM)
Reverse Primer (20µM)	1µl (HPV 27: 0,8µl)	1µM (HPV 27: 0,8µM)
MgCl ₂ (25mM)	1,6µl (HPV 33: 2,4µl)	3mM (HPV 33: 4mM)
HybProbe 3FI (3µM)	1µl	0,15µM
HybProbe 5LC (3µM)	1µl	0,15µM
LC Mastermix (10 x)	2µl	1 x
Template DNA	2µl	-
Gesamtvolumen	20µl	-

Anmerkungen:

- Der LC Mastermix enthält die Taq-Polymerase, den Reaktionspuffer und die Nukleotide.
- Da der LC Mastermix bereits 10 mM MgCl enthält, ergeben sich die obigen MgCl-Endkonzentrationen.

- Die Template DNA bestand aus 30 ng gesamtgenomischer DNA (2µl einer 15ng/µl DNA-Lösung; Proben) bzw. aus einer definierten Kopienzahl an Plasmid-DNA (z.B. 2µl einer auf 500 Kopien/µl eingestellten Plasmid-DNA Lösung; Standard 1000 Kopien).

PCR im Lightcycler:

Die PCR wurde für alle Virustypen unter den folgenden Bedingungen durchgeführt:

95° 10 min

45 Zyklen:

95° 10 sec

55° 20 sec mit Fluoreszenzdetektion

72° 20sec

Die initiale Denaturierung ist zur Aktivierung der FastStart-Polymerase notwendig. Hierdurch werden kovalente Bindungen gelöst und das Enzym in einen aktiven Zustand überführt. Durch diese Technik („Hot Start“) kann einer übermäßigen Bildung unspezifischer Nebenprodukte, welche im Reaktionsansatz schon vor Beginn der eigentlichen PCR durch „self-annealing“ der Primer stattfinden kann, vorgebeugt werden. Das Fluoreszenzsignal wurde jeweils am Ende der Annealing-Phase registriert.

4.3.6 Bestimmung der β -Globin Kopienzahl

Zur genauen Bestimmung der pro Reaktionsansatz eingesetzten Zellzahl, wurde für jede DNA-Probe eine Quantifizierung eines diploiden zellulären Gens, des β -Globin Gens, durchgeführt. Hierzu wurde der Lightcycler Control Kit DNA (Roche, Mannheim) verwendet. Die PCR wurde im HybProbes-Format mit 1µl Primermix durchgeführt. Alle weiteren Reaktionsbedingungen entsprachen der Anleitung des Herstellers. Als Standards wurden Verdünnungen von humaner Placenta-DNA in den Mengen 30 ng, 3 ng, 300 pg und 30 pg verwendet. Dies

entspricht β -Globin Genzahlen von 10000, 1000, 100 und 10, beziehungsweise „Zellzahlen“ von 5000, 500, 50 und 5.

4.3.7 Auswertung mit der Lightcycler Data Analysis Software (LCDA)

Bei einer Lightcycler-PCR wird während jedes Zyklus einmal die Fluoreszenz gemessen. Die Intensität des Signals wird gegen die Zykluszahl aufgetragen und man erhält z.B. folgende Fluoreszenzkurven:

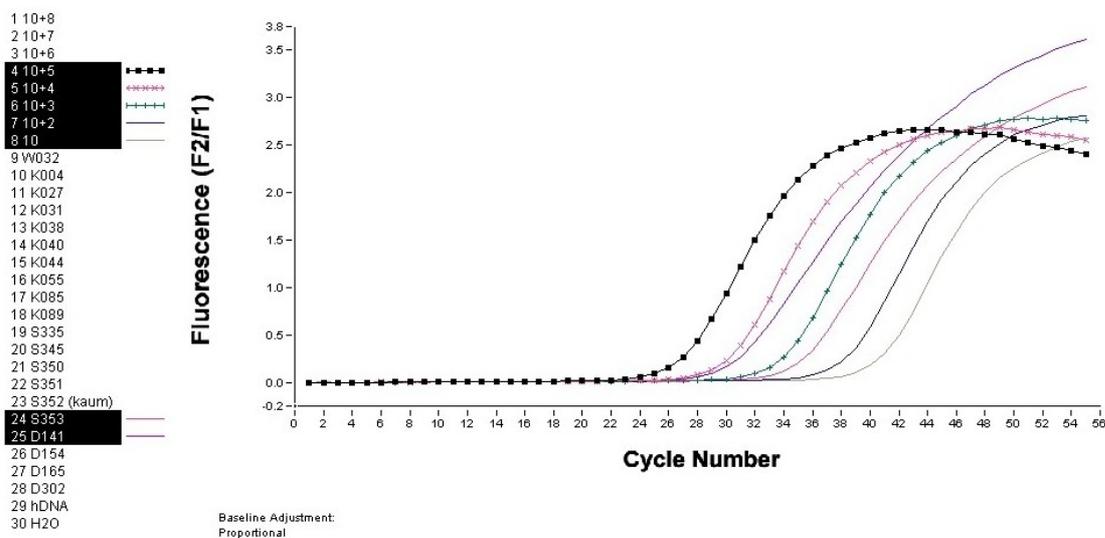


Bild 3: Fluoreszenzkurven einer Lightcycler PCR

Für die Quantifizierung wird nur der Kurvenanteil betrachtet, der die exponentielle Wachstumsphase des PCR Amplifikationsprozesses (log-lineare Phase) repräsentiert. Um unbekannte Proben zu quantifizieren, muss mit Hilfe der bekannten Standards eine Standardkurve erstellt werden. Jedem Standard wird hierzu die Zykluszahl zugeordnet, bei der sein Fluoreszenzsignal einen bestimmten Wert erreicht hat („threshold cycle“). Die Software bietet 2 Möglichkeiten der Auswertung an. Es soll hier die in dieser Arbeit ausschließlich verwendete, sogenannte „Fit Points“-Methode, beschrieben werden: Hierzu werden die Kurven in einem Koordinatensystem mit logarithmisch skaliertem y-Achse dargestellt. Der exponentiell wachsende Kurventeil erscheint hier linear.

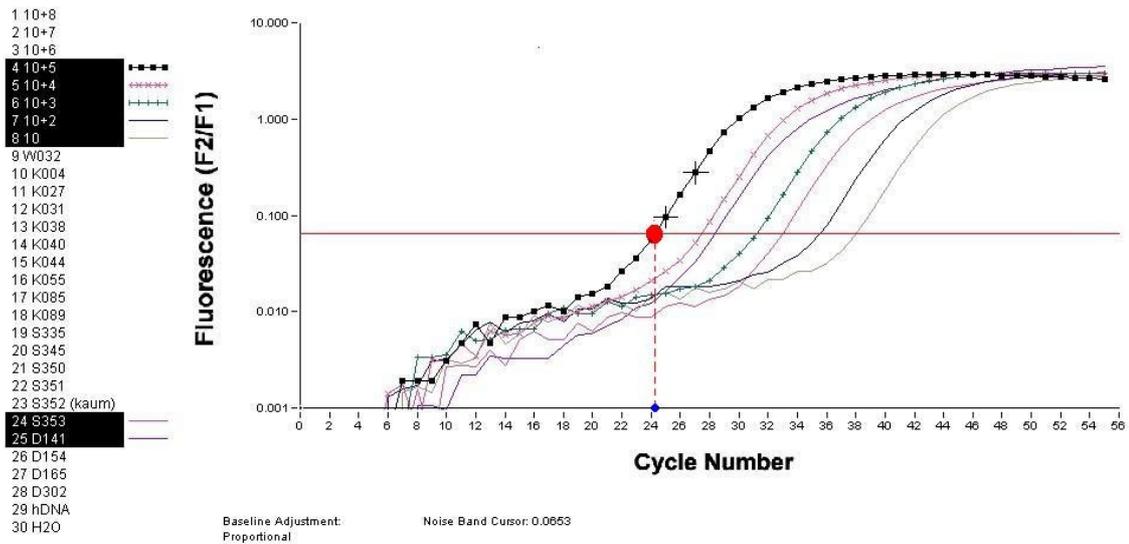


Bild 4: Halblogarithmische Darstellung der Fluoreszenzkurven mit „Noiseband“, „Fit Points“ (Kreuze) und „Crossing Point“ (rot) für Standard 10^5

Nun wird ein sogenanntes Noiseband in den unteren Bereich des log-linearen Anstiegs der Fluoreszenzkurven gelegt. Die Software ermittelt jetzt für jede Kurve jeweils 2 (je nach Voreinstellung auch mehr) Fluoreszenzwerte des log-linearen Kurvenanteils über dem Noiseband. Der Schnittpunkt der Gerade durch diese „Fit-Points“ mit dem Noiseband ergibt den jeweiligen Threshold-Cycle. Nun werden die Schnittpunkte gegen die logarithmische Konzentration bzw. Kopienzahl der Standards aufgetragen:

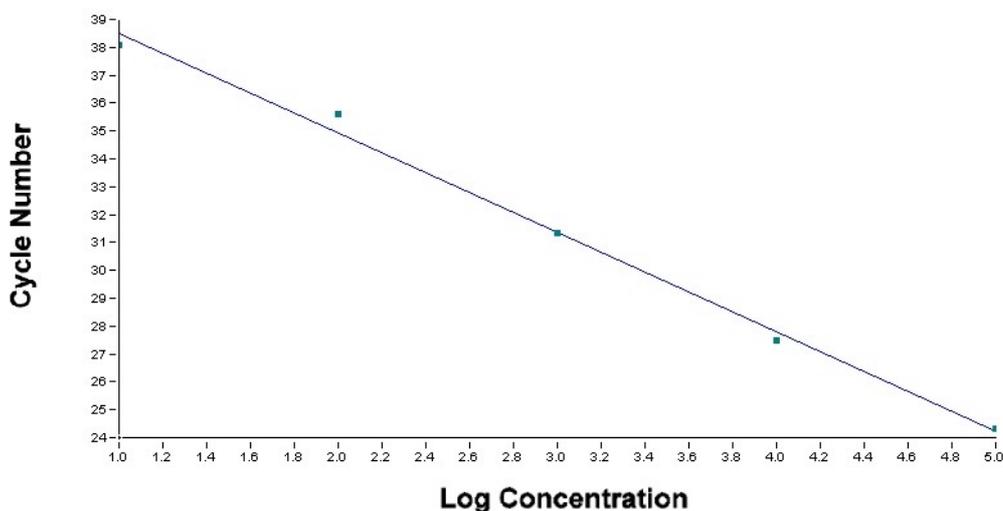


Bild 5: Standardkurve

Mit Hilfe dieser Standardkurve kann nun für jede unbekannte Probe durch Ermittlung ihres „Crossing-Points“ die Ausgangskonzentration der Ziel-DNA bestimmt werden.

Die Standardkurve kann mathematisch durch Steigung und Schnittpunkt mit der y-Achse beschrieben werden. Die Steigung ist ein Maß für die Effizienz E der PCR. Es gilt: Steigung = $-1/\log E$. Eine ideale PCR mit einer Effizienz von 2 ergibt eine Standardkurve mit einer Steigung von $-3,3$. Anschaulich bedeutet dies einen Abstand der Threshold-Cycles von jeweils 3,3 Zyklen für Zehnerverdünnungen. Größere Abstände und damit eine steilere Standardkurve bedeuten eine geringere Effizienz ($E < 2$). Der y-Achsen Schnittpunkt kann mathematisch als $\log N_n / \log E$ beschrieben werden, wobei N_n die Kopienzahl am Threshold Cycle bedeutet. Zusammen mit N_n hängt die Lage des y-Achsenabschnitts von der Höhe des Noiseband ab.

4.4 *In Situ* Hybridisierung

4.4.1 Vorbereitung der Gewebeschnitte

Aminosilan-Behandlung der Objektträger:

Die Objektträger wurden zuerst für 15 min in DEPC-H₂O bei Raumtemperatur gewaschen, dann in 1 M HCl kurz gekocht, ca. 4x in bidest. H₂O gewaschen und anschließend für 2 h bei 180° getrocknet. Hierdurch sollen RNAsen entfernt werden. Daraufhin wurden die Objektträger 10 sec in eine Lösung von 2% 3-Aminopropyltriethoxysilan (CH₂₃NO₃Si) in Aceton getaucht und anschließend 2x kurz mit Aceton und 2x kurz mit DEPC-H₂O abgespült. Schließlich wurden die Objektträger bei 80° für 1 h getrocknet. Durch die Aminosilanbeschichtung entstehen auf der Glasoberfläche kovalent gebundene Aminogruppen. Aldehyde können wiederum kovalent an diese Aminogruppen binden. Durch die Behandlung mit Paraformaldehyd, welcher sowohl Aminogruppen der Glasoberfläche als auch Aminogruppen der Gewebeproteine bindet, kann der Gewebeschnitt sehr fest auf dem Objektträger fixiert werden.

Gefrierschnitte:

Von dem bei -80°C gelagerten Gewebematerial wurde ein Teil in Tissue Tec (Sakura) eingebettet. An einem Gefriermikrotom (Reichert-Jung) wurden dann 5-6µm dicke Schnitte angefertigt und bis zu 8 Schnitte auf einen mit Aminosilan behandelten Objektträger aufgebracht.

Schnittfixierung:

Die frischen Gefrierschnitte wurden zur Fixierung 15 min in 4% Paraformaldehyd für 15 min inkubiert, anschließend 2x 5min in PBS gewaschen und in aufsteigender Alkoholreihe (3min 50% EtOH, 3min 75% EtOH, 3min 95% EtOH) dehydriert. Nach Trocknung wurden die fixierten Gefrierschnitte bei -20°C in einer Trockenperlen enthaltenden Box bis zur weiteren Verwendung gelagert.

4.4.2 Herstellung radioaktiv markierter RNA-Hybridisierungssonden mittels *in vitro* Transkription

Für den Nachweis von Transkripten in den Gewebeschnitten wurden komplementäre RNA-Sonden verwendet. Diese wurden mittels *in vitro* Transkription von subgenomischen HPV DNA-Fragmenten hergestellt. Die Matrizen-DNAs lagen in den Vektor Bluescribe™ M13+(Vector Cloning Systems) kloniert vor; flankiert von einem T3- und einem T7-Bakteriophagenpromotor. Vor der Transkription wurden die Plasmide an einer Restriktionsschnittstelle distal des Inserts in der MCS geschnitten. Je nach Verwendung des Promotors konnte sowohl RNA komplementär zur viralen mRNA („antisense“) als auch RNA derselben Polarität wie die mRNA („sense“) erzeugt werden.

Praktische Vorgehensweise:

Die Plasmid-DNA wurde wie unter 4.2.3 beschrieben isoliert. 2-4 µg der Präparation wurden mit dem geeigneten Restriktionsenzym linearisiert und mittels Phenolextraktion und Ethanol-fällung aufgereinigt. Das Pellet wurde in 5 µl DEPC-H₂O resuspendiert und 0,5 µl auf einem 1%-Agarosegel auf vollständige Linearisierung getestet. Hierbei sollte nur eine Bande entsprechend einer gleich großen linearen Marker-DNA vorliegen. Die DNA wurde dann wieder lyophilisiert.

Für die *in vitro* Transkription wurde folgender Reaktionsansatz vorbereitet:

- 0,8µl rNTP-Mix (je 3,33mM an rATP, rGTP und rCTP)
- 0,5µl DTT (100mM)
- 2µl 5x transcription buffer (Promega)
- 1µl RNAsin®Ribonuklease-Inhibitor (Promega)
- 5µl ³⁵S-UTP (400mCi/mmol, Amersham); entspricht 50µCi/Reaktionsansatz

Das Pellet wurde in obigem Reaktionsgemisch aufgelöst, 25 U der jeweiligen RNA-Polymerase (T3, T7, Promega) zugegeben und mit DEPC-H₂O auf 10 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 2h bei 37°C inkubiert.

Anschließend musste die Matrizen-DNA durch DNase-Verdau entfernt werden. Hierzu wurde der Transkriptionsansatz mit 1 µl RNase freier RQ-1 DNase (Promega) und 10 µl 10x DNase-Puffer (100mM Tris pH 7,4; 10mM MgCl₂) versetzt, mit DEPC-H₂O auf 100 µl aufgefüllt und für 45 min bei 37° inkubiert. Der DNase-Verdau wurde durch Zugabe von 10µl einer Stopp-Lösung (7µl 3M NaAcetat pH 6; 2,2µl 0,5M EDTA pH 8 und 1µl 5mg/ml Hefe t-RNA) abgebrochen. Anschließend wurde die RNA mittels erneuter Phenolextraktion von Proteinen befreit, bei einer Konzentration von 0,3 M NaAcetat (weitere Zugabe von 4µl 3M NaAcetat) mit Ethanol bei -20° über Nacht gefällt und in 25µl (HPV1-E2/E4) bzw. 55µl (HPV33-E6/E7) DEPC-H₂O aufgenommen.

Auf diese Weise wurden folgende RNAs generiert:

HPV 33: E6 / E7 – antisense: Linearisierung von Plasmid 4 (siehe Material)
mit Hind III und Transkription mit T7
E6 / E7 – sense: Linearisierung von Plasmid 4 mit EcoR I und
Transkription mit T3
volle Länge der Transkripte : 909 bp
(Beyer-Finkler et al., 1990)

HPV 1: E2 / E4 – antisense : Linearisierung von Plasmid 5 (siehe Material)
mit EcoR I und Transkription mit T3
E2 / E4 – sense: Linearisierung von Plasmid 5 mit Hind III und
Transkription mit T7
volle Länge der Transkripte: 302 bp
(Egawa et al., 1999)

Um Einflüsse der Sondenlänge auf die spätere Intensität des Signals auszuschließen, sollte die Länge der hybridisierenden RNA-Fragmente weniger als 300 bp betragen. Dies erlaubt später bei konstanter Expositionszeit einen quantitativen Vergleich der Expression der verschiedenen detektierten Transkripte. Im vorliegenden Fall war dies nicht zwingend notwendig, trotzdem

wurde die oben genannten Sonden HPV33-E6/E7-antisense und -sense dieser Längennormalisierung mittels alkalischer RNA-Hydrolyse unterworfen. Hierzu wurde 50 µl der gelösten RNA-Sonde mit 50 µl 0,2M Carbonatpuffer (20µl 0,2M NaHCO₃ und 30µl 0,2M Na₂CO₃) vermischt und bei 60°C für 20 min inkubiert.

Die Inkubationszeit berechnet sich nach der Formel $t = \frac{L_0 - L_K}{kL_0L_K}$, wobei L₀ die initiale Länge in kb (hier 0,9), L_K die gewünschte Länge in kb (0,3) und k die durchschnittliche Zahl an Stranghydrolysen pro kb und min bedeutet (k=0,107; konstant für die angegebenen Reaktionsbedingungen).

Der Abbruch der Hydrolysereaktion erfolgte durch Zugabe von 8 µl Stopp-Lösung (3µl 3M NaAcetat pH6; 5µl 10%ige Essigsäure). Danach wurden der Lösung 5µg Hefe t-RNA zugesetzt, die RNA mit Ethanol bei -20° über Nacht gefällt und das Pellet in 25 µl DEPC-H₂O resuspendiert.

Um die Qualität der *in vitro* transkribierten RNA und die Effizienz der Hydrolyse zu überprüfen, wurden jeweils 5 µl Aliquots der Sonden auf ein analytisches, denaturierendes 5%iges Harnstoff-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach dem Lauf wurde mit dem Gel eine Photoplatte 5 min belichtet und diese mit dem Phosphoimager (Fujifilm Bas 1800) ausgelesen.

Zur Ermittlung der Aktivität wurden jeweils 2 µl der verschiedenen Sonden unter Zugabe von 5 ml Szintillationsflüssigkeit (Ultima GoldTM; Packard, Groningen,NL) im Szintillationszähler (Wallac 1409) gemessen. Die Radioaktivität lag für die transkribierten RNAs typischerweise bei Werten um die 1,5 x 10⁶ cpm / µl RNA-Lösung.

4.4.3 Radioaktive RNA-RNA *In Situ* Hybridisierung

Acetylierung der Schnitte:

Um eine unspezifische Bindung der Sonde gering zu halten, wurden die Schnitte vor der Hybridisierung zur Acetylierung in einer Mischung aus 3ml Triethanolamin, 0,3ml 100% Essigsäure und 200ml DEPC-H₂O für 10 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach wurden die Objektträger 2 mal in 0,2x SSC für jeweils 10 min gewaschen und an der Luft getrocknet. Durch diese Prozedur werden potentiell reaktive Gruppen des

Gewebes und der Objektträgeroberfläche acetyliert und positive Ladungen abgedeckt.

Die trockenen Schnitte wurde mit Fixogum Rubber Cement (Marabu, Tamm) eingekreist, um ein Überfließen der Hybridisierungslösung auf die benachbarten Schnitte zu vermeiden.

Prähybridisierung:

Dann wurde folgende Lösung vorbereitet:

		Endkonzentration
500µl	100% deionisiertes Formamid	50%
50µl	50x Denhardt	2,5x
120µl	5M NaCl	0,6M
10µl	1M Tris pH 7,5	10mM
2µl	0,5M EDTA	1mM
10µl	10% SDS	0,1%
15µl	10mg/ml Hefe t-RNA	0,15mg/ml
293µl	DEPC-H ₂ O	
1000µl		

Die Lösung wurde für 3 min gekocht und auf Eis wieder abgekühlt. Dann wurde jeder Schnitt mit 20µl der Prähybridisierungslösung bedeckt. Die Prähybridisierung erfolgte für 2h bei 42°C in einer feuchten Kammer, die 50% Formamid und 4x SSC enthielt.

Hybridisierung:

Der Reaktionsansatz für die Hybridisierungslösung enthielt neben den schon für die Prähybridisierung verwendeten Komponenten 10% Dextransulfat, 10mM DTT und die radioaktive RNA-Sonde in einer Konzentration von 5×10^4 cpm /µl Hybridisierungslösung. Die Prähybridisierungslösung wurde mit einer Pipette von den Gewebeschnitten abgesaugt und durch 20 µl Hybridisierungslösung ersetzt. Die Hybridisierung erfolgte in derselben feuchten Kammer bei 42° für 16 h.

Waschen:

Nach entfernen der Fixogum-Streifen und abkippen der Hybridisierungslösung wurden die Objektträger folgenden Waschschritten unterworfen:

1. 50% Formamid, 1x SSC, 10mM DTT; 5 min bei 55°C
2. und 3. 50% Formamid, 1x SSC; je 15 min bei 55°C
4. und 5. 0,5x SSC; je 5 min bei Raumtemperatur

Um unspezifisch gebundene, nicht an die Ziel-mRNA hybridisierte Sonden-RNA zu entfernen, wurden die Objektträger nach dem Waschen mit RNase behandelt. Der RNase Verdau erfolgte in RNase-Puffer (0,5M NaCl; 0,1mM Tris pH8; 1mM EDTA), dem 20 µg/ml RNase A zugesetzt wurden.

Anschließend wurden die Schnitte 2 mal je 10 min in RNase-Puffer (s.o.) ohne Enzym bei Raumtemperatur und 5 mal je 20 min in 0,1x SSC bei 55°C gewaschen.

Danach erfolgte eine Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe in Gegenwart von 300mM Ammoniumacetat.

Die trockenen Objektträger wurden schließlich mit einem Autoradiographiefilm (HyperfilmTMMP, Amersham) über Nacht autoradiographiert.

Diese Übernachtexposition kann bei relativ starken Signalen einen erste qualitative Aussage über einen positiven Transkriptionnachweis liefern.

Darstellung der Signale:

Um die radioaktiven Hybride im Kontext der Gewebemorphologie darzustellen, wurden die Objektträger mit einer Filmemulsion beschichtet.

Hierzu wurde die Filmemulsion (Kodak NTB-2) 1:1 mit 0,6M Ammoniumacetat verdünnt und im Wasserbad auf 37° erwärmt. Die Objektträger wurden mehrmals in die Emulsion getaucht, an der Luft getrocknet und in einer in Alufolie eingewickelten Kunststoffbox für 10-14 Tage bei 4°C exponiert.

Die Entwicklung der Objektträger erfolgte, nach Erwärmung der Schnitte auf Raumtemperatur, für 3 min bei 15°C in Entwicklerlösung (Kodak D19), für 30 sec bei 15°C in Unterbrecherlösung (2% Essigsäure) und für 5 min bei 15°C in

Fixierlösung (Kodak A3000). Anschließend wurden die Objektträger 2 mal in H₂O bei 15°C und 2 mal in H₂O bei Raumtemperatur gewaschen.

4.4.4 H.E.-Gegenfärbung

Die entwickelten Gewebeschnitte wurden letztendlich nach folgendem Schema mit Hämalan und Eosin gegengefärbt und mit Entellan (Merck) eingedeckt.

30 sec	Hämalan (1:2 in H ₂ O)
3 X	waschen in Aqua dest.
1 X	waschen in Leitungswasser
1 X	waschen in Aqua dest.
1-2 min	50% Ethanol
1-2 min	75% Ethanol
1-2 min	90% Ethanol
30 sec	Eosin (12% EosinG [1% in H ₂ O]; 1,2% PhloxinB [1% in H ₂ O]; 83% Ethanol; 0,5% Essigsäure)
3 X	waschen in 100% Ethanol
2 X	waschen in Xylol

5 Ergebnisse

5.1 Quantitative Realtime PCR zur Bestimmung der Viruslast

Mit Hilfe der RTQ-PCR wurde für HPV-positive Haut- und Schleimhautveränderungen die HPV-Viruslast bestimmt. Hierzu wurden jeweils 30 ng gesamtgenomische DNA pro Reaktion eingesetzt. Dies entspricht im Idealfall der DNA von 5000 Zellen mit diploidem Chromosomensatz. Um den Einfluss von DNA-Qualität und PCR-Inhibitoren sowie die Ungenauigkeit der photometrischen DNA-Konzentrationsbestimmung auszugleichen, wurde für jede Probe das humane β -Globin Gen mitquantifiziert.

Die Ergebnisse sind in den Tabellen 8 - 15 genau aufgeführt. Der Wert der Viruslast ist der Quotient aus den arithmetischen Mittelwerten von HPV-Kopien und Zellzahl.

5.1.1 Bewertungskriterien der PCR

Effizienz:

Eine PCR in der exponentiellen Wachstumsphase lässt sich durch folgende Formel beschreiben: $N_n = N_0 \times E^n$. N_n ist hierbei die Kopienzahl des PCR-Produkts nach Zyklus n , N_0 ist die initiale Kopienzahl und E ist die Effizienz der PCR. Eine ideale Effizienz würde eine Verdopplung der DNA-Kopien pro Reaktionszyklus bedeuten; E wäre dann 2. Dieser eher abstrakte Zusammenhang gewinnt für die Lightcycler PCR eine anschauliche Bedeutung: N_n ist nämlich für den Zeitpunkt des Threshold-Cycle für alle Reaktionsansätze unterschiedlicher Startkonzentrationen gleich; ein gleich starkes Fluoreszenzsignal bedeutet gleich viele DNA-Kopien. Kennt man nun für Standards bekannter Konzentration die jeweiligen Threshold-Cycles, kann die Effizienz E berechnet werden. Einer Effizienz von 2 entspricht ein Abstand der Threshold-Cycles zwischen Zehnerverdünnungen von 3,3 Zyklen. Mit der LCDA-Software kann E auch leicht aus der Standardkurve, bei der die Nummern der Threshold-Cycles gegen den Logarithmus der Konzentrationen der Standards aufgetragen

wurden, abgelesen werden. Für die Steigung s dieser Standardkurve gilt: $s = -1 / \log E$. Eine Effizienz von 2 entspricht einer Steigung von $-3,3$.

Für fast alle verwendeten PCR-Designs lag die Steigung der Standardkurven zwischen $-3,3$ und $-3,8$. Für die HPV4-L2 PCR lag diese Steigung bei $4,4$ (niedrigere Effizienz). Es konnte jedoch kein direkter Zusammenhang zwischen Effizienz und Sensitivität festgestellt werden. Zum Teil amplifizieren Primerpaare im höheren Kopienbereich mit guter Effizienz, während geringer konzentrierte Standards gar nicht detektiert werden.

Reproduzierbarkeit und Sensitivität:

Zur Bewertung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurden für jede PCR für die Threshold-Cycles der in den verschiedenen Läufen amplifizierten Standards Standardabweichungen s und Variationskoeffizienten bestimmt. Der Variationskoeffizient VK gibt an, wie viel Prozent vom arithmetischen Mittelwert die Standardabweichung beträgt und berechnet sich als: $VK = s / \text{Mittelwert}$. Zur Ermittlung der Threshold-Cycles wurde das Noiseband hier immer auf einen Fluoreszenzwert von $0,1$ gesetzt (Tabellen 3-7). Hierzu muss man sagen, dass diese Werte natürlich auch von anderen Faktoren, wie z.B. dem Alter der verwendeten Reaktionskomponenten abhängen können. Deshalb wurde für jeden einzelnen Lauf, in dem Virus-DNA quantifiziert wurde, eine eigene Verdünnungsreihe von bis zu 8 verschiedenen Standardkonzentrationen mitgeführt.

Für die einzelnen Tumor- DNAs wurden ebenfalls, sowohl für die β -Globinwerte als auch für die HPV-Kopienzahlen, jeweils Standardabweichung und Variationskoeffizient bestimmt. Da die Nummer des Threshold-Cycles mit dem Logarithmus der Konzentration linear korreliert, fallen die Variationskoeffizienten, wenn man Standardabweichungen der Konzentration zu Grunde legt, deutlich höher aus als wenn man Standardabweichungen der Zykluszahl verwendet. Trotzdem muss man sagen, dass in den allermeisten Fällen eine ausreichende Reproduzierbarkeit bestand. Im Bereich sehr niedriger Konzentrationen - < 100 Kopien - sind die Abweichungen zwischen wiederholten Messungen erwartungsgemäß erheblich. In diesen

Konzentrationsbereichen spielen Zufallsprozesse für die PCR eine große Rolle. Eine Erhöhung der Genauigkeit wäre hier nur durch sehr viele wiederholte Messungen zu erreichen.

Die Sensitivität der verschiedenen verwendeten PCR-Designs kann ebenfalls aus den Tabellen abgelesen werden (n.d. bedeutet „nicht detektiert“).

Tabelle 4: Threshold-Cycles der Standards für die HPV33-PCR

	1,00E+08	1,00E+07	1,00E+06	1,00E+05	1,00E+04	1,00E+03	1,00E+02	1,00E+01
1. Lauf	13,9	17,7	21,6	25,1	28,3	32	36,4	38,8
2. Lauf	-	-	-	26,1	28,9	33,4	36,7	41
3. Lauf	-	-	22,1	24,5	28,3	31,8	35,7	38,9
Mittelwert	13,9	17,7	21,9	25,2	28,5	32,4	36,3	39,6
Stabw. s	-	-	0,25	0,66	0,28	0,71	0,42	1,01
Varkoeff.	-	-	1,14%	2,62%	0,99%	2,20%	1,16%	2,56%

Tabelle 5: Threshold-Cycles der Standards für die HPV4-L2 PCR

	1,00E+09	1,00E+08	1,00E+07	1,00E+06	1,00E+05	1,00E+04	1,00E+03	1,00E+02	1,00E+01
1. Lauf	-	-	-	-	25,7	30	33,7	38	40,1
2. Lauf	-	-	-	-	27,3	32,4	35,2	40	41
3. Lauf	8,9	13,6	17,8	20,4	26,5	31,2	-	-	-
4. Lauf	9,3	13,7	19,1	23	27,1	31,9	-	-	-
Mittelwert	9,1	13,65	18,45	21,7	26,7	31,4	34,5	39,0	40,6
Stabw. s	0,2	0,05	0,65	1,30	0,62	0,90	0,75	1,00	0,45
Varkoeff.	2,20%	0,37%	3,52%	5,99%	2,34%	2,87%	2,18%	2,56%	1,11%

Tabelle 6: Threshold-Cycles der Standards für die HPV4-E7 PCR

	1,00E+04	1,00E+03	1,00E+02	1,00E+01
1. Lauf	-	30	33,2	37,7
2. Lauf	26	29,2	33,2	36,7
3. Lauf	25,8	29,4	32,8	35,8
Mittelwert	25,9	29,5	33,1	36,7
Stabw. s	0,10	0,34	0,19	0,78
Varkoeff.	0,39%	1,15%	0,57%	2,11%

Tabelle 7: Threshold-Cycles der Standards für die HPV27- PCR

	1,00E+08	1,00E+07	1,00E+06	1,00E+05	1,00E+04	1,00E+03	1,00E+02	1,00E+01
1. Lauf	-	-	-	-	28,4	32,3	35,8	38,7
2. Lauf	-	-	21,1	24,5	28,4	30,8	34,5	37,9
3. Lauf	-	-	20,9	24,9	28,3	31,2	35,7	n.d.
4. Lauf	-	17,7	22,5	24,7	28	31,7	34,9	39,3
5. Lauf	13,5	16,7	20,5	23,7	27,5	30,8	33,7	-
Mittelwert	13,5	17,2	21,3	24,5	28,1	31,4	34,9	38,6
Stabw. s	-	0,5	0,75	0,46	0,34	0,57	0,78	0,57
Varkoeff.	-	2,91%	3,55%	1,86%	1,22%	1,83%	2,24%	1,48%

Tabelle 8: Threshold-Cycles der Standards für die HPV1- PCR

	1,00E+05	1,00E+04	1,00E+03	1,00E+02	1,00E+01
1. Lauf	23,1	26,4	30	32,1	n.d.
2. Lauf	23,4	27,1	30,8	33,5	37,9
Mittelwert	23,3	26,8	30,4	32,8	37,9
Stabw. s	0,15	0,35	0,40	0,70	-
Varkoeff.	0,65%	1,31%	1,32%	2,13%	-

5.1.2 Einfluss der β -Globin Normalisierung

Idealerweise sollten hier 30 ng Proben-DNA den gleichen Threshold-Cycle wie 30 ng Referenz-DNA (Placenta-DNA) aufweisen. In der Regel wurden für die Proben-DNAs etwas geringere Konzentrationen berechnet. Als wichtig erwies sich die β -Globin Bestimmung vor allem bei DNAs, die weit unter der eigentlich eingesetzten Menge berechnet wurden. Ohne Normalisierung hätte dies zu Fehleinschätzungen um bis zu Faktor 100 geführt. Teilweise war es auch nötig schlecht amplifizierende DNAs in höherer, angepasster Konzentration einzusetzen bzw. die DNA-Präparation aufzureinigen.

In den Ergebnistabellen wurden die berechneten β -Globin Genzahlen bereits halbiert und als Zellzahl bezeichnet. Der Begriff Zellzahl und damit auch der Wert „Kopien pro Zelle“ sagt jedoch nichts darüber aus, wie viele Kopien tatsächlich in einer infizierten Zelle vorliegen, da alle Zellen, auch nichtinfizierte Epithelien, Bindegewebs- und Entzündungszellen, zum β -Globin Signal beitragen.

5.1.3 Viruslast in HPV33-positiven kutanen und genitalen Präkanzerosen und Karzinomen

Es wurden 2 Basalzellkarzinome (BCC), 6 Plattenepithelkarzinome (SCC) und 6 aktinische Keratosen (akt.K.) der Haut untersucht. Außerdem wurden 1 niedriggradige zervikale intraepitheliale Neoplasie (CIN 1-2), 12 hochgradige zervikale intraepitheliale Neoplasien (CIN 3), 3 invasive Zervixkarzinome, 1 Lymphknotenmetastase eines Zervixkarzinoms (LkMe), 1 Zungenkarzinom (ZuCa) und ein Tonsillenkarzinom (ToCa) zum Vergleich mituntersucht. Alle Veränderungen waren nach vorangegangener HPV-PCR und Sequenzierung positiv für HPV 33.

Die Hautkarzinome (BCC und SCC) zeigten sehr geringe Viruslasten im Bereich von 1 Viruskopie auf 500 – 140 Zellen. Von den 6 aktinischen Keratosen war bei 2 die Viruslast unter der Nachweisgrenze, während die 4 anderen deutlich höhere Viruslasten zwischen 1 Kopie auf 40 Zellen und 2,5 Kopien pro Zelle aufwiesen (Tabelle 8).

Die genitalen Läsionen zeigten für die hochgradigen CIN HPV-Kopienzahlen über ein weites Spektrum zwischen 1 Kopie auf 10 Zellen und 2000 Kopien pro Zelle. Für die Zervixkarzinome und die Kopf-Hals Karzinome reichte die Viruslast von 1 Kopie pro 500 Zellen bis 70 Kopien pro Zelle (Tabelle 9).

In Bild 6 sind diese Ergebnisse als Gegenüberstellung zwischen Haut- und Schleimhautveränderungen, sowohl für die Präkanzerosen als auch für die Karzinome, nochmals zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 9: Viruslast in HPV33-pos. Hauttumoren

ID-Nr.	Ergebnisse der β -Globin-PCR					Ergebnisse der HPV33-PCR						Viruslast	Typ
	1.Lauf	2.Lauf	\emptyset Zellzahl	Stabw.	VK	1.Lauf	2.Lauf	3.Lauf	\emptyset HPV-Kop.	Stabw.	VK		
K004	3500	2569	3034,5	465,5	15%	8	25	6	13	8,52	66%	0,0043	BCC
K055	6240	4628	5434	806	15%	25	6	3	11	9,74	86%	0,0024	BCC
K031	4711	4152	4431,5	279,5	6%	7	14	14	12	3,30	28%	0,0026	SCC
K038	7870	6045	6957,5	912,5	13%	14	49	29	31	14,34	47%	0,0044	SCC
K040	2851	2339	2595	256	10%	5	14	36	18	13,02	71%	0,0071	SCC
K044	6320	5060	5690	630	11%	2	27	5	11	11,15	98%	0,0020	SCC
K027	3801	3751	3776	25	1%	15	39	26	27	9,81	37%	0,0071	SCC
K089	825	774	799,5	25,5	3%	neg.	neg.	neg.	< 10	-	-	< 0,0125	SCC
K085	2968	1589	2278,5	689,5	30%	neg.	neg.	neg.	< 10	-	-	< 0,0044	akt.K.
S335	244	107	175,5	68,5	39%	neg.	neg.	neg.	< 10	-	-	< 0,0570	akt.K.
S345	128	97	112,5	15,5	14%	19	135	56	70	48,38	69%	0,6222	akt.K.
S350	287	312	299,5	12,5	4%	13	9	1	8	4,99	65%	0,0256	akt.K.
S352	4219	n.u.	4219	-	-	600	n.u.	n.u.	600	-	-	0,1422	akt.K.
S353	201	212	206,5	5,5	3%	330	914	341	528	272,74	52%	2,5585	akt.K.

Tabelle 10: Viruslast in HPV33-pos. genitalen Veränderungen und 2 Kopf-Hals Karzinomen

ID-Nr.	Ergebnisse der β -Globin-PCR					Ergebnisse der HPV33-PCR						Viruslast	Typ
	1.Lauf	2.Lauf	\emptyset Zellzahl	Stabw.	VK	1.Lauf	2.Lauf	\emptyset HPV-Kop.	Stabw.	VK	Kop./Zelle		
E770-27	11450	12355	11903	452,5	4%	14130	17380	15755	1625	10%	1,3	CIN 2	
E525-13	1915	3169	2542	627	25%	7841	5264	6553	1288,5	20%	2,6	CIN 3	
E549-10	2831	4064	3448	616,5	18%	3043	2461	2752	291	11%	0,8	CIN 3	
E575-11	3024	3874	3449	425	12%	2250	1881	2066	184,5	9%	0,6	CIN 3	
E575-20	2260	3457	2859	598,5	21%	546	366	456	90	20%	0,2	CIN 3	
E773-10	1825	1767	1796	29	2%	20130	21910	21020	890	4%	11,7	CIN 3	
E705-09	507	1619	1063	556	52%	9145	16650	12898	3752,5	29%	12,1	CIN 3	
E740-24	561	1466	1014	452,5	45%	2687	2952	2820	132,5	5%	2,8	CIN 3	
E768-15	4474	4984	4729	255	5%	7,76E+06	1,12E+07	9,48E+06	1,72E+06	18%	2004,7	CIN 3	
E575-15	4315	6570	5443	1128	21%	9,72E+05	1,72E+06	1,35E+06	3,74E+05	28%	247,3	CIN 3	
E575-32	4905	7220	6063	1158	19%	546	647	597	50,5	8%	0,1	CIN 3	
E784-10	5670	7480	6575	905	14%	1,75E+05	2,79E+05	2,27E+05	52000	23%	34,5	CIN 3	
D302	3893	2838	3366	527,5	16%	71800	48290	60045	11755	20%	17,8	CIN 3	
E655-18	4495	6015	5255	760	14%	1,07E+05	1,55E+05	1,31E+05	24000	18%	24,9	CxCa	
JW20-01	5995	8630	7313	1318	18%	4,28E+05	5,11E+05	4,70E+05	41500	9%	64,2	CxCa	
E821-27	3616	5395	4506	889,5	20%	18810	27010	22910	4100	18%	5,1	LkMe	
E623-39	7490	12575	10033	2543	25%	5,24E+05	8,42E+05	6,83E+05	1,59E+05	23%	68,1	ZuCa	
JW7-03	4319	6230	5275	955,5	18%	17	3	10	7	70%	0,002	CxCa	
E624-05	3944	3849	3897	47,5	1%	1,25E+05	1,51E+05	1,38E+05	13000	9%	35,4	ToCa	

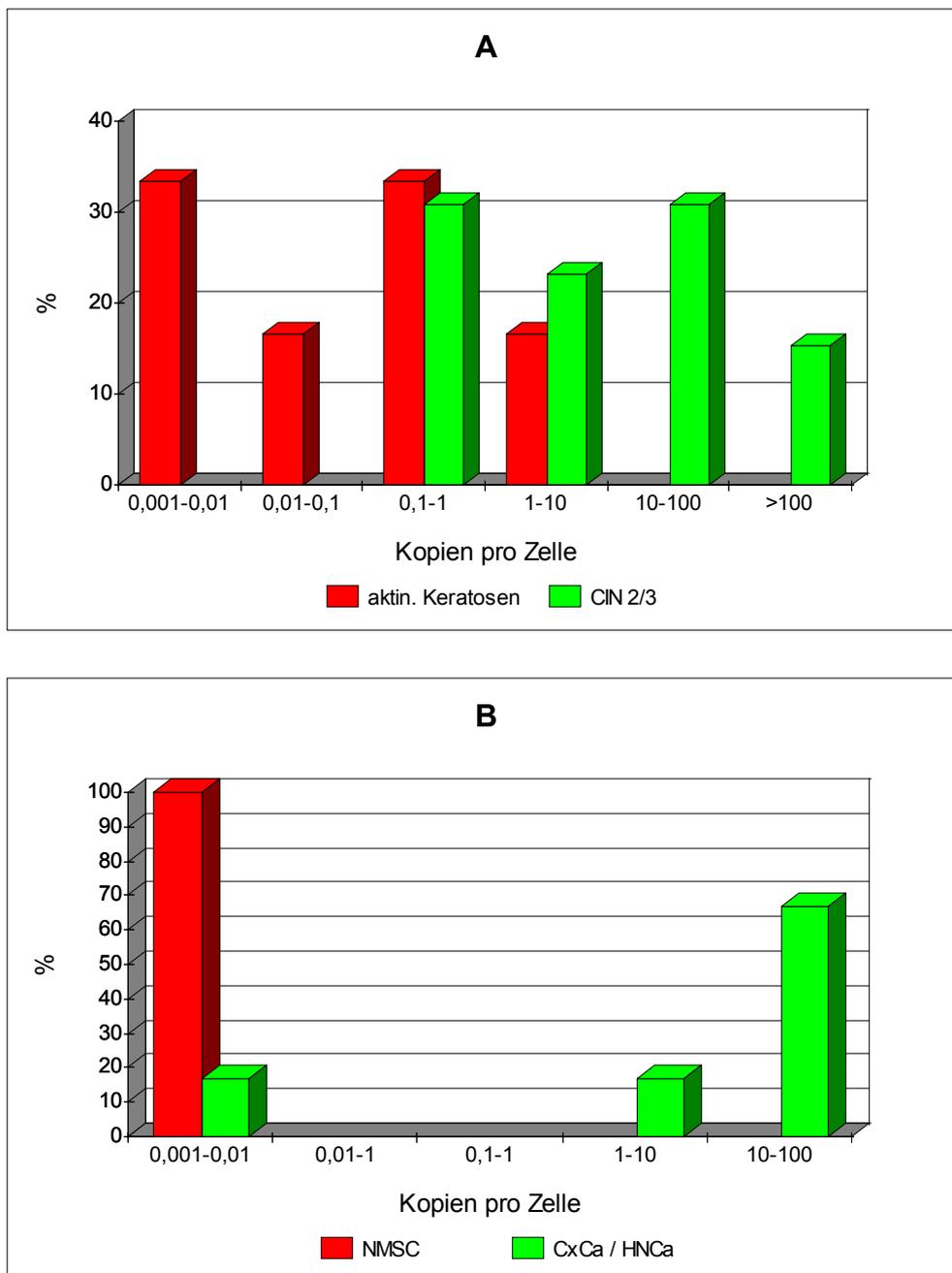


Bild 6: Prozentuale Anteile von HPV33-positiven Haut- und Schleimhautveränderungen bestimmter Viruslast-Klassen an der Gesamtheit der untersuchten HPV33-positiven Veränderungen derselben Entität. Diagramm A zeigt die Verteilung der aktinischen Keratosen (n=6) und der zervikalen Präkanzerosen (n=13) auf die unterschiedlichen Viruslastbereiche. Diagramm B stellt in gleicher Weise die Verhältnisse für die Hautkarzinome (SCC + BCC, n=8) und die Schleimhautkarzinome (Zervixkarzinome + Kopf-Hals-Karzinome, n=6) dar.

5.1.4 Viruslast in HPV4-positiven benignen und malignen Hauttumoren

Es wurden für 10 HPV4-positive Plattenepithelkarzinome, 1 HPV4-positive aktinische Keratose, 6 HPV4-positive vulgäre Warzen (V.v.) und 4 HPV4-positive Plantarwarzen (Pl.W.) Viruslastbestimmungen durchgeführt. Die Karzinome wurde zur Bestätigung der Ergebnisse mit Primern aus dem E7-ORF nachuntersucht.

Für die Karzinome zeigten sich in 9 Fällen Virusmengen, welche die Sensitivität der Methode unterschreiten. Die in der Tabelle angegebenen Grenzwerte für die Viruslast berechnen sich mit einer angenommenen höchstmöglichen Kopienzahl von 10 Kopien pro Reaktionsansatz. Ein Karzinom zeigte eine HPV-Viruslast von 1 Kopie auf 10 Zellen. Die aktinische Keratose lag bei 1 Kopie auf 15 Zellen. (Tabelle 10).

Die untersuchten vulgären und plantaren Warzen wiesen HPV-Kopienzahlen zwischen 1 Kopie auf 10 Zellen und 9×10^5 Kopien pro Zelle auf (Tabelle 11).

Tabelle 11: Viruslast in HPV4-positiven Plattenepithelkarzinomen und einer aktinischen Keratose

ID-Nr.	Ergebnisse der β -Globin-PCR					Ergebnisse der HPV4-PCR						Viruslast	
	1.Lauf	2.Lauf	$\bar{\Delta}$ Zellzahl	Stabw.	VK	1.Lauf(L2)	2.Lauf(E7)	3.Lauf(E7)	$\bar{\Delta}$ HPV-Kop	Stabw.	VK	Kop./Zelle	Typ
K002	2790	2173	2481,5	308,5	12%	neg.	neg.	neg.	<10	-	-	< 0,004	SCC
K013	6180	4879	5529,5	650,5	12%	neg.	neg.	neg.	<10	-	-	< 0,002	SCC
K016	4422	5010	4716	294	6%	neg.	neg.	neg.	<10	-	-	< 0,002	SCC
K019	3263	2520	2891,5	371,5	13%	neg.	neg.	neg.	<10	-	-	< 0,003	SCC
K024	2220	1443	1831,5	388,5	21%	neg.	neg.	neg.	<10	-	-	< 0,005	SCC
K037	3226	2102	2664	562	21%	neg.	neg.	neg.	<10	-	-	< 0,004	SCC
K042	1354	1345	1349,5	4,5	0%	neg.	neg.	neg.	<10	-	-	< 0,007	SCC
K052	3168	2375	2771,5	396,5	14%	neg.	neg.	neg.	<10	-	-	< 0,004	SCC
K066	3861	2802	3331,5	529,5	16%	neg.	2	neg.	2	-	-	0,0006	SCC
K090	1130	1257	1193,5	63,5	5%	157	72	147	125	32,85	26%	0,1050	SCC
S247	2520	3144	2832	312	11%	245	n.u	142	194	42,05	22%	0,0683	aktK

Tabelle 12: Viruslast in HPV4-positiven vulgären und plantaren Warzen

ID-Nr.	Ergebnisse der β -Globin-PCR					Ergebnisse der HPV4-PCR					Viruslast	Typ
	1.Lauf	2.Lauf	$\bar{\Delta}$ Zellzahl	Stabw.	VK	1.Lauf	2.Lauf	$\bar{\Delta}$ HPV-Kop.	Stabw.	VK	Kop./Zelle	
W003	687	555	621	66	11%	14240	13290	13765	475	3%	22	Pl.W.
W283	2769	2518	2643,5	125,5	5%	2,10E+05	1,72E+05	1,91E+05	19000	10%	72	V.v.
W543	615	707	661	46	7%	2,46E+08	2,53E+08	2,50E+08	3,50E+06	1%	3,77E+05	V.v.
W542	542	490	516	26	5%	4,29E+08	4,93E+08	4,61E+08	3,20E+07	7%	8,93E+05	V.v.
W002	830	773	801,5	28,5	4%	35630	34700	35165	465	1%	44	Pl.W.
W420	542	151	346,5	195,5	56%	1,18E+06	1,02E+06	1,10E+06	80000	7%	3175	V.v.
W545	615	421	518	97	19%	2,61E+05	2,28E+05	2,45E+05	16500	7%	472	V.v.
W136	1052	889	970,5	81,5	8%	1186	1068	1127	59	5%	1,2	Pl.W.
W115	582	540	561	21	4%	1,06E+08	1,10E+08	1,08E+08	2,00E+06	2%	1,93E+05	Pl.W.
W118	1164	1144	1154	10	1%	94	142	118	24	20%	0,1	V.v.

5.1.5 Viruslast in HPV27-positiven benignen und prämaligen Hautveränderungen

Von den positiv auf HPV 27 getesteten Läsionen wurde für 1 Basaliom, 1 Morbus Bowen (Bow.), 5 aktinische Keratosen, 6 vulgäre Warzen, 11 Plantarwarzen und 1 juvenile plane Warze (V.p.j.) die Viruslast gemessen.

Die Virusmenge lag hier für 3 aktinische Keratosen genauso wie für den Morbus Bowen unter der Nachweisgrenze. 2 aktinische Keratosen zeigten Viruslasten von 1 Kopie auf 30 Zellen bzw. 1 Kopie auf 2 Zellen (Tabelle 12).

Die Viruslast der Warzen lag in einem Bereich zwischen 1 Kopie auf 2 Zellen und 60 000 Kopien pro Zelle (Tabelle 13).

Tabelle 13: Viruslast in HPV27-pos. Präkanzerosen und einem Basaliom

ID-Nr.	Ergebnisse der β -Globin-PCR					Ergebnisse der HPV27-PCR					Viruslast	Typ
	1.Lauf	2.Lauf	$\bar{\Delta}$ Zellzahl	Stabw.	VK	1.Lauf	2.Lauf	$\bar{\Delta}$ HPV-Kop.	Stabw.	VK	Kopien/Zelle	
S072	1116	1471	1293,5	177,5	14%	pos.	362	362	-	-	0,2	BCC
S104	1493	1842	1667,5	174,5	10%	546	1198	872	326,0	37%	0,5	akt.K.
S111	1126	1622	1374	248	18%	neg.	neg.	<10	-	-	< 0,007	akt.K.
S122	1137	1489	1313	176	13%	4	85	45	40,5	91%	0,03	akt.K.
S137	113	146	129,5	16,5	13%	neg.	neg.	<10	-	-	< 0,08	akt.K.
S143	903	760	831,5	71,5	9%	neg.	neg.	<10	-	-	< 0,01	akt.K.
S119	717	1208	962,5	245,5	26%	neg.	neg.	<10	-	-	< 0,01	Bow.

Tabelle 14: Viruslast in HPV27-pos. benignen Warzen:

ID-Nr.	Ergebnisse der β -Globin-PCR					Ergebnisse der HPV27-PCR					Viruslast	
	1.Lauf	2.Lauf	\bar{O} Zellzahl	Stabw.	VK	1.Lauf	2.Lauf	\bar{O} HPV-Kop.	Stabw.	VK	Kop./Zelle	Typ
S048	1921	3048	2484,5	563,5	23%	2,81E+07	2,42E+07	2,62E+07	1,95E+06	7%	10525	V.v.
S102	1806	1412	1609	197	12%	3,07E+07	2,13E+07	2,60E+07	4,70E+06	18%	16159	V.p.j.
W039	2997	2963	2980	17	1%	8,33E+06	8,28E+06	8,31E+06	25000	0%	2787	Pl.W.
W065	1447	2451	1949	502	26%	1,39E+07	1,12E+07	1,26E+07	1,35E+06	11%	6439	Pl.W.
W070	1264	2380	1822	558	31%	1,59E+07	1,88E+07	1,74E+07	1,45E+06	8%	9523	Pl.W.
W205	2483	2716	2599,5	116,5	4%	1,91E+08	1,24E+08	1,58E+08	3,35E+07	21%	60589	Pl.W.
W227	1008	1930	1469	461	31%	9,59E+06	5,65E+06	7,62E+06	1,97E+06	26%	5187	Pl.W.
W263	584	1201	892,5	308,5	35%	3,52E+07	1,78E+07	2,65E+07	8,70E+06	33%	29692	Pl.W.
W271	1443	2647	2045	602	29%	3,81E+07	1,92E+07	2,87E+07	9,45E+06	33%	14010	V.v.
W272	991	1317	1154	163	14%	3,49E+07	1,81E+07	2,65E+07	8,40E+06	32%	22964	V.v.
W279	1474	1483	1478,5	4,5	0%	5,78E+07	3,86E+07	4,82E+07	9,60E+06	20%	32601	Pl.W.
W284	1314	1663	1488,5	174,5	12%	1,82E+07	1,22E+07	1,52E+07	3,00E+06	20%	10212	Pl.W.
W330	1467	1483	1475	8	1%	863	629	746	117	16%	0,5	V.v.
W335	1471	1635	1553	82	5%	8,10E+07	3,59E+07	5,85E+07	2,26E+07	39%	37637	Pl.W.
W377	5265	4977	5121	144	3%	7,38E+06	4,52E+06	5,95E+06	1,43E+06	24%	1162	Pl.W.
W378	1341	1318	1329,5	11,5	1%	1,47E+07	9,85E+06	1,23E+07	2,43E+06	20%	9233	V.v.
W410	2344	2286	2315	29	1%	1,67E+07	1,17E+07	1,42E+07	2,50E+06	18%	6134	Pl.W.

5.1.6 Viruslast in HPV1-positiven Hautveränderungen

Es wurden 1 Plattenepithelkarzinom, 2 Morbus Bowen, 5 aktinische Keratosen, 10 vulgäre Warzen und 20 Plantarwarzen untersucht. Alle Tumoren waren vorher als HPV 1-positiv erkannt worden.

Das Plattenepithelkarzinom wies eine Viruslast von 4 Kopien pro Zelle auf.

Die Morbus Bowen zeigten geringe Virusmengen um 1 Kopie pro 1000 Zellen.

Von den aktinischen Keratosen lag eine bei 19 Kopien pro Zelle, die anderen lagen zwischen 1 Kopie auf 30 Zellen und 1 Kopie pro Zelle (Tabelle 14).

Die HPV-Kopienzahlen in den untersuchten Warzen waren in einem Bereich zwischen 1 Kopie auf 10 Zellen und $4,5 \times 10^6$ Kopien pro Zelle (Tabelle 15).

Tabelle 15: Viruslast in HPV1-pos. prämaligen und malignen Hautveränderungen

ID-Nr.	Ergebnisse der β -Globin-PCR					Ergebnisse der HPV1-PCR							Viruslast	
	1.Lauf	1.Lauf	\bar{O} Zellzahl	Stabw.	VK	1.Lauf	2.Lauf	3.Lauf	4.Lauf	\bar{O} HPV-Kop.	Stabw.	VK	Kop./Zelle	Typ
K082	452	623	537,5	85,5	16%	1640	1475	3558	1972	2161	826	38%	4	SCC
S385	622	329	475,5	146,5	31%	12	neg	neg	neg	12	-	-	0,03	akt.K
S026	10170	5995	8082,5	2088	26%	2000	1177	3894	2011	2271	996,5	44%	0,3	akt.K
S029	3737	2230	2983,5	753,5	25%	2033	1356	2891	2412	2173	561,2	26%	0,7	akt.K
S084	6245	3736	4990,5	1255	25%	neg	325	839	645	603	211,9	35%	0,1	akt.K
S027	233	289	261	28	11%	4440	2221	8962	4263	4972	2463	50%	19	akt.K
S215	4283	3172	3727,5	555,5	15%	neg	neg	neg	5	5	-	-	0,001	Bow
S214	267	224	245,5	21,5	9%	neg	neg	neg	neg	neg.	-	-	neg.	Bow

Tabelle 16: Viruslast in HPV1-pos. benignen Warzen

ID-Nr.	Ergebnisse der β -Globin-PCR					Ergebnisse der HPV1-PCR					Viruslast	
	1.Lauf	2.Lauf	\emptyset Zellzahl	Stabw.	VK	1.Lauf	2.Lauf	\emptyset HPV-Kop.	Stabw.	VK	Kop./Zelle	Typ
W168	2339	1436	1888	451,5	24%	2,45E+09	3,31E+09	2,88E+09	4,30E+08	15%	1,53E+06	Pl.W.
W026	5975	4004	4990	985,5	20%	1,37E+09	1,58E+09	1,48E+09	1,05E+08	7%	2,96E+05	Pl.W.
W028	4649	2353	3501	1148	33%	1,20E+07	1,63E+07	1,42E+07	2,15E+06	15%	4042	Pl.W.
W145	3667	1779	2723	944	35%	7,69E+05	1,24E+06	1,00E+06	2,36E+05	23%	369	Pl.W.
W569	715	856	786	70,5	9%	3700	6960	5330	1630	31%	6,8	V.v.
W125	18280	11340	14810	3470	23%	3720	4620	4170	450	11%	0,3	V.v.
W105	324	921	623	298,5	48%	27200	29300	28250	1050	4%	45	V.v.
W126	1207	1408	1308	100,5	8%	4370	2140	3255	1115	34%	2,5	V.v.
W346	1342	1095	1219	123,5	10%	3420	8000	5710	2290	40%	4,7	V.v.
W027	2206	2180	2193	13	1%	3,28E+06	4,53E+06	3,91E+06	6,25E+05	16%	1781	V.v.
W248	1115	1380	1248	132,5	11%	2,03E+07	2,93E+07	2,48E+07	4,50E+06	18%	19880	V.v.
W264	2005	2093	2049	44	2%	53	5	29	24	83%	0,01	V.v.
W260	1037	1032	1035	2,5	0%	2,86E+08	4,87E+08	3,87E+08	1,01E+08	26%	3,74E+05	V.v.
W242	1070	1077	1074	3,5	0%	n.u.	155	155	-	-	0,1	V.v.
W19/1	n.u.	3748	3748	-	-	99	172	136	37	27%	0,04	Pl.W.
W246	n.u.	1186	1186	-	-	3,35E+08	4,58E+08	3,97E+08	6,15E+07	16%	3,34E+05	Pl.W.
W579	779	726	753	26,5	4%	16900	20100	18500	1600	9%	25	Pl.W.
W550	620	575	598	22,5	4%	2,25E+09	3,15E+09	2,70E+09	4,50E+08	17%	4,52E+06	Pl.W.
W548	2038	1859	1949	89,5	5%	26000	33200	29600	3600	12%	15	Pl.W.
W547	1180	1029	1105	75,5	7%	6850	9160	8005	1155	14%	7,2	Pl.W.
W582	1763	1317	1540	223	14%	1,35E+07	2,13E+07	1,74E+07	3,90E+06	22%	11299	Pl.W.
W577	4207	3894	4051	156,5	4%	1,06E+08	1,21E+08	1,14E+08	7,50E+06	7%	28021	Pl.W.
W173	910	629	770	140,5	18%	78180	58230	68205	9975	15%	89	Pl.W.
W182	3006	1771	2389	617,5	26%	2565	1179	1872	693	37%	0,8	Pl.W.
W100	5235	3538	4387	848,5	19%	1911	771	1341	570	43%	0,3	Pl.W.
W185	2033	1996	2015	18,5	1%	46220	27570	36895	9325	25%	18	Pl.W.
W180	1319	1165	1242	77	6%	15010	7848	11429	3581	31%	9,2	Pl.W.
W106	1600	1173	1387	213,5	15%	3142	1344	2243	899	40%	1,6	Pl.W.
W187	210	152	181	29	16%	2374	2867	2621	247	9%	14	Pl.W.

5.2 RNA *In Situ* Hybridisierung

Mit Hilfe der RNA *In Situ* Hybridisierung kann eine transkriptionelle Aktivität der Papillomviren in den Geweben nachgewiesen werden. Neben einem qualitativen und semiquantitativen Transkriptnachweis, kann mit diesem Verfahren vor allem auch eine Aussage über die Lokalisation der Transkripte im Gewebeverband und im Idealfall sogar auf Zellebene getroffen werden.

Nach der Bestimmung der Viruslast erschienen vor allem die HPV33-positiven aktinischen Keratosen interessant und sollten mit diesem Verfahren näher untersucht werden. Außerdem wurde ein HPV1-positives Plattenepithelkarzinom und eine HPV1-positive Warze (Positivkontrolle) mittels *In Situ* Hybridisierung untersucht.

5.2.1 *In Situ* Hybridisierung HPV33-positiver aktinischer Keratosen

Gewebeschnitte HPV33-positiver aktinischer Keratosen mit den Identifikationsnummern S345 (Viruslast: 1 Kopie / 2 Zellen) und S353 (Viruslast: 2 Kopien / Zelle) wurden mit zur mRNA des E6- und des E7-Gens von HPV 33 komplementären, radioaktiv markierten Antisense RNA Sonden hybridisiert. Die radioaktiven mRNA-Sonden-Hybride sollten nach RNase-Verdau überschüssiger oder unspezifisch gebundener Sondenmoleküle und Waschen ein der mRNA Verteilung im Gewebe entsprechendes Signal erzeugen, indem sie eine auf den Schnitt aufgebraute Filmemulsion schwärzen. Nach Entwicklung der Filmemulsion tragenden Schnitte, stellen sich die betreffenden mRNA enthaltende Gewebe- bzw. Zellanteile unter dem Mikroskop im Hellfeld als schwarze Punkte und im Dunkelfeld als helle weiße Punkte dar. Um das durch unspezifische Bindung der radioaktiven Sonden an Gewebebestandteile entstehende Hintergrundsignal abzuschätzen, wurden als Negativkontrolle Schnitte mit E6/E7-RNA-Sonden in Sense-Orientierung (d.h. die RNA hat die gleiche Orientierung wie die Transkripte) hybridisiert.

Die folgenden mikroskopischen Bilder zeigen mit HPV33-E6/E7 Antisense- und Sense-Sonden hybridisierte Gewebeschnitte der aktinischen Keratose S353 (Bild 8 und 9) sowie die korrespondierende Histologie (Bild 7).

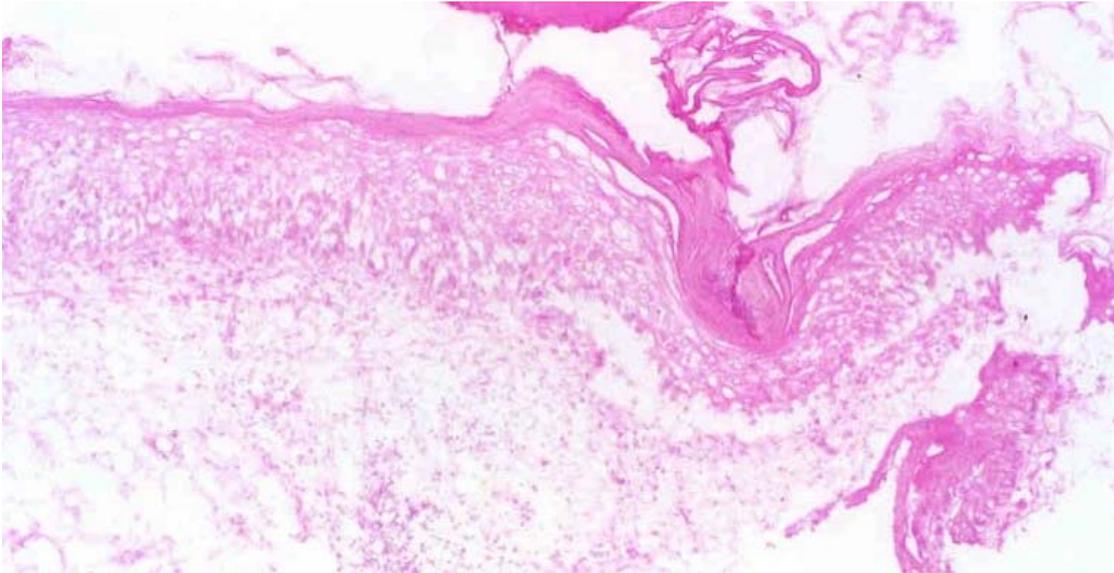


Bild 7: H.E.-Präparat der HPV33-positiven aktinischen Keratose S353. Man erkennt die aufgehobene epitheliale Schichtung sowie die Hyperkeratose. Vergrößert 100fach



Bild 8: RNA-RNA In Situ Hybridisierung der HPV33-positiven aktinischen Keratose S353 mit der E6/E7-Antisense RNA-Sonde. Dunkelfeld; vergrößert 100fach

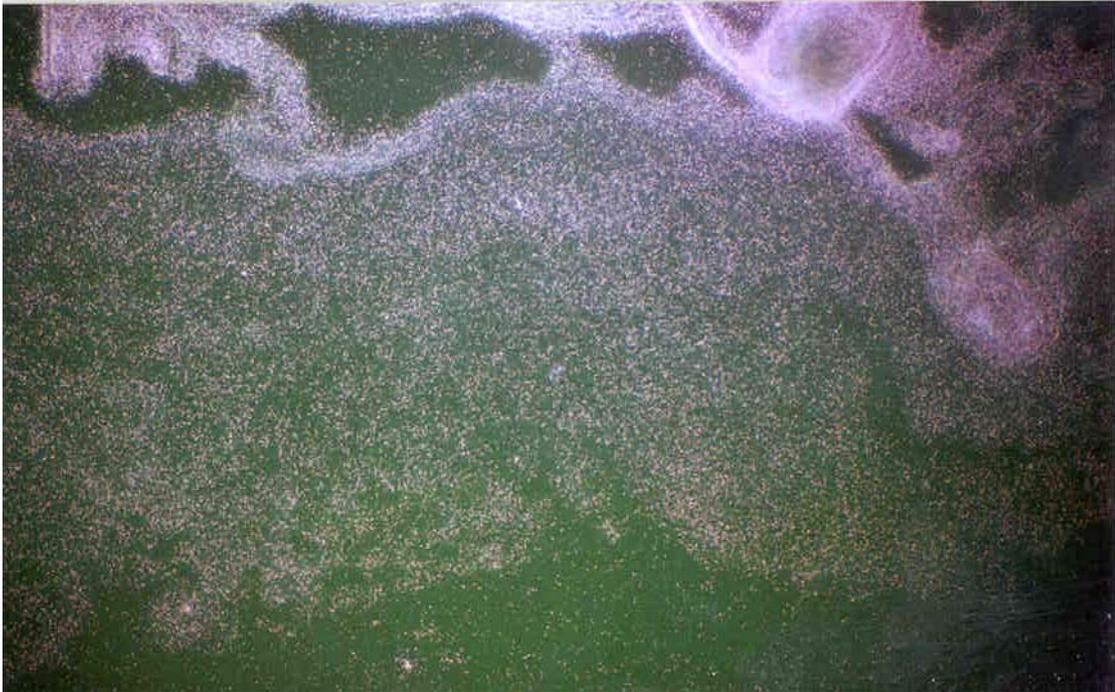


Bild 9: Negativkontrolle: In Situ Hybridisierung von S353 mit der HPV33-E6/E7-Sense Sonde. Dunkelfeld; vergrößert 100fach

Vergleicht man den mit der Antisense-Sonde hybridisierten Schnitt mit der Negativkontrolle, kann kaum ein Unterschied festgestellt werden. In beiden Schnitten sieht man ein starkes unspezifisches Signal in der Hornschicht. Die Signalgebung im Bereich des Epithels sieht annähernd identisch aus.

In den untersuchten HPV33-positiven aktinischen Keratosen konnte mit der *In Situ* Hybridisierung keine E6- oder E7-Transkripte nachgewiesen werden. Womöglich unterschreitet die mRNA-Menge in den Geweben die Nachweisgrenze der Methode oder der Schnitt stammt aus Bezirken der Läsion, in denen das Virus transkriptionell stumm bleibt.

5.2.2 *In Situ* Hybridisierung eines HPV1-pos. Plattenepithelkarzinoms und einer HPV1-pos. Warze

Gewebeschnitte des HPV1-positiven Plattenepithelkarzinoms K082 wurden mit zu HPV1-E4-mRNA komplementären Antisense-Sonden hybridisiert (Bild 10). Als Negativkontrolle diente wiederum der mit der E4-Sense RNA-Sonde hybridisierte Schnitt (Bild 11). Man sieht auch hier keine wesentlichen Unterschiede zwischen dem mit der Antisense-Sonde hybridisierten Schnitt und der Negativkontrolle, und damit gelingt der Nachweis von die HPV1-E4-Sequenz enthaltenden Transkripten nicht.

Die HPV1-positiven Warze W016 war bereits in vorherigen *In Situ* Hybridisierungs-Experimenten hochpositiv auf die virale E4-Sequenz enthaltende mRNA getestet worden (Egawa et al., 2000). Gewebeschnitte dieser Warze wurden ebenfalls mituntersucht und dienten einerseits als Positivkontrolle für die experimentelle Prozedur der *In Situ* Hybridisierung an sich und andererseits als Nachweis für die Integrität der HPV1-E4 Antisense-Sonde (Bild 12). Man sieht ein starkes Signal in den suprabasalen Epithelschichten, welches wahrscheinlich hauptsächlich durch für das E1^{E4}-Protein kodierende Transkripte zu Stande kommt (vgl. Egawa et al., 2000).

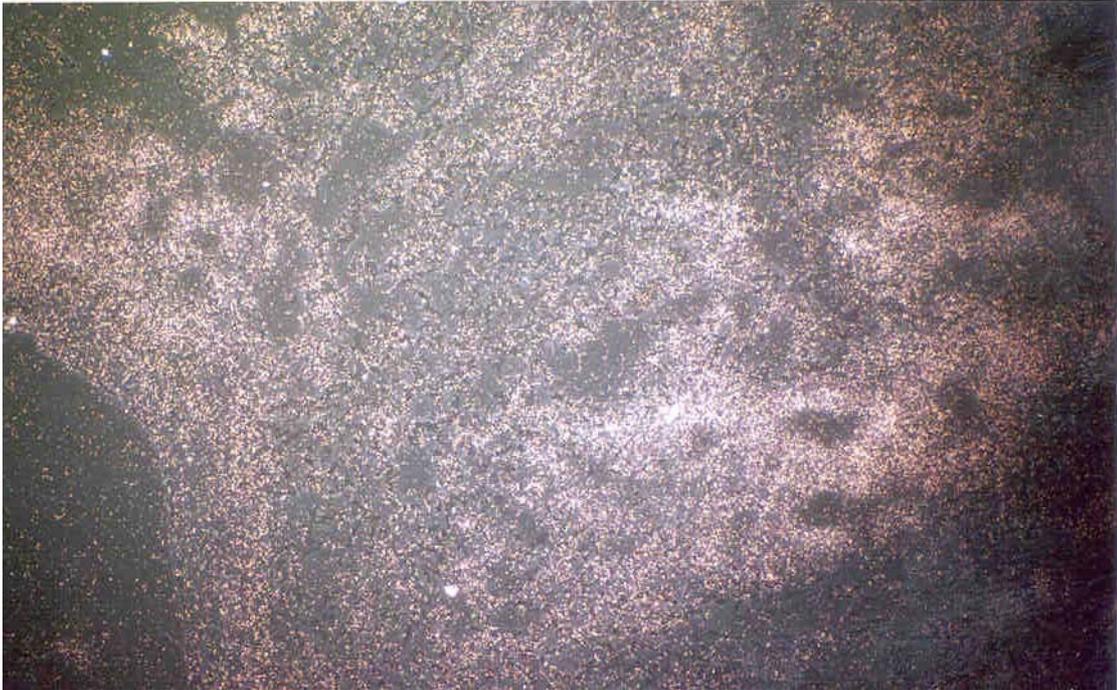


Bild 10: RNA-RNA In Situ Hybridisierung des HPV1-positiven SCC K082 mit der E2/E4-Antisense-Sonde. Dunkelfeld; vergrößert 100fach

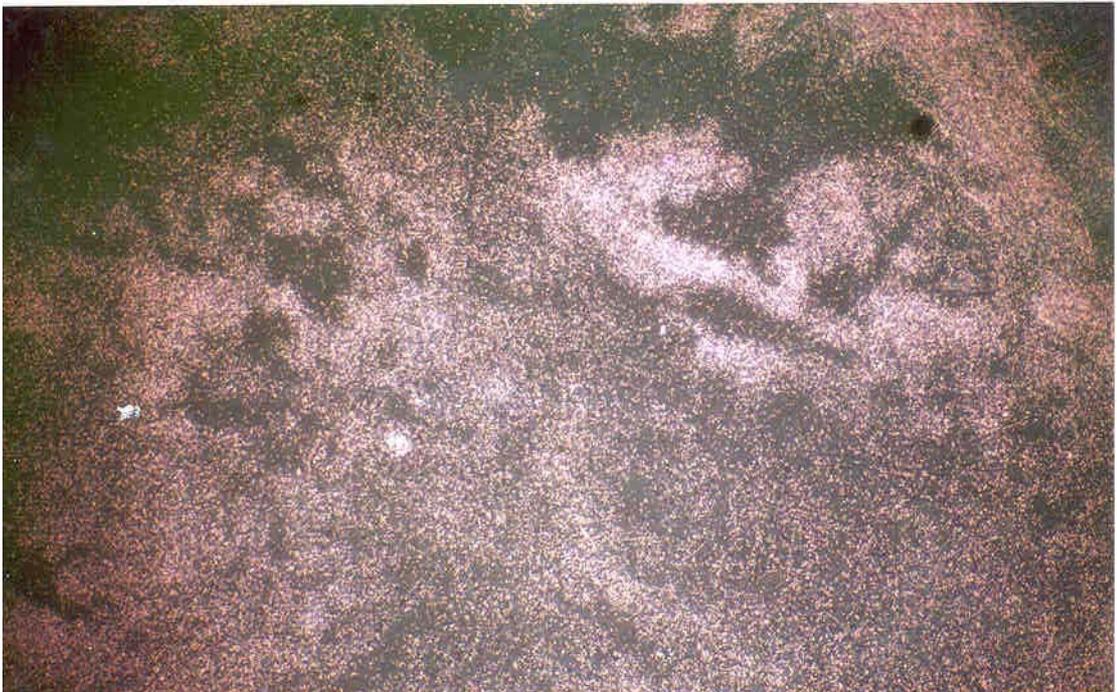


Bild 11: Negativkontrolle: In Situ Hybridisierung von K082 mit der HPV1-E2/E4 Sense-Sonde. Dunkelfeld; vergrößert 100fach

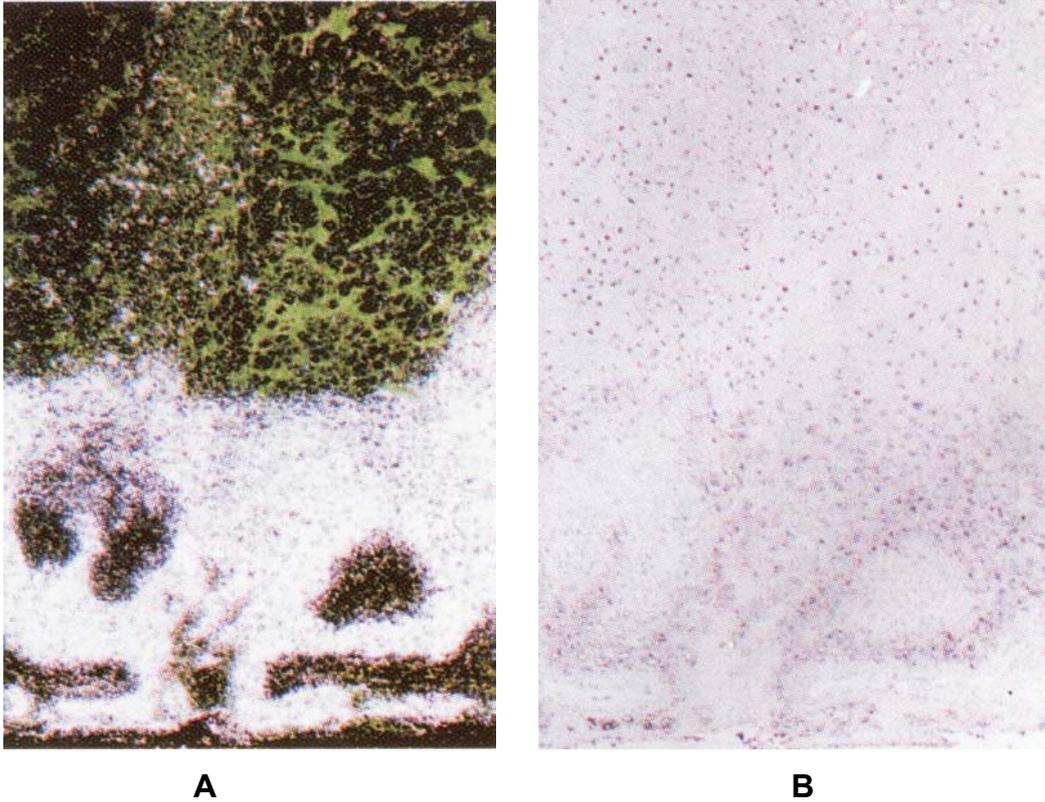


Bild 12: A zeigt die RNA-RNA In Situ Hybridisierung der HPV1-pos. Warze W016 mit der HPV1-E4 Antisense-Sonde. Die weißen Signale zeigen Bereiche an, in denen virale Transkripte vorliegen, die die E4-Sequenz enthalten. Dunkelfeld; vergrößert 100fach. B zeigt einen korrespondierende Serienschnitt als H.E.-Präparats. Hellfeld; vergrößert 100fach.

6 Diskussion

Im Gegensatz zu anogenitalen Karzinomen, bei denen eine kausale Rolle des HPV durch eine Fülle an epidemiologischen und molekularbiologischen Daten als gesichert gilt (Bosch et al., 2002), ist eine ähnliche Rolle des Virus für die Karzinomentstehung an der Haut außerhalb des Anogenitaltraktes unklar und momentan Gegenstand intensiver Diskussion (Harwood and Proby, 2002). In einer vorherigen Studie (Iftner et al., Manuskript in Bearbeitung) von Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe konnte erstmals eine signifikante Assoziation genitaler High-Risk HPV-Typen, insbesondere HPV 33, mit Plattenepithelkarzinomen und Präkanzerosen der Haut nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe der RTQ-PCR Viruslastbestimmungen für kutane und genitale HPV-positive Tumoren durchgeführt.

Die RTQ-PCR hat sich als geeignete Methode zur Viruslastmessung aus Gewebematerial erwiesen. Das Spektrum in dem eine Quantifizierung möglich ist, reicht von ca. 10^9 Viruskopien / Reaktionsansatz bis z.T. weniger als 10 Kopien / Reaktionsansatz. Voraussetzung für eine absolute Quantifizierung ist die Verwendung geeigneter Standards, die jedoch sehr einfach durch TA-Klonierung des jeweiligen PCR-Produkts hergestellt werden können. Für einen Großteil der verwendeten Primerkombinationen hat sich die sogenannte „Hybridization-Probes“ Methode als Mittel der Wahl herausgestellt. Sie erlaubt im Gegensatz zur SYBR-Green Methode eine genauere Differenzierung in Bereichen niedriger Kopienzahlen. Als absolute Voraussetzung für genaue und vergleichbare Werte hat sich auch die zusätzliche Normalisierung der Werte in Bezug auf das ebenfalls quantifizierte β -Globin Gen herausgestellt. Ein Problem bleibt der unbekannte Anteil von nicht-epithelialen Zellen, die zum β -Globin Signal beitragen. Möglichkeiten dieses Problem zu lösen, könnten einerseits in wiederholter histologischer Kontrolle der zur DNA-Isolierung verwendeten Teile der Gewebeprobe mit Abschätzung des absoluten Epithelanteils oder idealerweise in der Verwendung einer Laser-assistierten Mikrodisektionstechnik (vgl. Klussmann et al., 2001) liegen. Der Hauptnachteil der RTQ-PCR liegt

momentan noch in den immensen Kosten sowohl für das Gerät selber als auch für die Reagenzien und vor allem auch für die fluoreszenzmarkierten Oligonukleotide.

Von vorrangigem Interesse bei der vorliegenden Arbeit war die weitere Untersuchung der HPV33-positiven Karzinome und Präkanzerosen im Bezug auf die Viruslast. Für alle untersuchten Läsionen konnte die in der Voruntersuchung festgestellte Infektion mit HPV 33 durch die quantitative PCR mit typspezifischen Hybridisierungssonden bestätigt werden. Sowohl die SCC als auch die BCC zeigten jedoch eine sehr geringe Viruslast in Größenordnungen von 1 Viruskopie auf 500 – 140 Zellen. 4 der 6 untersuchten HPV33-positiven aktinischen Keratosen enthielten deutlich höhere Virusmengen in einem Bereich zwischen 1 Kopie auf 40 Zellen bis 2,5 Kopien pro Zelle. Zum Vergleich wurden für HPV33-positiv hochgradige CIN, Zervixkarzinome und Kopf-Hals Karzinome ebenfalls Viruslastbestimmungen durchgeführt. 2 der 3 Zervixkarzinome sowie die Kopf-Hals Karzinome zeigten eine deutlich höhere Viruslast als die Hautkarzinome, während 1 Zervixkarzinom ähnlich wenig Virus enthielt. Die Viruslast in den genitalen Präkanzerosen lag für 7 der 13 untersuchten Läsionen in einem Bereich zwischen 1 Kopie auf 10 Zellen und 3 Kopien pro Zelle, also in einer den kutanen Präkanzerosen durchaus vergleichbaren Größenordnung. Allerdings lag die Viruslast in den anderen 6 untersuchten CIN zum Teil um ein vielfaches höher.

Der für die Hautkarzinome festgestellte Befund der sehr geringen Viruslasten, die deutlich unter einer Viruskopie pro Zelle liegen, deckt sich mit Untersuchungsergebnissen anderer Studien über HPV-positiv Hautkarzinome: So deutet etwa die Tatsache, dass durch sensitivste PCR- und nested PCR-Methoden die Detektionsfrequenz von HPV-DNA in Hautkarzinomen drastisch angestiegen ist (Harwood et al., 2000; Meyer et al., 2000) auf eine niedrige Konzentration der Virus-DNA in den Geweben hin. Wieland et al. beschreiben Viruslasten für HPV8-positiv Basalzellkarzinome von 1 Kopie auf 20-400 Zellen (Wieland et al., 2000). In einer anderen Studie konnte in 2 von 9 extragenitalen Morbus Bowen HPV33-DNA durch PCR nachgewiesen werden, während die Untersuchung mittels *In Situ* Hybridisierung negativ ausgefallen

war (Deguchi et al., 1998). Hier stellt sich jetzt natürlich die Frage, ob eine solche niedrige Viruskopienzahl im Bezug auf Tumorentstehung und -progression überhaupt biologisch relevant sein kann. Betrachtet man Studien, die Viruslast in HPV-assoziierten Tumoren nicht-epidermaler Lokalisation untersucht haben, fallen interessante Gegensätze aber z.T. auch Parallelen zu den hier gefundenen Ergebnissen auf. Für HPV16-positive zervikale intraepitheliale Neoplasien zeigt sich ein signifikanter Anstieg der Viruslast mit dem Grad der intraepithelialen Atypie (Swan et al., 1999): Hier konnte ein Anstieg der Viruslast von 250 Kopien pro Zelle (CIN 1) auf 8000 Kopien pro Zelle (CIN 3) nachgewiesen werden. Jedoch konnte ein ähnlicher Zusammenhang für andere genitale High-Risk Typen nicht gezeigt werden. Für die HPV-Typen 18, 31 und 45 waren in höhergradigen Läsionen keine erhöhten Virusmengen festzustellen. Zudem lag die Viruslast für diese HPV-Typen um Größenordnungen niedriger. So lag die mittlere Viruslast für HPV31-positive CIN bei 2 Kopien pro Zelle, für HPV 18 bei 1 Kopie pro Zelle und für HPV 45 gar nur bei 1 Kopie pro 20 Zellen. Trotzdem sind auch diese Typen in der Lage Zervixkarzinome zu induzieren und sind mit statistischer Ähnlichkeit wie HPV 16 mit Zervixkarzinomen assoziiert (Bosch et al., 2002). Die in der vorliegenden Arbeit für HPV 33 gefundenen Viruskopienzahlen in höhergradigen CIN entsprechen von der Größenordnung diesen nicht-HPV16 High-Risk Typen. Die hier untersuchten HPV33-positiven aktinischen Keratosen liegen von der Viruslast her ebenfalls teilweise in einer vergleichbaren Größenordnung, so dass diese Ergebnisse einer vermuteten kausalen Rolle von HPV 33 für die Entstehung von kutanen Präkanzerosen nicht widersprechen.

Wie ist jedoch der drastische Abfall der Kopienzahl bei den HPV33-positiven SCC und BCC zu bewerten? In den untersuchten Zervix- und Kopf-Hals Karzinomen war ein solches Phänomen allgemein nicht zu beobachten, wobei jedoch eines der Zervixkarzinome ebenfalls sehr wenig HPV-DNA enthielt. Ist es vorstellbar, dass die unter Mithilfe des Virus transformierten Zellen der Präkanzerose bei weiterer Progression zum invasiven Karzinom die Anwesenheit des Virus zur Aufrechterhaltung des malignen Phänotyps nicht mehr benötigen und das Virus evtl. „verlieren“? Eine Unabhängigkeit der Tumorentstehung vom Erhalt der

viralen DNA für durch HPV 33 transformierte Tumorzellen in Zellkultur ist in der Tat beschrieben worden (Kitasato et al., 1991). Auch für das Bovine Papillomvirus 4 (BPV 4) wurde ähnliches beobachtet: Dieses Virus verursacht in Verbindung mit dem Kokarzinogen Quercetin, einem Inhaltsstoff des Adlerfarns, bei Rindern Karzinome des oberen Verdauungsapparat. Obwohl die Viren für die Induktion der Präkanzerosen kausal verantwortlich sind, scheint ihre weitere Anwesenheit im manifesten Karzinom nicht mehr notwendig zu sein (Campo et al., 1985). Betrachtet man die bereits weiter oben erwähnten Arbeiten von Antonsson et al. und Forslund et al. muss auch eine weitere Erklärung für die geringere Viruslast der Karzinome im Vergleich zu den Präkanzerosen in Betracht gezogen werden: Während sich in konventionellen Hautabstrichen gesunder Probanden sehr häufig Papillomviren nachweisen lassen (Antonsson et al., 2000), scheinen Hautabstriche von mit adhesivem Tape vorbehandelter Haut meist HPV-negativ zu sein (Forslund et al., unveröffentlicht). Dies könnte sich auch auf die hier vorliegenden Ergebnisse ausgewirkt haben: Aktinische Keratosen werden in der Regel flach abgetragen. Da der Eingriff weniger invasiv ist, wird dort mit einer weniger intensiven Desinfektion gearbeitet als bei der Entfernung von Karzinomen, welche tiefer exzidiert werden (Möhrle, mündliche Mitteilung). Die tiefere Exzision der BCC und SCC bewirkt zudem einen höheren Anteil nicht-epithelialer Zellen im Operationspräparat, zumal im Stroma immer auch eine entzündliche Begleitreaktion vorliegt. Dies führt, wie oben bereits beschrieben, dazu, dass sich im Ansatz verhältnismäßig weniger epitheliale und möglicherweise HPV-infizierte Zellen finden („Lymphozytenverdünnung“). Diesem Verdünnungsphänomen könnte idealerweise mit der oben bereits kurz erwähnten laser-assistierten Mikrodissektionstechnik begegnet werden. Hierbei kann aus Gewebeschnitten des Präparats gezielt nur der Epithelanteil herausgeschnitten und für die DNA-Isolation verwendet werden (Klussmann et al., 2001).

Für die beiden HPV33-positiven aktinischen Keratosen mit der höchsten Viruslast wurden *In Situ* Hybridisierungs-Experimente für die viralen Onkogene E6 und E7 durchgeführt. Leider ist hier kein positiver Transkriptnachweis gelungen, welcher eigentlich bei Kausalität der Virusinfektion für die Karzino-

genese zu fordern wäre. Einschränkend muss angemerkt werden, dass diese Experimente vorsichtig interpretiert werden müssen: Zum einen wurde auf Grund mangelnder Biopsie keine Positivkontrolle eines HPV33-infizierten Gewebes, in dem Virusgene nachgewiesenermaßen transkribiert werden, mit-untersucht. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass das Virus innerhalb der Läsion ungleich verteilt ist und der hybridisierte Schnitt aus einem Bereich stammt, in dem im Gegensatz zu dem Bereich, aus dem die für die PCR verwendete DNA isoliert wurde, gar keine infizierten Zellen vorhanden waren. Ähnliches ist sowohl für Zervixkarzinome (Beyer-Finkler et al., 1995) als auch für HPV-assoziierte Tumoren anderer Lokalisation, wie z.B. HPV16-positive Tonsillenkarcinome (Klussmann et al., 2001), mehrfach beschrieben worden.

Ein Versuch der Interpretation der Ergebnisse für die HPV33-positiven aktinischen Keratosen und Hautkarzinome könnte folgendermaßen aussehen: Es erscheint unwahrscheinlich, dass Papillomviren einen notwendigen Kofaktor für die Genese von kutanen Präkanzerosen und Hautkarzinomen darstellen, wie dies für die zervikale Karzinogenese der Fall ist. Nichtsdestotrotz könnten die in einigen der aktinischen Keratosen vorgefundenen Virusmengen dafür sprechen, dass HPV 33 in Kombination mit bekannten Risikofaktoren, wie fortgeschrittenes Alter, heller Hauttyp und vor allem UV-Strahlung, eine kausale Rolle für die Entwicklung von Präkanzerosen spielt. Welche Rolle hierbei den Papillomviren genau zukommt und auf welche Weise sie z.B. mit UV-Strahlung zusammenwirken können, müssten weitere Experimente, bei denen unter anderem der Status der viralen DNA, die Transkription viraler und zellulärer Gene, die Anwesenheit viraler Proteine oder die nähere quantitative und qualitative Untersuchung potentieller zellulärer Zielproteine der viralen Onkogene, wie z.B. Bak (vgl. Jackson et al., 2000), untersucht werden. Der limitierende Faktor ist hierbei leider die zum Teil äußerst geringe Menge des zur Verfügung stehenden Tumormaterials.

Ein weiterer HPV-Typ, der häufig in Plattenepithelkarzinomen gefunden wurde, ist HPV 4. Da dieser Virustyp jedoch auch sehr häufig in benignen vulgären und plantaren Warzen aufgetreten war, ergab sich keine signifikante Assoziation mit Karzinomen. Die Frage nach der Viruslast ist hier vor allem auch im Bezug auf

den direkten Vergleich zwischen maligner und benigner Läsion von Interesse. Während die untersuchten Warzen HPV-Kopienzahlen in Größenordnungen zwischen 1 Kopie auf 10 Zellen und 10^6 Kopien pro Zelle aufwiesen, betrug in 9 von 10 untersuchten Karzinomen die Kopienzahl weniger als 1 Kopie auf 150 Zellen und lag somit in einem Bereich, der bereits für die HPV33-positiven Hautkarzinome beobachtet worden war. Lediglich in einem Karzinom (1 Kopie / 10 Zellen) und einer aktinischen Keratose (1 Kopie / 14 Zellen) war die Viruslast etwas höher. Da diese Werte mit 2 unterschiedlichen Primerkombinationen, einmal aus L2 und einmal aus E7, gefunden wurden, ist es unwahrscheinlich, dass die niedrigen gemessenen Kopienzahlen auf einem Verlust der Erkennungssequenz der Primer durch eine Integration der viralen DNA in das Genom der Zelle, wie dies bei High-Risk HPV in Zervixkarzinomen häufig der Fall ist, beruhen. Denkbar wäre angesichts der hohen Prävalenz von HPV 4 in den sehr häufig vorkommenden benignen Warzen, dass das Virus nach Abheilen dieser Läsionen in einigen wenigen Zellen persistiert. Ob dieses persistierende HPV 4 nun einen harmlosen Passagier der Haut darstellt oder ob es gar für die Pathogenese von Hautkarzinomen eine Rolle spielt, kann auch hier wiederum nur durch eingehendere Untersuchungen (siehe oben) dieser und weiterer Tumorbiopsien geklärt werden.

Die Virustypen HPV 1 und 27 werden hauptsächlich in benignen Warzen gefunden. In der Hautstudie der Arbeitsgruppe konnte HPV 1 jedoch auch in 5 aktinischen Keratosen, 2 Morbus Bowen und in einem Plattenepithelkarzinom nachgewiesen werden. HPV 27 war in 5 aktinischen Keratosen und 1 Morbus Bowen nachweisbar. Sowohl für diese prä-malignen und malignen Läsionen als auch für eine Reihe von Warzen wurde eine Bestimmung der viralen Kopienzahl durchgeführt. Die Viruslast in den Warzen lag in einem erstaunlich breiten Bereich, der von 1 Kopie auf 100 Zellen bis hin zu mehr als 10^6 Kopien pro Zelle reichte. Während die Virusmenge in den Morbus Bowen sehr gering war, lag dieselbe in den aktinischen Keratosen mit Werten zwischen 1 Kopie auf 30 Zellen und 19 Kopien pro Zelle zumindest für HPV 1 in einer ähnlichen Größenordnung, wie dies bereits für HPV33-positiv kutane und genitale Präkanzerosen beobachtet werden konnte. Erstaunlicherweise lag hier auch die

Kopienzahl in dem untersuchten HPV1-positiven Karzinom mit 4 Kopien pro Zelle deutlich höher als in den HPV4- oder HPV33-positiven Hautkarzinomen. Aus diesem Grund wurden auch für diesen Tumor *In Situ* Hybridisierungs-Experimente zum Nachweis einer Transkription viraler Gene durchgeführt. Leider konnte auch hier, im Gegensatz zu der als Positivkontrolle mituntersuchten HPV1-positiven Warze, keine virale Transkription gezeigt werden. Möglicherweise hätte die Verwendung einer zu den viralen Onkogenen E6 und E7 komplementäre Hybridisierungssonde ein positives Ergebnis erbracht. Dies könnte noch untersucht werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit können neue Ansatzpunkte für weiterführende Experimente und zur Interpretation eines positiven HPV-Befundes in einem Hauttumor bieten. Eindeutige Hinweise, die für oder gegen eine kausale Rolle des Virus für die Karzinogenese der Haut sprechen, konnten nicht gefunden werden. Jedoch scheinen die Ergebnisse für die mit dem genitalen High-Risk Typ HPV 33 infizierten kutanen Präkanzerosen, auch im Vergleich mit den zervikalen Präkanzerosen, durchaus interessant. In Anbetracht jüngerer Forschungsergebnisse, bei denen die für die kutane Karzinogenese vieldiskutierten EV-HPV sehr häufig in und auf normaler Haut gefunden werden (Antonsson et al., 2000), könnten HPV 33 und andere genitale High-Risk Typen die interessanteren Verdächtigen darstellen. Größere epidemiologische Studien und eingehendere Untersuchung positiven Tumorgewebes müssen diese Frage klären. Interessant wird es sein zu sehen, ob sich zukünftig die Durchführung einer Impfung gegen genitale High-Risk Typen, deren Wirksamkeit jüngste Studien eindrucksvoll belegt haben (Koutsky et al., 2002) und die der Prävention des Zervixkarzinoms dienen soll, auch auf die Inzidenz von nicht-melanozytärem Hautkrebs auswirken wird.

7 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μCi	Mikrocurie
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	mikromolar (Mikromol pro Liter)
³⁵ S-UTP	mit ³⁵ S markiertes UTP
akt.K.	aktinische Keratose
ATP	Adenosintriphosphat
BCC	Basaliom (basal cell carcinoma)
Bow	Morbus Bowen
bp	Basenpaare
Ci	Curie
CIN 1-3	zervikale intraepitheliale Neoplasien mit steigender Atypie
cpm	counts per minute; radioaktiver Zerfall
CRPV	Cottontail Rabbit Papillomavirus
CTP	Cytidintriphosphat
CxCa	Zervixkarzinom
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	Effizienz der PCR
E1-E8	Frühe Leserahmen der Papillomviren ("early")
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
EV	Epidermodysplasia verruciformis
F	Fluoreszenz
FRET	fluorescence resonance energy transfer

GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H.E.	Hämalaun-Eosin Färbung
HCl	Salzsäure
HNCa	Kopf-Hals Karzinom (head and neck cancer)
HPV	Humanes Papillomvirus
ID-Nr.	Identifikationsnummer
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
ISH	In Situ Hybridisierung
kb	Kilobasenpaare
Kop.	Kopien
LC	Lightcycler
LCDA	Lightcycler Data Analysis
LkMe	Lymphknotenmetastase
log	logarithmisch
M	molar (Mol pro Liter)
MCS	multiple Klonierungsstelle (multiple cloning site)
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	millimolar (Millimol pro Liter)
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
n.d.	„nicht detektiert“
n.u.	„nicht untersucht“
N_0	initiale Kopienzahl
NCR	nicht-kodierende Region (non coding region)
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NMSC	nicht-melanozytärer Hautkrebs
N_n	Kopienzahl nach n Zyklen
\emptyset	Durchschnitt
OD	optische Dichte

ORF	offener Leserahmen
P/C/I	Phenol/ Chloroform / Isoamylalkohol
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
pg	Pikogramm
Pl.W.	Plantarwarze
pRB	Retinoblastomprotein
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rNTP	Ribonukleotidtriphosphat
rpm	Umdrehungen pro Minute
RTQ-PCR	realtime quantitative PCR
SCC	Plattenepithelkarzinom (squamous cell carcinoma)
SDS	Sodiumdodecylsulfat (Natriumlaurylsulfat)
SSC	standard saline citrate
Stabw.	Standardabweichung
T	Temperatur
T7, T3	Bakteriophagen
TA-Klonierung	Thymidin-Adenosin Klonierung
Taq-Polymerase	Polymerase des <i>Thermus aquaticus</i>
Tm	Schmelzpunkt
ToCa	Tonsillenkarzinom
Tris	Trihydroxymethylaminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	Enzymatische Einheit („units“)
UTP	Uridintriphosphat
V.p.j.	Verruca plana juvenilis
V.v.	vulgäre Warze (verruca vulgaris)
VK	Variationskoeffizient
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactopyranosid
ZuCa	Zungenkarzinom

8 Literaturverzeichnis

- Antonsson, A., Forslund, O., Ekberg, H., Sterner, G., Hansson, B.G.** 2000: The ubiquity and impressive genomic diversity of human skin papillomaviruses suggest a commensalic nature of these viruses. *J. Virol.* 74: 11636-11641
- Astori, G., Lavergne, D., Benton, C., Hockmayr B, Egawa K, Garbe C., de Villiers, E.M.** 1998: Human papillomaviruses are commonly found in normal skin of immunocompetent hosts. *J. Invest. Dermatol.* 110: 752-755
- Ausubel, F.A., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., and Smith, J.A.** 1999: *Current protocols in molecular biology.* Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York.
- Berkhout, R., J., M., Bouwes Bavinck, J.N., ter Schegget, J.** 2000: Persistence of human papillomavirus DNA in benign and (pre) malignant skin lesions from renal transplant recipients. *J. Clin. Microbiol.* 38: 2087-2096
- Beyer-Finkler, E., Girardi, F., Sillem, M., Pfister, H.** 1995: Human papillomavirus DNA in genital cancers, metastases, and lymphnodes. *Intervirology* 38:173-180
- Beyer-Finkler, E., Stoler, M.H., Girardi, F., Pfister, H.** 1990: Cell differentiation-related gene expression of human papillomavirus 33. *Med. Microbiol. Immunol* 179: 185-192
- Birkeland, S.A., Storm, H.H., Lamm, L.U., Barlow L., Blohme, I, Forsberg, B., Eklund, B., Fjeldborg, O., Friedberg, M., Frodin, L.** 1995: Cancer risk after renal transplantation in the nordic countries. *Int. J. Cancer* 60: 183-189
- Bosch, F.X., Lorincz, A., Munoz, N, Meijer, C.J.L.M., Shah, K.V.** 2002: The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J. Clin. Pathol.* 55: 244-265

- Bouwes Bavinck, J.N., Feltkamp, M., Struijk, L., ter Schegget, J.** 2001: Human papillomavirus infection and skin cancer risk in renal transplant recipients. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* 6: 207-211
- Bouwes Bavinck, J.N., Hardie, D.R., Green, A., Cutmore, S., MacNaught, A., O'Sullivan, B., Siskind, V., Van Der Woude, F.J., Hardie, I.R.** 1996: The risk of skin cancer in renal transplant recipients in Queensland, Australia. A follow-up study. *Transplantation* 61: 715-721
- Boxman, I.L., Berkhout, R.J., Mulder, L.H., Wolkers, M.C., Bouwes Bavinck, J.N., Vermeer, B.J., ter Schegget, J.** 1997: Detection of human papillomavirus DNA in plucked hairs from renal transplant recipients and healthy volunteers. *J. Invest. Dermatol.* 108: 712-715
- Brash, D.E., Rudolph, J.A., Simon, J.A., Lin, A., McKenna, G.J., Baden, H.P., Halperin, A.J., Ponten, J.** 1991: A role of sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 10124-10128
- Braun-Falco, O., Plewig, G., Wolff, H.H.** 1996. *Dermatologie und Venerologie*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York. 1302-1316; 1324-1340
- Campo, M.S., Moar, M.H., Sartirana, M.L., Kennedy, I.M., Jarret, W.F.** 1985: The presence of bovine papillomavirus type 4 DNA is not required for the progression to, or the maintenance of, the malignant state in cancers of the alimentary canal in cattle. *EMBO J.* 4: 1819-1825
- Daling, J.R., Madeleine, M.M., Schwartz, S.M., Shera, K.A., Carter, J.J., McKnight, B., Porter, P.L., Galloway, D.A., McDougall, J.K., Tamimi, H.** 2002: A population-based study of squamous cell vaginal cancer: HPV and cofactors. *Gynecol. Oncol.* 84: 263-270
- de Jong-Tieben, L.M., Berkhout, R.J.M., Smits, H.L., Bouwes Bavinck, J.N., Vermeer, B.J., van der Woude, F.J., ter Schegget, J.** 2000: High frequency of detection of epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus DNA in biopsies from malignant and premalignant

- skin lesions from renal transplant recipients. *J. Invest. Dermatol.* 105: 367-371
- Deguchi, M., Tomioka, Y., Mizugaki, M., Tagami, H.** 1998: Detection of human papillomavirus type 33 in extragenital Bowen's disease with the polymerase chain reaction. *Dermatology* 196: 292-294
- Derancourt, C., Mougia, C., Chopard Lallier, M., Coumes-Marquet, S., Drobacheff, C., Laurent, R.** 2001 : Oncogenic human papillomavirus in extra-genital Bowens disease revealed by in situ hybridization. *Ann. Dermato. Venereol.* 128: 715-718
- Dyson, N., Howley, P.M., Munger, K., Harlow E.** 1989: The human papillomavirus 16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 143: 934-936
- Egawa, K., Iftner, A., Doorbar, J., Honda, Y., and Iftner, T.** 2000: Synthesis of viral DNA and late capsid protein L1 in parabasal spinous cell layers of naturally occurring benign warts infected with human papillomavirus type 1. *Virology* 268: 281-293
- Elbel, M., Carl, S., Spaderna, S., Iftner, T.** 1997: A comparative analysis of the interactions of the E6 proteins from cutaneous and genital papillomaviruses with p53 and E6AP in correlation to their transforming potential. *Virology* 239: 132-149
- Favre, M., Majewski, S., Noszczyk, B., Maienfisch, F., Pura, A., Orth, G., Jablonska, S.** 2000 Antibodies to human papillomavirus type 5 are generated in epidermal repair processes. *J. Invest. Dermatol.* 114: 403-407
- Forslund, O., Nordin, P., Hansson, B.G.** 2000: Mucosal human papillomavirus types in squamous cell carcinomas of the uterine cervix and subsequently on the fingers. *Br. J. Dermatol.* 142: 1148-1153
- Garbe, C.** 1997: Epidemiologie des Hautkrebs. In *Dermatologische Onkologie* (Garbe, C., Dummer, R., Kaufmann, R., Tilgen, W, eds.). Springer, Berlin, Heidelberg. 40-52
- Gillison, M.L., Koch, W.M., Capone, R.B., Spafford, M., Westra, W.H., Wu, L.** 2000: Evidence for a causal association between human

- papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J. Natl. Cancer Inst.* 92: 709-720
- Glover, M.T., Niranjan, N., Kwan, J.T.C., Leigh, I.M.** 1994: Non-melanoma skin cancer in renal transplant recipients: extent of the problem and a strategy for management. *Br. J. Plast. Surg.* 47: 86-89
- Hardie, I.R.** 1995: Skin cancer in transplant recipients. *Transplant. Rev.* 9: 1-17
- Harwood, C.A. and Proby, C.M.** 2002: Human papillomaviruses and non-melanoma skin cancer. *Current Opinion in Infectious Diseases* 15: 101-114
- Harwood, C.A., Suretheran, T., McGregor, J.M., Spink, P.J., Leigh, I.M., Breuer, J., Proby, C.M.** 2000 Human papillomavirus infection and non-melanoma skin cancer in immunosuppressed and immunocompetent individuals. *J. Med. Virol.* 61: 289-297
- Ho, G.Y.F., Biermal R., Beardsly L., Chang, C.J., Burk, R.D.** 1998: Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N. Eng. J. Med.* 338: 423-428
- IARC** 2001: GLOBOCAN 2000: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. IARC CancerBase No. 5. Lyon, IARCPress
- Jablonska, S. and Orth, G.** 1985: Epidermodysplasia verruciformis. *Clin. Dermatol.* 3: 83-96
- Jackson, S., Harwood, C., Thomas, M., Banks, L., Storey, A.** 2000: Role of Bak in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins. *Genes Devel* 14: 3065-3073
- Kitasato, H., Hillova, J., Lenormand, M, Hill, M.** 1991: Tumorigenicity of the E6 an E6-E7 gene constructions derived from human papillomavirus type 33. *Anticancer Res.* 11: 1165-1172
- Klussman, J.P., Weissenborn, S.J., Wieland, U., Dries, V., Kolligs, J., Jungehueling, M., Eckel, H.E., Dienes, H.P., Pfister, H.J., Fuchs, P.G.** 2001: Prevalence, distribution, and viral load of human papillomavirus 16 DNA in tonsillar carcinomas. *Cancer* 92: 2875-2884

- Koutsky, L.A., Ault, K.A., Wheeler, C.M., Brown, D.R., Barr, E., Alvarez, F.B., Chiacchierini, L.M., Jansen, K.U.** 2002: A controlled trial of human papillomavirus type 16 vaccine. *N. Engl. J. Med.* 347: 1703-1705
- Lampert, A., Pauwels, C., Duboucher, C., Morel, G., Poveda, J.D., Perie G.** 2000 : Detection of human papillomavirus in cutaneous extragenital Bowen's disease in immunocompetent patients. *Ann. Dermatol. Venereol.* 127: 40-45
- Lutzner, M.A.** 1978: Epidermodysplasia verruciformis. An autosomal recessive disease characterized by viral warts and skin cancer. A model of viral oncogenesis. *Bull. Cancer Paris.* 65: 169-182.
- Mantovani, F. and Banks, L.** 2001: The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene* 20: 7874-7887
- Marks, R.** 1995: The epidemiology of nonmelanoma skin cancer: Who, why and what can we do about it. *J. Dermatol.* 22: 853-857
- Marks, R.** 1996: Squamous cell carcinoma. *Lancet*: 347: 735-738
- McCance, D.J.** 2000: Papillomaviruses. In *Principles and Practice of Clinical Virology* (Zuckerman, A.J., Banatvala, J.E. and Pattison, J.R., eds.). John Wiley and Sons, Chichester, England
- McCance, D.J., Kalache, A., Ashdown, K., Andrade, L., Menezes, F., Smith, P., Doll, R.** 1986: Human papillomavirus type 16 and 18 in carcinomas of the penis from Brazil. *Int. J. Cancer* 37: 55-59
- Meyer, T., Arndt, R., Christophers, E., Stockfleth, E.** 2000: Frequency and distribution of HPV types detected in cutaneous squamous-cell carcinomas depends upon the HPV detection system: a comparison of four PCR assays. *Dematology* 201: 204-211
- Münger, K., Basile, J.R., Duensing, S., Eichten, A., Gonzalez, S.L., Grace, M., Zacny, V.L.** 2001: Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene* 20: 7888-7898
- Munoz, N., Bosch, F.X., Chichareon, S.** 2000: A multinational case-control study on the risk of cervical cancer linked to 25 HPV types: which are the high-risk types? In: Castellsagué, X., Bosch, F.X., de Sanjosé, S., et

- al, eds. 18th International Papillomavirus Conference – program and abstract book. Barcelona: Thau, S.L.
- Orth, G.** 1987. The Papovaviridae (Salzman, N.P. and Howley, P.M., eds.) Plenum Press, New York. 199-243
- Palefsky, J.M., Holly, E.A., Gonzales, J., Berline, J., Ahn, D.K. and Greenspan, J.S.** 1991: Detection of human papillomavirus DNA in anal intraepithelial neoplasia and anal cancer. *Cancer Res.* 51: 1014-1019
- Pfister, H.** 1992: Human papillomavirus and skin cancer. *Semin. Cancer Biol.* 3: 263-271
- Pinto, A.P., Signorello, L.B., Crum, C.P., Harlow, B.L., Abrao, F., Villa, L.L.** 1999: Squamous cell carcinoma of the vulva in brazil: prognostic importance of host and viral variables. *Gynecol. Oncol.* 14: 61-67
- Rous, P. and Beard, J.W.** 1935: The progression to carcinoma of virus-induced rabbit papillomas (Shope). *J. Exp. Med.* 62: 523-548
- Sambrook, J. and Russel D.W.** 2001: Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. – ISBN 0-87969-577-3
- Scheffner, M.B., Werness, B.A., Huibregtse J.M., Levine, A.J., Howley, P.M.** 1990: The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus type 16 and 18 promotes degradation of p53. *Cell* 63: 1129-1136
- Shope, R.E. and Hurst, E.W.** 1933: Infectious papillomatosis of rabbits. *J. Exp. Med.* 68: 607-623
- Shuman, S.** 1994. Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J.Biol.Chem* 269: 32678-32684
- Stoler, M.H., Rhodes, C.R., Whitbeck, A., Wolinsky, S.M., Chow, L.T., Broker, T.R.** 1992: Human papillomavirus type 16 and 18 gene expression in cervical neoplasias. *Hum. Pathol.* 23: 117-128
- Stubenrauch, F. und Iftner, T.** 1999: Krebs durch Papillomviren. *Target Forum.* 1: 5-15
- Swan, D.C., Tucker, R.A., Tortolero-Luna, G., Mitchell, M.F., Wideroff, L., Unger, E.R., Nisenbaum, R.A., Reeves, W.C., Icenogle, J.P.** 1999:

- Human papillomavirus DNA copy number is dependent on grade of cervical disease and HPV type. *J. Clin. Microbiol.* 37: 1030-1034
- Syverton, J.T.** 1952: The pathogenesis of the rabbit papilloma to carcinoma sequence. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 54: 1126-1140
- van Beurden, M., ten Kate, F.W.J., Tjong-A-Hunt, S.P., de Craen, A.J., van der Vange, N., Lammes, F.B., ter Schegget, J.** 1998: Human papillomavirus DNA in multicentric vulvar intraepithelial neoplasia. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 17: 12-16
- Wagener, C.** 1995: Einführung in die Molekulare Onkologie. Thieme, Stuttgart, New York
- Weissenborn, S.J., Hopfl, R., Weber, F., Smola, H., Pfister, H.J., Fuchs, P.G.** 1999: High prevalence of a variety of epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus in psoriatic skin of patients treated or not treated with PUVA. *J. Invest. Dermatol.* 113: 122-126
- Wieland, U., Ritzkowsky, A., Stoltidis, M., Weissenborn, S., Stark, S., Ploner, M., Majewski, S., Jablonska, S., Pfister, H.J., Fuchs, P.G.** 2000: Papillomavirus DNA in basal cell carcinoma of immunocompetent patients: an accidental association ? *J. Invest. Dermatol.* 115: 124-128
- Wilmanns, W., Huhn, D., Wilms, K.** 2000: Internistische Onkologie. Thieme, Stuttgart, New York
- Woodman, C.B., Collins, S., Winter, H., Bailey, A., Ellis, J., Prior, P., Yates, M., Rollason, T.P., Young, L.S.** 2001: Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. *Lancet* 357: 1831-1836
- Woodworth, C.D., Doninger, J., DiPaolo, J.A.** 1989: Immortalization of human foreskin keratinocytes by various human papillomavirus DNAs corresponds to their association with cervical carcinoma. *J. Virol.* 63: 159-164
- Zabawski, E.J. Jr, Washak, R.V., Cohen, C.B., Cockerell, C.J., Brown, S.M.** 2001: Squamous cell carcinoma of the nail bed: is finger predominance a clue to etiology ? A report of 5 cases. *Cutis* 67: 59-64

zur Hausen, H. 2001: Oncogenic DNA viruses. *Oncogene* 20: 7820-7823

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Iftner für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung hervorragender Arbeitsbedingungen und den konstruktiven Dialog.

Weiterhin möchte ich Herrn Dr. Frank Stubenrauch danken, der im Labor stets als kompetenter Ansprechpartner zur Verfügung stand.

Ganz besonders Dank sagen möchte ich auch Eva-Maria Huber, Ralf Gaupp, Sonja Jeckel und Thomas Zobel, die ihr technisches und theoretisches Wissen geduldig und gerne weitergaben.

Herzlichen Dank auch allen anderen Mitarbeitern der Sektion Experimentelle Virologie.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten:	Christoph Braun geboren am 18.12.1975 in Blaubeuren ledig
Schulbildung:	1982-1986: Grundschule Schelklingen 1986-1995: Gymnasium Blaubeuren
Zivildienst:	1995-1996: Individuelle Schwerstbehinderten- betreuung des ASB in Ulm
Studium:	1996-1997: Studium der Chemie in Ulm ab 1997: Studium der Medizin in Tübingen 1999: Physikum in Tübingen 2000: 1. Staatsexamen in Tübingen 2002: 2. Staatsexamen in Tübingen 07.11.2003: 3. Staatsexamen in Friedrichshafen
