

Aus dem Institut für Virologie der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. H.-J. Thiel

und

dem Institut für Virologie der Universität zu Köln

Betreuer: Prof. Dr. H. J. Pfister

**Etablierung eines transgenen Mausmodells
für kutane Karzinogenese
durch
Epidermodysplasia verruciformis-assoziierte
humane Papillomviren**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Inke Diana Schaper

Tierärztin aus Essen

Gießen 2003

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan Prof. Dr. Dr. h. c. B. Hoffmann

Gutachter:

Prof. Dr. H.-J. Thiel

Prof. Dr. H. J. Pfister

Tag der Disputation: 15. Oktober 2003

I. EINLEITUNG.....	1
1.1. Papillomviren	1
1.2. Genomorganisation der Papillomviren	2
1.3. Infektion durch Papillomviren und deren Replikation	4
1.4. Papillomvirus-bedingte Tumorentstehung	6
1.4.1. Beteiligung humaner Papillomviren bei der Entstehung des Zervixkarzinoms.....	6
1.4.2. Die Rolle von HPV bei der Entstehung des nicht-melanozytären Hautkrebses	7
1.5. Virusproteine.....	10
1.5.1. E1-Protein.....	10
1.5.2. E2-Protein.....	10
1.5.3. E4-Protein.....	11
1.5.4. E5-Protein.....	11
1.5.5. E6- und E7-Proteine	12
1.5.5.1. E6-Protein	12
1.5.5.2. E7-Protein	14
1.6. Zielsetzung.....	16
 II. MATERIAL	 17
2.1. Versuchstiere	17
2.2. Bakterienstämme	17
2.3. Chemikalien und Materialien	17
2.4. Radionuklide	18
2.5. Enzyme und Proteine.....	18
2.5.1. DNA-Polymerasen	18
2.5.2. Restriktionsendonukleasen.....	19
2.5.3. Weitere Enzyme	19
2.6. Nukleinsäuren.....	19
2.6.1. Plasmide	19
2.6.1.1. Vektoren.....	19
2.6.1.2. Konstrukte	20

2.6.2. Oligonukleotide	20
2.6.2.1. Primer für die reverse Transkription	20
2.6.2.2. Primer für die β -Globin-PCR (Konkel et al., 1978)	20
2.6.3. DNA-Längenstandards für die Agarose-Gelelektrophorese	20
2.7. Gebrauchsfertige Reagenziensysteme	21
2.8. Puffer und Lösungen	21
2.8.1. PCR-Puffer	21
2.8.2. Puffer und Lösungen für die RNA Gelelektrophorese	22
2.8.3. Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese	22
2.8.4. Sonstige Lösungen und Puffer	22
2.8.5. Materialien für die Mikroinjektion	22
2.9. Software	23
2.10. Laborgeräte	23
2.11. Plastikmaterial	24
III. METHODEN	25
3.1. Mikroinjektion	25
3.1.1. Aufreinigung des Tragens für die Mikroinjektion	25
3.1.2. Superovulation und Gewinnung von befruchteten Oozyten	25
3.1.3. Mikroinjektion mittels eines Mikromanipulators (Hammes und Schedl, 2000)	25
3.1.4. Erzeugung scheinchwangerer Ammenweibchen und Implantation der mikroinjizierten Oozyten	26
3.2. Kreuzung von Mäusen	26
3.3. Markierung der Mäuse	26
3.4. Medizinische Analyse der Mäuse	27
3.4.1. Makroskopische medizinische Analyse der Mäuse	27
3.4.2. Histologische Untersuchungen	28
3.5. DNA-Methoden	28
3.5.1. Isolation von DNA	28
3.5.1.1. DNA-Extraktion aus Mausbiopsien und Sektionsproben	28
3.5.1.2. Isolierung von Plasmid DNA	28
3.5.1.2.1. Plasmidminipräparation	28
3.5.1.2.2. Modifizierte Plasmidmaxipräparation nach Sambrook et al. (1989)	28
3.5.1.3. Reinigung von DNA über Phenolextraktion	29

3.5.1.4. Ethanolfällung von DNA	30
3.5.2. Agarose-Gelelektrophorese	30
3.5.3. Extraktion von DNA aus Agarosegelen	30
3.5.4. Quantifizierung von DNA	30
3.5.4.1. Photometrische DNA-Konzentrationsmessung.....	30
3.5.4.2. Konzentrationsbestimmung mittels Mengenstandards.....	31
3.5.5. Modifikation von Nukleinsäuren.....	31
3.5.5.1. Dephosphorylierung von DNA	31
3.5.5.2. Ligation von DNA mit T4-DNA-Ligase	32
3.5.5.3. Restriktionsspaltung von DNA	32
3.5.6. Southern Blot.....	33
3.5.6.1. DNA-Restriktionsverdau und Agarose-Gelelektrophorese	33
3.5.6.2. Transfer der DNA	33
3.5.6.3. Markierung der Sonden-DNA.....	34
3.5.6.4. Prähybridisierung und Hybridisierung	34
3.5.6.5. Waschen der Membran und Detektion.....	35
3.6. RNA-Methoden	35
3.6.1. Isolation von RNA	35
3.6.2. RNA-Agarose-Gelelektrophorese	35
3.7. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	36
3.7.1. Protokolle qualitativer PCRs	36
3.7.1.1. β -Globin-PCR (Konkel et al., 1978)	36
3.7.2. Allgemeines Protokoll für quantitative PCRs.....	37
3.7.3. Reverse Transkription	38
3.7.3.1. Reverse Transkription mit Oligo-dT ₂₃ -Primern	38
3.8. Sequenzanalyse.....	39
3.9. Auswertung der Sequenzdaten	39
3.10. Methoden aus der Bakteriologie	39
3.10.1. Transformation von E.coli.....	39
3.10.2. Medien und Zusätze für Bakterienkulturen	39
3.11. Statistische Analyse.....	40
IV. ERGEBNISSE.....	41
4.1. Etablierung einer transgenen Maus-Linie mit den frühen Genen von HPV8	41
4.1.1. Konstruktion des Transgens	41

4.1.1.1. Leserahmen der frühen Gene E1, E2, E4, E6 und E7 von HPV8.....	41
4.1.1.2. Präparation des K14-Vektors	43
4.1.1.3. Herstellung und Überprüfung des Konstruktes K14-HPV8	44
4.1.2. Mikroinjektion des K14-HPV8 Konstruktes und Implantation der befruchteten Eizellen	47
4.1.3 Nachweis des HPV8-Transgens in Mäusen der F0-Generation und Nachkommen späterer Generationen	48
4.2. Analyse der DNA-Extrakte mittels Southern Blot Hybridisierung	53
4.3. Pathologisch-histologische Untersuchung.....	55
4.3.1.Makroskopische Untersuchung	55
4.3.2.Mikroskopische Untersuchung.....	60
4.3.2.1. Benigne Tumoren.....	60
4.3.2.2. Maligne Tumoren.....	63
4.4. Neu etablierte Protokolle der Echt-Zeit-PCR zur Bestimmung der Kopienzahl des Transgens pro Zelle sowie zum Nachweis und zur Quantifizierung der mRNA der Gene E2, E6 und E7 von HPV8.....	65
4.4.1. Quantifizierung der Transgenzahl pro Mauszelle.....	66
4.4.1.1. Echt-Zeit-Fluoreszenz-PCR für die Quantifizierung des β -Actin-Gens.....	66
4.4.1.2. Echt-Zeit-Fluoreszenz-PCR für die Quantifizierung des HPV8-E6-Gens	69
4.4.2. Nachweis und Quantifizierung der mRNAs der frühen Gene E2, E6 und E7 von HPV8	69
4.4.2.1. Überprüfung der Qualität der RNA-Isolation.....	71
4.4.2.2. Überprüfung der reversen Transkription.....	72
4.4.2.3.Echt-Zeit-PCRs zum Nachweis und zur Quantifizierung der Transkripte der frühen Gene von HPV8	72
4.5. PCR für die p53-Mutationsstudie.....	77
V. DISKUSSION	80
VI. ZUSAMMENFASSUNG	89
VII. SUMMARY.....	90
VIII.LITERATUR.....	91
IX. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	102

I. Einleitung

1.1. Papillomviren

Papillomviren sind weit verbreitete, kleine nicht umhüllte DNA-Viren. Seit 1999 bilden sie die eigenständige Familie Papillomaviridae (Abb.1). Papillomviren infizieren zunächst undifferenzierte Keratinozyten des Epithels der Haut und der Schleimhaut einer Vielfalt von Wirbeltieren sowie des Menschen, die sie durch Mikroverletzungen der äußeren Schichten erreichen. Je nach Virustyp können sie verschiedene benigne oder maligne Tumoren hervorrufen (Pfister, 1984). Das Spektrum der befallenen Tiere reicht von Haustieren, wie Wiederkäuern, Pferden und Hunden über Nager und verschiedene Wildtiere bis hin zu Vögeln (Sundberg, 1987). Die hierbei am besten erforschten Viren sind die bovinen Papillomviren (BPV) BPV1 und BPV2. Sie dienten in der Vergangenheit als Modell für die Erforschung humaner Papillomviren. Bei den Papillomviren des Rindes werden 6 Typen unterschieden, welche wiederum zwei Untergruppen zugeordnet werden. Die Vertreter der Untergruppe A (BPV1 und BPV2) besitzen die Besonderheit, neben Epithelzellen auch Bindegewebszellen zu infizieren und zur Proliferation anzuregen. Sie können daher neben Papillomen der Haut und Schleimhaut auch Fibropapillome verursachen. Eine weitere Besonderheit von BPV1 und BPV2 ist das, verglichen mit anderen Papillomviren, ungewöhnlich breite Wirtsspektrum. So sind sie in der Lage, neben dem Rind auch Pferde zu infizieren und bei ihnen das sogenannte „Equine Sarkoid“ hervorzurufen, welches die am häufigsten beobachtete Neubildung beim Pferd darstellt. Die Infektion des Rindes mit BPV erfolgt durch Kontakt mit anderen Tieren oder kontaminierte Gegenstände und tritt vorwiegend bei Tieren unter 2 Jahren auf. Dabei werden erste Veränderungen nach 4 bis 6 Wochen beobachtet, welche in der Regel spontan nach 4 bis 6 Monaten regressieren. Je nach Lage können sie verschiedenste mechanische Störungen, beispielsweise beim Melken, bei der Futteraufnahme, dem Harnabsatz und dem Deckakt, verursachen. Eine maligne Transformation konnte nur im Zusammenhang mit BPV4-induzierten Schleimhautpapillomen im Verdauungstrakt und der Harnblase beobachtet werden und wurde auf die Verfütterung von Adlerfarn zurückgeführt, welcher als Kokarzinogen wirkende Stoffe enthält.

Analog zu BPVs rufen Humane Papillomviren (HPV) benigne Läsionen in Form von Papillomen der Haut und Schleimhaut hervor. Weiterhin konnte die Beteiligung von HPV an der Entstehung des Zervixkarzinoms beim Menschen klar belegt werden. Für das kutane Plattenepithelkarzinom hingegen konnte dies bislang nur ansatzweise geklärt werden. Beim Menschen gibt es bislang über 100 komplett charakterisierte humane Papillomvirus-Genotypen, die aufgrund ihres Tropismus` in Haut- und Schleimhaut-Typen unterteilt werden (Shah und Howley, 1996; zur Hausen, 2000). Nach dem Grad ihrer Assoziation mit malignen Läsionen unterscheidet man bei den genitalen Typen außerdem Hoch-Risiko (engl. high-risk, hr-HPV) und Niedrig-Risiko HPVs (engl. low-risk, lr-HPV).

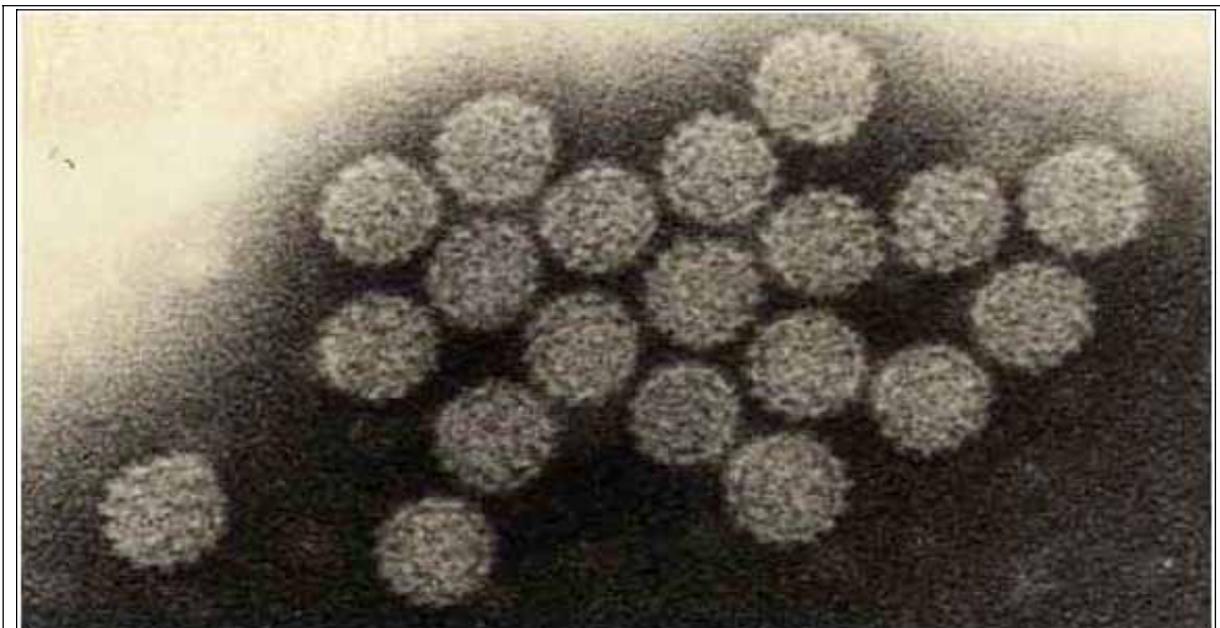


Abb.1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von HPV-Partikeln, die aus einer Plantarwarze isoliert wurden.

Kontrastierung: Phosphorwolframsäure; Vergrößerung: 20000x (mit freundlicher Genehmigung von Prof. H. J. Pfister).

1.2. Genomorganisation der Papillomviren

Papillomviren besitzen eine doppelsträngige zirkuläre DNA von etwa 8000 Basenpaaren. Sie bildet mit zellulären Histonen eine chromatinähnliche Struktur (Pfister, 1984). Das Genom aller bis heute sequenzierten Papillomviren ist sehr ähnlich aufgebaut und wird in den kodierenden und den nicht- kodierenden Bereich unterteilt. Die kodierende Region umfaßt Leserahmen („open reading frames“, ORFs), die für 5-8 frühe, regulatorische Proteine („early“, E) sowie für zwei

Strukturproteine („late“, L) kodieren (Shah und Howley, 1996). Die teilweise überlappenden Leserahmen liegen auf demselben DNA-Strang und nehmen trotz großer Sequenzunterschiede zwischen den verschiedenen Typen relativ zueinander entsprechende Positionen ein (Abb. 2) (Pfister und Ter Schegget, 1997). Die Genprodukte der frühen Gene üben Funktionen bei der Transformation der Wirtszelle (E6, E7), der viralen DNA-Replikation (E1, E2), der Transkriptionskontrolle (E2) und der Virusfreisetzung (E4) aus. Die späten Gene kodieren für die beiden Kapsidproteine L1 und L2 (Pfister und Fuchs, 1987). Eine detaillierte Übersicht über die Funktion der viralen Proteine wird im Abschnitt 1.5. gegeben. Zwischen den ORFs L1 und E6 befindet sich die regulatorische, nicht-kodierende Region („non coding region“, NCR oder „long control region“, LCR), die die wichtigsten cis-Kontrollelemente enthält, die essentiell für die Regulation der Transkription und Replikation des viralen Genoms sind. Die NCR nimmt ca. 7-10 % des HPV-Genoms in Anspruch und weist eine hohe Sequenzhomologie zwischen verwandten Virustypen auf (Pfister und Fuchs, 1987).

Im Vergleich mit anderen Papillomviren weisen Epidermodysplasia verruciformis (EV) assoziierte HPVs einige Unterschiede auf. Bei EV handelt es sich um eine seltene, genetisch bedingte Hauterkrankung, die sich durch eine ausgeprägte Prädisposition für HPV-Infektionen auszeichnet. EV-assoziierten Viren fehlt der E5-ORF. Außerdem ist die NCR deutlich kürzer als bei den übrigen HPVs. HPV8, der am besten untersuchte EV-HPV-Typ, besitzt z.B. eine NCR von 395 bp, im Gegensatz zu einer üblichen Länge der NCR bei nicht EV-assoziierten HPV von 650-900 bp.

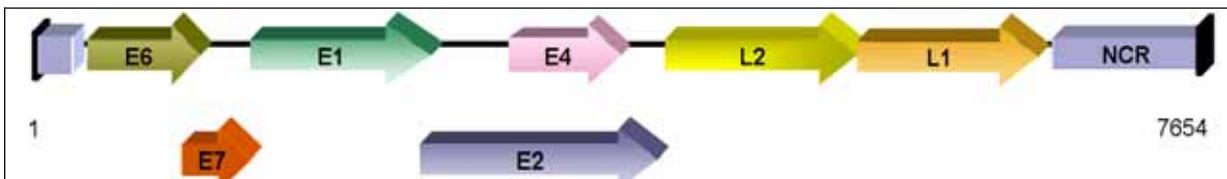


Abb. 2: Schematische Darstellung des HPV8-Genoms.

Bei dieser Darstellung wurde das zirkuläre HPV8-Genom an der Position 1/7654 geöffnet.

NCR: non coding region (modifiziert nach Pfister und Fuchs, 1987).

1.3. Infektion durch Papillomviren und deren Replikation

Papillomviren sind hoch speziesspezifisch und vermehren sich in Abhängigkeit vom Differenzierungsstatus der Haut (Pfister und Ter Schegget, 1997). Die Erregerübertragung erfolgt durch direkten Kontakt zu Virusinfizierten, z.B. Warzenträgern, oder indirekt, z.B. durch Inokulation virustragender Hornschuppen vom Boden. Im Fall genitaler HPVs gilt Geschlechtsverkehr als Hauptübertragungsweg. Als ein möglicher Rezeptor konnte das α -6-Integrin identifiziert werden, das auf der Oberfläche von epithelialen, endothelialen und neuronalen Zellen exprimiert wird (Evander et al., 1997). Dieser Rezeptor scheint nach jüngsten Erkenntnissen nicht von allen Papillomviren gebunden zu werden. Er ist obligatorisch für HPV6b (Evander et al., 1997) und HPV16 (Yoon et al., 2001), jedoch scheint er von bovinen Papillomviren für den Eintritt in die Zelle nicht benutzt zu werden (Sibbet et al., 2000). HPV33 erkennt Heparansulfate auf den Zelloberflächen und scheint mit einem noch unbekanntem, zweiten Rezeptor zu interagieren (Giroglou et al., 2001). Nach Adsorption und Aufnahme der Virionen durch Endozytose liegen die viralen Genome in den Kernen der undifferenzierten, proliferierenden Basalzellen in geringer Kopienzahl als Episome vor und replizieren synchron mit der Zellteilung (Abb. 3). Nur die frühen Gene E1, E2 und E5 werden transkribiert. Im Rahmen des Erneuerungsprozesses der Haut teilen sich die Zellen des Stratum basale vertikal zur Hautoberfläche, worauf es zur kontinuierlichen Differenzierung der Keratinozyten kommt. Während der Differenzierung ändert sich das Expressionsschema zellulärer Gene, wodurch es zu einer Änderung des zellulären Milieus kommt. Dies könnte eine Verstärkung der viralen Transkription und der vegetativen Replikation zur Folge haben. Die allmählich differenzierenden Keratinozyten verlieren ihr Teilungspotential. Die Expression viraler Gene kann jedoch zu einer vorübergehenden Verzögerung der Zelldifferenzierung führen und somit die Ausbildung von Warzen begünstigen (Chow und Broker, 1994; zur Hausen und de Villiers, 1994). Die Papillomvirus-DNA-Replikation im differenzierenden Epithel wird in drei Phasen gegliedert (Howley, 1996). Während der Amplifikationsphase in den Basalzellen wird das virale Genom unmittelbar nach der Infektion bis zum Erreichen einer für die Virusgruppen typischen Genomkopienzahl (ca.10-50) repliziert. In der folgenden „Maintenance“-Phase in den sich teilenden Basalzellen wird die virale DNA im Durchschnitt einmal pro Zelle während der S-Phase des

Zellzyklus dupliziert. Diese Art der Replikation sichert die Persistenz und latente Infektion der Zellen (Gilbert und Cohen, 1987). Hierbei treten keine apparenten Epithelveränderungen auf. Dieser Zustand kann Monate oder Jahre andauern und danach wieder in einen produktiven Infektionszyklus übergehen. In den differenzierten Epithelzellen kommt es zur dritten Phase, der „vegetativen“ DNA-Replikation. Es wird eine große Anzahl von Virusgenomen produziert, die in Viruskapside verpackt werden. Mit dem Absterben und der Abschuppung der obersten Hautschichten kommt es zur Freisetzung der reifen Viruspartikel (Howley, 1996). Alle Papillomviren bleiben außerhalb der Wirtszelle sehr lange stabil und infektiös.

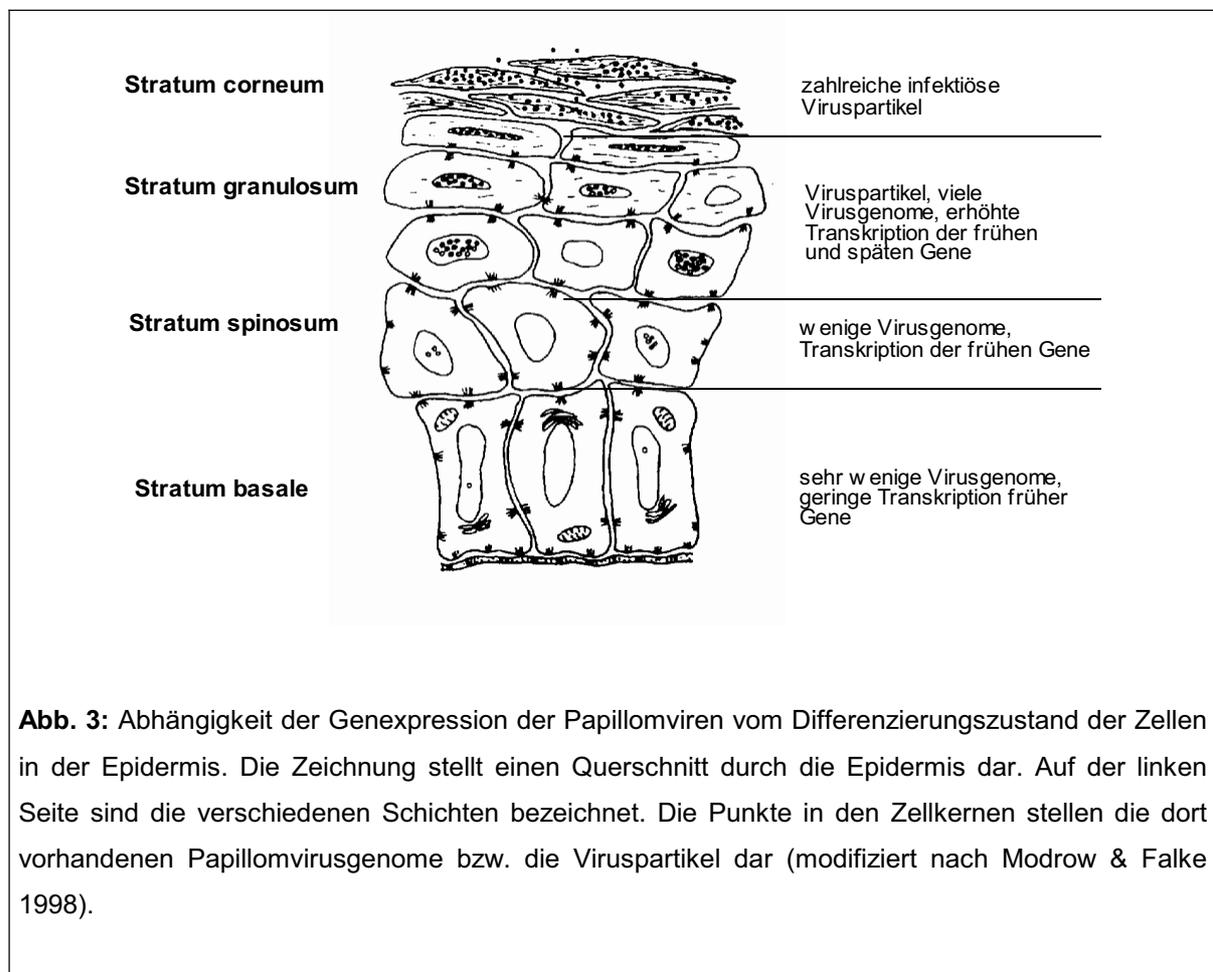


Abb. 3: Abhängigkeit der Genexpression der Papillomviren vom Differenzierungszustand der Zellen in der Epidermis. Die Zeichnung stellt einen Querschnitt durch die Epidermis dar. Auf der linken Seite sind die verschiedenen Schichten bezeichnet. Die Punkte in den Zellkernen stellen die dort vorhandenen Papillomvirusgenome bzw. die Viruspartikel dar (modifiziert nach Modrow & Falke 1998).

Mit Papillomvirus infizierte Zellen können, zumindest bei Infektionen mit bestimmten HPV-Typen, charakteristische zytopathische Effekte aufweisen. Ein typischer zytopathischer Effekt bei Kondylomen (HPV6 oder 11) und einigen Zervixläsionen ist z.B. die Anwesenheit von Koilozyten. Es handelt sich dabei um große, klare Zellen

mit perinukleären Vakuolen und vergrößertem Kern (häufig Doppelkernigkeit), welche gruppiert im Stratum granulosum und Stratum spinosum der Epidermis vorliegen. Das Karyoplasma ist klar, und das Zytoplasma enthält Keratohyalin granula in unterschiedlicher Größe und Form (Majewski und Jablonska, 1995).

1.4. Papillomvirus-bedingte Tumorentstehung

Infektionen mit HPV können zu lokal begrenzten, grundsätzlich benignen Tumoren, wie Warzen der verhornenden Haut, Genitalwarzen oder spitzen Kondylomen, Papillomen der Mundhöhle und des Kehlkopfes oder Konjunktivalpapillomen führen. Sie bilden sich meistens spontan wieder zurück (Howley, 1996; Gross, 1997). Manche dieser gutartigen Tumoren entarten jedoch nach längerer Persistenz, wobei das virale Genom in Karzinomen der Schleimhaut persistiert und fortgesetzt partiell exprimiert wird (Wettstein, 1990; Pfister, 1992a; Pfister, 1992b). Zahlreiche Studien lieferten Hinweise auf einen kausalen Zusammenhang zwischen HPV-Infektionen und der malignen Entartung bestimmter Tumoren des Anogenitaltraktes, des Larynx und der Haut (zur Hausen, 1977; Pfister und Fuchs, 1987; Pfister, 1996; Padlewska et al., 2001).

Während in gutartigen Läsionen alle Strukturen des differenzierten Epithels vorhanden sind und nur die Lebensdauer der HPV-infizierten Keratinozyten verlängert ist, kommt es im Verlauf der malignen Entartung zu einer Proliferation undifferenzierter Keratinozyten. Der Vorgang der Tumorentstehung, bei dem die viralen Proteine eine entscheidende Rolle spielen, wurde am besten bei den genitalen Papillomviren untersucht und wird im Folgenden dargestellt.

1.4.1. Beteiligung humaner Papillomviren bei der Entstehung des Zervixkarzinoms

Die größte Subgruppe im phylogenetischen Stammbaum der Papillomviren wird durch die HPV-Typen repräsentiert, die die Schleimhäute des Anogenitaltraktes infizieren (Abb.4) (Myers et al., 1997). Nur ein Teil dieser Typen konnte in Anogenitalkarzinomen gefunden werden (Bosch et al., 1995; Pirog et al., 2000). Die am häufigsten in Zervixkarzinomen detektierten Typen sind HPV 16, 18, 31, 33, 39, 45, 52, 58 und 69 (zur Hausen, 2000). Diese werden zu den sogenannten hr-HPV gezählt. Die Typen 16 und 18 sind die Hauptvertreter dieser Hochrisikogruppe

(Gissmann, 1992). Die viralen E6 und E7 Proteine können wie für einige genitale HPV-Typen gezeigt, die Zellproliferation anregen und sie besitzen zelltransformierende Eigenschaften (zur Hausen, 2000). Ihre genaue Funktion wird noch näher in 1.5.5. beschrieben.

1.4.2. Die Rolle von HPV bei der Entstehung des nicht-melanozytären Hautkrebses

Nicht melanozytärer Hautkrebs (NMHK) ist die häufigste Krebsart unter Kaukasiern. In den letzten Jahren ist die Inzidenz signifikant angestiegen. Histologisch wird NMHK in Basaliome (engl. Basal cell carcinoma, BCC) und Plattenepithelkarzinome (PEC) unterteilt (Pfister, 2003). Die Beteiligung von HPV bei der Entstehung von NMHK wurde erstmals für die Krankheit EV gezeigt, welche mit einem hohen Risiko für die Entwicklung von PEC verbunden ist. HPV-Infektionen führen bei EV-Patienten zu lebenslang persistierenden, gutartigen Hautläsionen, wie flachen Warzen und makulösen Läsionen (Jablonska und Majewski, 1994). Die genetische Prädisposition für diese Hautkrankheit wird autosomal rezessiv vererbt und konnte kürzlich einem DNA-Lokus auf Chromosom 17 zugeordnet werden (Ramos et al., 2002). In einem Zeitraum von 10-20 Jahren entwickeln sich auf dem Boden der primär benignen Tumoren multiple präkanzeröse Läsionen, die bei bis zu 60% der EV-Patienten zu PEC entarten (Fuchs et al., 1986). EV-assoziierte HPV-Typen stellen die zweitgrößte Subgruppe in dem phylogenetischen Stammbaum der Papillomviren dar (Abb. 4) (Myers et al., 1997). Auffällig ist, dass in EV-Karzinomen vorwiegend HPV5 und HPV8 episomal persistieren, wobei sich in den benignen EV-Läsionen etwa 20 verschiedene EV-assoziierte Virustypen nachweisen lassen, was möglicherweise auf ein besonderes onkogenes Potential von HPV5 und 8 hinweist (Pfister, 1992a). Bis vor kurzem wurde vermutet, dass Infektionen mit diesen HPV-Typen auf EV-Patienten begrenzt sind. Neuere Studien zeigen, dass sie nicht nur in PEC von EV-Patienten vorkommen, sondern auch in NMHK von Nierentransplantatempfängern und von immunkompetenten Patienten sowie in normaler Haut (Pfister und Ter Schegget, 1997; Boxman et al., 1999; Berkhout et al., 2000; Harwood et al., 2000; Padlewska et al., 2001). Anerkannte Risikofaktoren beim NMHK sind ein geschwächter Immunstatus, ein heller Hauttyp, extensive Sonnenexposition, ionisierende Strahlung, verschiedene chemische Karzinogene und das Alter der

gefährdeten Person (Bouwes Bavinck und Berkhout, 1997). Als wichtigster Risikofaktor gilt der Grad der natürlichen UV-Bestrahlung, da BCCs und PECs und EV-Tumoren zumeist an lichtexponierten Körperstellen lokalisiert sind (Jablonska und Majewski, 1994). Zudem hat die geographisch bedingte Strahlungsintensität der Sonne einen entscheidenden Einfluss auf die Ausbildung von NMHK (Vitaliano und Urbach, 1980). Der Pigmentierungsgrad der Haut spielt bei der Entstehung von NMHK auch eine entscheidende Rolle, so tritt NMHK weit häufiger bei hellhäutigen Europäern auf als bei Afrikanern und Asiaten.

Ein starker Hinweis auf den Einfluss von UV-Licht auf die NMHK-Pathogenese stammt von Studien an Biopsien, die gezeigt haben, dass spezifische *p53*-Mutationen, die auf UV-Licht zurückzuführen sind, bei NMHKs gehäuft auftreten (Ziegler et al., 1993). So wurde z.B. für PECs eine Frequenz der *p53*-Mutationen von 15-69% gezeigt (Nelson et al., 1994). Hierbei sind die Mutationen bevorzugt in den Exons 4, 5, 7, 8 und 9 anzutreffen. Neben den *p53*-Mutationen wiesen PECs Mutationen im *ras*-Gen (van der Schroeff et al., 1990) sowie in den Genen von *p21WAF/CIP1* (Liu et al., 1999) und *p16INK4/CDKN2A* (Pavey et al., 1999) auf. Damit wird zum einen die Signaltransduktionskaskade der Wachstumsfaktoren in der Zelle gestört (Ras), und zum anderen führt der Ausfall von *p16INK4/CDKN2A* und *p21WAF/CIP1* zur unkontrollierten Zellproliferation. Während die kausale Rolle von HPV bei der Entstehung genitaler Tumore sehr gut beschrieben ist, bleibt es bis heute unklar, in welcher Weise sie an der kutanen Onkogenese beteiligt sind, da die transformierenden Eigenschaften der E6- und E7-Proteine der kutanen HPV-Typen gegenüber den genitalen hr-Typen kaum untersucht sind (Kiviat, 1999).

Für die kutanen HPV-Typen 5, 10, und 77 wurde *in vitro* gezeigt, dass sie das Apoptose-induzierende Protein Bak binden und degradieren können (Jackson et al., 2000). Bak-induzierte Apoptose stellt normalerweise eine (*p53*-unabhängige) Antwort der Haut auf UV-B Strahlung dar und dient der Elimination von Zellen mit UV-bedingten Mutationen. Insofern könnte dies für die HPV-bedingte Genese von NMHK besonders wichtig sein. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass in HPV-positiven NMHK kein Bak-Protein mehr nachweisbar ist, während es in HPV-negativen NMHK gefunden wurde. Bezüglich der Rolle von UV-Licht und HPV bei der Entstehung von NMHK konnte außerdem gezeigt werden, dass bei verschiedenen kutanen HPV die Promotoren durch UV-Licht indirekt stimuliert werden (Purdie et al., 1999; Padlewska et al., 2001; Ruhland und de Villiers, 2001; Akgül, 2002).

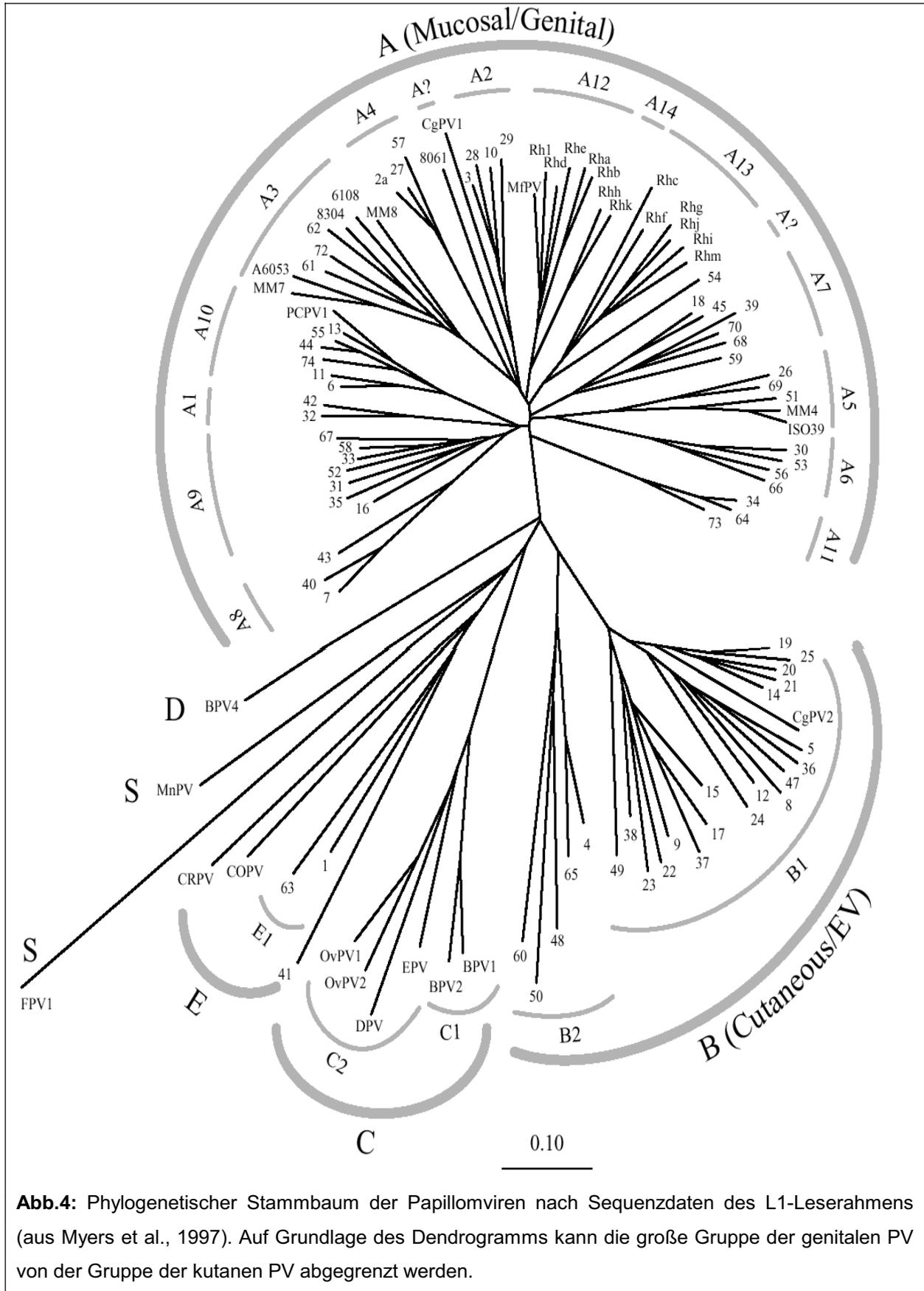


Abb.4: Phylogenetischer Stammbaum der Papillomviren nach Sequenzdaten des L1-Leserahmens (aus Myers et al., 1997). Auf Grundlage des Dendrogramms kann die große Gruppe der genitalen PV von der Gruppe der kutanen PV abgegrenzt werden.

1.5. Virusproteine

Die Expression papillomaviraler Proteine markiert entscheidende Punkte im viralen Lebenszyklus. Zum Teil ist es ihre Aufgabe, die Zellzykluskontrolle des Wirts zu überwinden, wodurch sie an Bedeutung für die Onkogenese gewinnen. Die Rolle und Funktion der einzelnen Proteine wird im Folgenden beschrieben.

1.5.1. E1-Protein

Der Replikationsinitiator E1 ist ein kernlokalisiertes, ATP bindendes Phosphoprotein (Sun et al., 1990), das sequenzspezifisch an die DNA bindet (Holt et al., 1994). Es besitzt eine ATP-abhängige Helikase-Aktivität (Yang et al., 1993), die in Anwesenheit von Topoisomerase I und Replikationsprotein A (RPA) doppelsträngige DNA entwindet (Kuo et al., 1994). Es konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von E1 durch CyclinE-Cdk2 notwendig ist, um die Replikation einzuleiten (Cueille et al., 1998).

1.5.2. E2-Protein

Vom E2-Leserahmen wird ein multifunktionales, 43 bis 48 kD großes DNA bindendes Phosphoprotein kodiert (Chiang et al., 1992). Es moduliert die DNA Replikation, Transkription und Segregation des viralen Genoms bei der Zellteilung (McBride et al., 1991; Majewski und Jablonska, 1995; Lehman und Botchan, 1998; Skiadopoulos und McBride, 1998). Das E2-Protein zeigt einen für die meisten Transkriptionsfaktoren typischen modularen Aufbau mit zwei physikalisch und funktionell getrennten Domänen: einer Aktivierungsdomäne, die im N-terminalen Bereich liegt und einer DNA-Binde- und Dimerisierungsdomäne im C-Terminus. Beide Domänen sind über eine sogenannte "hinge-Region" miteinander verbunden. Die N- und C-terminalen Regionen sind unter Papillomviren hoch konserviert, dagegen ist die "hinge-Region" mit unterschiedlicher Länge und Aminosäuresequenz sehr variabel (McBride et al., 1991). Das E2-Protein bindet als Dimer an die Basenfolge 5'-ACC(N)₆GGT-3' (Androphy et al., 1987), die in mehreren Kopien im viralen Genom vorhanden ist (Steger et al., 1996). E2 kann die virale Genexpression sowohl aktivieren als auch reprimieren, wobei die Position der E2-Bindestellen relativ zu anderen *cis*-aktiven Promotorelementen für den jeweiligen Effekt verantwortlich ist (Steger et al., 1993).

Das E2-Protein ist auch an der Initiation der viralen DNA-Replikation beteiligt, indem es an E1 bindet und dieses zum Replikationsursprung rekrutiert.

Kürzlich wurde gezeigt, dass das E2-Protein von HPV31 immortalisierte und normale Keratinozyten in der S-Phase des Zellzyklus arretiert, was mit einer kontinuierlichen Replikation der zellulären DNA verbunden ist. Der Verlust der Replikationskontrolle beruhte einerseits auf der Konzentrationserhöhung der cyclin A- und cyclin E-abhängigen Kinasen, sowie auf einem schnellen Abbau des zellzyklusregulierenden Tumorsuppressors p53. E2 ist demnach in der Lage, die DNA-Replikation durch Kontrolle des Zellzyklus', welcher größtenteils von p53 reguliert wird, zu stimulieren (Frattoni et al., 1997).

Offenbar besitzt das E2-Protein von HPV8 auch transformierende Eigenschaften. So konnten epitheliale Zellen und Fibroblasten nach Transfektion eines E2-Expressionsvektors Kolonien in Weichagar bilden. Außerdem war der Serumbedarf dieser Zellen reduziert. Die transformierenden Eigenschaften des E2-Proteins waren dabei von einer intakten Aktivierungsdomäne abhängig, sodass der transformierende Effekt möglicherweise auf einer transkriptionellen Fehlregulierung wichtiger Wachstums-kontrollgene beruht (Fuchs et al., 1993).

1.5.3. E4-Protein

Das E4-Gen ist unter den Papillomviren wenig konserviert. Obwohl es in der frühen Region lokalisiert ist, wird es relativ spät transkribiert. Seine genaue Rolle im viralen Lebenszyklus ist noch ungeklärt. Mutationsanalysen des E4-Gens von BPV-1 zeigten, dass E4 für die virale Transformation und DNA-Replikation nicht essentiell ist. In Zellkultur konnte demonstriert werden, dass E4 mit dem Zytokeratingerüst assoziiert ist. Das HPV16 E4-Protein konnte den Kollaps des Zytokeratinnetzwerkes induzieren, was die Vermutung zulässt, dass es eine Rolle bei der Virusfreisetzung spielt (Howley, 1996).

1.5.4. E5-Protein

Bei BPV1 und einigen genitalen HPV-Typen (HPV16 und 18) liegt zwischen den ORFs E2 und L2 im Gegensatz zu den kutanen, EV-assoziierten HPVs noch ein zusätzliches offenes Leseraster, E5. Das papillomavirale E5-Genprodukt repräsentiert ein kleines, extrem hydrophobes Polypeptid, bestehend aus 44-90

Aminosäuren. Es ist im Golgi-Apparat, im Zytoplasma oder in nukleären Membranen lokalisiert (Burkhardt et al., 1989; Conrad et al., 1993). Unter animalen Papillomviren ist es hoch konserviert. Für dieses Protein wurde in vitro transformierendes Potential bei epidermalen Keratinozyten gezeigt (Leptak et al., 1991). Es bewirkt eine verstärkte Proliferation der Wirtszelle durch Stimulation der EGF- und PDGF-Rezeptoren (Ullmann und Emery, 1996).

1.5.5. E6- und E7-Proteine

Die E6- und E7-Proteine von Papillomviren sind Onkoproteine, die durch ihre Interaktionen mit wirtskodierten Tumorsuppressorproteinen verschiedene Zellzykluskontrollpunkte inaktivieren (Crook und Vousden, 1996). Die Eigenschaften der Onkogene E6 und E7 der genitalen HPV-Typen 16 und 18 wurden am besten aufgeklärt.

1.5.5.1. E6-Protein

Das E6-Protein ist hauptsächlich im Zellkern lokalisiert, wurde aber auch in nicht-nukleären Membranen gefunden (Grossman et al., 1989; Kanda et al., 1991; Chen et al., 1998). Es besteht aus ungefähr 150 Aminosäuren. Das E6 Protein weist vier C-X-X-C Motive auf, welche zwei Zinkfinger bilden und sowohl für die Stabilität als auch für die meisten biologischen Funktionen essentiell sind.

Die Proteininteraktionen von E6 wurden bislang hauptsächlich anhand der genitalen Typen untersucht. HPV16- und HPV18-E6 bildet einen Komplex mit dem zellulären Protein p53. p53 ist ein nukleäres Protein (53 kDa), dessen Hauptfunktion in der transkriptionellen Aktivierung von Genen liegt, deren Produkte für die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität verantwortlich sind. Die p53 Expression wird als Antwort auf zelluläre DNA-Schäden erhöht. p53 aktiviert dann verschiedene zelluläre Gene, die entweder zu einem Verharren des Zellzyklus in der G1-Phase führen (z.B. der CDK-Inhibitor p21WAF/CIP1) oder Apoptose induzieren (z.B. bax). Das Verharren in der G1-Phase ermöglicht der Zelle, angefallene DNA-Schäden zu reparieren, bevor sie in die S-Phase fortschreitet. Zellen mit schweren Genomschäden werden durch Apoptose eliminiert. E6-Proteine von genitalen Hochrisiko-HPV führen zu einer ubiquitinabhängigen Degradation von p53. Zunächst bindet E6 an das zelluläre Protein E6-AP (E6-assoziiertes Protein). Der E6/E6-AP-

Komplex wirkt als Ubiquitin-Protein-Ligase und verknüpft Ubiquitin mit p53. (Scheffner et al., 1990; Wieland und Pfister, 2003, im Druck). Die Degradation von p53 führt zu erhöhter genetischer Instabilität und zur Akkumulation onkogener Mutationen. In vivo ist dieser Mechanismus vermutlich vor allem in frühen Phasen der Tumorprogression entscheidend. Die Wechselwirkung von p53 mit dem E6-Protein ist der Hauptgrund für die genomische Instabilität von Zellen, die mit hr-HPV-Typen infiziert sind (Thomas und Laimins, 1998). In der humanen Population ist das p53-Gen polymorph für die Aminosäure 72, die entweder Prolin oder Arginin sein kann. Besitzt das p53 an der Position 72 ein Arginin, so ist es verstärkt für eine Degradierung anfällig. Das Zervixkarzinom ist dann siebenmal häufiger anzutreffen (Storey et al., 1998). Es konnte weiterhin festgestellt werden, dass bestimmte p53-Mutanten das p73-Protein, ein proapoptotisches Protein, binden und inaktivieren können (Brooks et al., 2000). Die Tatsache, dass die DNA bindende- und die E6-bindende Domäne des p53 Proteins überlappen, ist eine mögliche Erklärung für den degradationsunabhängigen Effekt von E6 auf p53 (Mansur et al., 1995; Li und Coffino, 1996; Elbel et al., 1997). Neben der wohl bekanntesten Interaktion von E6 mit p53 konnten Interaktionen von E6 mit zahlreichen zellulären Faktoren, beispielsweise mit Transkriptionsfaktoren wie TAF, TBP, c-myc, IRF-3, p300/CBP, AMF-1/Gps2, Signaltransduktionsfaktoren wie Paxillin, MAGI-1,2,3, MUPP-1, Tumorsuppressorproteinen wie p73 und Proteinen, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind, wie XRCC1, O-6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase, nachgewiesen werden (Smola-Hess und Pfister, 2002).

Die meisten Interaktionen für das E6 Protein kutaner HPVs, bei denen E6 als Hauptonkogen gilt, sind bislang noch nicht untersucht worden. Aus molekularbiologischen Versuchen geht hervor, dass das E6-Protein von HPV8 im Gegensatz zu den genitalen HPV16 und -18 nicht an p53 bindet und somit nicht den Funktionsverlust dieses Regulatorproteins bewirkt. Obwohl für E6 von HPV8 eine direkte Interaktion mit dem TATA-bindenden Protein (TBP) (Massimi et al., 1997) und den TBP assoziierten Faktoren (TAFs) festgestellt werden konnte, ist die funktionelle Bedeutung noch nicht geklärt. Schließlich wurde für E6 Proteine von HPV8 ebenso wie für HPV1 und HPV16 eine Bindung des XRCC1-Proteins gezeigt, welches für die Reparatur von Einzelstrang-DNA-Brüchen verantwortlich und für die genetische Stabilität essentiell ist (Iftner et al., 2002).

In vitro Experimente konnten zeigen, dass das E6-Protein von HPV16 allein menschliche Mammazellen immortalisieren kann (Band et al., 1991), während für die Immortalisierung anderer menschlicher Zellen neben dem E6-Protein auch das E7-Protein vorhanden sein muss (Hawley-Nelson et al., 1989; Munger et al., 1989; Hudson et al., 1990).

E6-Proteine der EV-assoziierten Typen 5, 8, 47 können Rattenfibroblasten transformieren, sind aber nicht in der Lage, humane Keratinozyten zu immortalisieren (Iftner et al., 1988; Kiyono et al., 1989; Kiyono et al., 1992; Pfister, 1992a; Schmitt et al., 1994).

1.5.5.2. E7-Protein

Der E7-Leserahmen kodiert für ein Protein, welches etwa 100 Aminosäuren umfaßt. Hauptsächlich ist es in den Kernen der infizierten Zellen lokalisiert, jedoch ist es auch in geringen Mengen im Zytoplasma zu finden (Smotkin, 1987).

Es besteht aus zwei konservierten Domänen (CRI und CRII) sowie zwei C-X-X-C Motiven, welche einen Zinkfinger bilden und für die transformierende Aktivität verantwortlich gemacht werden.

Die bekannteste Proteininteraktion von E7 ist die mit dem Retinoblastomprotein pRb (Dyson et al., 1989), welche zu dessen Abbau über das 26S-Proteasom führt (Berezutskaya und Bagchi, 1997). Neben dem E7-Protein der genitalen hr-Typen bindet auch das E7-Protein der genitalen Ir-HPV und der EV-HPV-Typen an pRb, wobei die Affinität der letzten beiden Gruppen zu pRb deutlich niedriger ist (Iftner et al., 1988; Kiyono et al., 1989; Schmitt et al., 1994). Das nach der Mitose dephosphorylierte pRb-Protein kann durch Bindung den zellulären Transkriptionsfaktor E2F inaktivieren und dadurch den Eintritt der Zelle in die S-Phase verhindern. Tritt jedoch das E7-Protein mit dem dephosphorylierten pRb in Wechselwirkung, kann pRb E2F nicht mehr binden, wodurch die Transkription verschiedener Gene induziert wird (Armstrong und Roman, 1997). Die Folge ist eine unkontrollierte Zellteilung (Jones et al., 1997). Die Aktivierung von E2F-abhängigen Genen erfolgt nicht nur in Zellen, die mit den genitalen hr-Typen infiziert sind, sondern auch in Zellen, die mit den Ir-Typen 6 und 11 (Armstrong und Roman, 1997) oder den kutanen Typen 5, 12, 14, 20, 21, 25 und 47 infiziert sind (Hiraiwa et al., 1996). Von diesen getesteten kutanen HPV-Typen war jedoch nur HPV47 E7 in der Lage,

Rattenfibroblasten zu transformieren (Hiraiwa et al., 1996), was kürzlich auch für HPV8-E7 und HPV15-E7 gezeigt werden konnte (Roth, 2000; Krause, 2002). Caldeira et al. (2003) konnten neulich zeigen, dass HPV38 E7 in der Lage ist, primäre humane Keratinozyten zu transformieren.

Für E7 von HPV16 konnte außerdem gezeigt werden, dass es die Zentrosomduplikation stören und damit zu verminderter genetischer Stabilität und der Entstehung von Aneuploidie beitragen kann (Duensing et al., 2000). Weiterhin konnten für genitale HPVs Interaktionen mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren, wie TAF100, TBP, AP-1, MPP2, Skip, Tumorsuppressorproteinen wie hTid und mit weiteren zellulären Faktoren nachgewiesen werden. Für das E7-Protein der kutanen HPVs gibt es bislang nur wenige Interaktionsstudien. Für E7 von HPV8 wurde gezeigt, dass es mit dem Transkriptionsfaktor TBP und verschiedenen TAFs interagiert, doch die funktionellen Konsequenzen dieser Interaktionen sind noch unklar (Enzenauer et al., 1998). Des Weiteren konnte für E7 kutaner HPVs eine Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor Skip, dem Translationsinitiator eEF-1a und ribosomalen Proteinen festgestellt werden (Marcuzzi, 2001).

In vitro Experimente konnten zeigen, dass das E7-Protein der anogenitalen hr-HPV-Typen in der Lage ist, primäre Vorhautkeratinozyten zu immortalisieren (Halbert et al., 1991).

1.6. Zielsetzung

Während die ätiologische Rolle spezifischer humaner Papillomviren bei der Zervixkarzinomentstehung klar gezeigt wurde (zur Hausen, 2000), sind die kausale Beteiligung kutaner HPVs an der Tumorentstehung und die zugrundeliegenden Mechanismen bislang nur ansatzweise in in vitro Studien erforscht (Pfister und Ter Schegget, 1997). Bei der Karzinomentstehung handelt es sich um einen komplexen Prozeß, der neben der Dysregulation zellulärer Kontrollmechanismen auch eine Interaktion der genetisch veränderten epidermalen Zellen mit mesenchymalen Zellen beinhaltet. Darüber hinaus sind Tumorzellen genetisch instabil, und nach längerer in vitro Kultivierung ändern sie ihr Expressionsmuster. So führt die Langzeitkultur zur Selektion bestimmter Zellpopulationen, welche die ursprünglichen Eigenschaften der Tumorzellen verloren haben. Möchte man die verschiedenen Prozesse der Tumorentstehung besser verstehen, ist offensichtlich, dass dies nur in einem Organismus untersucht werden kann. Bisher wurden Mausmodelle für die Untersuchung von BPV1 und der genitalen Typen HPV16 und 18 eingesetzt (Sippola-Thiele et al., 1989; Lacey et al., 1986; Coussens et al., 1996). Für die kutanen HPVs gibt es bislang lediglich ein Modell für HPV1, welches mit benignen Warzen assoziiert ist (Tinsley et al., 1992). Daher ist die Erstellung eines Tiermodells für kutane HPV-Typen (beispielsweise HPV8), welche im Verdacht stehen, mit NMHK assoziiert zu sein, für die Tumorforschung unerlässlich.

Ziel dieser Arbeit war, eine HPV8-transgene Mauslinie zu generieren, welche es ermöglicht, Funktionen von HPV8 in vivo zu untersuchen. Weiterhin sollte anhand dieses Modells geklärt werden, ob die Expression viraler Gene von HPV8 in vivo für die Entwicklung von NMHK ausreichend ist.

II. MATERIAL

2.1. Versuchstiere

Als Zuchtmäuse wurden Wildtyp-Mäuse der Linien FVB/N und C57BL/6J (B16) (Harlan, Borchon, Deutschland) bezogen und vor Ort gehalten und gezüchtet. Die Haltung der Mäuse erfolgte unter kontrolliert pathogenfreien Bedingungen mit einem Lichtzyklus von 12 Stunden, wobei die Tiere ständigen Zugang zu Futter (Typ 1314, spezialbehandelt, Altromin) und Wasser hatten.

Von allen Nachkommen wurden nach dem Absetzen im Alter von ca. 3 Wochen 0,5-1 cm lange Mausschwanzbiopsien entnommen.

2.2. Bakterienstämme

Der verwendete Stamm von *Escherichia coli* (*E. coli*) hatte folgenden Genotyp:

One Shot Top 10 Competent Cells (Invitrogen): F⁻, mcrAΔ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80dlacZΔM15 (ΔlacX74deoR recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU rpsL endA1 nupG).

2.3. Chemikalien und Materialien

Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
BSA (20 mg/ml; nicht acetyliert; Wässrige Lösung)	Sigma, Deisenhofen
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Diethyl-Pyrocbonat-Stammlösung (DEPC) -H ₂ O	Sigma, Deisenhofen
DMSO	Sigma, Deisenhofen
DNA Typing Grade Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA	Merck, Darmstadt
Eosin	Sigma, Deisenhofen
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Formaldehyd	Carl Roth GMBH, Karlsruhe

Formamid	Merck, Darmstadt
Glycerin	Sigma, Deisenhofen
Hämatoxylin	Sigma, Deisenhofen
Hybond N+	Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire England
Hyaluronidase	Sigma, Deisenhofen
LB Agar (Lennox L Agar)	Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA
LB Broth Base (Lennox L Broth Base)	Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA
Magnesiumchlorid-Lösung 1M	Sigma, Deisenhofen
Millipore-Membran	Millipore, Massachusetts, USA
MOPS 3(N-Morpholino)propanesulfonic acid	Sigma, St.Louis, USA
Natriumazetat	Merck, Darmstadt
Paraffin	Sigma, Deisenhofen
Sybr Green	Applied Biosystems, USA
Whatman Papier (3mm)	Whatman International Ltd., Mainstone, England
Xylencyanol	Serva, Heidelberg

2.4. Radionuklide

$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$	Amersham, Braunschweig
---	------------------------

2.5. Enzyme und Proteine

2.5.1. DNA-Polymerasen

Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I mit 10x RE _{ACT} 2-Puffer [500 mM Tris-HCl (pH 8); 100 mM MgCl ₂ ; 500 mM NaCl]	GIBCO BRL (Eggenstein)
Taq DNA-Polymerase mit 10x Taq-DNA-Polymerase-Puffer [200 mM Tris-HCl (pH 8.4); 500 mM KCl]	Pharmacia Biotech, Freiburg

5231; 5339bp; #gi186704) und dem SP6-Primer (Vasioukhin et al., 1999).

2.6.1.2. Konstrukte

pPF35: Ein Plasmid, welches das 5111 bp BamHI-Fragment von HPV8 umfasst (Nukleotid 1-5111) mit der gesamten NCR, den Genen E6, E7, E1, E2, E4 und Teilen des L2 Gens.

2.6.2. Oligonukleotide

Sämtliche als PCR-Primer oder Sequenzierprimer verwendeten Oligonukleotide wurden von Eurogenetec (Seraing, Belgien) und Sigma-Ark GMBH (Steinheim) bezogen oder entstammten Reagenzien-Kits. Die Sequenzen der neu entworfenen Primer sind im Ergebnisteil bei den entsprechenden Protokollen angegeben.

2.6.2.1. Primer für die reverse Transkription

Für die reverse Transkription wurden Oligo-dT₂₃-Primer der Firma Sigma (Deisenhofen, Deutschland) verwendet.

2.6.2.2. Primer für die β -Globin-PCR (Konkel et al., 1978)

Funktion	Name	Oligonukleotidsequenz 5' 3'
5'-Primer	β -Glob fw	CCA ATC TGC TCA CAC AGG ATA GAG AGG GCA GG
3'-Primer	β -Glob bw	CCT TGA GGC TGT CCA AGT GAT TCA GGC CAT CG

Tabelle 1: Oligonukleotidprimer für die β -Globin-PCR.

2.6.3. DNA-Längenstandards für die Agarose-Gelelektrophorese

1 kb DNA-Leiter (GIBCO BRL): zur Größenbestimmung doppelsträngiger DNA-Fragmente von 500 bp bis 12 kb (enthält folgende Fragmente: 12216 bp, 11198 bp, 10180 bp, 9162 bp,

8144 bp, 7126 bp, 6108 bp, 5090 bp, 4072 bp, 3054 bp, 2036 bp, 636 bp, 1018 bp, 506 bp)

λ -HindIII-Leiter:
(GIBCO BRL) zur Größenbestimmung und Mengenabschätzung linearer doppelsträngiger DNA von 125 bp bis 23 kb (die komplette Restriktion von λ -DNA mit HindIII ergibt folgende Fragmente: 23130 bp, 9416 bp, 6557 bp, 4361 bp, 2322 bp, 2027 bp, 564 bp)

100 bp DNA-Leiter
(Invitrogen) zur Größenbestimmung und Mengenabschätzung linearer doppelsträngiger DNA von 100 bp bis 1500 bp (enthält Fragmente in hunderter Schritten von 100 bp aufwärts bis zu 1500 bp)

2.7. Gebrauchsfertige Reagenziensysteme

Für einige Standardreaktionen/-verwendungen der Molekularbiologie werden Reagenziensätze angeboten. Es wurden folgende gebrauchsfertige Reagenziensysteme eingesetzt:

Omniskript Reverse Transkriptase Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep8 Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
Qia-Shredder	Qiagen, Hilden
QIAspin PCR Purifikation Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAamp Tissue Kit	Qiagen, Hilden
Random Primers DNA Labeling Kit	GibcoBRL (Eggenstein)
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden

2.8. Puffer und Lösungen

2.8.1. PCR-Puffer

Es wurden die vom Hersteller mitgelieferten PCR-Puffer für die Taq-Polymerase verwendet.

2.8.2. Puffer und Lösungen für die RNA Gelelektrophorese

DEPC-H ₂ O	1 l deionisiertes Wasser + 1 ml 100% Diethyl-Pyrocbonat- Stamm-lösung (DEPC)
10x MOPS 3(N-Morpholino)propansulfonsäure	0,2 M MOPS pH 7,0; 20 mM Natriumazetat, 10 mM EDTA (8,0)
Farbstoff	50% (v/v) Glycerin, 0,25% (w/v) Bromphenolblau, 0,25% (w/v) Xylencyanol, 1 mM EDTA
Probenpuffer	100µl Formamid, 38µl Form- aldehyd, 20µl 10xMOPS

2.8.3. Puffer für die Agarose Gelelektrophorese

50x TAE	2 M Tris-Acetat, 0,05 M EDTA
Probenpuffer 10x/Farbmarker	5 ml Glycerin, 0,2 ml 50x TAE 3 ml 5%ige Bromphenolblau- lösung 3 ml 5%ige Xylen-Cyanol-Lö- sung, 1,3 ml H ₂ O
Ethidiumbromidstammlösung	10 mg/ml Aqua bidest.

2.8.4. Sonstige Lösungen und Puffer

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

2.8.5. Materialien für die Mikroinjektion

Für die Mikroinjektion wurden die von Hammes und Schedl (2000) angegebenen Materialien verwendet und über Sigma (St.Louis, USA) bezogen.

2.9. Software

Blast-Search	NCBI
Easy Image Plus	Herolab Wiesloch
Mac Vector 6.0	Oxford Molecular Group PLC, 1996
Adobe Photoshop 7.0	Adobe
LightCycler Software (Version 3.1.102)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
SPSS 10.0.7	SPSS Inc., IL, USA

2.10. Laborgeräte

Biometra Trio Thermocycler	Biometra, Göttingen
Elektrophorese-Kammern für Agarose-Horizontalgele	Biotech Fischer
Eppendorf Mastercycler 5330 mit Heizdeckel 5330 plus	Eppendorf Hamburg
Eppendorf Thermomixer 5436	Eppendorf Hamburg
Kodak M35 X-OMAT Processor	Kodak, Rochester, NY, USA
LightCycler	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Magnetrührer Ikamag RCT	IKA-Labortechnik, Staufen i. Brsg.
Mikromanipulator	Leica, Solms
Netzgerät Phero-Stab 200/300	Biotech Fischer
Ohrlochzange	Natsame, Seikaguchi, Tokyo, Japan
Photometer:	
Pharmacia Gene Quant RNA/DNA Calculator	Pharmacia Biotech, Freiburg
UVIKON 9x2 Spectrophotometer	Kontron Instruments, Neufahrn
Pipettierhilfen:	
Eppendorf Reference Pipetten	Eppendorf
Multipette 4780	Eppendorf

Trockenschrank	Memmert, Schwabach
Vortexer REAX2000	Heidolph Elektro GmbH, Kelheim
Wasserbäder:	
GFL-Wasserbad	GFL, Burgwedel
Julabo 12 B	Julabo, Seelbach
Zentrifugen:	
Tischzentrifugen:	
Biofuge 13	Heraeus Sepatech, Osterode
Eppendorf Centifuge 5415 C	Eppendorf
Pico Fuge	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Kühlzentrifugen:	
Sigma-Zentrifuge 2K15	Sigma, Deisenhofen
Varifuge 3.OR	Heraeus, Hanau
Hybridisierungsöfen	Hybaid Mini 10

2.11. Plastikmaterial

Plastikmaterial wurde von den Firmen BECKMAN (München), EPPENDORF (Hamburg), FALCON (Heidelberg), GREINER (Frickhausen), SARSTEDT (Nümbrecht) und COSTAR (Bodenheim) bezogen.

III. Methoden

3.1. Mikroinjektion

3.1.1. Aufreinigung des Tragens für die Mikroinjektion

50 µg des K14-HPV8-Konstrukts (4.1.1.3.) wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und über das Gel aufgereinigt (3.5.3.). Das Produkt wurde anschließend über eine Millipore-Membran filtriert, mit 100-200µl H₂O eluiert und eine OD-Bestimmung durchgeführt (3.5.4.1.). Danach wurde eine erneute Filtrierung über eine Millipore-Membran vorgenommen, mit 100-200µl M2-Medium eluiert und eine erneute OD-Bestimmung durchgeführt. Die Endkonzentration der DNA in der zur Injektion bestimmten Lösung betrug 1pg/µl.

3.1.2. Superovulation und Gewinnung von befruchteten Oozyten

Um befruchtete Oozyten zu gewinnen, wurden juvenile D2B6F1CrI (DBA/BI6) Weibchen zur Superovulation angeregt. Hierzu wurden den Weibchen am Tag eins 15U PMSG (Pregnant-Mare-Serum-Gonadotropin) intraperitoneal injiziert. Am Tag drei erfolgt eine intraperitoneale Injektion von 5 U hCG (human Choriogonadotropin). Anschließend wurden die Weibchen verpaart. Am Tag vier konnte eine erfolgreiche Befruchtung anhand des Vorhandenseins eines Vaginalplaques erkannt werden. Nach Euthanasie der Weibchen mittels cervicaler Dislokation wurden die befruchteten Oozyten isoliert. Hierzu wurden zunächst die Ovidukte in M2-Medium gelegt. Unter dem Mikroskop wurden die Ovidukte eröffnet und die Oozyten in M2-Medium (300mg/ml Hyaluronidase) überführt. Nachdem die Oozyten sich von den Follikelzellen gelöst hatten (nach ca. 3 Minuten), wurden die Oozyten mit frischem M2-Medium dreimal gewaschen. Pro Maus konnten so ca. 30 Oozyten isoliert werden.

3.1.3. Mikroinjektion mittels eines Mikromanipulators (Hammes und Schedl, 2000)

Für die Mikroinjektion wurden die Oozyten zunächst in frisches M2-Medium überführt. Die Mikroinjektion von ca. 1-2 µl DNA-Lösung erfolgte in den männlichen

(größeren) Pronukleus der Oozyte. Im Anschluss wurden die Oozyten in M16-Medium überführt und wie unter 3.1.4. angegeben weiterverwendet.

3.1.4. Erzeugung scheinchwangerer Ammenweibchen und Implantation der mikroinjizierten Oozyten

Da sich bei Mäusen befruchtete Eier nur nach einer Kopulation in das Ovidukt implantieren lassen, wurden Weibchen im Alter von etwa 8 Wochen zur Erreichung einer Scheinschwangerschaft mit vasktomierten Männchen gepaart. Am nächsten Tag wurden sie auf das Vorhandensein eines Vaginalplaques untersucht. Weibchen mit Vaginalplaque wurden in Narkose etwa 15-30 mikroinjizierte Oozyten in das Ovidukt implantiert.

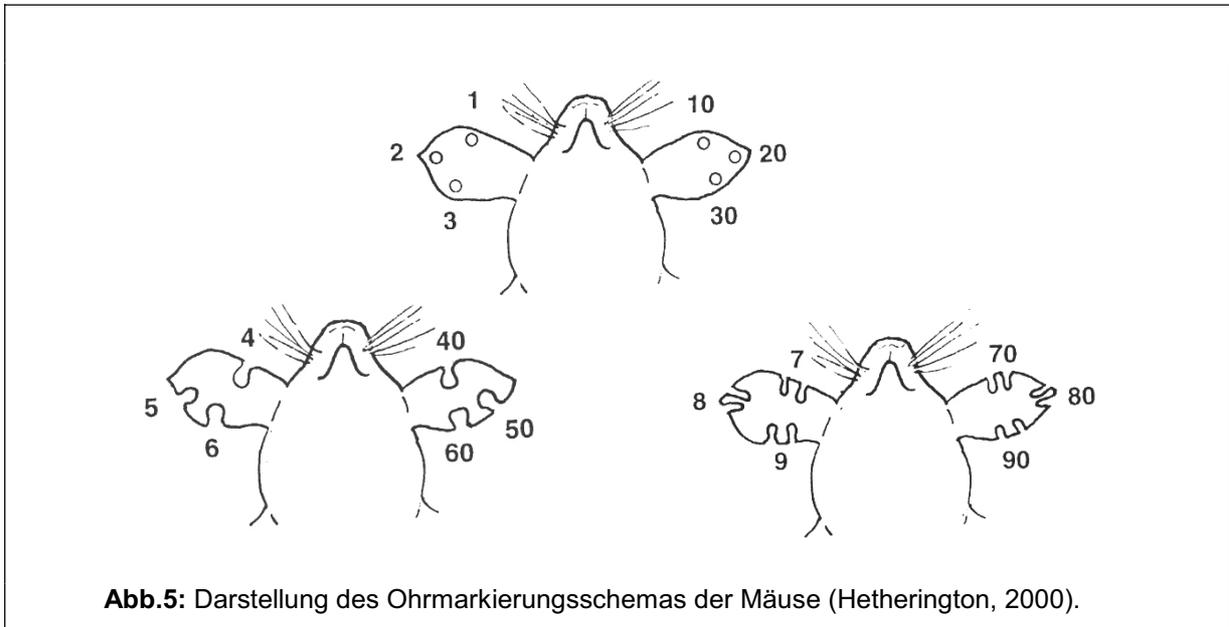
3.2. Kreuzung von Mäusen

Nach Möglichkeit wurden männliche Tiere von den Transgen-positiv getesteten Mäusen der F0-Generation bzw. Transgen-positiven Nachkommen späterer Generationen für die Zucht ausgewählt. Männliche Zuchttiere wurden im Regelfall mit zwei Wildtyp-Weibchen verpaart. Wurden weibliche Zuchttiere verwendet, wurde hingegen nur mit einem Wildtyp-Männchen, zur Vermeidung von Rankämpfen, verpaart. Wenn eine Trächtigkeit anhand des vermehrten Bauchumfanges festgestellt werden konnte, wurden die trächtigen Weibchen separiert. Nach dreiwöchiger Trächtigkeit wurden die Nachkommen geboren und im Alter von ca. 3 Wochen abgesetzt. Zum gleichen Zeitpunkt erfolgte die Aufteilung der Nachkommen getrennt, nach Männchen und Weibchen, und die Markierung der Mäuse mittels einer Ohrlochzange (nach 3.3.).

3.3. Markierung der Mäuse

Unmittelbar nach dem Absetzen der Jungtiere erfolgte die Markierung mittels einer Ohrlochzange. Die Markierung basiert auf einer Kodierung, bestehend aus Kerben und Löchern, die an bestimmten Positionen des Ohres eingestanz werden. Jede Markierung steht hierbei, wie in Abbildung 5 gezeigt, für eine Zahl. Die Zahlen wurden in der Regel so verteilt, dass Nachkommen einer Zuchtmaus von eins ausgehend fortlaufend nummeriert wurden. Dementsprechend erhält jede Maus eine

individuelle Nummer und, davor stehend, eine bzw. mehrere Nummern, die die Zuchteltern bezeichnen. Beispielsweise bedeutet die Nummer 9/3/6, dass der Stamm von Maus 9 ausging, das entsprechende Elternteil Nummer 3 ist und die bezeichnete Maus selber die individuelle Nummer 6 des Wurfs trägt.



3.4. Medizinische Analyse der Mäuse

3.4.1. Makroskopische medizinische Analyse der Mäuse

Die Mäuse wurden regelmäßig auf eventuelle Veränderungen untersucht. Auftretende Veränderungen wurden protokolliert und fotografisch dokumentiert. Mäuse, deren Läsionen ein Ausmaß erreichten, welches tierschutzrechtlich nicht mehr zu vertreten war, wurden mittels cervicaler Dislokation euthanasiert und anschließend obduziert. Bei der Obduktion wurde besonderer Wert auf die äußerlich sichtbaren Veränderungen der Haut gelegt. Die Tumoren wurden sorgfältig frei präpariert und gewünschte Bereiche für Paraffinschnitte für die anschließende histologische Untersuchung beiseite gelegt. Nach dem Abpräparieren der Haut, wobei besonders auf eventuelle Verwachsungen der Haut mit darunter liegendem Gewebe geachtet wurde, wurden die Brust- und Bauchhöhle eröffnet. Jedes Organ wurde einzeln begutachtet und präpariert. Weiterhin wurden während der Sektion Biopsien für molekularbiologische Untersuchungen entnommen und bei -80°C bis zur

weiteren Verwendung eingelagert. Für histologische Untersuchungen wurde nach Romeis (1989) verfahren.

3.4.2. Histologische Untersuchungen

Die entnommenen Präparate wurden zunächst in gepuffertem Formalin (4%) fixiert und entsprechend dem routinemäßigen Standardprotokoll in einem Autotechnikon (Tissue-TE VIP) entwässert und in Paraffin eingebettet (Romeis, 1989). Anschließend wurden 4 µm dicke Schnitte angefertigt und mit HE gefärbt. Die Präparate wurden im Anschluss unter dem Mikroskop auf pathologische Auffälligkeiten überprüft.

3.5. DNA-Methoden

3.5.1. Isolation von DNA

3.5.1.1. DNA-Extraktion aus Mausbiopsien und Sektionsproben

Die DNA-Extraktion erfolgte mit dem QIAamp Tissue Kit nach den Angaben des Herstellers. Dabei wurde der Proteinase K-Verdau über Nacht bei 56°C durchgeführt. Dazu wurden zuvor unfixierte Gefriermaterialien aufgetaut und ca. 0,5 cm lange Schwanzspitzen bzw. 25 mg Gewebeprobe mit einem Einmalskalpell in einer Petrischale möglichst fein zerkleinert. Zur Elution der DNA wurden 100 µl vorgewärmter Puffer AE auf die Säule pipettiert, fünf Minuten bei 70°C inkubiert und schließlich eine Minute bei 8000 Upm zentrifugiert. Die DNA-Präparationen wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.5.1.2. Isolierung von Plasmid DNA

3.5.1.2.1. Plasmidminipräparation

Plasmidminipräparation wurden mit dem QIAprep8 Plasmid Kit Reagenzsystem der Firma Qiagen entsprechend dem Protokoll durchgeführt. Die Methode basiert auf der alkalischen Extraktionsmethode nach Birnboim und Doly (1979). Die DNA-Ausbeute einer solchen Plasmidminipräparation lag in der Regel bei ca. 10-30 µg/100 µl Eluat.

3.5.1.2.2. Modifizierte Plasmidmaxipräparation nach Sambrook et al. (1989)

Da die Präparation von Plasmid-DNA einer Größe von mehr als 10kb nicht erfolgreich mit herkömmlichen Kits durchgeführt werden konnte, wurde das folgende Protokoll für die Präparation größerer Mengen von DNA etabliert. Dabei wurde von einem Grundprotokoll von Sambrook et al. (1989) ausgegangen.

Es wurden 200 ml LB-Medium mit Antibiotikum mit dem entsprechenden Bakterienklon angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Kulturen wurden am folgenden Tag zunächst für 10 min zentrifugiert (4000 Upm), das Bakterienpellet in 5 ml Lösung I (Glucoselösung) aufgenommen und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 10 ml Lösung II (alkalische SDS-Lösung) zugegeben und erneut 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 7,5 ml Lösung III (Hochsalzpuffer) wurde gevortext und erneut 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation bei 4000 Upm für 5 Minuten bei 4°C wurde der Überstand filtriert und 10 ml Isopropanol zugegeben. Es folgte eine 5-minütige Inkubation auf Eis und eine Zentrifugation bei 4000 Upm für 5 Minuten bei 4°C. Das Pellet wurde in 2 ml 50 mM Tris-HCl (pH 7,6) resuspendiert und mit 2 ml 5M Lithiumchlorid versetzt. Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis und folgender Zentrifugation wurde dem Überstand 9ml 100%iges Ethanol zugegeben und 1 Stunde bei -20°C inkubiert. Anschließend folgte eine Zentrifugation bei 5000 Upm für 10 Minuten bei 4°C, nach der das Pellet in 400µl TE-Puffer (pH 8) aufgenommen, mit RNase (10mg/ml) versetzt und 1 Stunde bei 37°C inkubiert wurde. Anschließend erfolgten eine Phenolextraktion (3.5.1.3.) und eine Präzipitation der Nukleinsäure (3.5.1.4.). Das Pellet wurde in 100µl H₂O gelöst.

3.5.1.3. Reinigung von DNA über Phenolextraktion

Um Proteinreste aus DNA-Präparationen zu entfernen, wurde eine Phenolextraktion vorgenommen. Hierfür wurde dem zu reinigenden DNA-Ansatz das gleiche Volumen an Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (PCI: im Mischverhältnis 25/24/1) hinzugefügt und 1 min auf dem Vortexer gemischt. Anschließend wurden die Phasen durch 5-minütige Zentrifugation bei 17500 g getrennt. Die obere, wässrige Phase enthielt die DNA und wurde vorsichtig abgenommen. Um Phenolreste aus der Phase zu entfernen, wurde nach dem gleichen Schema noch zweimal mit gleichem Volumen

Chloroform gewaschen. Die gelöste DNA wurde schließlich über eine Ethanolfällung (3.5.1.4.) präzipitiert.

3.5.1.4. Ethanolfällung von DNA

Zu der DNA-Lösung wurden $\frac{1}{10}$ des Ausgangsvolumens Natriumacetatlösung (3 M, pH 4,8) und 3 Volumen Ethanol abs. gegeben. Der Ansatz wurde kurz gemischt und 20 min bei -20°C oder auf Eis ≥ 30 min inkubiert. Nach einer mindestens 30-minütigen Zentrifugation mit $\geq 10000g$ bei 4°C wurde der Überstand vorsichtig aus dem Reaktionsgefäß entfernt und das Nukleinsäurepellet mit 70%igem kaltem Ethanol gewaschen, getrocknet und in der gewünschten Menge Wasser oder, für längere Lagerung, in TE-Puffer aufgenommen.

3.5.2. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde wie bei Sambrook et al. (1989) beschrieben, durchgeführt. Sie wurde verwendet, um Nukleinsäuregemische analytisch zu untersuchen oder für präparative Zwecke im elektrischen Feld aufzutrennen.

3.5.3. Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die Aufreinigung der DNA aus Agarosegelen erfolgte mittels des „Qiaquick Gel Extraktion Kits“ (Qiagen). Zuerst wurde das gewünschte DNA-Fragment unter UV-Licht (366nm) mit einem Einmalskalpell aus dem Gel exzidiert, in ein vorgewogenes Eppendorfgefäß überführt, gewogen und anschließend entsprechend den Herstellerangaben weiterverarbeitet. Die gereinigte DNA wurde mit $30\ \mu\text{l}$ TE-Puffer eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.5.4. Quantifizierung von DNA

Zur Konzentrationsbestimmung von DNA wurden in der Regel zwei Methoden durchgeführt: Eine photometrische Bestimmung (UV) und eine Gelelektrophorese, bei der ein Mengenstandard neben der Probe aufgetragen wurde.

3.5.4.1. Photometrische DNA-Konzentrationsmessung

Zur photometrischen Bestimmung der Konzentration einer DNA-Präparation wurde diese 10- bis 100-fach verdünnt und ihre Absorption im UV-Spektrometer bei einer Wellenlänge von 260 nm (A_{260}) gemessen.

Dabei gilt im Rahmen der hier erforderlichen Genauigkeit:

$$\text{DNA-Konzentration } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times 50$$

$$\text{Oligonukleotidkonzentration } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times 20$$

Als Kriterium für die Verunreinigung der Präparation mit Proteinen oder RNA wurde der Quotient der Absorptionen bei 260nm (DNA) und 280nm (Proteine) bestimmt. Dabei wurde angenommen, dass bei einem $A_{260} : A_{280}$ -Verhältnis zwischen 1,8 und 1,95 reine DNA, bei Werten kleiner als 1,8 DNA mit Protein-Verunreinigungen und bei Werten größer als 1,95 mit RNA-Verunreinigungen vorliegt.

3.5.4.2. Konzentrationsbestimmung mittels Mengenstandards

Diese Methode eignet sich zur Bestimmung gering konzentrierter und kleiner DNA-Mengen (ab 5 ng/ μ l) bzw. für Proben, die wegen Verunreinigungen mit Proteinen oder RNA eine genaue photometrische Bestimmung nicht zulassen.

Die DNA-Proben wurden in verschiedenen Verdünnungen neben einem geeigneten DNA-Mengenstandard bekannter Konzentration auf ein Agarosegel aufgetragen. Nach dem Gellauf konnten die mit Ethidiumbromid gefärbten Banden unter einer UV-Lampe in ihrer Intensität mit denen des Mengenstandards verglichen werden.

3.5.5. Modifikation von Nukleinsäuren

3.5.5.1. Dephosphorylierung von DNA

Die Abspaltung der 5'-Phosphat-Gruppen eines linearen, doppelsträngigen DNA-Moleküls wurde mit Hilfe der alkalischen Phosphatase aus E.coli (BAP, Bacterial Alkaline Phosphatase) durchgeführt. Die Dephosphorylierung von DNA-Molekülen mit alkalischer Phosphatase verhindert die durch DNA-Ligase katalysierte Rezirkularisierung linearer, doppelsträngiger DNA-Moleküle, da dieses Enzym einen endständigen 5'-Phosphat-Rest benötigt. Die Unterdrückung dieser Reaktion dient

bei Klonierungsexperimenten dazu, den Einbau von Fremd-DNA in einen linearisierten Klonierungsvektor zu begünstigen und dadurch die Klonierungseffizienz zu erhöhen (Ibelgauf, 1993). Standardmäßig wurde für die Dephosphorylierung folgender Reaktionsansatz gewählt:

1 pmol	geschnittene Vektor-DNA
4 µl	10x Dephosphorylierungspuffer
1 µl	BAP (7 U/µl)
ad	40 µl mit Wasser

Dieser Ansatz wurde 1h bei 65°C inkubiert. Um die Phosphatase wieder zu entfernen, folgte eine Reinigung über Agarosegele (3.5.3.).

3.5.5.2. Ligation von DNA mit T4-DNA-Ligase

Um DNA-Fragmente in einen Vektor zu klonieren, wurden Vektor und Insert in einem molaren Verhältnis von 1:3 bis 1:100 mit T4-DNA-Ligase inkubiert. Durch den Überschuss an Insert wurde die Wahrscheinlichkeit der Insertion in den Vektor erhöht. Die Ligationen wurden in dem vom Enzymhersteller angegebenen Puffer durchgeführt. Die Enzymmenge, Inkubationszeit und -temperatur wurden an die Form der zu ligierenden Enden angepasst. Standardmäßig wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

10-20 ng	Vektor-DNA
variable Menge	Insert-DNA
1 U	T4-DNA-Ligase
$\frac{1}{5}$ Vol.	T4-Ligasepuffer (5x)
ad 10µl	Wasser

Die Ligationen wurden über Nacht bei 16°C inkubiert.

Die Ligationsansätze wurden entweder direkt oder nach etwa zehnmütigem Erhitzen auf 70°C (Inaktivierung der Ligase) zur Transformation kompetenter Zellen (3.10.1.) eingesetzt.

3.5.5.3. Restriktionsspaltung von DNA

Restriktionsspaltungen von DNA wurden zu analytischen oder präparativen Zwecken mit Restriktionsendonukleasen verschiedener Hersteller unter den angegebenen Reaktionsbedingungen durchgeführt. Standardmäßig wurden fünf Einheiten Enzym pro 1 µg zu spaltender DNA eingesetzt. Ein 15 µl-Standardansatz setzte sich wie folgt zusammen:

100-500 ng	DNA
1,5 µl	10x Reaktionspuffer
0,5-1 µl	Enzym (1-5 U)

Der Ansatz wurde mit Wasser auf 15 µl aufgefüllt und 1-2 h bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur, in der Regel 37°C, inkubiert. Die Spaltung wurde auf einem Agarosegel (3.5.2.) überprüft.

3.5.6. Southern Blot

3.5.6.1. DNA-Restriktionsverdau und Agarosegelelektrophorese

Je 10 µg Mausschwanz-DNA wurden mit BamHI bzw. EcoRV und den entsprechenden Puffern versetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und bei 200 Volt ca. 3 Stunden elektrophoretisch aufgetrennt.

3.5.6.2. Transfer der DNA

Um die DNA zu depurinieren, wurde das zu blottende Agarosegel zunächst für ca. 15 Minuten in 0,25 M HCl geschwenkt, daraufhin kurz mit Wasser gespült und zur Denaturierung der DNA ca. 15 Minuten in 0,4 M NaOH geschwenkt. Zum Transfer ("Blotten") der DNA auf die Nylonmembran (Hybond+, Amersham Pharmacia) wurde das Gel auf die Membran gelegt, unter der sich mehrere Schichten trockenes Saugpapier befanden. Über das Gel wurden einige Lagen mit 0,4 M NaOH getränkten 3 MM Whatman-Papiers gelegt, die von einem Bogen Whatman-Papier bedeckt waren, welches in ein Pufferreservoir eintauchte. Dies sorgte für einen

ständigen Flüssigkeitsstrom, der durch das Saugpapier aufrechterhalten wurde. Das Blotten erfolgte über Nacht.

3.5.6.3. Markierung der Sonden-DNA

Der Nachweis der gesuchten DNA erfolgte über eine komplementäre Sonde, die mit [α -³²P]-dATP radioaktiv markiert wurde. Die Markierung wurde mit dem „Random Primers DNA Labeling Kit“ von Gibco durchgeführt.

35 ng der zu markierenden DNA (=HPV8-E6/E7) wurden mit Wasser auf ein Endvolumen von 10 μ l aufgefüllt. Die DNA wurde denaturiert, indem sie 10 Minuten bei 95 °C inkubiert und anschließend in einem Eis/Ethanol-Bad abgekühlt wurde. Es wurden je 2 μ l dCTP, dGTP, dTTP sowie 15 μ l Puffer, 13 μ l H₂O, 1 μ l Klenow-Enzym und 5 μ l [α -³²P]-dATP zugegeben, gemischt und 2,5 h bei 25 °C inkubiert.

3.5.6.4. Prähybridisierung und Hybridisierung

Um alle freien DNA Bindestellen auf dem Filter abzusättigen, wurde zunächst prähybridisiert, damit bei der späteren Hybridisierung die [α -³²P]-dATP -markierte Sonde nicht unspezifisch an den Filter, sondern nur an die geblottete, denaturierte DNA binden konnte. Unter dauernden Rotationsbewegungen wurde die Membran für drei Stunden im Hybridisierungspuffer (2xSSC, 1x Denhardt, 0,1mg/ml Hefe RNA) bei 65°C inkubiert.

Die markierte Sonde wurde durch fünfminütiges Erhitzen auf 95°C und rasches Abkühlen in Ethanol-Eis denaturiert. Die Prähybridisierungslösung wurde abgeschüttet und ein Hybridisierungspuffer mit der markierten Sonde zur Membran gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 37°C.

Hybridisierungspuffer in H₂O:

	Endkonz.
Formamid	50%
20x SSC	5x
50x Denhardt	1x
Hefe mRNA (5 mg/ml)	0,1 mg/ml
10% SDS	0,1%
50x NA-Puffer	20 nM

3.5.6.5. Waschen der Membran und Detektion

Um unspezifisch an die Membran gebundene Sonde zu entfernen, wurde die Membran zweimal 2 Stunden in Waschpuffer (6x SSC; 0,5%SDS) bei 65°C gewaschen. Der Waschpuffer wurde abgekippt und die Membran 30 Sekunden in 2x SSC geschwenkt. Anschließend wurde die Membran in Frischhaltefolie gehüllt und in eine Kassette eingelegt. Nach Auflegen eines Röntgenfilms und 2-24-stündiger Exposition bei -80°C und anschließender Entwicklung des Filmes konnte der Southern Blot abgelesen werden.

3.6. RNA-Methoden

3.6.1. Isolation von RNA

Die RNA-Isolierung aus Mausschwanzbiopsien erfolgte mit dem *RNeasy Mini* Kit von Qiagen. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben unter Verwendung des Protokolls für Herz, Muskel und Haut in Appendix C.

Zunächst wurden ca. 30 mg der bei -80 °C gelagerten Gewebeproben von unauffälliger Haut, Tumor, Herz und Leber in flüssigem Stickstoff zwischengelagert und mit einem Einmalskalpell fein zerkleinert. Nach Zugabe von 600 µl RLT-Puffer (*RNeasy Mini* Kit, Qiagen) wurden die Proben mit Hilfe von Micropistillen homogenisiert. Anschließend wurden die Proben auf einen Shredder überführt, 2 Minuten bei 5000 Upm zentrifugiert und nach dem Protokoll verfahren. Eluiert wurde mit 30 µl RNase freiem Wasser. Die Proben wurden bei -20 °C eingefroren.

3.6.2. RNA-Agarose-Gelelektrophorese

Für RNA-Agarosegele wurden 2,7g Agarose in 162 ml DEPC- Wasser und 22,5ml 10x MOPS in der Mikrowelle erhitzt und gelöst. Zu der Agaroselösung wurden 40 ml 37,5%ige Formaldehydlösung gegeben. Die Lösung wurde anschließend in die entsprechende Gelkammer gegossen. Nach der Verfestigung des Gels wurde dieses mit 1x MOPS überschichtet. Jeweils 5µl der RNA-Präparationen wurden mit je 5µl Proben-Puffer versehen und 10 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde 1µl Farbstoff (welcher mit EtBr 10mg/ml im Verhältnis 1:20 versetzt wurde) zugesetzt. Diese Proben wurden in die Geltaschen pipettiert und bei 50 V für 4-5 Stunden

aufgetrennt. Nach Abschluss der Auftrennung wurden die RNA-Banden unter UV-Licht visualisiert und dokumentiert.

3.7. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PCR für qualitative und quantitative Analysen eingesetzt. Zur Gewährleistung maximaler Homogenität der Ansätze wurde mit vorgemischten Ansätzen gearbeitet, welche auf die einzelnen Reaktionsgefäße verteilt wurden. Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch überprüft.

3.7.1. Protokolle qualitativer PCRs

Alle PCRs wurden mit Pharmacia Taq Polymerase und dem dazugehörigen Puffer in 0,2ml PCR-Gefäßen in einem programmierbaren PCR-Heizblock durchgeführt. Die Komposition der Ansätze erfolgte entsprechend den Angaben in den folgenden Abschnitten. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden umfangreiche Vorkehrungen gemäß Kwok (1990) getroffen.

3.7.1.1. β -Globin-PCR (Konkel et al., 1978)

Die β -Globin-PCR dient zur Überprüfung der DNA-Aufarbeitung und zum Ausschluß inhibitorischer Substanzen. Der Ansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

DNA-Matrize	1 μ l des Eluats aus (3.5.1.1.)
Primer I	0,6 μ M
Primer II	0,6 μ M
dNTPs	0.2 mM
10x DNA-Polymerase Puffer	5 μ l
Taq-Polymerase	1 U
H ₂ O	ad 50 μ l

Der Verlauf der Reaktionszyklen ist in Tabelle 2, die Primersequenzen sind in Tabelle 1 angegeben.

Anzahl der Zyklen	Denaturierung (95°C)	Primerannealing	DNA-Synthese (72°C)
1	3 min	_____	_____
35	30 sec	90 sec/60°C	1,5 min
1	_____	_____	10 min

Tabelle 2: Reaktionszyklen der β -Globin-PCR.

3.7.2. Allgemeines Protokoll für quantitative PCRs

Quantitative PCRs wurden allgemein wie in der folgenden Aufstellung angegeben im LightCycler durchgeführt. Die im Amplifikationsteil angegebene Denaturierungszeit von null Sekunden bedeutet, dass diese Temperatur nur kurz angesteuert wird. Die individuellen Annealingtemperaturen ($T_{ann.}$) und Magnesiumchloridkonzentrationen und Abweichungen vom Standard sind in Tabelle 10 angegeben. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in den Tabellen 11 und 16 aufgeführt. Alle Quantifizierungen wurden in einem 20 μ l Endvolumen durchgeführt. Es wurden 0,8 U Platinum Taq Polymerase (Sigma) pro Ansatz und der mitgelieferte Puffer mit 200 μ M dNTPs, 5% DMSO, 2 μ l Sybr Green (1/1000 Verdünnung) und 500 ng/ μ l BSA verwendet. Primer wurden 0,5 μ M eingesetzt. In der Regel kamen 2 μ l der DNA-Extrakte (3.5.1.1.) bzw. der cDNAs (3.7.3.1.) oder RNAs (3.6.1.) zum Einsatz. In Einzelfällen, bei zu hoher Konzentration, wurden Verdünnungen verwendet. Es wurde jeweils mit Ampuwa auf 20 μ l aufgefüllt. Die PCR wurde mit dem Fluorophor Sybr Green durchgeführt.

Prädenaturierung: Cycles 1

Analysis mode: None

Fluorescence Display Mode = F1

Target Temp. (°C)	Incubation Time (sec)	Temp. Trans. Rate (°C/sec)	2°Target Temp (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
95	60	20	0	0	0	None

Touch down³: Cycles 10

Analysis mode: None

Fluorescence Display Mode = F1

Target Temp. (°C)	Incubation Time (sec)	Temp. Trans. Rate (°C/sec)	2°Target Temp (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
95	1	20	0	0	0	None
65	5	20	55	1	0	None
72	10	5	0	0	0	None

Amplification: Cycles 40^{1,2}/45³

Analysis mode: Quantification

Fluorescence Display Mode = F1

Target Temp. (°C)	Incubation Time (sec)	Temp. Trans. Rate (°C/sec)	2°Target Temp (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
95	0	20	0	0	0	None
(T _{ann.})	5	20	0	0	0	None
72	10 ^{1,3} /12 ²	5 ^{2,3} /20	0	0	0	Single
78 ²	0	20	0	0	0	Single

1 = E2; 2 = E6, E7, hier entfällt dann die Fluoreszenzaufnahme bei 72°C; 3 = β-Actin

3.7.3. Reverse Transkription

Die unter 3.6.1. isolierten RNAs wurden revers transkribiert. Dabei wurden je 7 µl der RNA-Extrakte aus 3.6.1. bzw. 1,4µl oder 0,7µl entsprechend der mittels des RNA-Gels geschätzten Menge eingesetzt.

3.7.3.1. Reverse Transkription mit Oligo-dT₂₃-Primern

Die reverse Transkription wurde entsprechend den Anweisungen des Herstellers der Oligo-dT₂₃-Primer (Sigma) unter Verwendung des „Omniskript Reverse Transkriptase“ Kits (Qiagen) durchgeführt.

3.8. Sequenzanalyse

Jeweils 3-10 pmol Primer und ca. 200 ng Plasmid-DNA wurden in einem Gesamtvolumen von 6µl auf einem ABI Prism 377 Sequenzer (Applied Biosystems, Perkin Elmer) im Servicelabor des ZMMK sequenziert.

3.9. Auswertung der Sequenzdaten

Alle ermittelten DNA-Sequenzen wurden mit dem Software-Paket Mac Vector 6.0 untersucht: Die HPV-Sequenzen wurden mit einem Referenzpool von 111 veröffentlichten HPV-Sequenzen (Myers et al., 1996) verglichen.

3.10. Methoden aus der Bakteriologie

3.10.1. Transformation von E.coli

Die bei -70°C gelagerten kompetenten Bakterien (E.coli Top10) wurden langsam auf Eis aufgetaut. Danach wurden der komplette Ligationsansatz mit 80 µl der kompetenten Bakterien vorsichtig gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem 2-minütigen Hitzeschock bei 42°C wurde die Zellsuspension für weitere 5 min auf Eis inkubiert und nach Zugabe von 500 µl vorgewärmtem LB-Medium (ohne Antibiotikum) für 1 h bei 37°C geschüttelt. Geeignete Aliquots dieser Ansätze wurden auf Ampicillin-haltigen (200 ng/ml) Agarplatten ausgestrichen und über Nacht im 37°C-Brutschrank inkubiert.

3.10.2. Medien und Zusätze für Bakterienkulturen

20g/L LB-Broth-Base (Lennox I Broth Base Gibco (Karlsruhe) wurden in Aqua dest. gelöst und 20 min bei 121°C autoklaviert. Nach Zugabe von 200 µg Ampicillin-Lösung/ml LB-Agar wurde die Lösung bei 4°C gelagert.

Da alle verwendeten Plasmid-Konstrukte ein Ampicillin-Resistenzgen besaßen, wurden mit solchen Plasmiden transformierte Bakterienstämme auf LB-Agarplatten bzw. in LB-Medium mit 200 µg/ml Ampicillin kultiviert. 4 ml Übernachtskulturen wurden für analytische Plasmidminipräparationen oder zum Animpfen von Kulturen mit einem Volumen von 200 ml LB-Medium für Plasmidmaxipräparationen verwendet.

3.11. Statistische Analyse

Alle statistischen Analysen (Deskriptive Statistik, exakter Mann-Whitney-U Test, Spearman-Korrelationstest) wurden mit der Software SPSS 10.0.7 gerechnet. P-Werte, die kleiner als 0,05 waren, wurden als statistisch signifikant gewertet. Für P-Werte wurden in der Regel zweiseitige Signifikanzen berechnet. Für den Zusammenhang der Transgenlast pro Zelle und der Tumorinzidenz wurde eine positive Korrelation angenommen und daher die einseitige Signifikanz berechnet.

IV. ERGEBNISSE

4.1. Etablierung einer transgenen Maus-Linie mit den frühen Genen von HPV8

Während für genitale HPVs die Beteiligung viraler Proteine an der Genese genitaler Tumoren in zahlreichen epidemiologischen und molekularbiologischen Studien klar belegt ist, liefern für kutane HPVs epidemiologische Daten und in vitro Experimente nur Hinweise auf eine Beteiligung an der Onkogenese von nicht melanozytären Hauttumoren.

Um die Funktion von HPV8 in vivo zu untersuchen und eine eventuelle Beteiligung von HPV8 an der Transformation epithelialer Zellen bis hin zum malignen Phänotyp zu zeigen, wurde ein transgenes Mausmodell etabliert.

4.1.1. Konstruktion des Transgens

Das verwendete Transgen setzt sich aus den frühen Genen von HPV8 und dem K14 Vektor zusammen. Einzelschritte der Konstruktion und Überprüfung sind im Folgenden dargestellt.

4.1.1.1. Leserahmen der frühen Gene E1, E2, E4, E6 und E7 von HPV8

Da sich die bisherigen Erkenntnisse zu transformierenden Eigenschaften bei kutanen HPVs auf die Gene E2, E6 und E7 beziehen, die Funktion der anderen Gene in diesem Zusammenhang jedoch noch weitestgehend ungeklärt ist, wurde in dieser Arbeit der gesamte frühe Genabschnitt von HPV8 in die Untersuchungen einbezogen. Der Genombereich von Nukleotid 1 bis 5111, welcher die frühen Gene E1-E7, Teile der NCR und des L2-Leserahmens umfasst (im späteren Verlauf als frühe Gene bezeichnet), wurde dem Konstrukt pPF35 entnommen. Das Konstrukt pPF35 besteht aus dem Vektor pSVX und den frühen Genen von HPV8, welche von Erkennungssequenzen des Restriktionsenzym BamHI flankiert werden (Fuchs P., persönliche Mitteilung). Zur Präparation ausreichender Mengen des Plasmids wurde dieses in E.coli-Zellen retransformiert (3.10.1.). Der Retransformationsansatz wurde auf einer Agarplatte ausgestrichen (3.10.2.) und über Nacht kultiviert. 18 Klone wurden gepickt und von ihnen eine DNA-Minipräparation angefertigt. Anschließend wurden mit einer BamHI-Restriktionsspaltung und analytischer Gelelektrophorese die

positiven Klone identifiziert (Abb.6: frühe Gene HPV8 5111 bp, pSVX 9502 bp). Ein positiver Klon wurde wiederum über Nacht kultiviert. Nach DNA-Maxipräparation (3.5.1.2.2.) erfolgte zur Isolation des gewünschten Genomabschnitts eine Restriktionsspaltung mittels BamHI (3.5.5.3.).

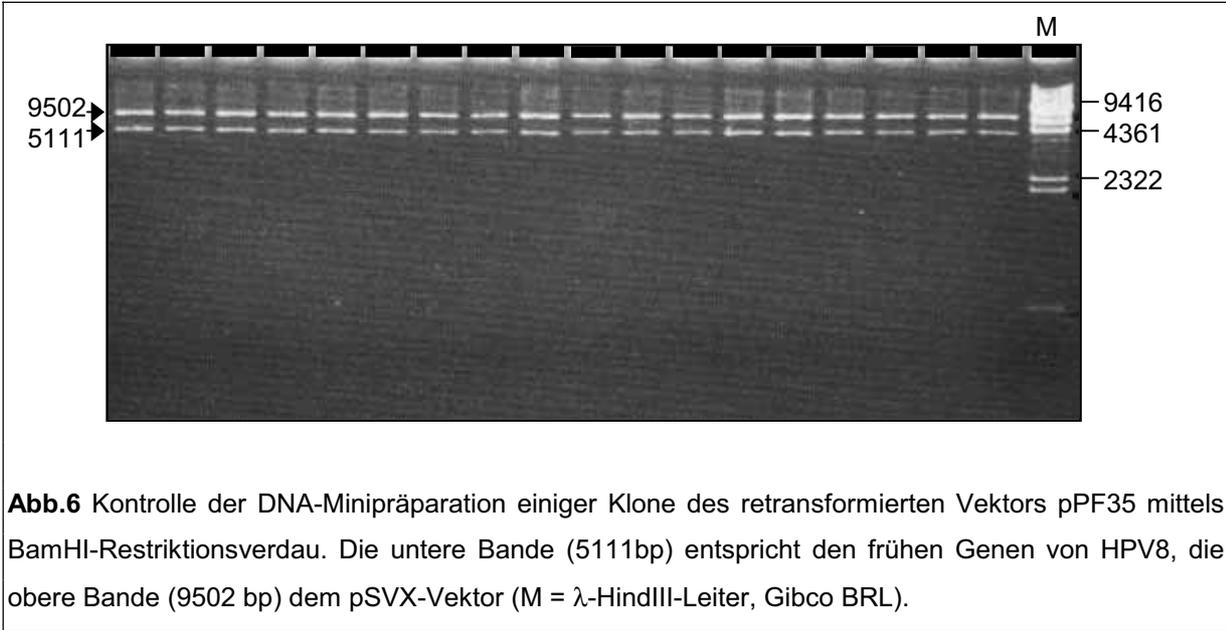


Abb.6 Kontrolle der DNA-Minipräparation einiger Klone des retransformierten Vektors pPF35 mittels BamHI-Restriktionsverdau. Die untere Bande (5111bp) entspricht den frühen Genen von HPV8, die obere Bande (9502 bp) dem pSVX-Vektor (M = λ -HindIII-Leiter, Gibco BRL).

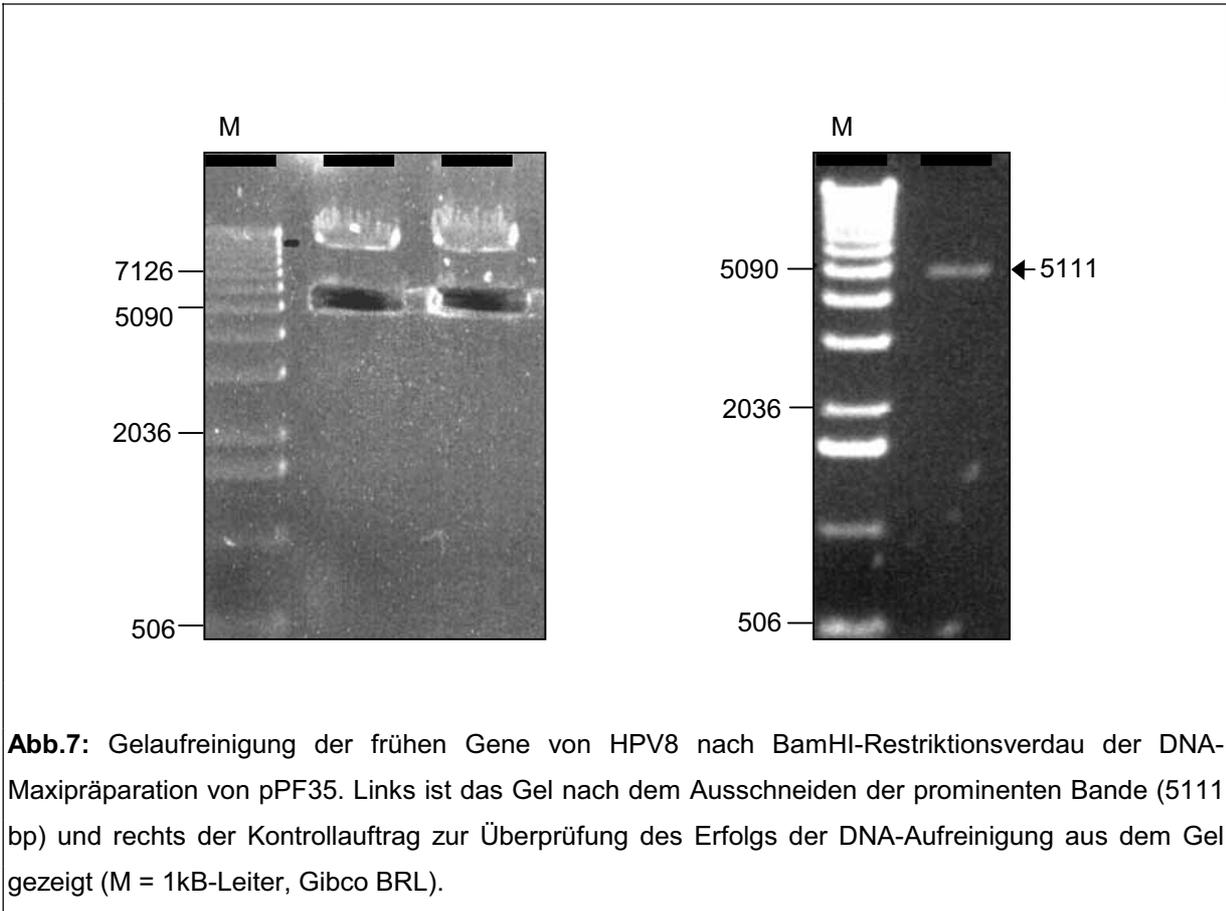


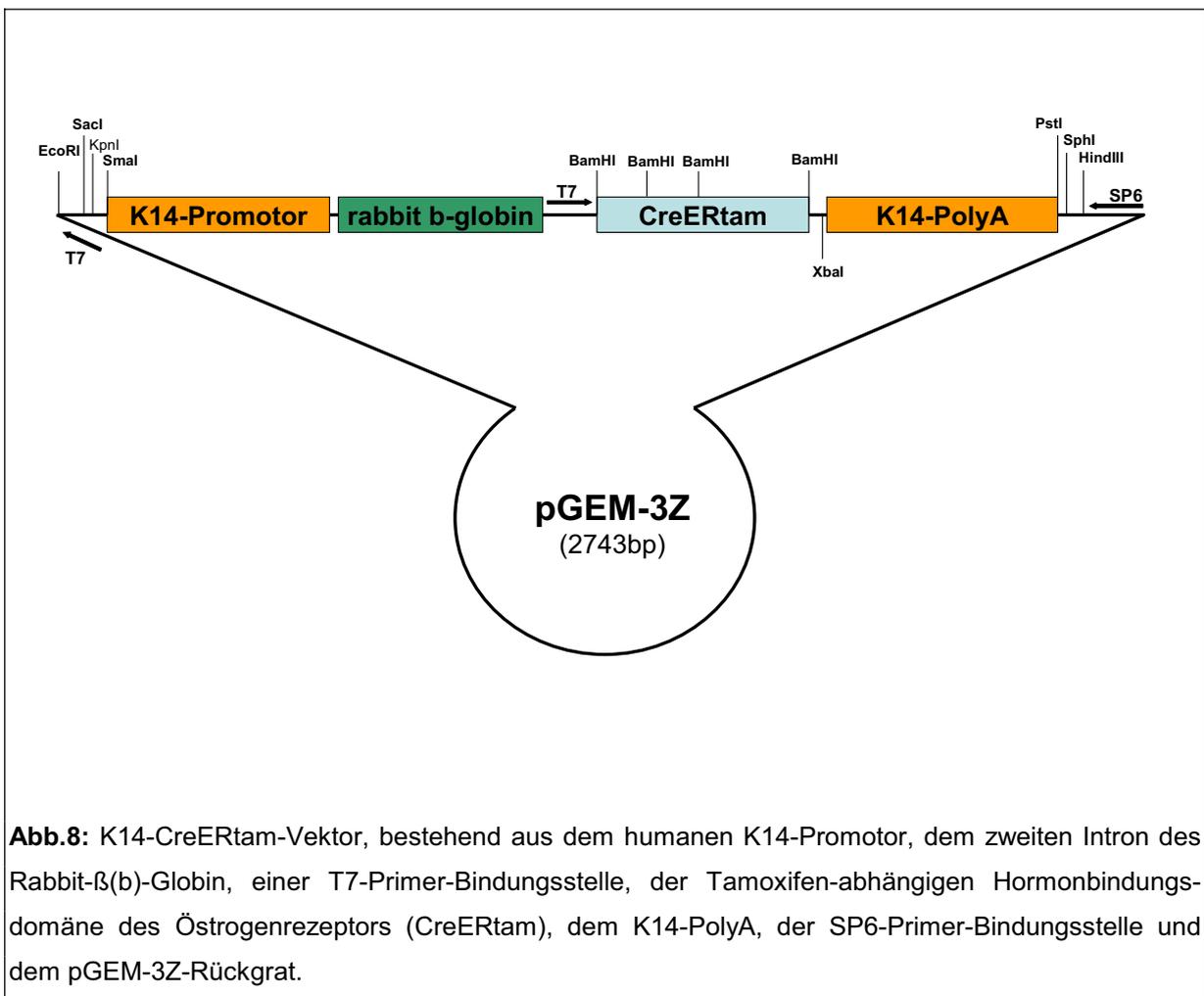
Abb.7: Gelaufreinigung der frühen Gene von HPV8 nach BamHI-Restriktionsverdau der DNA-Maxipräparation von pPF35. Links ist das Gel nach dem Ausschneiden der prominenten Bande (5111 bp) und rechts der Kontrollauftrag zur Überprüfung des Erfolgs der DNA-Aufreinigung aus dem Gel gezeigt (M = 1kB-Leiter, Gibco BRL).

Der Restriktionsansatz wurde auf ein Agarosegel aufgetragen und nach erfolgter Gelelektrophorese die prominente Bande (5111 bp) unter UV-Licht (3.5.3.) ausgeschnitten und nach 3.5.3. aufgereinigt.

Abbildung 7 zeigt links das Gel nach dem Ausschneiden der prominenten Bande und rechts den Kontrollauftrag zur Überprüfung des Erfolgs der DNA-Aufreinigung aus dem Gel.

4.1.1.2. Präparation des K14-Vektors

Um die Expression der in der Regel in jeder Zelle der transgenen Maus vorhandenen HPV8-DNA auf das Epithel zu beschränken, wurde ein humaner K14-Promotor verwendet. In Studien an transgenen Mäusen wurde gezeigt, dass seine Aktivität hauptsächlich auf die Basalzellen des Epithels beschränkt ist (Vasioukhin et al., 1999). Als Grundlage wurde der von E. Fuchs konstruierte Vektor K14CreERtam verwendet (Abb. 8).



Der Vektor enthält sowohl ein β -Globin-Intron stromabwärts des K14-Promotors als auch ein Polyadenylierungssignal, da gezeigt werden konnte, dass eine effiziente Expression des Transgens Splicing und Polyadenylierung des Transgens erfordert (Brinster et al., 1988).

Um das Vektorgerüst für die weitere Klonierung zu isolieren, wurde mittels des Restriktionsenzym *Bam*HI die CreERTam-Sequenz aus dem Vektor K14CreERTam ausgeschnitten (3.5.5.3.) und, um eine Religation zu vermeiden, mit Hilfe der „Bakteriellen Alkalischen Phosphatase“ dephosphoryliert (3.5.5.1.). Anschließend wurde das Gemisch gelelektrophoretisch aufgetrennt, die Vektorbande exzidiert und aufgereinigt (3.5.3., Abb.9).

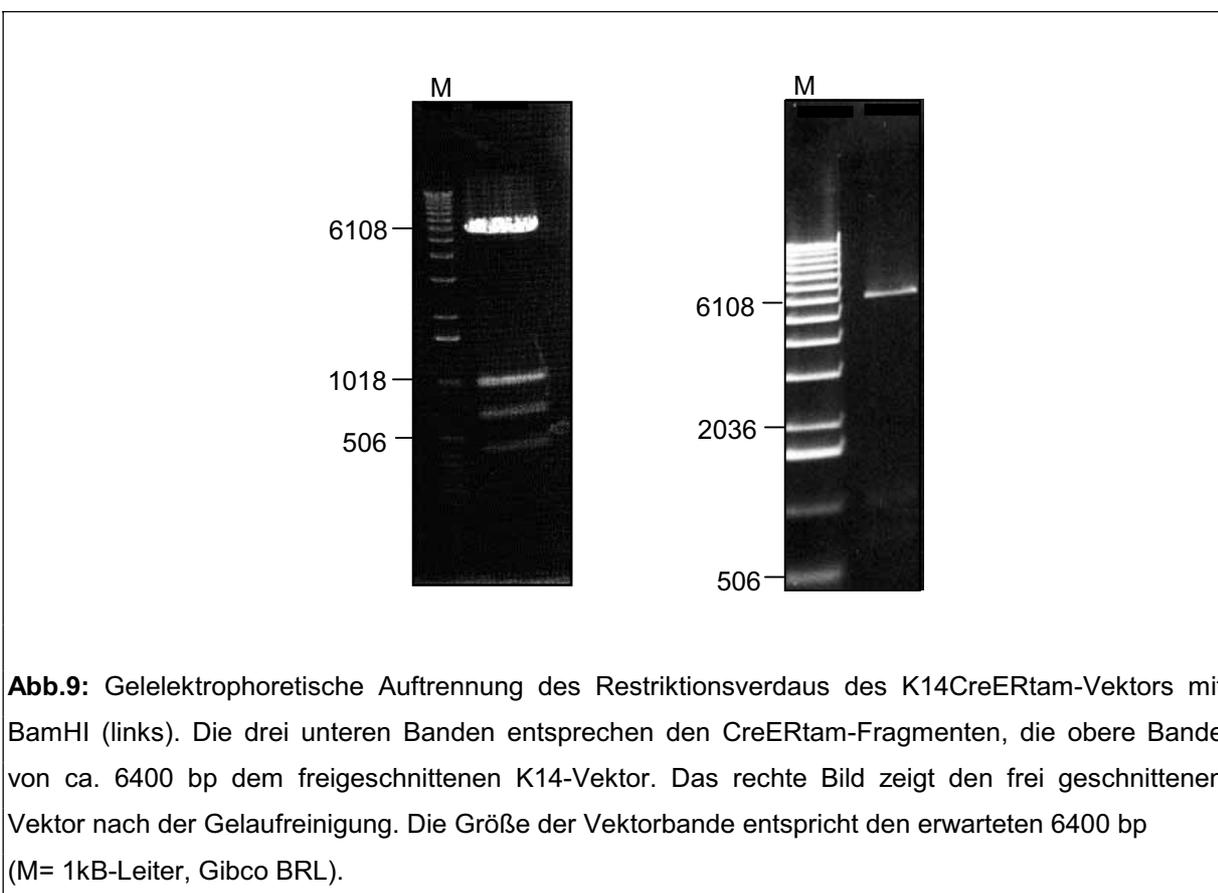
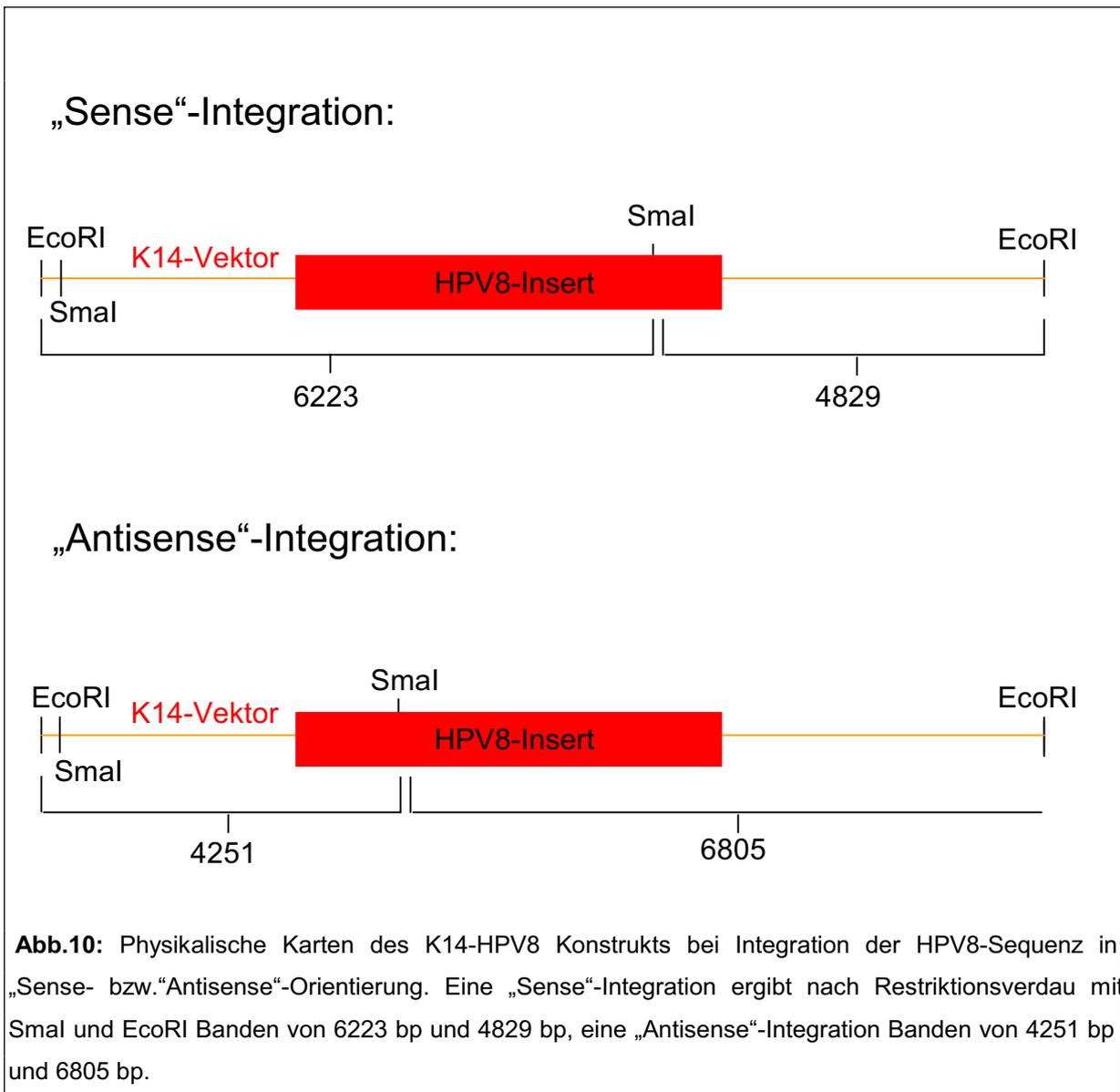


Abb.9: Gelelektrophoretische Auftrennung des Restriktionsverdaus des K14CreERTam-Vektors mit *Bam*HI (links). Die drei unteren Banden entsprechen den CreERTam-Fragmenten, die obere Bande von ca. 6400 bp dem freigeschnittenen K14-Vektor. Das rechte Bild zeigt den frei geschnittenen Vektor nach der Gelaufreinigung. Die Größe der Vektorbande entspricht den erwarteten 6400 bp (M= 1kB-Leiter, Gibco BRL).

4.1.1.3. Herstellung und Überprüfung des Konstruktes K14-HPV8

Die Ligation des Inserts aus 4.1.1.1. mit dem K14 Vektor aus 4.1.1.2. erfolgte mittels T4 Ligase. Nach anschließender Transformation in *E.coli*-Zellen und Minipräparation (3.10.1. u. 3.5.1.2.1.) des K14-HPV8-Konstrukts erfolgte die Überprüfung der Polarität des Inserts mittels Restriktionsverdau (3.5.5.3.) mit den Enzymen *Sma*I und *Eco*RI und anschließender Gelelektrophorese (3.5.2., Abb.12). *Eco*RI schneidet den

Vektor einmal an Position 5 und SmaI schneidet den Vektor einmal an Position 23 und einmal das HPV8-Insert an Position 3541 (Abb.10). Bei positiver Polarität ergibt sich somit ein Fragment von 6223 bp, bestehend aus 2681 Basenpaaren des Vektors und 3541 bp des HPV8-Inserts. Das zweite Fragment hat eine Größe von 4829 bp, bestehend aus 3264 bp des Vektors und 1570 bp des Inserts. Das dritte kleine Fragment von 18 bp ist zu vernachlässigen. Entsprechend ergeben sich bei negativer Polarität zwei Fragmente mit einer Länge von 4251bp und 6805bp.



Um die Nukleotidsequenz zu überprüfen, wurde das K14-HPV8-Konstrukt bidirektional sequenziert. Die erhaltene Sequenz wurde mit der Referenzsequenz

(Fuchs et al., 1986) mit Hilfe des Computerprogrammes McVector 6.0 überprüft und zeigte 100% Übereinstimmung. In Abbildung 11 ist das K14-HPV8-Konstrukt dargestellt. Mit dem so identifiziertem K14-HPV8-Klon positiver Polarität wurde weitergearbeitet.

Da Vektorsequenzen die Transgen-Expression deutlich beeinflussen können, wurde für die Mikroinjektion (3.1.1.) der pGEM-3-Vektor mittels HindIII- und SacI-Restriktionsverdau (3.5.5.3.) aus dem Konstrukt weitestgehend entfernt. Für eine möglichst hohe Erfolgsrate der Mikroinjektion ist eine große Reinheit des Konstrukts maßgeblich. Daher wurde das Konstrukt weiter über ein Agarosegel aufgereinigt (3.5.3.) und über eine Millipore-Membran gefiltert.

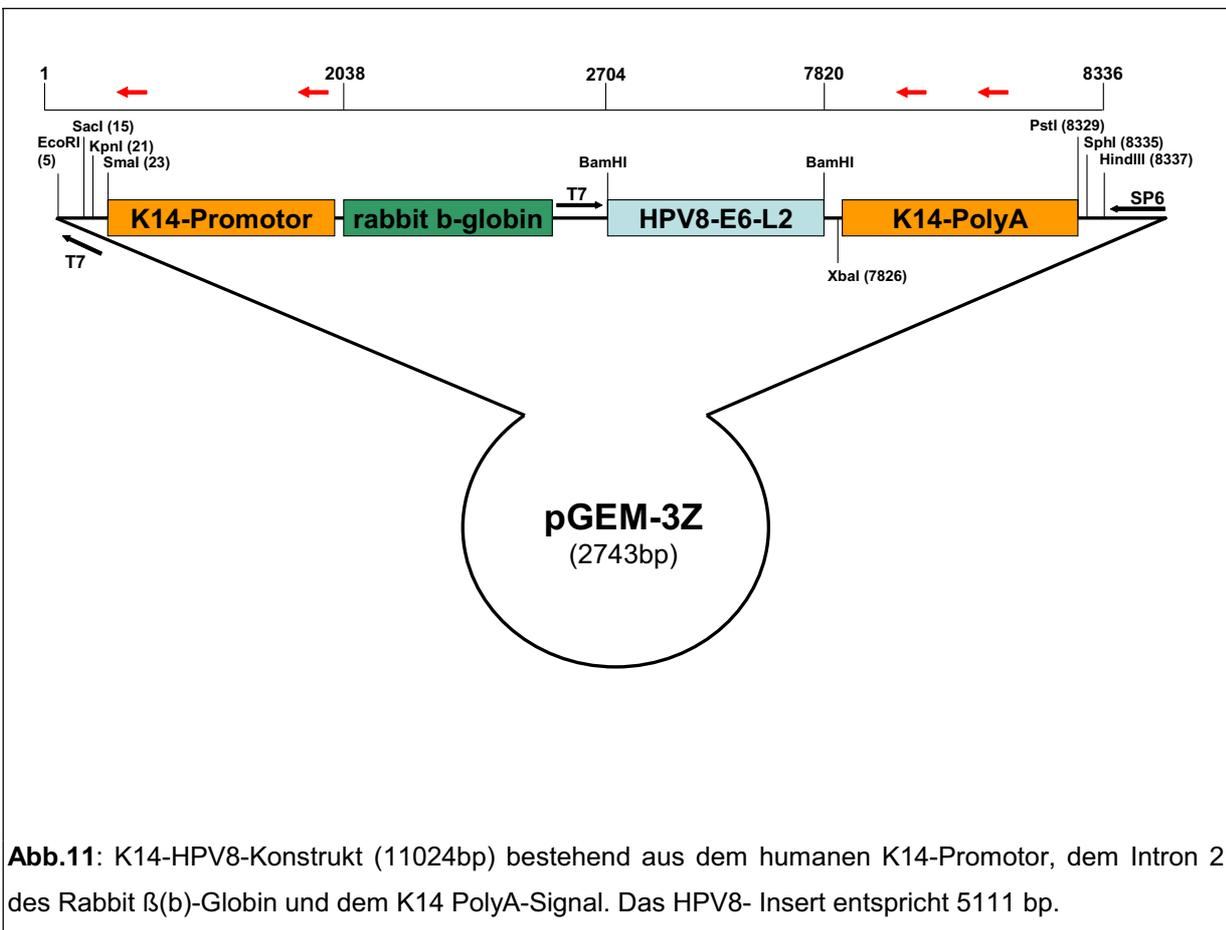


Abb.11: K14-HPV8-Konstrukt (11024bp) bestehend aus dem humanen K14-Promotor, dem Intron 2 des Rabbit β (b)-Globin und dem K14 PolyA-Signal. Das HPV8- Insert entspricht 5111 bp.

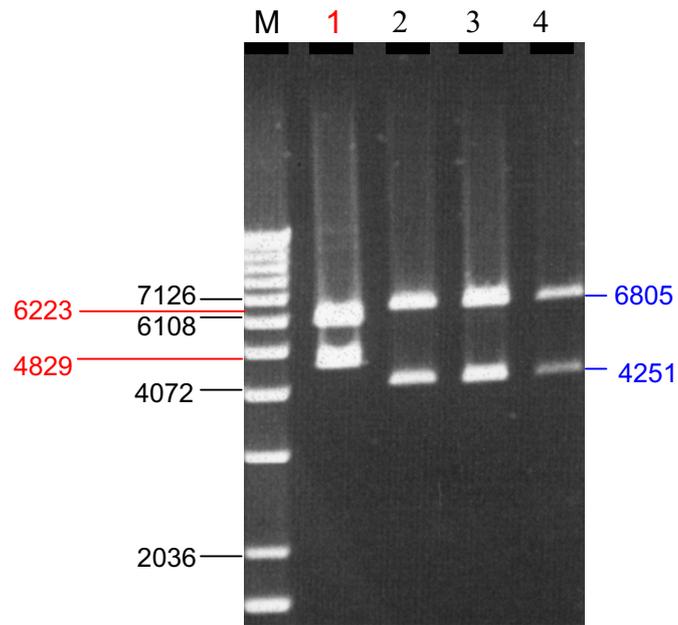


Abb.12: Gelelektrophoretische Überprüfung der Polarität des HPV8-Inserts mittels eines EcoRI- und SmaI-Restriktionsverdau. Die Banden von 6223 bp und 4829 bp weisen auf eine positive Polarität (Lane 1) und Banden von 4251 bp und 6805 bp auf eine negative Polarität (Lane 2-4) hin. (M= 1kB-Leiter, Gibco BRL).

4.1.2. Mikroinjektion des K14-HPV8 Konstruktes und Implantation der befruchteten Eizellen



Abb.13: Mikroinjektion des HPV8-Konstruktes in den männlichen Pronucleus der befruchteten Eizelle einer DBA/BI6 Maus.

Mittels eines Mikromanipulators wurde das K14-HPV8-Konstrukt in den männlichen Pronukleus der befruchteten Eizelle einer DBA/BI6 Maus mikroinjiziert (Abb.13; 3.1.3.). DBA/BI6 Mäuse wurden gewählt, da die Erfahrung (Smyth, N., persönliche Mitteilung) in der Vergangenheit zeigte, dass diese Kreuzung besonders gut für diese Prozedur geeignet ist. Die mikroinjizierten Eier wurden anschließend in die Ovidukte von scheinsschwangeren Ammenmüttern implantiert (3.1.4.). Nach drei Wochen wurden die ersten transgenen Mäuse geboren, die sogenannte Founder-Generation (F0). Diese wurden wie unter 4.2.1. beschrieben per PCR auf das Vorhandensein des Transgens untersucht. HPV8-positive Mäuse wurden wie unter 3.2. beschrieben mit FVB/N bzw. BI6-Wildtyp-Mäusen gekreuzt.

4.1.3. Nachweis des HPV8-Transgens in Mäusen der F0-Generation und Nachkommen späterer Generationen

Eine Voraussetzung für die Etablierung einer transgenen Mauslinie ist die Identifizierung transgener Mäuse der F0-Generation und der Nachkommen einer Rückkreuzung Transgen tragender Mäuse mit Wildtyp-Mäusen. Je nachdem, ob nach der Mikroinjektion die Integration des Transgens noch im Einzellstadium oder erst im Mehrzellstadium erfolgt, entstehen F0-Tiere, die aus genetisch identischen Zellen oder aber aus genetisch unterschiedlichen Zellen, einem sogenannten "Mosaik", bestehen. Ein solches Mosaik weist Transgen-negative und Transgen-positive Zellen auf. Außerdem können auch positive Zellen mit unterschiedlicher Transgenanzahl entstehen. Im Fall eines Mosaiks kann das Transgen unter Umständen nicht in der Keimbahn der Maus vorliegen und somit auch nicht an die Nachkommen in der F1-Generation weiter vererbt werden. Bei Weitervererbung ist im Allgemeinen eine 50%-Rate Transgen-positiver Nachkommen zu erwarten.

Von jeder ca. 3 Wochen alten Maus wurde ein ca. 0,5-1cm langes Stück Schwanzspitze entnommen. Aus diesen Schwanzbiopsien wurde mittels des Qiamp-Tissue Kit von Qiagen die gesamtzelluläre DNA extrahiert (3.5.1.1.). Der Gehalt adäquater DNA-Mengen und die Abwesenheit inhibitorischer Substanzen in den erhaltenen DNA-Eluaten wurde durch den Nachweis von β -Globin-spezifischen Sequenzen in der PCR (3.7.1.1.) und das Vorhandensein des Transgens mittels HPV8-spezifischer PCR überprüft.

Insgesamt wurden 464 Mäuse untersucht. Alle untersuchten Proben zeigten nach der Gelelektrophorese die für die β -Globin-PCR spezifische 494 bp-Bande. Die

parallel durchgeführten Negativkontrollen waren bei allen Ansätzen negativ. Abbildung 14 zeigt exemplarisch das Ergebnis einer elektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte.

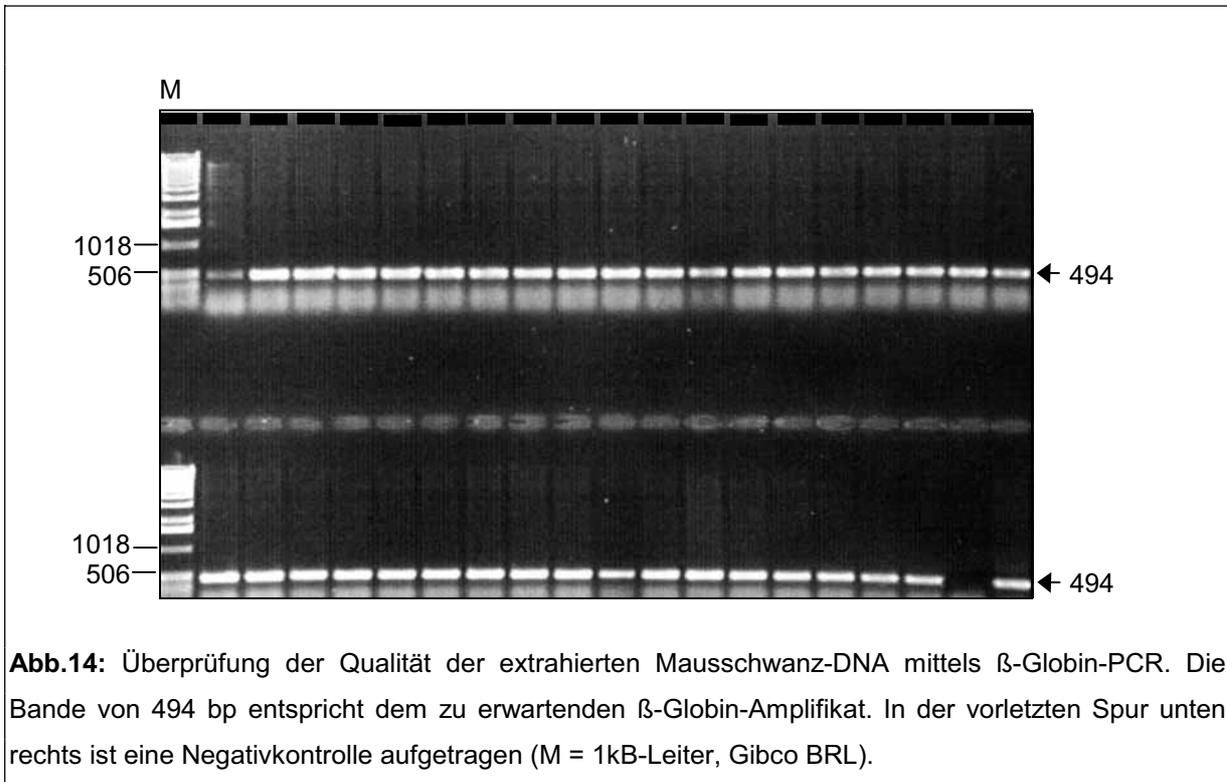


Abb.14: Überprüfung der Qualität der extrahierten Mausschwanz-DNA mittels β -Globin-PCR. Die Bande von 494 bp entspricht dem zu erwartenden β -Globin-Amplifikat. In der vorletzten Spur unten rechts ist eine Negativkontrolle aufgetragen (M = 1kB-Leiter, Gibco BRL).

Für den stellvertretenden Nachweis des Transgens wurde eine PCR für das E6- und E7-Gen von HPV8 entworfen.

Bei der Auswahl von Oligonukleotiden als Primer für die Polymerase-Kettenreaktion wurden die von Saiki et al. (1989) und Innis et al. (1990) formulierten, prinzipiellen Regeln berücksichtigt:

1. Um ähnliche Annealing-Eigenschaften zu haben, sollen Primerpaare einen annähernd gleichen Schmelzpunkt besitzen. Optimale Schmelzpunkte liegen dabei um 60°C, da so hohe Annealing-Temperaturen angewandt werden können, die eine spezifische Amplifikation der Zielsequenz ermöglichen.
2. Das Auftreten von Sekundärstrukturen wie z.B. "hairpins" sollte vermieden werden.
3. Zwischen den beiden Primern eines Paares sollte insbesondere im 3'-Bereich keine Komplementarität bestehen, da diese zur gegenseitigen Anlagerung (Dimerbildung) führen kann.

4. Der G/C-Gehalt eines Primers sollte idealerweise zwischen 45 und 60% liegen und beide Primer sollten jeweils einen ähnlichen G/C-Gehalt aufweisen.

Die neuen Primer wurden nach den oben genannten Kriterien ausgewählt und sollten eine Länge von 18 nt bis 24 nt aufweisen. Die Schmelzpunktberechnung (T_m) erfolgte nach einer Formel von Suggs et al., 1981.

$$T_m = 2x \sum(A/T) + 4x \sum(G/C) \text{ in } ^\circ\text{C}$$

Die für die HPV8-E6/E7 PCR verwendeten Primersequenzen sind in Tabelle 3 angegeben.

Funktion	Name	Oligonukleotidsequenz		Bindestelle im HPV8-Genom *
		5'	3'	
5`-Primer	E6/E7	CAA TTT TCC TAA		Pos. 180-201
	fw	GCA AAT GGA C		
3`-Primer	E6/E7	CAC TAC ATT CAG		Pos. 999-1023
	bw	CTT CCA AAA TAC A		

Tabelle 3: Sequenzen der Primer für den PCR-Nachweis von HPV8-E6/E7

*Die Positionsangaben im HPV8-Genom folgen den Nummerierungen von Fuchs et al., 1986.

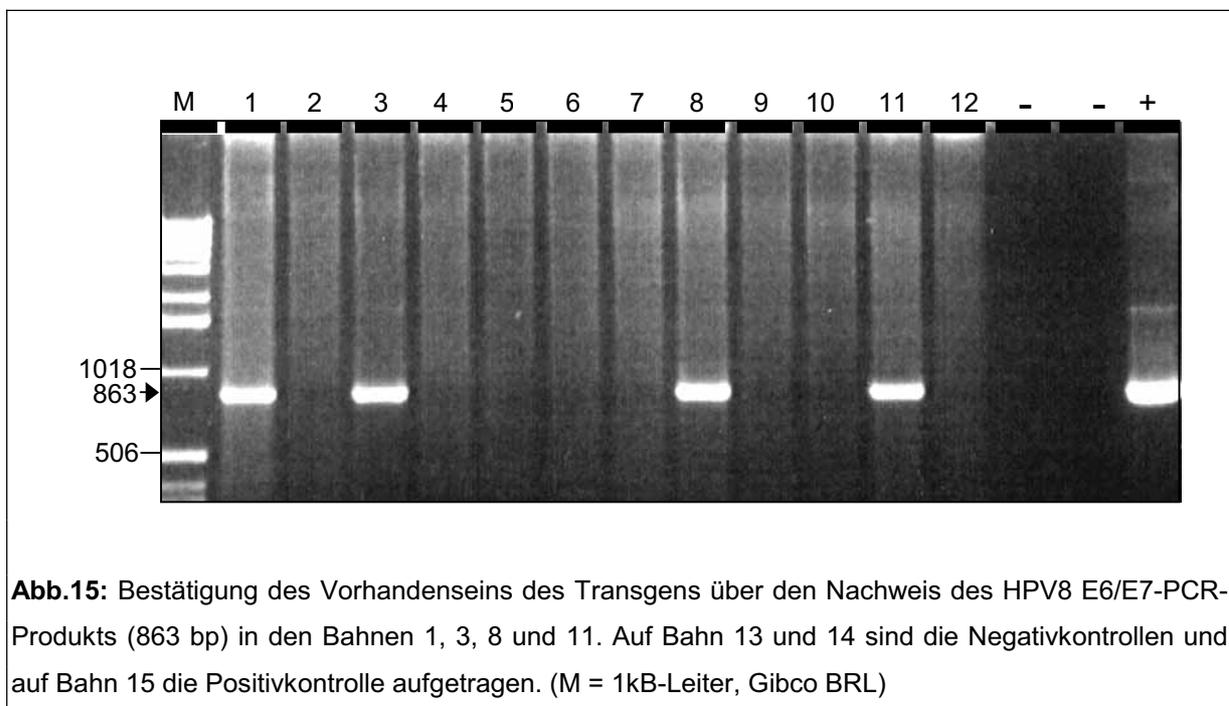
Die physikalischen Parameter des PCR-Protokolls sind in Tabelle 4 angegeben. Der PCR-Ansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

DNA-Matrize	10µl des Eluats aus 3.5.1.1.
HPV8-E6/7 fw	0,3µM
HPV8-E6/7 bw	0,3µM
dNTPs	0.3 mM
10x DNA-Polymerase Puffer	5µl
Taq-Polymerase (Pharmacia)	2,5 U
H ₂ O	ad 50 µl

Anzahl der Zyklen	Denaturierung (95°C)	Primerannealing	DNA-Synthese (72°C)
1	3 min	_____	_____
35	45 Sek.	1 min 50°C	1,5min
1	_____	_____	10 min

Tabelle 4: Physikalische Parameter der HPV8-E6/E7-PCR.

Das HPV8-E6/E7-PCR-Produkt besitzt eine Größe von 863 bp. In Abbildung 15 ist exemplarisch die gelelektrophoretische Analyse der PCR-Reaktionen von 12 untersuchten Mäusen eines Wurfs der F1-Generation von Linie 9 dargestellt. Auf Bahn eins ist der 1kb-Marker (Gibco BRL) aufgetragen, auf den Bahnen 13 und 14 die Negativkontrollen und auf Bahn 15 die Positivkontrolle. Insgesamt wurden in diesem Lauf 4 Transgen-positive (Bahnen 1, 3, 8, 11) und 8 Transgen-negative Mäuse (Bahnen 2, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 12) identifiziert.



Von den insgesamt 464 getesteten Mäusen wurden 192 (41,0%) als Transgen-positiv identifiziert. Die Anzahl der Transgen-positiven Mäuse in der jeweiligen Linie und Generation ist in Tabelle 5 wiedergegeben.

Nach Mikroinjektion wurden insgesamt 115 Mäuse der F0-Generation geboren. Von diesen Mäusen erwiesen sich 13 (11,3%) als HPV8-transgen. Vier dieser transgenen Tiere (Nr.9, 61, 85 und 88) wurden für das Kreuzungsprogramm ausgewählt und mit Wildtyp-Mäusen des FVB/N- bzw. Bl6-Stammes rückgekreuzt. Maus 9 und 85 wurden gewählt, da sie zum Zeitpunkt des Zuchtbeginns bereits einen Tumor entwickelt hatten, die Wahl von Maus 61 und 88 erfolgte willkürlich. Ziel der Rückkreuzung ist ein reiner FVB/N- bzw. Bl6-Background der transgenen Mäuse, welcher nach ca. 6-8 Generationen zu erreichen ist. FVB/N-Mäuse wurden ausgewählt, da Versuche mit HPV16-transgenen Mäusen in der Vergangenheit zeigten, dass dieser Stamm eine gewisse Prädisposition zur Tumorentstehung aufweist (Brown und Balmain, 1995a; Brown et al., 1995b; Coussens et al., 1996). Der Stamm Bl6 diente als Vergleich, um die Auswirkung unterschiedlicher genetischer Hintergründe auf die Anfälligkeit für die Tumorentwicklung zu beobachten. Linie 9 und 88 wurde in den folgenden Kreuzungen ausschließlich mit FVB/N-Mäusen, Linie 61 ausschließlich mit Bl6-Mäusen und Linie 85 mit beiden Stämmen verpaart. Von jeder neu entstandenen Generation wurden einige HPV8-positive Mäuse zur weiteren Zucht mit den entsprechenden Wildtyp-Mäusen verwendet (3.2.). Bis zum heutigen Zeitpunkt entstanden auf diese Art und Weise in der Linie 9 fünf weitere Generationen (F1-F5) und in den Linien 85, 85 Bl6 und 61 jeweils drei weitere Generationen (F1-F3)(Tabelle 5). Alle Nachkommen der Linie 88 waren HPV-negativ. Dies lässt darauf schließen, dass das Transgen erst im Mehrzellstadium und hierbei nicht in Zellen der Keimbahn integriert wurde.

Aus jeder Generation und Linie wurden Transgen-negative Kontrollmäuse mitgeführt. Insgesamt leben bis zum heutigen Zeitpunkt noch 131 dieser Kontrollmäuse. Ihr Alter liegt zwischen 12,8 und 67,8 Wochen (Mittelwert 44 Wochen). Die Daten der noch lebenden Negativ-Kontrollmäuse sind nach Linie und Generation in den Tabellen 6-9 wiedergegeben. 39 Transgen-negative Mäuse wurden aus Platzgründen euthanasiert. Sie erreichten ein Alter zwischen 6,3 und 17,7 Wochen (Mittelwert:12,3).

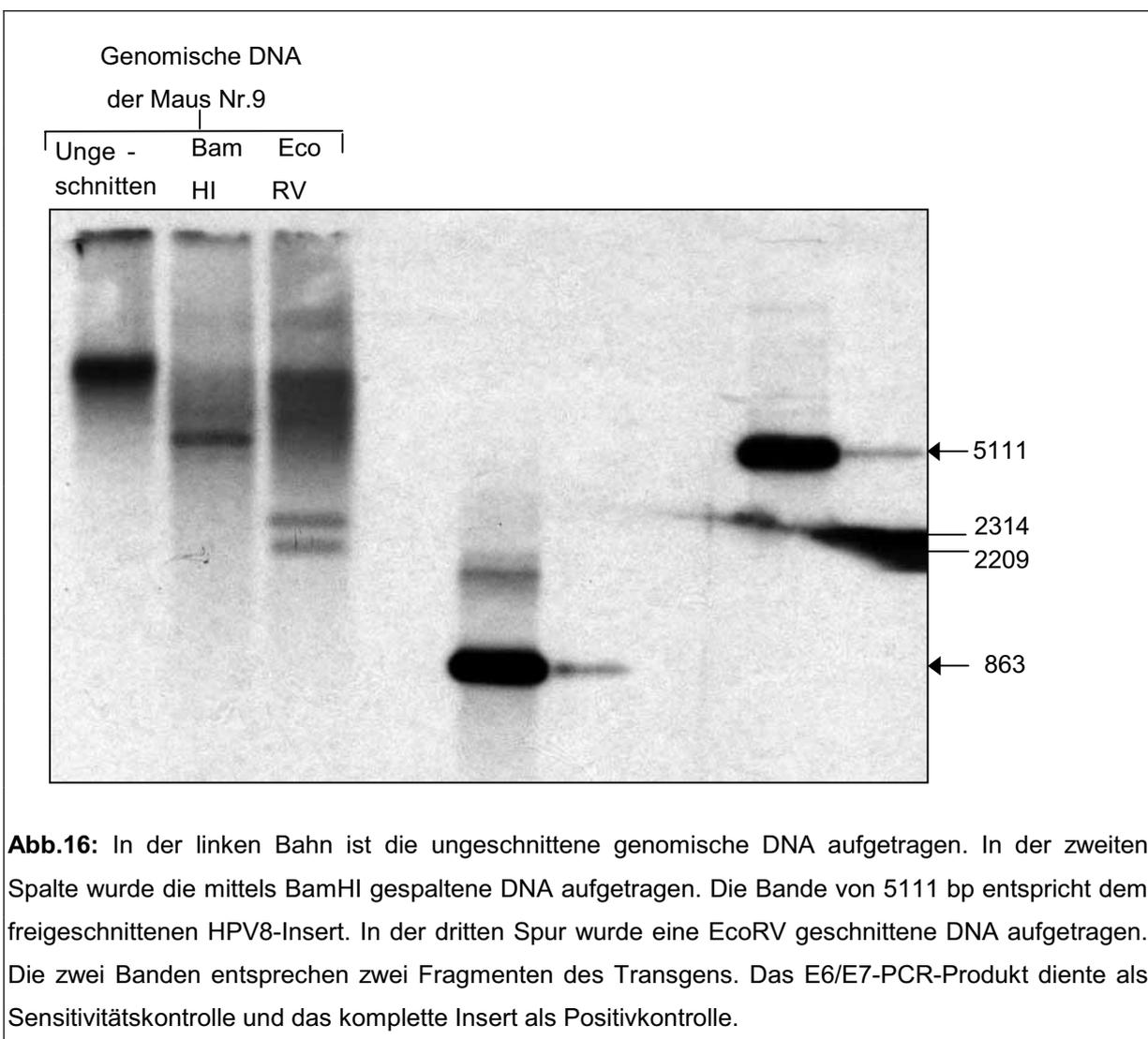
Generation	Transgen-positive Mäuse / getestete Mäuse (%)			
	Linie 9 (FVB/N)	Linie 85 (FVB/N)	Linie 85 (Bl6)	Linie 61 (Bl6)
F1	25/40 (62,5)	7/24 (29,2)	4/12 (33,3)	5/6(83,3)
F2	19/38 (50)	12/32 (37,5)	5/7 (71,4)	4/14 (28,6)
F3	49/82 (59,8)	8/14 (57,1)	2/6 (33,3)	4/8 (50)
F4	27/49 (55,1)			
F5	8/17 (47,1)			
Positive insgesamt	128 (56,5%)	27 (38,6%)	11 (44%)	13 (46,4%)

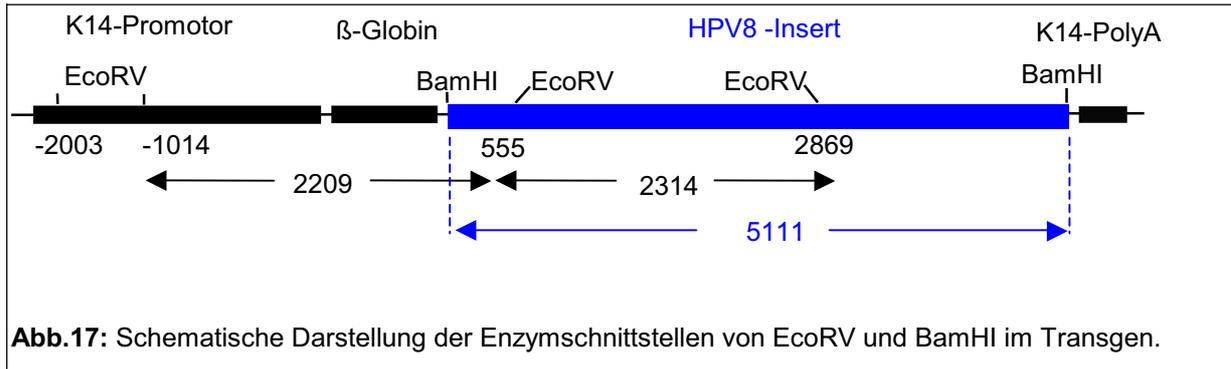
Tabelle 5: Anteil Transgen-positiver Mäuse in den Generationen F1-F5 der Linien 9, 85, 85 Bl6 und 61.

4.2. Analyse der DNA-Extrakte mittels Southern Blot Hybridisierung

Um die Integration des Transgens in das Genom der Mäuse 9 und 85, welche für die Zucht verwendet wurden, nachzuweisen, wurden DNA-Extrakte mittels Southern Blot Hybridisierung überprüft. Die Untersuchung der dritten Zuchtmaus (Nr.61) war noch nicht möglich, da sie zum Zeitpunkt des Abschlusses dieser Arbeit noch lebte und so die benötigten DNA-Mengen nicht zur Verfügung standen. Als Sonde wurde das HPV8-E6/E7-Fragment genutzt, welches mittels ^{32}P - α -dATP radioaktiv markiert worden war (3.5.6.3.). Als Positivkontrolle wurde das komplette HPV8-Insert verwendet. Die Sensitivität wurde mit Verdünnungsstufen von 10pg bis hin zu 100ng eines E6/E7-PCR-Produktes überprüft. In Abb. 16 ist der Southern Blot von Maus 9

dargestellt. Der Southern Blot von Maus 85 ist vergleichbar und daher hier nicht extra abgebildet. In der ersten Spur sieht man, dass das Transgen mit der ungeschnittenen Maus-DNA läuft, wodurch eine Integration des Transgens gezeigt wird. In der zweiten Bahn wurde das Insert mittels BamHI freigeschnitten. In der dritten Spur ist eine Restriktionsspaltung mittels EcoRV zu sehen, welche das Transgen vierfach schneidet (vergleiche hierzu Abb.17). Die zwei Banden, welche durch die E6/E7-Sonde detektiert wurden, korrespondieren mit zwei Fragmenten des Transgens. Dies beweist, dass das Transgen zumindest zwischen Position -1014 des K14-Promotors und 2869 des HPV8-Inserts intakt ist.





4.3. Pathologisch-histologische Untersuchung

In Ergänzung zu den molekularbiologischen Untersuchungen wurden medizinisch-makroskopische und histopathologische Untersuchungen durchgeführt. Alle Mäuse wurden regelmäßig, alle zwei bis drei Tage, auf Auffälligkeiten untersucht und bei Feststellung von massiven Rankenkämpfen separiert.

4.3.1. Makroskopische Untersuchung

Von den ursprünglichen 115 Founder-Mäusen, von denen 13 (11,3%) HPV8-positiv getestet wurden, entwickelten drei positive Mäuse (23%) tumoröse Veränderungen. Bei Maus Nr.9 begann die Entwicklung einer Läsion im Alter von 13,8 Wochen (Abb.18).



Die Läsionen erstreckten sich zum Zeitpunkt des Todes diffus entlang der dorsolateralen Thorax- und Bauchwand von den Ohren bis ins hintere Drittel des Rumpfes reichend. Betroffene Areale wiesen Haarverlust mit extremer Hyperkeratose auf. An einigen Stellen entwickelten sich Ulcera.

Maus Nr.85 entwickelte den ersten Tumor im Alter von 27,8 Wochen. Die Entstehung der zweiten Läsion trat etwa mit 4-6 Wochen Verzögerung auf. Die umschriebenen Herde waren beide an der lateralen Thoraxwand lokalisiert. Der kleinere vordere Herd umfasste 0,5 x 0,4 cm und betrug im Anschnitt 0,4 cm. Der hintere Herd umfasste ein Areal von ca. 2,5 x 2,5 cm und betrug im Anschnitt 0,8 cm. Beide Herde waren scharf begrenzt und verschieblich. Sie zeichneten sich durch Haarverlust und extreme Hyperkeratose aus, welche zur Ausbildung von Hauthörnern führte (Abb.19).



Abb.19: Maus 85 (F0-Generation) zum Zeitpunkt der Sektion im Alter von 33,2 Wochen.

Maus 61 entwickelte einen Tumor im Alter von 80,9 Wochen. Die Läsion ähnelt optisch derjenigen von Maus Nr.9, ist jedoch noch weit weniger ausgedehnt.

Da die Entwicklung der Läsionen bei allen Mäusen vergleichbar verlief, wird sie hier allgemein beschrieben. Im Frühstadium war eine Alopezie und teilweise Schorf, bevorzugt im hinteren dorsalen Körperbereich bzw. am Schwanz zu beobachten. Diese bevorzugte Lokalisation ist zumindest teilweise auf Bißverletzungen durch Wurfgeschwister zurückzuführen. Mit einer zeitlichen Verzögerung von ca. 1-2

Wochen kamen schuppig-borkige Areale der Haut zum Vorschein. In der folgenden Zeit kam es zu einer Ausdehnung der Läsionen, welche nun auch die cranialen und ventralen Körperregionen betreffen konnten, zu einer verstärkten Hyperkeratose und teilweise zu Juckreiz und Ulcerationen. Zum Teil waren die Läsionen diffus, teilweise circumskript. Zum späteren Zeitpunkt war eine deutliche Verschlechterung des Allgemeinzustandes mit Apathie und Abmagerung der Mäuse festzustellen, weshalb sie dann auch teilweise euthanasiert werden mussten.

Es zeigten sich deutliche Unterschiede in der Tumorfrequenz in den unterschiedlichen Linien und Generationen. Aus der mit FVB/N rückgekreuzten Linie 9 entwickelten 13 Mäuse der F1-Generation (52%) Tumore. Das mittlere Alter bei Beginn der Tumorentwicklung lag bei 38,6 Wochen. In der F2-Generation entwickelten 11 Mäuse (57,9%) Tumore. Das mittlere Alter bei Beginn der Tumorentwicklung lag bei 17,4 Wochen. In der F3-Generation entwickelten 40 Mäuse (81,6%) Tumore. Das mittlere Alter bei Beginn der Tumorentwicklung lag bei 15,5 Wochen. In der F4-Generation entwickelten 19 Mäuse (70,4%) Tumore. Das mittlere Alter bei Beginn der Tumorentwicklung lag bei 12,3 Wochen. In der F5-Generation entwickelten 6 Mäuse (75%) Tumore. Das mittlere Alter bei Beginn der Tumorentwicklung lag bei 7,6 Wochen.

Bei Linie 9 konnte der Anstieg der Tumorzinzidenz mit fortschreitender Generation besonders deutlich beobachtet werden. Der exakte Test nach Spearman bestätigte diese Korrelation für die Generationen F1 bis F3 ($p=0,115$). Die Generationen F4 und F5 wurden aufgrund des noch jungen Alters nicht berücksichtigt. Für Linie 9 zeigte sich weiterhin ein signifikanter Trend für ein geringeres Alter bei Tumorentwicklung hin zu späteren Generationen ($p<0,001$).

In der mit FVB/N rückgekreuzten Linie 85 entwickelten in der F2-Generation 3 Mäuse (25%) Tumore. Das mittlere Alter bei Beginn der Tumorentwicklung lag bei 22,9 Wochen.

Aus der mit Bl6 gekreuzten Linie 85 Bl6 entwickelte eine Maus aus der F1-Generation (25%) Tumore. Das Alter bei Beginn der Tumorentwicklung lag bei 45,6 Wochen. In der F2-Generation entwickelten 2 Mäuse (40%) Tumore. Das mittlere Alter bei Beginn der Tumorentwicklung lag bei 26,7 Wochen. In der F3-Generation entwickelten 2 Mäuse (100%) Tumore. Das mittlere Alter bei Beginn der Tumorentwicklung lag bei 8,3 Wochen.

In der mit Bl6 gekreuzten Linie 61 entwickelte in der F1-Generation ebenso wie in der F3-Generation keine Maus einen Tumor. In der F2-Generation entwickelte eine Maus im Alter von 9,3 Wochen einen Tumor (Tabellen 6-9).

Linie 9				
Gen.	Tumor+/ HPV+(%)	MW* Alter bei Tumorbeginn (Spannweite;STABW**) HPV+, Tumor+	MW*Alter (Spannweite;STABW**) HPV+,Tumor-	Anzahl***; MW*Alter (Spannweite;STABW**) HPV-
F1	13/25 (52)	38,6 (13,5-65,9; 16,5)	46,5 (8,8-72,6; 28,6)	2; 68 (68; 0)
F2	11/19 (57,9)	17,4 (9,8-57,4; 13,6)	55,2 (37,3-61; 10,5)	19; 54 (37-61; 11)
F3	40/49 (81,6)	15,5 (5,8-38,9; 8,9)	45,3 (34-51,3; 6)	32; 48 (47-51; 1)
F4	19/27 (70,4)	12,4 (6,5-26,4; 6,0)	33,6 (29,8-38; 4,1)	21; 36 (30-56; 5)
F5	6/8 (75)	7,6 (5,6-9,4; 1,6)	13,5 (12,8-14,2; 1)	9; 13 (13-14; 0,1)

Tabelle 6: Anzahl und Alter (in Wochen) HPV-positiver Mäuse mit Tumoren, HPV positiver Mäuse ohne Tumoren und HPV negativer Mäuse in der Linie 9 nach Generationen.

*MW=Mittelwert
 ** STABW=Standardabweichung
 n***=Anzahl HPV-negativer Mäuse

Linie 85				
Gen.	Tumor+/ HPV+(%)	MW* Alter bei Tumorbeginn (Spannweite;STABW**) HPV+, Tumor+	MW*Alter (Spannweite;STABW**) HPV+,Tumor-	Anzahl***; MW*Alter (Spannweite;STABW**) HPV-
F1	0/7	0	55,7 (10-65,2; 20,2)	5; 63 (62-65; 1,2)
F2	3/12 (25%)	22,9 (14,1-34,7; 10,7)	48,8 (47-50,4; 1,6)	10; 48 (47-50; 1,5)
F3	0/8	0	26 (14,4-29,9; 7)	6; 27 (14-30; 6,3)

Tabelle 7: Anzahl und Alter (in Wochen) HPV-positiver Mäuse mit Tumoren, HPV positiver Mäuse ohne Tumoren und HPV negativer Mäuse in der Linie 85 nach Generationen.

*MW=Mittelwert
 ** STABW=Standardabweichung
 n***=Anzahl HPV-negativer Mäuse

Linie 85 B16

Gen.	Tumor+/ HPV+(%)	MW* Alter bei Tumorbeginn (Spannweite;STABW**) HPV+, Tumor+	MW*Alter (Spannweite;STABW**) HPV+,Tumor-	Anzahl***; MW*Alter (Spannweite;STABW**) HPV-
F1	1/4 (25%)	45,6 (45,6-45,6; 0)	58,7 (58,4-58,9;0,3)	6; 59 (58-59; 0,2)
F2	2/5 (40%)	26,7 (15,1-46; 16,8)	49,4 (49,4-49,4; 0)	2; 49 (49; 0)
F3	2/2 (100%)	8,3(6,8-9,8; 2,1)		4; 29 (29; 0)

Tabelle 8: Anzahl und Alter (in Wochen) HPV-positiver Mäuse mit Tumoren, HPV positiver Mäuse ohne Tumoren und HPV negativer Mäuse in der Linie 85 B16 nach Generationen.

*MW=Mittelwert

** STABW=Standardabweichung

n***=Anzahl HPV-negativer Mäuse

Linie 61

Gen.	Tumor+/ HPV+(%)	MW* Alter bei Tumorbeginn (Spannweite;STABW**) HPV+, Tumor+	MW*Alter (Spannweite;STABW**) HPV+,Tumor-	Anzahl***; MW*Alter (Spannweite;STABW**) HPV-
F1	0/5	0	59,7 (59,7-59,7; 0)	1; 60 (60; 0)
F2	1/4 (25%)	9,3 (9,3-9,3; 0)	50 (49,5-50,3; 0,4)	10; 50 (49-50; 0,4)
F3	0/4	0	28,5 (28,5-28,5; 0)	4; 28 (28; 0)

Tabelle 9: Anzahl und Alter (in Wochen) HPV-positiver Mäuse mit Tumoren, HPV positiver Mäuse ohne Tumoren und HPV negativer Mäuse in der Linie 61 nach Generationen.

*MW=Mittelwert

** STABW=Standardabweichung

n***=Anzahl HPV-negativer Mäuse

Bei 31 von 104 Mäusen mit Tumoren (29,8%) war das Geschlecht weiblich und bei 73 der Mäuse mit Tumoren (70,2%) männlich. Diese geschlechtliche Verteilung konnte gleichermaßen in allen untersuchten Linien beobachtet werden. Keine der HPV-negativen Mäuse entwickelte einen Tumor.

Bei der Obduktion der Mäuse nach 3.4.1. konnten bei keiner der untersuchten Mäuse makroskopische Veränderungen anderer Organe als der Haut festgestellt werden. Aus der Linie 85 wurde eine Maus, die Founder-Maus im Alter von 33,2 Wochen, euthanasiert und untersucht. Zum Zeitpunkt des Todes lag der Beginn der Tumorentstehung 5,4 Wochen zurück.

Aus der Linie 9 wurde die Founder-Maus im Alter von 24,9 Wochen euthanasiert und obduziert. Der Beginn des Tumorwachstums lag zu dem Zeitpunkt 11,1 Wochen zurück. Aus der F1-Generation wurden 2 Mäuse, aus der F2-Generation 3, aus der F3-Generation 9, aus der F4-Generation 3 und aus der F5-Generation 1 Maus histopathologisch untersucht (Tabelle 10). Bislang wurde keine Maus aus Linie 61 und, neben der Founder-Maus, keine weitere Maus der Linie 85 obduziert.

4.3.2. Mikroskopische Untersuchung

4.3.2.1. Benigne Tumoren

Von allen obduzierten Mäusen wurden histologische Schnitte angefertigt (3.4.2.) und diese anschließend unter dem Mikroskop begutachtet.

Die Befunde ähnelten sich bei den untersuchten Mäusen. In der histologischen Beurteilung der benignen Hauttumoren (Abb.20, 21) zeigten sich folgende Befunde: flache Papillome mit extremer Hyperkeratose, Dyskeratose und Parakeratose. Die Epidermis war hyperplastisch und zeigte schwere Papillomatose, Akanthose und multiple Hohlräume gefüllt mit lamellierten konzentrisch arrangierten Keratinmassen, sogenannte Hornperlen. Es konnte zum Teil eine milde Atypie in den suprabasalen Lagen mit vermehrten mitotischen Figuren, Kern-Hyperchromasie und milder Anisonukleosis beobachtet werden. Im Stratum granulosum wurden runde, ovale oder irreguläre Keratohyalin granula in den dysplastischen Zellen gefunden und einige Areale zeigten die für Papillomavirusinfektionen typische Koilozytose. Die Basalmembran war stets intakt und es konnten keine Hinweise für Invasivität gefunden werden.

Gene- ration	Maus	Geschlecht	Sektionsalter	Tumoralter bei Sektion
F0	85	m	33,2	5,4
F0	9	m	24,9	11,1
F1	9/20	m	65,3	51,8
F1	9/20	w	66,2	14,9
F2	9/3/9	w	44,7	28,8
F2	9/3/6	m	23,9	14,1
F2	9/522/7	w	24,1	12,1
F3	9/3/6/13	m	45,8	36,4
F3	9/ 3/8/9	m	42,6	32,7
F3	9/3/6/4	m	38,2	31,5
F3	9/3/6/10	w	38,4	27,5
F3	9/15/2/3	m	45,6	26,9
F3	9/3/6/5	m	34,9	26,2
F3	9/3/6/2	m	34,9	26,2
F3	9/522/7/7	m	50	40
F4	9/3/6/14/35	m	35,4	26,9
F4	9/3/6/14/5	w	30	22,9
F4	9/3/6/5/6	w	24,3	15,5
F5	9/3/6/14/22/1	m	12	6,4

Tabelle 10: Obduktionstabelle der Mäuse nach Generation, Geschlecht, Alter und Tumoralter in Wochen.m= männlich; w= weiblich

Folgende Abbildungen zeigen Ausschnitte aus den histologischen Präparaten:

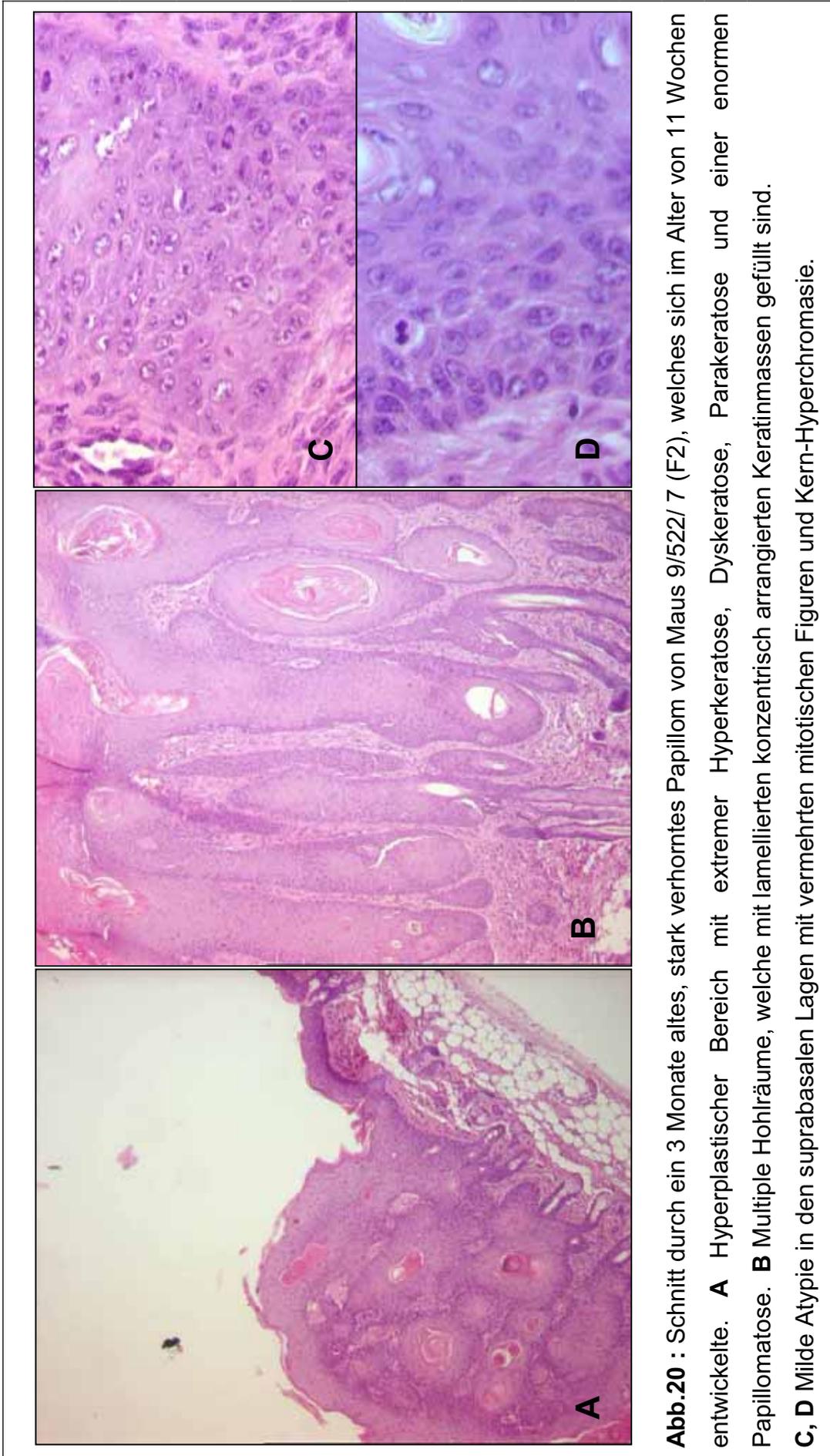


Abb.20 : Schnitt durch ein 3 Monate altes, stark verhorntes Papillom von Maus 9/522/ 7 (F2), welches sich im Alter von 11 Wochen entwickelte. **A** Hyperplastischer Bereich mit extremer Hyperkeratose, Dyskeratose, Parakeratose und einer enormen Papillomatose. **B** Multiple Hohlräume, welche mit lamellierten konzentrisch arrangierten Keratinmassen gefüllt sind. **C, D** Milde Atypie in den suprabasalen Lagen mit vermehrten mitotischen Figuren und Kern-Hyperchromasie.

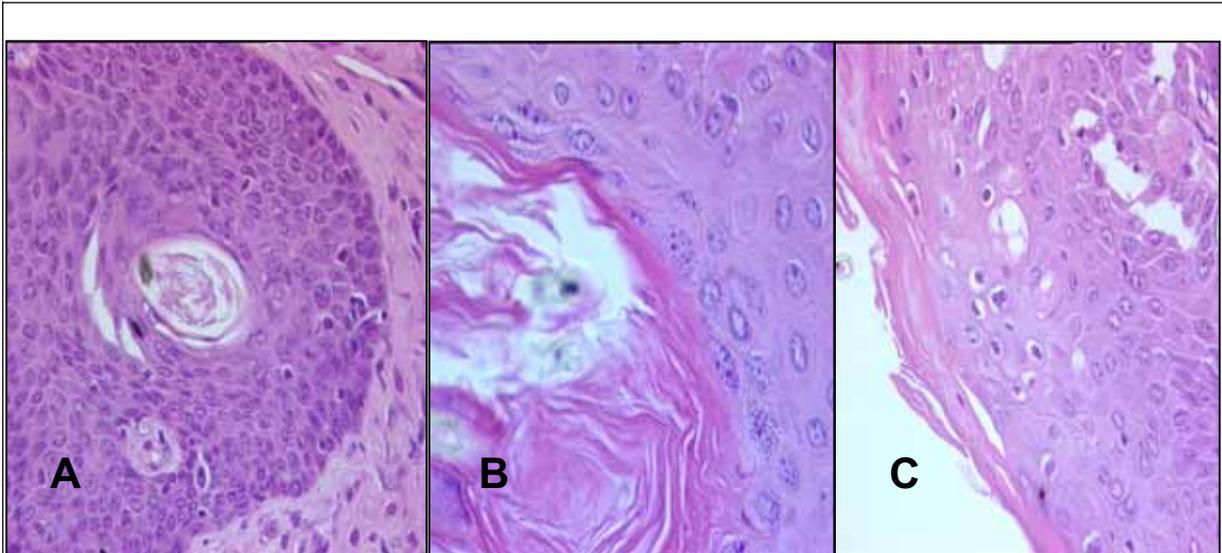


Abb.21: Ausschnitt aus einem 13 Wochen alten Tumor von Maus 9/3/6 (F2), welcher im Alter von ca. 9 Wochen entstand. **A** Anzeichen einer Anisonucleose und Kern-Hyperchromasie. **B** Keratohyalin-granula in den oberen epithelialen Schichten. **C** Areale, welche die für Papillomvirusinfektionen typische Koilozytose aufweisen.

4.3.2.2. Maligne Tumoren

In drei Fällen konnte die Histologie das Auftreten eines invasiven Plattenepithelkarzinoms zeigen. Abbildung 22 zeigt Maus 9/20 aus der F1-Generation im frühen Stadium der Tumorentwicklung, Abbildung 23 zeigt selbige Maus zu einem Zeitpunkt, als sie bereits ein invasives Karzinom entwickelt hat.

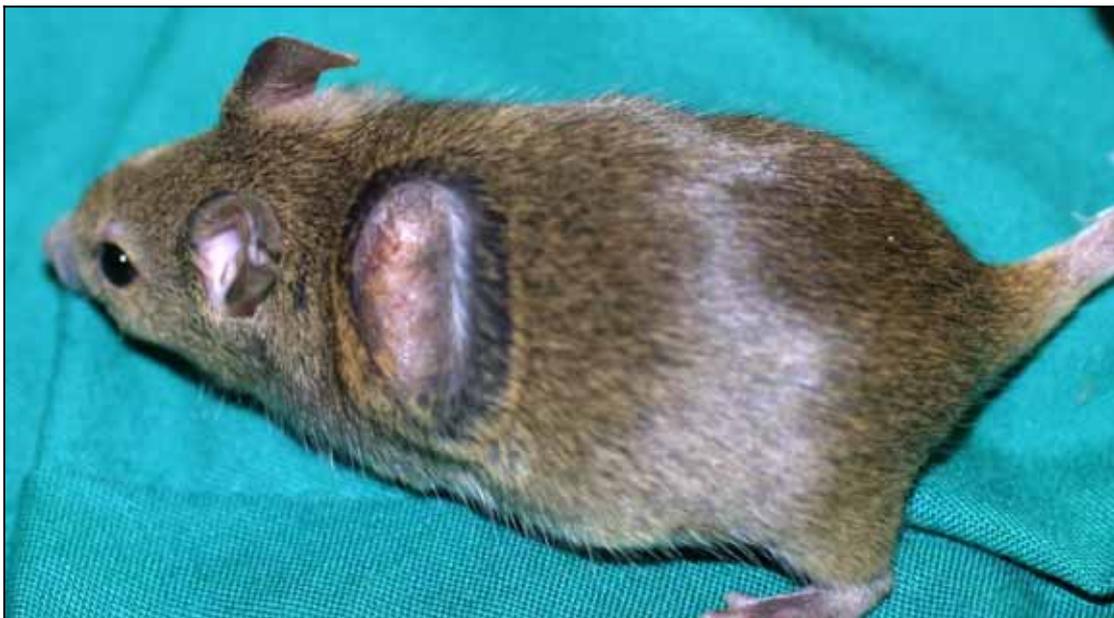


Abb.22: Maus 9/20 aus der F1-Generation. Die Entwicklung des Tumors begann im Alter von 51,3 Wochen.



Abb.23: Mit 65,3 Wochen wurde Maus 9/20 euthanasiert und ein invasives Plattenepithelkarzinom diagnostiziert.

Die Histologie der malignen Tumore zeigte eine z.T. plumpe, z.T. verzweigt- zapfige Invasionsfront mit desmoplastischer Stromareaktion und kaum lymphozytärer Begleitreaktion (Abb.24).

Die Tumorzellen zeigten deutliche Atypien mit Verschiebung der Kern-Plasma-Relation zugunsten des Zellkerns, Hyperchromasie und Anisonukleose. Die Kerne waren pleomorph. Es ließen sich vermehrt Mitosen finden, darunter auch atypische. In einem Areal konnte eine Invasion in die Muskulatur beobachtet werden.

Maus 9/30/3/3 aus der F3-Generation (nicht abgebildet) entwickelte im Alter von 10 Wochen einen Tumor. Nach weiteren 40 Wochen wurde sie euthanasiert und ein Plattenepithelkarzinom diagnostiziert.

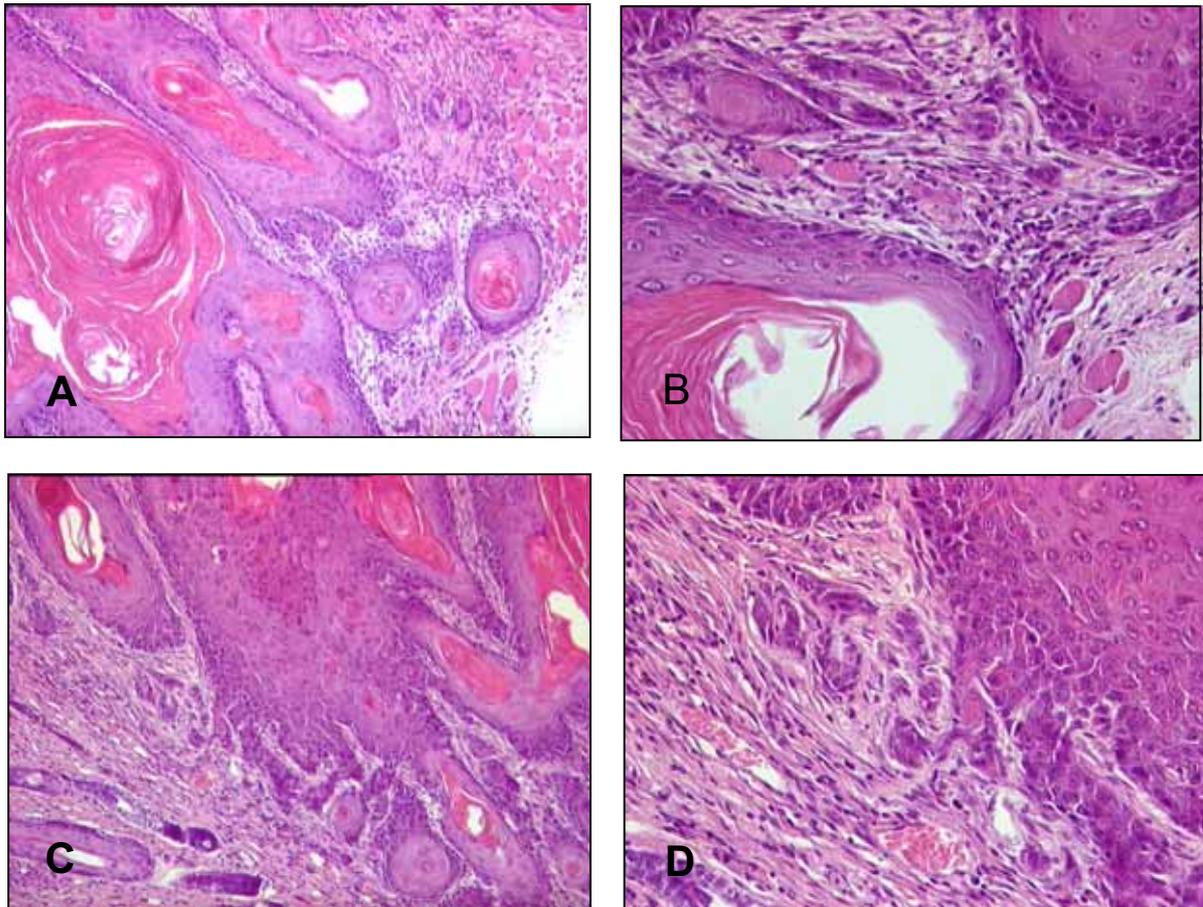


Abb.24: Invasives Karzinom von Maus 9/3/6/4 aus der F3-Generation. Die Maus entwickelte einen Tumor im Alter von 6 Wochen. Mit 38,2 Wochen wurde sie euthanasiert und ein invasives Karzinom diagnostiziert. **A, B** Plumpe Invasion in die Muskulatur. **C, D** Invasion der Keratinozyten in das Bindegewebe.

4.4. Neu etablierte Protokolle der Echt-Zeit-PCR zur Bestimmung der Kopienzahl des Transgens pro Zelle sowie zum Nachweis und zur Quantifizierung der mRNA der Gene E2, E6 und E7 von HPV8

Um quantitative Aussagen zur Transgenmenge und Expression des Transgens machen zu können, wurden Echt-Zeit-PCR-Protokolle entworfen. Gearbeitet wurde mit dem LightCycler (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) unter Verwendung des Fluorophors Sybr Green. Dabei diente das single copy-Gen β -Actin als Bezugsgen für die Bestimmung der Kopienzahl des Transgens pro Zelle und als zelluläres Bezugsgen für die Vergleiche der Expression der HPV8-Gene. Die Protokolle und die physikalischen Parameter eines Standardprotokolls sind unter 3.7.2. angegeben. Die Besonderheiten einzelner Protokolle sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Die Sequenz der Oligonukleotidprimer wurden wie bei 4.2.1. angegeben gewählt. Die Sequenzen der neu etablierten Oligonukleotidprimer sind in Tabellen 12 und 17 zusammengefasst.

Zielgen	T _{ann.} ¹ [°C]	Mg ²⁺ [mM]	Besonderheiten
β-Actin	55	3,0	Touch Down (3.7.2.)
HPV8-E2	56	3,0	
HPV8-E6	56	4,0	
HPV8-E7	56	4,0	

Tabelle 11: Annealingtemperaturen (T_{ann.}) und Magnesiumchloridkonzentrationen individueller Primersysteme für die Echt-Zeit-PCR mit dem Fluorophor Sybr Green.

4.4.1. Quantifizierung der Transgenzahl pro Mauszelle

Um die Anzahl der transgenen Integrate pro Zelle bestimmen zu können, wurde sowohl eine quantitative β-Actin-PCR (4.4.1.1.) als auch eine quantitative HPV8-spezifische PCR (4.4.1.2.) durchgeführt.

4.4.1.1. Echt-Zeit-Fluoreszenz-PCR für die Quantifizierung des β-Actin-Gens

Das single copy-Gen β-Actin diente sowohl als Bezugsgen für die Bestimmung der Kopienzahl des Transgens pro Zelle als auch als zelluläres Bezugsgen für die Vergleiche mit der Expression der HPV8-Gene (4.4.2.3.). Die Quantifizierung des single-copy-Gens β-Actin ermöglicht die Aussage, wie vielen Zellen die DNA in einem bestimmten Volumen einer Zellaufarbeitung entspricht. Die Bestimmung der Menge des Transgens derselben Zellaufarbeitung erlaubt dann die Berechnung der Menge der Transgenkopien pro Mauszelle. Zum anderen kann die Menge der revers-transkribierten β-Actin-mRNAs einer Gewebeaufarbeitung als Bezugspunkt für die Analyse der RNA-Spiegel der einzelnen Transgene in den unterschiedlichen Geweben und zum Vergleich unterschiedlicher Mäuse bzw. Mauslinien dienen (4.4.2.3.). Außerdem diente der Nachweis revers transkribierter β-Actin-mRNA als Positivkontrolle der RNA-Extraktion und der reversen Transkription (4.4.2.2.). Die für diese Aufgaben etablierten Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tabelle 12 angegeben.

Funktion	Name	Oligonukleotidsequenz		Bindestelle im Genom *
		5'	3'	
5'-Primer	β-Actin fw	CCA GAG CAA GAG AGG TAT CCTGAC		Pos .254-277
3'- Primer	β-Actin bw	CAT TGT AGA AGG TGT GGT GCC AG		Pos.335-358

Tabelle 12: Primer für die quantitative β-Actin –PCR. Die Positionsangaben im β-Actin-Gen folgen den Angaben des Sequenzeintrags mit der Accession-Nummer NM_007393 (NCBI).

Die Sensitivität des Protokolls wurde mit einer zehnfach-Verdünnungsreihe von genau quantifizierter Mausschwanz-DNA (3.5.1.1.) bestimmt und lag bei ≤13 Kopien. Die Spezifität des Protokolls für das β-Actin-Gen wurde gelelektrophoretisch überprüft. Dabei zeigte sich die erwartete prominente Bande von 105 bp (Abb. 25). Der linear quantifizierbare Bereich erstreckte sich von 13 bis 13100 Kopien. In Abbildung 26 sind exemplarisch für β-Actin die Graphen der Fluoreszenzwerte gegen die Zykluszahl der Verdünnungsreihe und von 4 Maus-DNA Proben dargestellt.

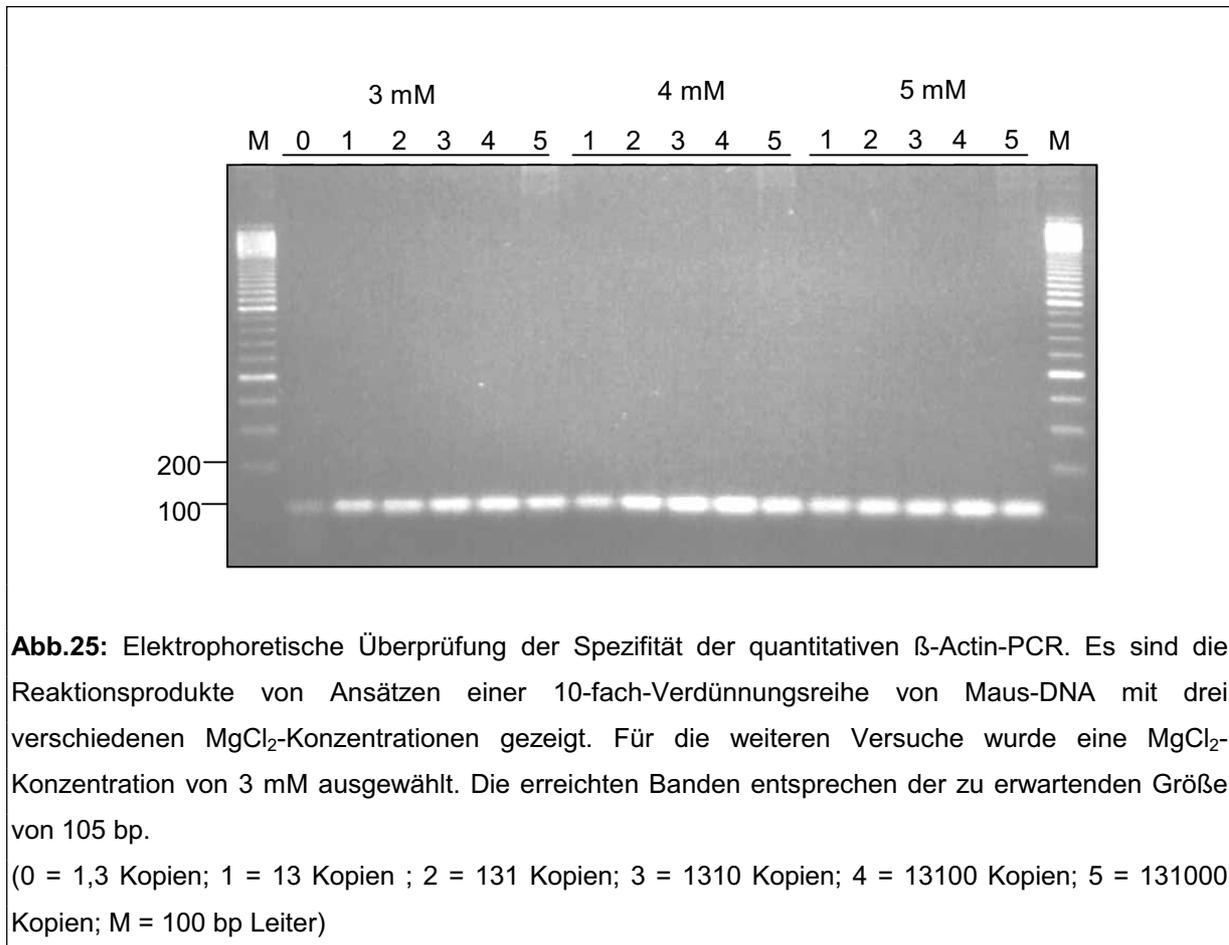


Abb.25: Elektrophoretische Überprüfung der Spezifität der quantitativen β-Actin-PCR. Es sind die Reaktionsprodukte von Ansätzen einer 10-fach-Verdünnungsreihe von Maus-DNA mit drei verschiedenen MgCl₂-Konzentrationen gezeigt. Für die weiteren Versuche wurde eine MgCl₂-Konzentration von 3 mM ausgewählt. Die erreichten Banden entsprechen der zu erwartenden Größe von 105 bp.

(0 = 1,3 Kopien; 1 = 13 Kopien ; 2 = 131 Kopien; 3 = 1310 Kopien; 4 = 13100 Kopien; 5 = 131000 Kopien; M = 100 bp Leiter)

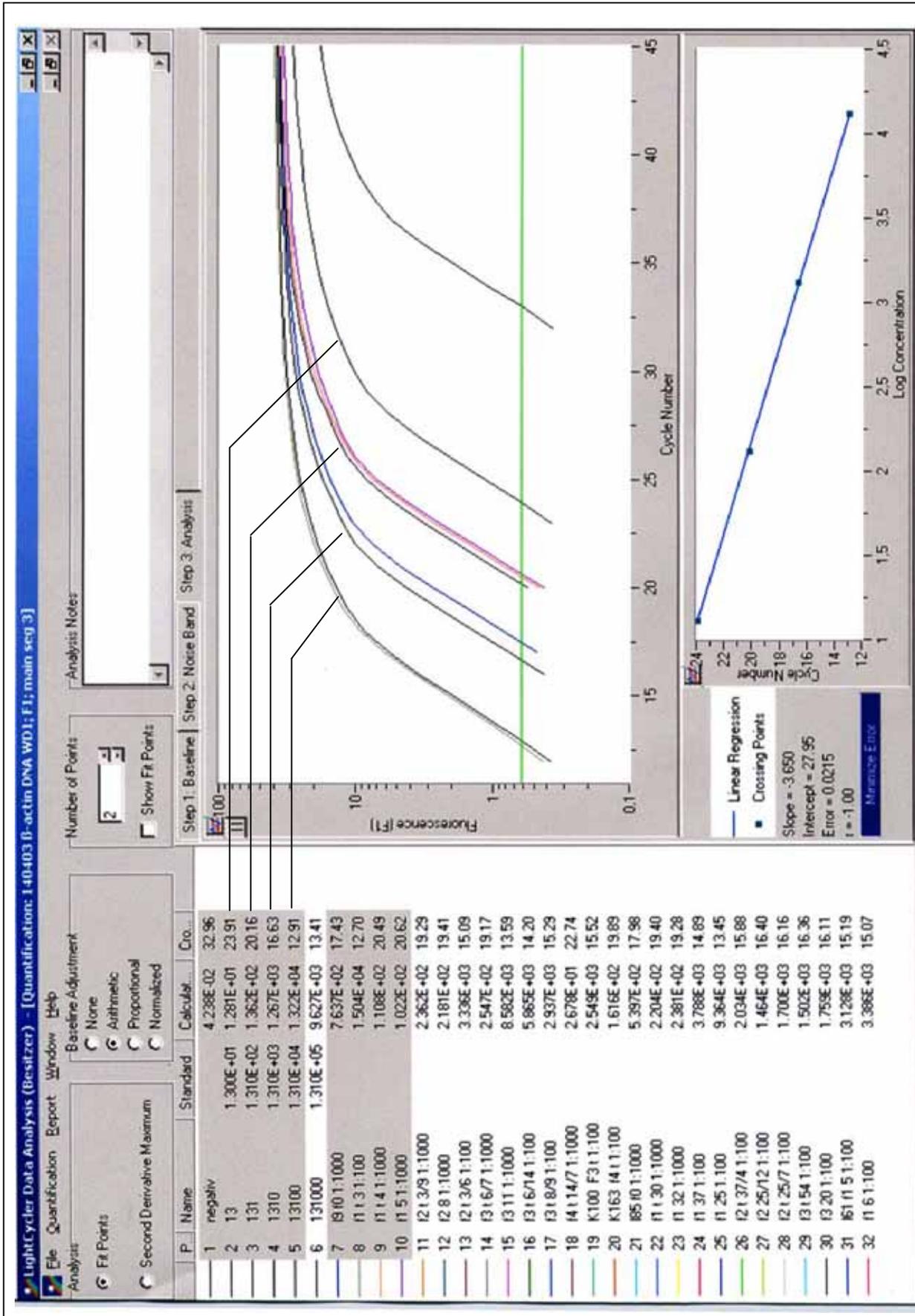


Abb. 26: Exemplarische Darstellung der Auswertung der β-Actin-Echtzeit PCR der DNA von 4 Mäusen (1/100 bzw. 1/1000-Verdünnung). Es wurden eine Negativkontrolle (H₂O) und eine Maus-DNA-Verdünnungsreihe (13-13100 Kopien) mitgeführt.

4.4.1.2. Echt-Zeit-Fluoreszenz-PCR für die Quantifizierung des HPV8-E6-Gens

Das neu etablierte Protokoll für die Quantifizierung von HPV8-E6 diente zum einen der Quantifizierung der pro Mauszelle integrierten HPV8-Transgenkonstrukte für die einzelnen Mauslinien und zum anderen dem exemplarischen Nachweis der transkriptionellen Aktivität des Transgenkonstrukts (4.4.2.3.).

Für die Quantifizierung des Transgens wurde stellvertretend für das HPV8-Konstrukt die Menge der HPV8-E6-Kopien ermittelt und in Bezug zu der ermittelten β -Actin-Kopienzahl gesetzt. Die Sequenzen der Primer sind in Tabelle 17 und die Überprüfung der Spezifität für die HPV8-Echt-Zeit-Fluoreszenz-PCR in Abbildung 29 angegeben.

Um die Zahl der Integrate pro Zelle bestimmen zu können, wurden die ermittelten Kopienzahlen für die E6-PCR durch die halbe β -Actin-Kopienzahl dividiert. Dementsprechend wurden die Transgenlasten bzw. Integrationshäufigkeit als Transgenkopie/Mauszelläquivalent definiert. Insgesamt wurden 25 Mäuse getestet. Diese wurden so ausgewählt, dass sowohl jede Linie als auch jede Generation und sowohl Mäuse ohne Tumor als auch mit Tumor mit einbezogen wurden. Dabei lagen die Werte der individuellen Mäuse zwischen 27,3 und 106,9, in einem Fall (85/30) sogar bei 442. Die Ergebnisse der Quantifizierung der Transgenzahl pro Mauszelle sind in den Tabellen 13-16 dargestellt. Dabei zeigte sich interessanterweise im exakten Mann-Whitney-Test allgemein eine starke Tendenz ($p=0,065$, einseitig) für höhere Transgenlasten bei Mäusen mit Tumor (Median 63,5) gegenüber Mäusen ohne Tumor (Median 47,2). Diese Tendenz stellte sich für die Linie 9, von der die Lasten von 12 Mäusen bestimmt wurden, als signifikant heraus ($p=0,012$). Hier lag die mediane Transgenlast bei 39,4 für Tumor-negative Mäuse und bei 59,9 für Tumor-positive Mäuse.

4.4.2. Nachweis und Quantifizierung der mRNAs der frühen Gene E2, E6 und E7 von HPV8

Eine wichtige Fragestellung war der Vergleich der transkriptionellen Aktivität der einzelnen Transgene zueinander und in den unterschiedlichen Geweben. Um die Expression des Transgens in Zellen des Epithels zu untersuchen, wurde von drei Mäusen RNA aus jeweils einer Probe Haut, Tumor und Leber isoliert (3.6.1.).

Generation	Maus-Nr.	Integrations- häufigkeit	Tumorstatus
F1	9/5	27,3	neg.
	9/3	44,3	pos.
F2	9/3/8	40	neg.
	9/3/6	57,4	pos.
F3	9/3/6/11	42,3	neg.
	9/522/4/1	38,7	neg.
	9/3/8/9	28,8	pos.
	9/3/6/7	69,2	pos.
	9/3/6/14	57,4	pos.
F4	9/3/6/4	62,3	pos.
	9/3/6/14/7	100,4	pos.
	9/3/6/5/6	106,9	pos.

Tabelle 13: Integrationshäufigkeit der Transgene pro Mauszelle von Linie 9 unter Berücksichtigung des Tumorstatus.

Generation	Maus-Nr.	Integrations- häufigkeit	Tumorstatus
Fo	85	57,9	pos.
F1	85/25	83,9	neg.
F2	85/25/7	73,3	pos.
F3	85/25/7/20	73,7	neg.

Tabelle 14: Integrationshäufigkeit der Transgene pro Mauszelle von Linie 85 unter Berücksichtigung des Tumorstatus.

Generation	Maus-Nr.	Integrations- häufigkeit	Tumorstatus
F0	85	57,9	pos.
F1	85/32	95,6	pos.
	85/37	94	neg.
	85/30	442,1	pos.
F2	85/37/4	58	pos.
F3	85/37/4/54	32,1	pos.

Tabelle 15: Integrationshäufigkeit der Transgene pro Mauszelle von Linie 85 Bl6 unter Berücksichtigung des Tumorstatus.

Generation	Maus-Nr.	Integrations- häufigkeit	Tumorstatus
F1	61/5	50,4	neg.
	61/6	35,9	neg.
F2	61/5/4	47,2	neg.
	61/6/3	64,7	pos.

Tabelle 16: Integrationshäufigkeit der Transgene pro Mauszelle von Linie 61 unter Berücksichtigung des Tumorstatus.

4.4.2.1. Überprüfung der Qualität der RNA-Isolation

Zum Nachweis einer erfolgreichen Extraktion (3.6.1.) wurde die RNA auf ein Formaldehyd-Gel (3.6.2.) aufgetragen. Die eukaryotischen Ribosomen enthalten 4 rRNA-Arten, von denen die beiden größeren (18 S und 28 S) (Knippers, 1997) auf dem Gel erkannt werden können und somit eine erfolgreiche Extraktion bestätigen. In Abbildung 27 ist der Auftrag von 7,5 µl der RNA-Extraktion aus Organen und Tumoren der Maus 9/3/6/5/4 dargestellt.

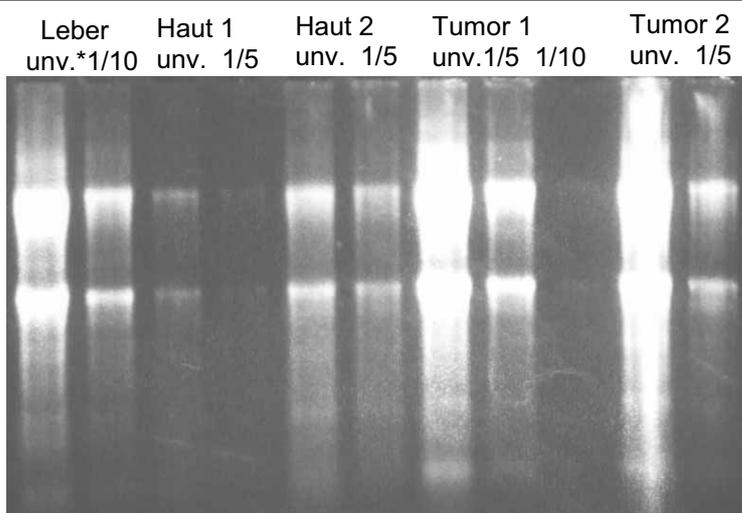


Abb.27: RNA-Gel zur Kontrolle der Qualität der RNA-Isolation. Aufgetragen sind RNA aus Leber, Haut und Tumor, jeweils in verschiedenen Konzentrationen von Maus 9/3/6/5/4.
 * unv. = unverdünnte RNA; 1/5 = 5-fach verdünnte RNA; 1/10 = 10-fach verdünnte RNA

4.4.2.2. Überprüfung der reversen Transkription

Zum Nachweis einer erfolgreichen reversen Transkription von RNA mit Oligo-dT-Primern (OdT) (3.7.3.1.) wurde das ubiquitär exprimierte β -Actin-Gen durch quantitative PCR (4.4.1.1.) nachgewiesen. Dabei konnte für alle Proben ein spezifisches Fluoreszenzsignal gezeigt werden. Die Negativkontrollen der reversen Transkription (Wasser statt Template) waren immer negativ. Ohne reverse Transkription konnten keine β -Actin-Sequenzen in den RNA-Extrakten nachgewiesen werden.

4.4.2.3. Echt-Zeit-PCRs zum Nachweis und zur Quantifizierung der Transkripte der frühen Gene von HPV8

Zur Quantifizierung der Transkripte der Gene E2, E6 und E7 wurden sowohl eine β -Actin-PCR (4.4.1.1.) als auch HPV8-spezifische PCRs durchgeführt. Die Sequenzen der HPV8-spezifischen Primer für die Echt-Zeit-Fluoreszenz-PCRs sind in Tabelle 17 angegeben.

Funktion	Name	Oligonukleotidsequenz		Bindestelle Im Genom*
		5'	3'	
5'-Primer	HPV8E6 fw	GCG GCT TTA GGT	ATT CCA TTG C	Pos. 271- 292
3'-Primer	HPV8E6 bw	GCT ACA CAA CAA	CAA CGA CAA CAC G	Pos. 404- 428
5'-Primer	HPV8E7 fw	CCT GAA GTG TTA	CCA GTT GAC CTG C	Pos. 710- 734
3'-Primer	HPV8E7 bw	CAG TTG CGT TGA	CAA AAA GAC G	Pos. 848- 870
5'-Primer	HPV8E2 fw	AAC AGC CAC AAC	AAA CCG	Pos. 3410- 3427
3'-Primer	HPV8E2 bw	CGT ATC CAG GTC	CAG GTC CT	Pos: 3567- 3586

Tabelle 17: Primer für die PCR zur Quantifizierung der frühen Gene von HPV8.*Die Positionsangaben im HPV8-Genom folgen den Nummerierungen von Fuchs et al. (1986).

Die Sensitivität der HPV8-spezifischen Protokolle wurde mit einer Zehnfach-Verdünnungsreihe von HPV8-DNA bestimmt und lag bei allen Protokollen bei ≤ 100 Kopien. Die Spezifität der Protokolle wurde gelelektrophoretisch überprüft.

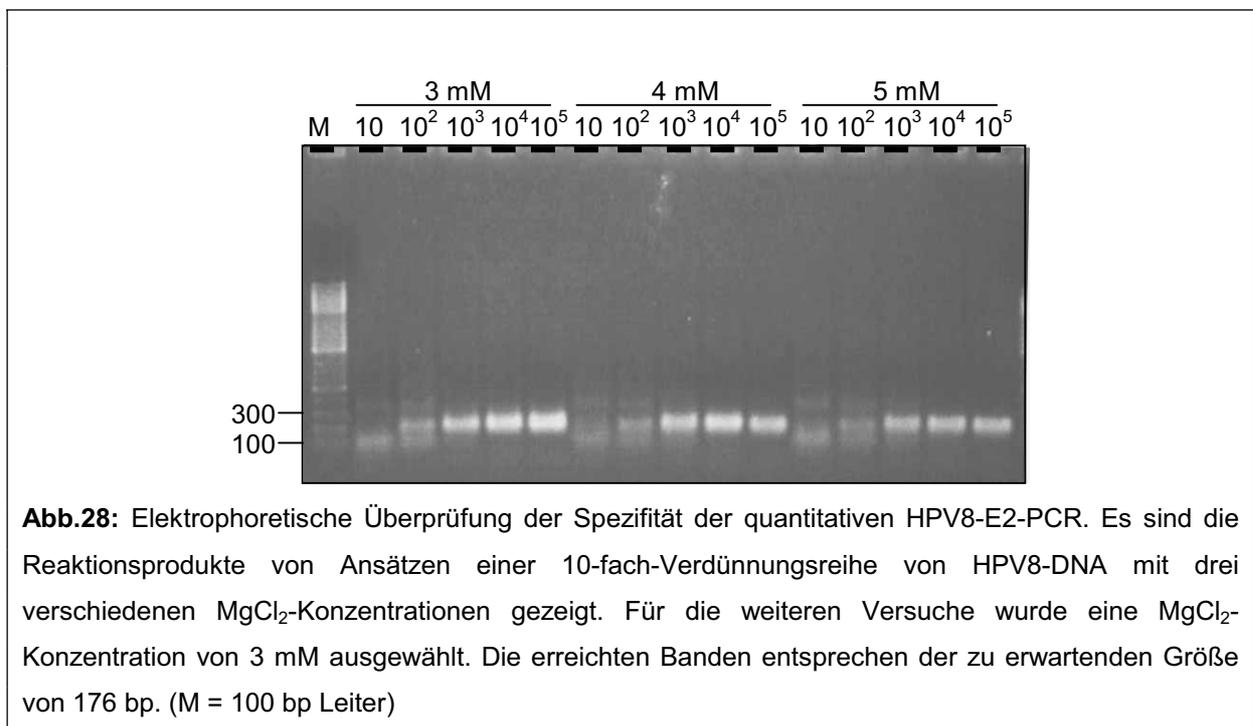


Abb.28: Elektrophoretische Überprüfung der Spezifität der quantitativen HPV8-E2-PCR. Es sind die Reaktionsprodukte von Ansätzen einer 10-fach-Verdünnungsreihe von HPV8-DNA mit drei verschiedenen $MgCl_2$ -Konzentrationen gezeigt. Für die weiteren Versuche wurde eine $MgCl_2$ -Konzentration von 3 mM ausgewählt. Die erreichten Banden entsprechen der zu erwartenden Größe von 176 bp. (M = 100 bp Leiter)

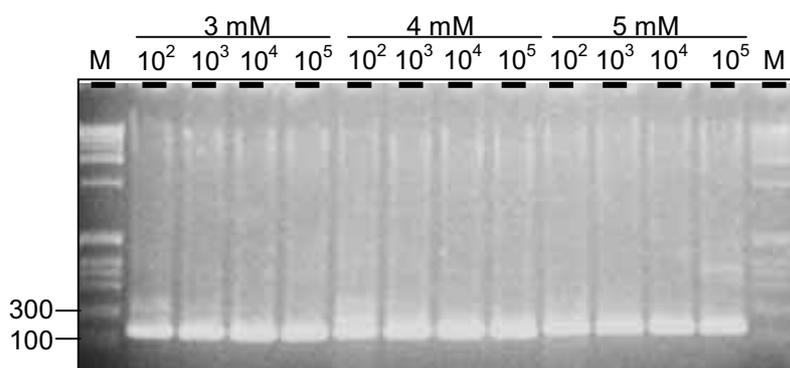


Abb.29: Elektrophoretische Überprüfung der Spezifität der quantitativen HPV8-E6-PCR. Es sind die Reaktionsprodukte von Ansätzen einer 10-fach-Verdünnungsreihe von HPV8-DNA mit drei verschiedenen $MgCl_2$ -Konzentrationen gezeigt. Für die weiteren Versuche wurde eine $MgCl_2$ -Konzentration von 4 mM ausgewählt. Die erreichten Banden entsprechen der zu erwartenden Größe von 133 bp. (M = 100 bp Leiter)

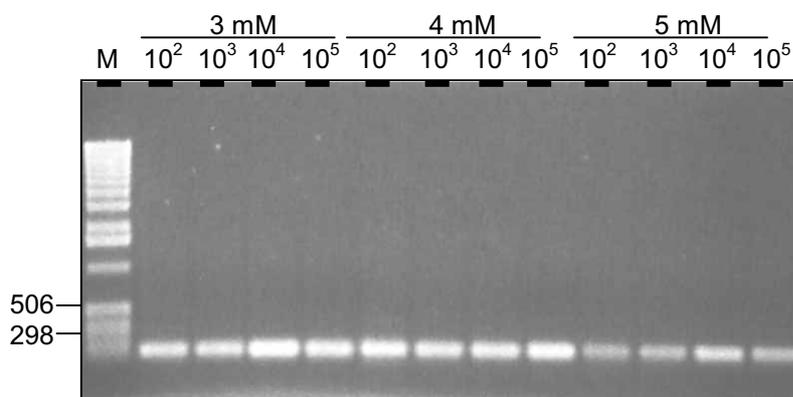


Abb.30: Elektrophoretische Überprüfung der Spezifität der quantitativen HPV8-E7-PCR. Es sind die Reaktionsprodukte von Ansätzen einer 10-fach-Verdünnungsreihe von HPV8-DNA mit drei verschiedenen $MgCl_2$ -Konzentrationen gezeigt. Für die weiteren Versuche wurde eine $MgCl_2$ -Konzentration von 4 mM ausgewählt. Die erreichten Banden entsprechen der zu erwartenden Größe von 160 bp. (M = 1 kb Leiter)

Es zeigten sich jeweils die erwarteten prominenten Banden (Abb. 28-30).

Der quantifizierbare Bereich erstreckte sich von 100 bis 1000000 Kopien. In Abbildung 31 sind exemplarisch für das HPV8-E7-Gen die Graphen der Fluoreszenz gegen die Zykluszahl dargestellt.

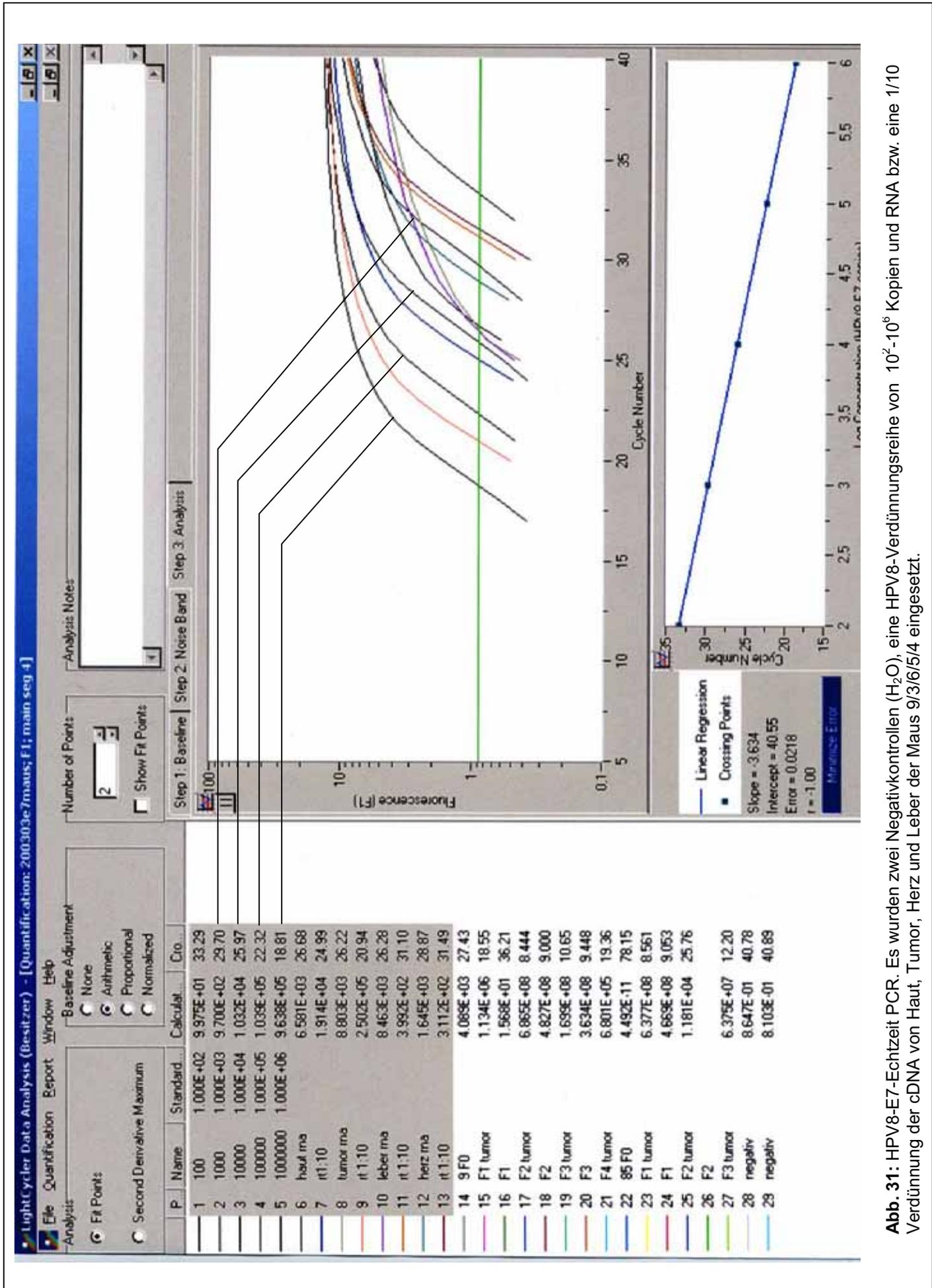


Abb. 31: HPV8-E7-Echtzeit PCR. Es wurden zwei Negativkontrollen (H₂O), eine HPV8-Verdünnungsreihe von 10²-10⁶ Kopien und RNA bzw. eine 1/10 Verdünnung der cDNA von Haut, Tumor, Herz und Leber der Maus 9/3/6/5/4 eingesetzt.

Um RNA von DNA-Verunreinigungen zu unterscheiden, wurden sowohl die reine RNA als auch die revers transkribierte RNA mittels Echt-Zeit-PCR untersucht. Die ermittelte Kopienzahl bei der Untersuchung von nicht revers transkribierter RNA wurde von der Kopienzahl von mRNA subtrahiert, um die reine Transkriptmenge zu bestimmen. Positive Werte weisen die revers transkribierte RNA und somit eine Expression des Transgens nach. Exemplarisch wurden drei Mäuse (Maus 9/3/6/5/6, Maus 9/3/6/4 und Maus 85) auf mRNA der frühen Gene E2, E6 und E7 von HPV8 untersucht. Die Mäuse wurden so gewählt, dass nach Möglichkeit aus jeder Mauslinie ein Tier in die Untersuchungen einbezogen wurde. Aus Linie 61 konnte kein Tier untersucht werden, da zum Zeitpunkt der Untersuchung aus dieser Linie noch keine Maus euthanasiert worden war und somit keine entsprechenden Proben zur Verfügung standen. Von jeder untersuchten Maus wurden jeweils drei Proben von Haut, Tumorgewebe und Leber untersucht. Nach der reversen Transkription (RT) der extrahierten RNA (3.7.3.1.) mit Oligo-dT-Primern (OdT) wurden von jeder zu testenden Maus sowohl quantitative PCRs der RNA (2 µl) als auch der cDNA nach der RT-Reaktion (2µl bzw. Verdünnungen bis zu 1/1000) durchgeführt. Bei allen drei Mäusen konnte in Haut und Tumorgewebe eine Expression von E6 nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu waren in der Leber keine E6-mRNA-Kopien nachweisbar. Die Expression von E7 konnte ebenfalls in der Haut und in Tumorgewebe nachgewiesen werden. Außerdem zeigte sich bei zwei Mäusen eine geringe E7-Expression in der Leber. Gleiches galt auch für die E2-Expression. Um nun eine relative Quantifizierung der mRNAs der frühen Gene E2, E6 und E7 von HPV8 durchzuführen, wurde zusätzlich eine quantitative β -Actin-PCR der cDNA und mRNA der genannten Proben durchgeführt (4.4.1.1.). Die Kopienzahlen der cDNA der einzelnen HPV-Gene sind in Tabelle 18 angegeben. Bei der Maus 9/3/6/4, die einen invasiven Tumor entwickelt hatte, lag in unauffälliger Haut die Expression von E2 um das 10-50 fache, von E6 um das 10-fache und von E7 um das 15-35-fache höher als bei den Mäusen mit nicht invasiven Tumoren. Die Expression von E2, E6 und E7 im Tumorgewebe hingegen war vergleichbar bzw. leicht reduziert. Weiterhin zeigte sich bei beiden Mäusen mit nicht invasiven Tumoren im Tumorgewebe eine 10-20-fach höhere E2-Expression, eine 10-fach höhere E6-Expression und eine 20-30-fach höhere E7-Expression im Vergleich zur unauffälligen Haut. Im Gegensatz dazu zeigt sich bei Maus 9/3/6/4 eine leicht reduzierte Expression der untersuchten Gene im Tumorgewebe im Vergleich zur unauffälligen Haut.

Bei Vergleichen der Expressionsraten der einzelnen Gene zueinander wurde festgestellt, dass die E7-Expressionsrate im Verhältnis zur E6-Expressionsrate in der Haut um den Faktor 2-5 und im Tumorgewebe um den Faktor 5-7 höher lag. Die E2-Expressionsrate lag ihrerseits in der Haut um den Faktor 40-150 und im Tumorgewebe um den Faktor 70-190 höher als die E6- Expressionsrate. Im Verhältnis zur E7-Expressionsrate lag die E2-Expressionsrate in der Haut um den Faktor 20-50 und im Tumorgewebe um den Faktor 10-30 höher. Detaillierte Daten sind in Tabelle 18 wiedergegeben.

cDNA-Kopien des HPV8-Gens pro cDNA-Kopien β -Actin									
Maus Transgen/Zelle	9/3/6/5/6* 26,7			9/3/6/4** 15,6			85* 14,5		
Material	Haut	Tumor	Leber	Haut	Tumor	Leber	Haut	Tumor	Leber
Gen									
E2	0,02	0,41	10 ⁻³	1,1085	0,7205	0,02	0,1349	1,4218	0
E6	0,0006	0,0059	0	0,0076	0,0043	0	0,0009	0,0076	0
E7	0,0011	0,0328	10 ⁻⁴	0,039	0,026	10 ⁻⁴	0,0027	0,0533	0
E7/E6	1,92	5,51		5,15	6,14		3,02	7,05	
E2/E6	40,95	69,46		146	168,86		152,6	188,1	
E2/E7	21,28	12,6		28,34	27,51		50,5	26,7	

Tabelle 18: Expressionsspiegel der Gene E2, E6 und E7 in Haut, Tumor und Leber der drei untersuchten Mäuse (* = benigner Tumor; ** = maligner Tumor).

4.5. PCR für die p53-Mutationsstudie

Da im Zusammenhang mit Hauttumoren bei Menschen gehäuft Mutationen der p53-Gensequenz der Exons 4–9 beobachtet wurden (Basset-Seguín et al., 1994), sollten die analogen Sequenzenabschnitte der Maus per PCR amplifiziert, sequenziert und anschließend überprüft werden. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tabelle 19, die physikalischen Parameter des PCR-Protokolls in Tabelle 20 angegeben. Der PCR-Ansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

DNA-Matrize	1µl des Eluats aus (3.5.1.1.)
Primer I	0,3µM
Primer II	0,3µM
dNTPs	0.3 mM
Taq-Polymerase (Pharmacia)	1 U
H ₂ O	ad 50 µl

Funktion	Name	Oligonukleotidsequenz		Bindestelle im Genom *
		5'	3'	
5'-Primer	Exon 4 fw 71	TAG GCT GAG AAC ACA	GTC CTG AGG	Pos. 7345-7368
3'- Primer	Exon 4 bw 2	GCA TTG AAA GGT CAC	ACG AAA GAC	Pos. 7674-7697
5'- Primer	Exon 5 fw 12	CCT GAT CGT TAC TCG	GCT TGT C	Pos. 8331-8352
3'- Primer	Exon 5 bw 1	CAA CTG TCT CTA AGA	CGC ACA AAC C	Pos. 8776-8800
5'- Primer	Exon 7 fw 1	TGT AGT GAG GTA	GGG AGC GAC TTC	Pos.9112-9135
3'- Primer	Exon 7 bw 2	GGG TAG GAA CCA	AAG AGC GTT G	Pos. 9362-9383
5'- Primer	Exon 8+9 fw 12	GCA GAT ATG ACA AGA	GGG GTT GG	Pos. 9482-9504
3'- Primer	Exon 8+9 bw 2	GCG AGA GAC AGA	GGC AAT AAT GG	Pos.9924-9946

Tabelle 19: Primer für die p53-spezifische PCR der Exons 4, 5, 7, 8 und 9 von.

*Die Positionsangaben im p53-Gen folgen den Angaben des Sequenzeintrags mit der Accession-Nummer NT 039520 (NCBI).

	Denaturierung (95°C)	Primerannealing	DNA-Synthese (72°C)
1	3 min	_____	_____
35	30 sec	90 sec/60°C	1,5 min
1	_____	_____	10 min

Tabelle 20: Physikalische Parameter der p53-spezifischen PCR

Es wurde DNA aus dem Karzinom der Maus (9/3/6/4) der F3-Generation, Schwanz-DNA einer HPV8-positiven Maus mit Tumor (9/4), Schwanz-DNA einer HPV8 positiven Maus ohne Tumor (9/5) sowie Schwanz-DNA einer HPV8-negativen (9/9) Maus untersucht. Von jeder Probe wurden die Exons 4, 5, 7 und 8/9 von p53 amplifiziert (Abb.32).

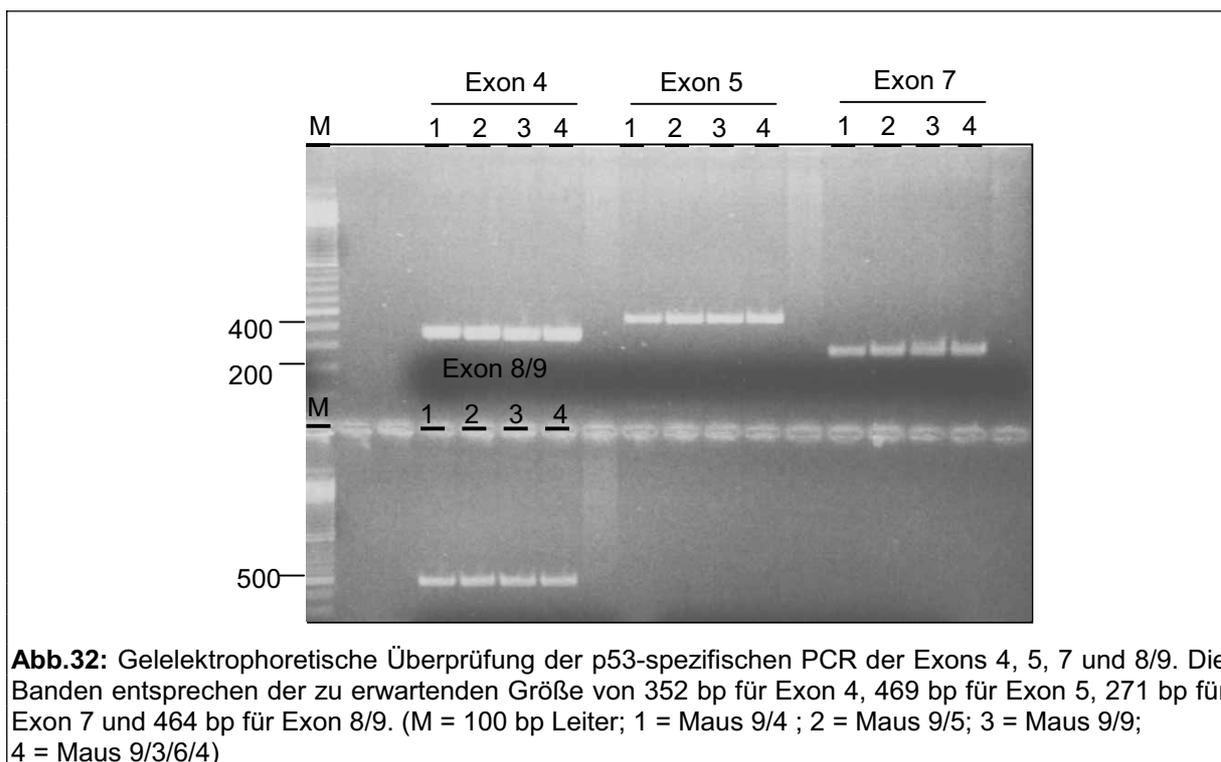


Abb.32: Gelelektrophoretische Überprüfung der p53-spezifischen PCR der Exons 4, 5, 7 und 8/9. Die Banden entsprechen der zu erwartenden Größe von 352 bp für Exon 4, 469 bp für Exon 5, 271 bp für Exon 4, 464 bp für Exon 8/9. (M = 100 bp Leiter; 1 = Maus 9/4 ; 2 = Maus 9/5; 3 = Maus 9/9; 4 = Maus 9/3/6/4)

Die Amplimere wurden nach Aufreinigung (3.5.3.) sequenziert (3.8.) und mittels der Web-gestützten Software Blast (3.9.) mit den Referenzsequenzen verglichen. Es zeigte sich für alle untersuchten Mäuse der p53-Wildtyp.

V. Diskussion

Der Nachweis von HPV-DNA in malignen Hauttumoren von EV-Patienten und jüngst auch in PEC von immunsupprimierten und immunkompetenten Patienten (Harwood et al., 2000) warf die Frage nach einer kausalen Beteiligung von Papillomviren bei der Entstehung dieser Tumoren auf (McGregor und Proby, 1996). In einer kleinen Zahl von in vitro-Studien konnte für die frühen Proteine E2, E6 und E7 kutaner Papillomviren zelltransformierendes Potential gezeigt werden (Iftner et al., 1988; Kiyono et al., 1992; Roth, 2000). Die in vivo Relevanz von HPVs bei der Hautkarzinomentstehung blieb jedoch ungeklärt.

Um das Studium der Konsequenzen der Expression der frühen Gene von HPV8 in vivo zu ermöglichen, wurde in dieser Arbeit ein transgenes Mausmodell etabliert. Hierzu wurde die Methode des „Random integration“ durch Mikroinjektion in den männlichen Vorkern einer befruchteten Eizelle gewählt. Diese Methode hat den Vorteil, dass die Integration in der Regel im Einzellstadium erfolgt und der Integrationsort für jede Maus ein anderer ist. Somit bleibt die Entstehung genetischer Mosaik in der Regel aus und jede Maus begründet eine eigene Linie (Gordon und Ruddle, 1983; Palmiter und Brinster, 1985). Zur Nachstellung der natürlichen in vivo Situation wurde die Expression der Transgene mit Hilfe des keratinozyten-spezifischen humanen K14-Promotors gezielt auf die sich teilenden Zellen der Epidermis beschränkt. Dabei wurden der gesamte frühe Genabschnitt von HPV8 (Gene E1-E7), Teile der NCR und des L2-Leserahmens verwendet.

Insgesamt wurden durch Mikroinjektion 115 Mäuse der sogenannten F0-Generation erzeugt. Von diesen konnten 13 (11,3%) mittels PCR als Transgen-positiv identifiziert werden. Dazu wurden stellvertretend für das Transgen die offenen Leserahmen von HPV8-E6 und E7 mittels eines neu entwickelten PCR-Protokolls amplifiziert. Die Ausbeute an Transgen-positiven Mäusen entsprach in etwa der zu erwartenden Erfolgsrate der Mikroinjektion. Im Maussystem überleben ca. 65% der fertilisierten Eier die Injektionsprozedur. Davon entwickeln sich jedoch nur 25% der implantierten Eier zu lebensfähigen Nachkommen. Von diesen Nachkommen sind wiederum lediglich ca. 25% transgen (Dingermann, 1999). Die Integration des Transgens in das Mausgenom konnte mittels Southern Blot gezeigt werden. Zur Demonstration der funktionellen Aktivität des Transgens wurden Echt-Zeit-PCR Protokolle mit Sybr Green als Fluorophor entwickelt, welche sowohl den Nachweis

als auch eine Quantifizierung von mRNA für die papillomaviralen Proteine E2, E6 und E7 ermöglichen. Bei allen untersuchten Tieren war der Nachweis von mRNA für die papillomaviralen Proteine E2, E6 und E7 in Hautproben möglich. In geringem Maße konnten mRNAs für E2 und E7 auch in der Leber nachgewiesen werden. Dies zeigt eine sehr schwache Aktivität des Keratin14-Promotors auch in diesem Gewebe an.

Vier Transgen-positive F0-Mäuse (9, 61, 85 und 88) wurden für die Zucht und Verpaarung mit FVB/N bzw. Bl6 Wildtyp-Mäusen gewählt. Die Nachkommen wurden nach dem Absetzen jeweils auf das Vorhandensein des Transgens untersucht. Interessanterweise waren alle Nachkommen der Maus 88 Transgen-negativ. Hier ist offenbar die Integration des Transgens erst im Mehrzellstadium erfolgt und ein so genanntes genetisches Mosaik entstanden. Dabei enthielten die Keimbahnzellen nicht das Transgen. Die andauernde Züchtung der drei anderen Linien lieferte bis dato insgesamt 349 Nachkommen aus bis zu fünf Generationen (Linie 9). Von diesen waren 179 (51%) Transgen-positiv. Diese Zahl entspricht dem erwarteten Anteil transgener Nachkommen von 50% nach den Gesetzen der Mendelschen Vererbung bei der Kreuzung Transgen-heterozygoter Mäuse mit nicht transgenen Wildtyp-Mäusen.

Interessanterweise konnte bereits nach ca. 14 Wochen bei einer Maus der Founder-Generation (Nr.9) die Entwicklung eines Tumors beobachtet werden. Dieser zeigte die für eine Papillomvirusinfektion typischen Merkmale. Es entwickelte sich zunächst dorso-caudal eine Läsion mit Alopezie und schuppiger bis stark verhornter Haut. Diese anfänglichen Symptome breiteten sich diffus aus, Hyperplasie und Hyperkeratose verstärkten sich und es kam zur Entwicklung von Ulcera. Nach weiteren 11 Wochen musste die Maus euthanasiert werden. Im Laufe der Arbeit konnte eine solche Tumorentwicklung bei einer erstaunlichen Vielzahl von Transgen-positiven Mäusen (104/192; 54,2%) beobachtet werden. Dies zeigt das hohe zelltransformierende, proliferationsfördernde Potential von HPV8. Zum Teil zeigten sich bei den Mäusen auch disseminierte Auftreten von Tumoren sowie multifokale Tumorentwicklung. Das disseminierte Auftreten und besonders die multifokale Tumorentwicklung zeigen, dass Tumoren aus unabhängigen Vorläuferzellen entstehen. Dies unterstreicht die Feststellung eines hohen zelltransformierenden, proliferationsfördernden Potentials von HPV8 im transgenen Mausmodell.

Die Tumorentstehung war bei allen vier Linien zu beobachten. Diese stammen von drei verschiedenen Founder-Mäusen ab und weisen insofern sehr wahrscheinlich individuelle Integrationsloci auf. Im Gegensatz dazu konnte bei keiner der 170 Transgen-negativen Mäuse die Entwicklung eines Tumors beobachtet werden. Daher liegt es nahe, dass das Vorhandensein des funktionell intakten Transgens für die Tumorentwicklung verantwortlich ist.

In allen Linien zeigte sich, dass männliche Mäuse im Vergleich zu weiblichen Mäusen doppelt so häufig von Tumoren betroffen waren. Dieses Ergebnis ist vermutlich auf die Tatsache zurückzuführen, dass bei männlichen Tieren Rankämpfe stattfinden, welche bei weiblichen Tieren deutlich seltener vorkommen (Hetherington, 2000). Dabei kommt es im Verlauf der Kämpfe zu Verletzungen, welche, wie die Tumoren, vornehmlich die dorsalen und caudalen Regionen betreffen. Während bei HPV-negativen Mäusen derartige Verletzungen stets abheilen, entwickelten sich bei HPV-positiven Mäusen an den Orten dieser Verletzungen regelmäßig Tumore. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die komplexen zellulären Prozesse während einer Wundheilung einen zusätzlichen Stimulus für die Tumorentstehung darstellen. Hier wäre es in Zukunft von Interesse, die möglichen Interaktionen von zellulären, wundheilungsfördernden Faktoren (z.B. Zytokinen) und papillomaviralen Faktoren zu untersuchen. Die Voraussetzungen sind durch dieses Mausmodell geschaffen.

Der Vergleich der Tumorzinzidenz in den verschiedenen Generationen der individuellen Linien zeigte eine steigende Rate hin zu späteren Generationen. Dies konnte besonders deutlich bei der Linie 9 beobachtet werden. Dort stieg die Tumorraten von 52% in der F1-Generation über 58% in der F2-Generation zu 82 % in der F3-Generation. Die beobachteten niedrigeren Raten von 70% in der F4-Generation und 75% in der F5-Generation sind auf das noch recht geringe Alter der Mäuse in diesen Generationen zurückzuführen. Der exakte Test nach Spearman bestätigte diese tendenzielle Korrelation für die Generationen F1 bis F3 ($p=0,115$).

Die mit der Generation ansteigende Tumorfrequenz könnte auf die Rückkreuzung mit FVB/N-Wildtyp-Mäusen zurückzuführen sein. Dabei verschiebt sich der genetische Hintergrund von Generation zu Generation in Richtung FVB/N. Bereits Brown et al. (1995a) und Coussens et al. (1996) hatten eine höhere Neigung zur Tumorentstehung bei FVB/N-Mäusen im Vergleich zu B16-Mäusen in Experimenten mit HPV16 transgenen Mäusen festgestellt. Ein weiterer interessanter, in diese

Richtung weisender Punkt ist die Beobachtung, dass das mittlere Alter der Tumorentstehung bei der Linie 9 von 38,6 Wochen in der F1-Generation auf 7,6 Wochen in der F5-Generation sank. Dieser Trend erwies sich als signifikant ($p < 0,001$). Somit unterstützt das Modell der HPV8-transgenen Maus die Annahme einer erhöhten Suszeptibilität des FVB/N-Hintergrundes für die Tumorentstehung. Dass der genetische Hintergrund einen Einfluss auf die Tumorinzidenz hat, steht auch im Einklang mit der Beobachtung beim Menschen, dass eine HPV-abhängige Erkrankung zusätzliche Faktoren, insbesondere auch genetische Faktoren, neben der HPV-Präsenz benötigt (Eckert et al., 2000). In den anderen Linien (85, 85 Bl6, 61) können aufgrund der bisherigen verhältnismäßig geringen Anzahl der Nachkommen keine Schlussfolgerungen gezogen werden.

Bei der histologischen Beurteilung der benignen Läsionen zeigten sich flache Papillome mit extremer Hyperkeratose, Dyskeratose und Parakeratose. Die Epidermis war hyperplastisch und zeigte schwere Papillomatose, Akanthose und die für Keratoakanthome typischen Hornperlen. Es konnte zum Teil eine milde Atypie in den suprabasalen Lagen mit vereinzelt mitotischen Figuren, Kernhyperchromasie und milder Anisonukleose beobachtet werden. Es zeigten sich Koilozyten und runde, ovale oder irreguläre Keratohyalin granula in den dysplastischen Zellen des Stratum granulosum und Stratum spinosum. Im Unterschied zum invasiven Karzinom konnte ausschließlich exophytisches Wachstum beobachtet werden.

Bei drei FVB/N gekreuzten Mäusen der Linie 9 (9/20, F1, weiblich; 9/3/6/4, F3, männlich und 9/30/3/3, F3, männlich) kam es zur Entwicklung eines PECs. Neben den bereits geschilderten Veränderungen konnten hier zusätzlich eine deutliche Atypie der Zellen, zahlreiche mitotische Figuren und eine Invasion in die Dermis und Muskulatur beobachtet werden. Somit konnte erstmalig experimentell in vivo gezeigt werden, dass ein Epidermodysplasia verruciformis assoziiertes PV die maligne Transformation von Keratinozyten induziert.

In der Literatur werden bisher transgene Mausmodelle für das benigne Warzen-induzierende HPV1 und die mukotropen hoch-Risiko HPV-Typen 16 und 18 beschrieben (Eckert et al., 2000). Im Gegensatz zu der hier beschriebenen HPV8-transgenen Mauslinie wurden für HPV1-transgene Mäuse lediglich für eine der fünf Linien epitheliale Abnormalitäten beschrieben. Diese waren transient, traten in den ersten Lebenstagen und hauptsächlich am Schwanz auf und verschwanden erstaunlicherweise nach ca. drei Wochen (Tinsley et al., 1992). Die phänotypischen

Unterschiede dieses Modells im Vergleich zu dem hier etablierten sind dabei wohl nicht nur in dem mit gutartigen Läsionen assoziierten HPV-Genotyp zu suchen, sondern evtl. auch mit dem CBA/C57Bl Genotyp der verwendeten Mauslinie und dem verwendeten Keratin 6 Promotor assoziiert. Transgene Mäuse mit den E6 und/oder E7-Genen der mukotropen, eng mit dem Zervixkarzinom assoziierten HPV-Typen 16 und 18, denen wie bei dem hier beschriebenen Modell der K14-Promotor vorgeschaltet wurde, zeigten andere Ergebnisse. Während für HPV18 sowohl im IRCxFVB/N als auch im C57Bl/6xSJl Hintergrund lediglich die Entwicklung benigner Tumore beobachtet wurde, traten bei HPV16 im FVB/N Hintergrund auch maligne Tumore auf. Interessanterweise entwickelten HPV16-E6 transgene Mäuse nur in den zwei von fünf Linien, die hohe Transgenlasten aufwiesen, Tumore (~12%). Von diesen zeigten 57% bzw. 75% den malignen Phänotyp. Die Transgenlasten wurden aus Southern Blots abgeschätzt und lagen bei den Tumor-negativen Mäusen um 1-2 Kopien pro Zelle und bei den Tumor-positiven bei 15 und 20 Kopien pro Zelle. Des Weiteren zeigten Vergleiche von HPV16 E6-heterozygoten mit HPV16 E6-homozygoten Tieren, dass homozygote Tiere Tumore früher und mit einer höheren Inzidenz entwickelten als heterozygote Tiere. Ylitalo et al. (2000) zeigten, dass Frauen mit hohen HPV16-Lasten ein stark erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Zervixkarzinoms aufweisen. Weiterhin deuten die Ergebnisse von Weißenborn et al. (2003) darauf hin, dass das erhöhte Risiko zur Zervixkarzinomentwicklung HIV-positiver Frauen auf stark erhöhte HPV-Lasten zurückzuführen ist. Da in dem hier beschriebenen HPV8-Mausmodell nicht alle Wurfgeschwister eines Elternpaares Tumore entwickelten, stellte sich daher die Frage, ob dies eventuell mit einer unterschiedlichen Integrationshäufigkeit des Transgens zusammenhängt. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Linien und Generationen wurden 25 HPV8-transgene Mäuse mittels quantitativer PCR auf die Integrationshäufigkeit des Transgens getestet. Dazu wurden Echt-Zeit-Protokolle mit Sybr Green als Fluorophor entwickelt. Stellvertretend für das Transgen wurde das frühe Gen E6 von HPV8 quantifiziert. Um die Transgenhäufigkeit pro Zelläquivalent zu ermitteln, wurde weiterhin das single-copy Gen β -Actin bestimmt. Es zeigten sich dabei Integrationshäufigkeiten zwischen 27,3 und 106,9. Bei einer Maus der F1-Generation wurde eine Integrationshäufigkeit von 442 Transgenen pro Zelläquivalent gefunden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der zu erwartenden Integrationshäufigkeit von in der Regel 1-50 Kopien bis hin zu 1000 im Einzelfall

(Hammes und Schedl, 2000). Da bei jeder Kreuzung die zum Teil transgenen Chromosomen des einen Elternteils mit den nicht transgenen Chromosomen des anderen Elternteils vermischt werden, kann jedes der Wurfgeschwister eine unterschiedliche Anzahl der transgenen Chromosomen erhalten. Bei zwei Mäusen der F4-Generation der Linie 9 konnte eine ca. doppelt so hohe Integrationshäufigkeit, verglichen mit ihren Vätern aus der F3-Generation, gefunden werden. Dieses Ergebnis könnte eventuell auf eine Genduplikation hinweisen. Interessanterweise zeigte sich im exakten Mann-Whitney-Test allgemein eine starke Tendenz ($p=0,065$) für höhere Transgenlasten bei Mäusen mit Tumor gegenüber Mäusen ohne Tumor. Diese Tendenz stellte sich für die Linie 9 als signifikant heraus ($p=0,012$). Diese Ergebnisse bestätigen die oben erwähnten Beobachtungen. Weiterhin scheint es plausibel, dass hohe HPV-DNA-Lasten erhöhte zelluläre Konzentrationen der HPV-Onkogene zur Folge haben könnten und so zu einer erhöhten Transformationswahrscheinlichkeit führen.

Um einen evtl. Zusammenhang zwischen Integrationshäufigkeit des Transgens und Expressionswerten zu erkennen, wurden die Expressionsspiegel der frühen Gene E2, E6 und E7 im Verhältnis zur Kopienzahl der β -Actin-mRNA in gesunder Haut bei zwei Mäusen mit benignen Tumoren und einer mit malignem Tumor untersucht. Für Maus 9/3/6/5/6 mit der höchsten Integratzahl zeigten sich erstaunlicherweise die niedrigsten Expressionswerte. Die geringe Zahl diesbezüglich untersuchter Tiere lässt jedoch noch keinen Zusammenhang zwischen der Integrationshäufigkeit und den Expressionswerten herleiten.

Im nächsten Schritt wurden die Expressionsspiegel der einzelnen Gene in unauffälliger Haut und im Tumor verglichen. Trotz des präliminären Charakters der Ergebnisse dieser wenigen Untersuchungen lassen sich hier einige interessante Beobachtungen machen. Überraschenderweise zeigte sich, dass in unauffälliger Haut der Maus mit dem invasiven Tumor die Expression der Gene E2, E6 und E7 um das 10-50-fache höher lag als in unauffälliger Haut der Mäuse mit benignen Tumoren. Diese Beobachtung könnte auf epigenetische Veränderungen, wie Methylierung oder Acetylierung, zurückzuführen sein und könnte erklären, warum sich bei dieser Maus im Gegensatz zu den anderen ein Karzinom entwickelt hat. Die Expressionslevel der papillomaviralen Gene im Tumorgewebe waren im Gegensatz dazu bei allen Mäusen vergleichbar. Es zeigte sich, dass bei den Mäusen mit benignen Tumoren die Expression im Tumorgewebe von E2, E6 und E7 um das 10-

30-fache höher lag als in unauffälliger Haut, wohingegen bei der Maus mit dem invasiven Tumor, verglichen mit unauffälliger Haut, die Expression der einzelnen Gene im Tumorgewebe gleich bzw. sogar leicht erniedrigt war. Die höheren Expressionsspiegel in benignen Tumoren im Vergleich zu gesunder Haut können durch die Beobachtung von Proby et al. (1993) erklärt werden, wonach in Warzen im Vergleich zu unauffälliger Haut, in der die Keratin14-Expression hauptsächlich auf die Basalzellen beschränkt ist, die K14-Expression panepithelial erfolgt. Dadurch käme es zu erhöhten Expressionswerten in hyperproliferativer Haut. So lässt sich vermuten, dass auch in dem hier beschriebenen HPV8-Mausmodell zu Beginn die Hyperproliferation der Zellen durch die Expression der frühen Gene von HPV8 initiiert wird und in den proliferierenden Zellen der Keratin14-Promotor hochreguliert wird. Die Beobachtung, dass bei der Maus mit dem invasiven Tumor die Expression im Tumorgewebe verglichen mit der Expression in gesunder Haut nicht wie bei den benignen Tumoren erhöht, sondern sogar leicht erniedrigt ist, spricht für eine Herabregulierung des Keratin14-Promotors ab einem gewissen Grad der Transformation und steht im Einklang mit den Daten von Southern et al. (2001). Sie konnten bei Gewebeproben zervikaler Läsionen feststellen, dass die K14-Expression in hochgradigen Läsionen verglichen mit niedriggradigen Läsionen signifikant erniedrigt war. Analog wurde eine variable, aber ebenfalls erniedrigte K14-Expression auch in PECs der Haut beobachtet. Der Mechanismus, durch den die K14-Expression reguliert wird, ist noch unklar. Es wird jedoch ein Zusammenspiel zwischen der Hochregulierung und Herabregulierung des Transkriptionsfaktors AP1 durch E5 und E7 verschiedener HPVs postuliert. Der Vergleich der relativen Expression der HPV8-Gene zeigte überraschenderweise ein unterschiedliches Ausmaß der Expression der individuellen Gene. Dabei zeigten sich ähnliche Expressionsverhältnisse der HPV8-Gene in unauffälliger Haut und im Tumor. So zeigten sich ein E7/E6-Expressionsverhältnis von 2-7, ein E2/E6- Expressionsverhältnis von 40-190 und ein E2/E7-Expressionsverhältnis von 12-50. Wäre die Expression der individuellen HPV8-Leserahmen lediglich durch den K14-Promotor reguliert, dann wäre eine ähnliche Menge aller mRNAs zu erwarten. Daher legt die differentielle Expression der individuellen Gene von HPV8 den Schluss nahe, dass neben dem K14-Promotor papillomvirale Promotoren die Genexpression kontrollieren. Im Transgen ist der bekannte E6-Promotor enthalten. Weiterhin wird vermutet, dass ein Promotor innerhalb des E6-Leserahmens für E7 (Iftner et al.,

1990), ein Promotor innerhalb E7 für E1 (Haller et al., 1995) und ein Promotor innerhalb E1 für E2 (Fuchs et al., 1986) existiert. Die Existenz keines der genannten Promotoren konnte bisher jedoch bestätigt werden. Größere Anteile bestimmter Gensequenzen in HPV-Transkripten könnten weiterhin auf alternatives Splicen zurückzuführen sein. Die beobachteten unterschiedlichen Expressionsraten früher Gene stehen im Einklang mit den Ergebnissen einer in situ Hybridisierung von Haller et al. (1995). Sie konnten zeigen, dass in benignen HPV5-positiven Läsionen von EV-Patienten die Transkriptionsrate von E2 verglichen mit E6 und E7 deutlich höher lag. Die E7 Transkriptionsrate lag ihrerseits wiederum höher als die von E6. Die niedrigen Werte für E6 und E7 ergeben einen Sinn, betrachtet man hochonkogene HPVs, welche im Wirt persistieren und mit ihm in Koexistenz leben. Eine Überexpression könnte schnell zur Entwicklung von Karzinomen führen, welche für das Virus eine Sackgasse ohne Virion-Produktion darstellt.

Bei allen Mäusen wurden erhöhte E7/E6- und E2/E6-Expressionsverhältnisse im tumorösen Gewebe verglichen mit unauffälliger Haut beobachtet. Weiterhin war bei den Mäusen mit benignen Tumoren das E2/E7-Expressionsverhältnis im Tumor erniedrigt. Im Gegensatz dazu war es bei der Maus mit malignem Tumor in beiden Geweben gleich. Diese Beobachtungen müssen für eine tiefergehende Interpretation an einer größeren Anzahl von Tieren bestätigt werden.

Padlewska et al. (2001) konnten zeigen, dass p53-Mutationen in 60% der EV-PECs und in bis zu 40% der prämaligen Läsionen auftreten. Aus diesem Grund wurden exemplarisch vier Mäuse mittels p53-spezifischer PCR auf Mutationen der Exons 4, 5, 7, 8 und 9 untersucht. Bei allen untersuchten Mäusen zeigte die Sequenzierung das Vorliegen des p53-Wildtyps. Das Fehlen dieser Mutationen unterstützt die Feststellung, dass HPV8 das Potential zur malignen Transformation von Keratinozyten besitzt und zeigt, dass dies in diesem Modell unabhängig von prädisponierenden Mutationen und von Kokarzinogenen wie z.B. UV-Licht ist. Dieses Potential konnte auch kürzlich im in vitro Hautorgan-Modell (raft-Kultur) nachgewiesen werden. Dort zeigten HPV8-E7 transduzierte Hautkeratinozyten invasives Verhalten (Akgül, 2002).

In dem in dieser Arbeit vorgestellten transgenen Mausmodell traten invasive PECs schon ab der 38. Lebenswoche auf. Bei einer natürlichen Infektion erfolgt die Transformation von Keratinozyten selten und sehr viel langsamer. Die PECs bei EV-Patienten entwickeln sich erst nach einigen Jahrzehnten. Dieser enorme zeitliche

Unterschied bei der Karzinogenese im Mausmodell und beim Menschen könnte auf die permanente Überexpression der frühen Gene von HPV8 in den Keratinozyten der transgenen Maus unter der Kontrolle des Keratin14-Promotors zurückzuführen sein. Durch die Integration des Transgens ist ein Verlust des Virusgenoms im Laufe der Zellteilung unmöglich und eine Persistenz garantiert. Unter natürlichen Bedingungen hingegen ist die Integration des HPV-Genoms bei kutanen Typen ein äußerst seltenes Ereignis und wurde nur in einem Fall berichtet (Yabe et al., 1999). Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass bei dem Mausmodell alle Keratinozyten das Virusgenom enthalten. Dadurch ist der Pool von Zellen, die die viralen Proteine exprimieren, sehr groß und infolge dessen die Wahrscheinlichkeit einer HPV vermittelten malignen Entartung der primär benigne transformierten Keratinozyten stark erhöht. Im Gegensatz zur natürlichen in vivo Situation unterliegen die Transgen-exprimierenden Keratinozyten im Mausmodell eingeschränkter immunologischer Kontrolle. Die Transgenprodukte werden schon während der Reifung des Immunsystems exprimiert und daher als „Selbst“ toleriert. Somit ist die Elimination „infizierter“ Zellen hier unmöglich und Mutationen können akkumulieren.

VI. Zusammenfassung

Die ätiologische Bedeutung von Papillomviren beim Zervixkarzinom des Menschen, beim Ösophaguskarzinom des Rindes und beim equinen Sarkoid ist akzeptiert. Eine Rolle Epidermodysplasia verruciformis (Ev)-assoziierter humaner Papillomviren (HPV) bei der Entstehung von Hautkrebs wird vermutet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein transgenes Mausmodell für kutane Onkogenese durch HPV8 generiert. Dabei wurde die gesamte frühe Genregion von HPV8 unter Kontrolle des humanen Keratin 14-Promotors in das Genom des Mausstamms DBA/Bl6 integriert. Im weiteren Verlauf wurde über fünf Generationen sukzessive in den genetischen Hintergrund der Mausstämme FVB/N bzw. Bl6 rückgekreuzt. Bei keiner der HPV8-Transgen-negativen Mäuse wurden Veränderungen in der Haut oder einem anderen Organsystem beobachtet. Im Gegensatz dazu entwickelten mehr als 50% der HPV8-transgenen Mäuse, teils multifokal, benigne Tumoren, welche durch Alopezie, Hyperplasie, Hyperkeratose und Ulcera gekennzeichnet waren. Die Tendenz zur Tumorentwicklung korrelierte mit den Transgenlasten. Bei drei von bisher 20 obduzierten Mäusen (15%) konnten histologisch Plattenepithelkarzinome nachgewiesen werden. Damit wurde erstmals experimentell das kanzerogene Potential eines Ev-assozierten HPV-Typs in vivo gezeigt. Mittels neu etablierter quantitativer Echt-Zeit-RT-PCR für die HPV8-Gene E2, E6 und E7 wurde die Expression des Integrats bestätigt. Die höchsten Expressionsspiegel wurden für E2 gefunden, gefolgt von E7 und E6, wobei diese in benignen Tumoren 10-30-fach höher lagen als in unauffälliger angrenzender Haut. Bei einer Maus mit malignem Tumor waren die Expressionsspiegel im Karzinom und in unauffälliger Haut vergleichbar, lagen aber um den Faktor 10-50 höher als in unauffälliger Haut von Mäusen mit benignen Tumoren. Während beim Hautkrebs des Menschen häufig UV-induzierte Mutationen im Tumorsuppressorgen p53 vorkommen, konnten mittels PCR und anschließender Sequenzanalyse weder in benignen noch in malignen Tumoren Mutationen in den p53-Exons 4-9 des Mausgenoms gezeigt werden. Die Beobachtung, dass die Expression viraler Gene im Mausmodell für die Entwicklung von nicht-melanozytären Hauttumoren ausreichend ist, unterstreicht das hohe onkogene Potential von HPV8. Die in dieser Arbeit etablierten HPV8-transgenen Mauslinien sind ein wertvolles Modell für Untersuchungen der Funktionen früherer Gene von HPV8 in vivo und die Entwicklung antiviraler Strategien.

VII. Summary

The etiologic role of papillomaviruses in human cervical carcinoma, bovine oesophageal carcinoma and equine sarcoid is accepted. A role of Epidermodysplasia verruciformis (Ev)-associated human papillomaviruses (HPV) in the development of skin cancer is suspected. In this work a transgenic mouse model for cutaneous oncogenesis by HPV8 was generated. The complete early region of HPV8 under the control of the human keratin 14-promoter was integrated into the genome of DBA/Bl6 mice. Transgenic mice were crossbred over five generations with FVB/N and Bl6 mouse strains. None of the HPV8-transgene negative mice developed lesions of the skin or any other organ. In contrast, more than 50% of HPV8-transgenic mice developed partially multifocal, benign tumours which were characterized by alopecia, hyperplasia, hyperkeratosis and ulcers. The tendency for tumour development correlated with transgene loads. For three out of twenty (15%) post mortem examined mice histology revealed squamous cell carcinomas. This is the first experimental proof of the carcinogenic potential of an Ev-associated HPV-type in vivo. Via newly established real-time-RT-PCR protocols for HPV8-genes E2, E6 and E7 the expression of the integrate was confirmed. Highest expression levels were found for E2, followed by E7 and E6 with 10-30 fold higher levels in benign tumours compared to adjacent skin without pathological findings. In a mouse with a malignant tumour expression levels were comparable in the carcinoma and the skin without pathological findings, however, the levels were 10-50-fold higher than in normal skin of mice with benign tumours. Whereas UV induced mutations in the tumour suppressor gene p53 are frequently detected in human skin carcinomas, mutations in p53 exons 4-9 via PCR and sequence analysis were observed neither in benign nor in malignant tumours. The notion, that the expression of viral genes in the mouse model is sufficient for the development of non-melanoma skin cancer underlines the high oncogenic potential of HPV8. The transgenic mouse-strains provide a valuable model for investigations of the functions of the early genes of HPV8 in vivo and for the development of antiviral strategies.

VIII.Literatur

Akgül, B (2002). Regulation der Transkription und Replikation von HPV8 und Charaktersistierung der transformierenden Eigenschaft des viralen E7-Proteins. Virologie Universität zu Köln. Ref Type: Dissertation.

Androphy, E J, Lowy, D R und Schiller, J T (1987). Bovine papillomavirus E2 trans-activating gene product binds to specific sites in papillomavirus DNA. *Nature*. **325**, 70-73.

Armstrong, D J und Roman, A (1997). The relative ability of human papillomavirus type 6 and human papillomavirus type 16 E7 proteins to transactivate E2F-responsive elements is promoter- and cell-dependent. *Virology*. **239**, 238-246.

Band, V, De Caprio, J A, Delmolino, L, Kulesa, V und Sager, R (1991). Loss of p53 protein in human papillomavirus type 16 E6-immortalized human mammary epithelial cells. *J Virol*. **65**, 6671-6676.

Basset-Seguín, N, Moles, J, Mils, V, Dereure, O und Guilhou, J (1994). p53 tumor suppressor gene and skin carcinogenesis. *J. Invest. Dermatol*. **103**, 102-106.

Berezutskaya, E und Bagchi, S (1997). The human papillomavirus E7 oncoprotein functionally interacts with the S4 subunit of the 26 S proteasome. *J Biol Chem*. **272**, 30135-30140.

Berkhout, R J, Bouwes Bavinck, J N und 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.

Birnboim, H C und Doly, J (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*. **7**, 1513-1523.

Bosch, F X, Manos, M M, Munoz, N, Sherman, M, Jansen, A M, Peto, J, Schiffman, M H, Moreno, V, Kurman, R und Shah, K V (1995). Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst*. **87**, 796-802.

Bouwes Bavinck, J N und Berkhout, R J (1997). HPV infections and immunosuppression. *Clin Dermatol*. **15**, 427-437.

Boxman, I L, Mulder, L H, Russell, A, Bouwes Bavinck, J N, Green, A und Ter Schegget, J (1999). Human papillomavirus type 5 is commonly present in immunosuppressed and immunocompetent individuals. *Br J Dermatol*. **141**, 246-249.

Brinster, R L, Allen, J M, Behringer, R R, Gelinas, R E und Palmiter, R D (1988). Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **85**, 836-840.

Brooks, L A, Tidy, J A, Gusterson, B, Hiller, L, O'Nions, J, Gasco, M, Marin, M C, Farrell, P J, Kaelin, W G, Jr. und Crook, T (2000). Preferential retention of codon 72 arginine p53 in squamous cell carcinomas of the vulva occurs in cancers positive and negative for human papillomavirus. *Cancer Res.* **60**, 6875-6877.

Brown, K und Balmain, A (1995a). Transgenic mice and squamous multistage skin carcinogenesis. *Cancer Metastasis Rev.* **14**, 113-124.

Brown, K, Burns, P A und Balmain, A (1995b). Transgenic approaches to understanding the mechanism of chemical carcinogenesis in mouse skin. *Toxicol Lett.* **82-83**, 123-130.

Burkhardt, A, Willingham, M, Gay, C, Jeang, K T, Schlegel, R (1989). The E5 oncoprotein of bovine papillomavirus is oriented asymmetrically in Golgi and plasma membranes. *Virology.* **170**, 334-339.

Caldeira, S, Zehbe, I, Accardi, R, Malanchi, I, Dong, W, Giarre, M, de Villiers, E M, Filotico, R, Boukamp, P und Tommasino, M (2003). The E6 and E7 proteins of the cutaneous human papillomavirus type 38 display transforming properties. *J Virol.* **77**, 2195-2206.

Chen, J J, Hong, Y, Rustamzadeh, E, Baleja, J D und Androphy, E J (1998). Identification of an alpha helical motif sufficient for association with papillomavirus E6. *J Biol Chem.* **273**, 13537-13544.

Chiang, C M, Ustav, M, Stenlund, A, Ho, T F, Broker, T R und Chow, L T (1992). Viral E1 and E2 proteins support replication of homologous and heterologous papillomaviral origins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **89**, 5799-5803.

Chow, L T und Broker, T R (1994). Papillomavirus DNA replication. *Intervirology.* **37**, 150-158.

Conrad, M, Bubb, V J, Schlegel, R (1993). The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein. *J Virol.* **67**, 6170-6178.

Coussens, L M, Hanahan, D und Arbeit, J M (1996). Genetic predisposition and parameters of malignant progression in K14-HPV16 transgenic mice. *Am J Pathol.* **149**, 1899-1917.

Crook, T und Vousden, K H (1996). *Papillomavirus reviews: Current research on papillomaviruses.* (Lacey, C, Eds.), Leeds University Press, Leeds.

Cueille, N, Nougarede, R, Mechali, F, Philippe, M und Bonne-Andrea, C (1998). Functional interaction between the bovine papillomavirus type 1 replicative helicase E1 and cyclin E-Cdk2. *J Virol.* **72**, 7255-7262.

Dingermann, T (1999). *Gentechnik -Biotechnik; Lehrbuch und Kompendium für Studium und Praxis.* Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.

Duensing, S, Lee, L Y, Duensing, A, Basile, J, Piboonniyom, S, Gonzalez, S, Crum, C P und Munger, K (2000). The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**, 10002-10007.

Dyson, N, Howley, P M, Munger, K und Harlow, E (1989). The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science.* **243**, 934-937.

Eckert, R L, Crish, J F, Balasubramanian, S und Rorke, E A (2000). Transgenic animal models of human papillomavirus-dependent disease. *International Journal of Oncology.* **16**, 853-870.

Elbel, M, Carl, S, Spaderna, S und Iftner, T (1997). A comparative analysis of the interactions of the E6 proteins from cutaneous and genital papillomaviruses with p53 and E6AP in correlation to their transforming potential. *Virology.* **239**, 132-149.

Enzenauer, C, Mengus, G, Lavigne, A, Davidson, I, Pfister, H und May, M (1998). Interaction of human papillomavirus 8 regulatory proteins E2, E6 and E7 with components of the TFIID complex. *Intervirol.* **41**, 80-90.

Evander, M, Frazer, I H, Payne, E, Qi, Y M, Hengst, K und McMillan, N A (1997). Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol.* **71**, 2449-2456.

Frattini, M G, Hurst, S D, Lim, H B, Swaminathan, S und Laimins, L A (1997). Abrogation of a mitotic checkpoint by E2 proteins from oncogenic human papillomaviruses correlates with increased turnover of the p53 tumor suppressor protein. *Embo J.* **16**, 318-331.

Fuchs, P G, Horn, S, Iftner, T, May, M, Stubenrauch, F und Pfister, H (1993). Molecular biology of epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus. In *Virus strategies*. (Doerfler, W and Böhm, P, Eds.), Verlag Chemie, Weinheim: 517-529.

Fuchs, P G, Iftner, T, Weninger, J und Pfister, H (1986). Epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus 8: genomic sequence and comparative analysis. *J. Virol.* **58**, 626-634.

Gilbert, D M und Cohen, S N (1987). Bovine papillomavirus plasmids replicate randomly in mouse fibroblasts throughout S phase of the cell cycle. *Cell.* **50**, 59-68.

Giroglou, T, Florin, L, Schafer, F, Streeck, R E und Sapp, M (2001). Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol.* **75**, 1565-1570.

Gissmann, L (1992). Human papillomaviruses and genital cancer. *Semin Cancer Biol.* **3**, 253-261.

- Gordon, J W und Ruddle, F H** (1983). Gene transfer into mouse embryos: production of transgenic mice by pronuclear injection. *Methods Enzymol.* **101**, 411-433.
- Gross, G E** (1997). Human papillomavirus infection of the skin: Treatment. In *Human Papillomavirus infection*. (Gross, G E and Barasso, R, Eds.), Ullstein Mosby, Berlin, Wiesbaden: 127-143.
- Grossman, S R, Mora, R und Laimins, L A** (1989). Intracellular localization and DNA-binding properties of human papillomavirus type 18 E6 protein expressed with a baculovirus vector. *J Virol.* **63**, 366-374.
- Halbert, C L, Demers, G W und Galloway, D A** (1991). The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. *J Virol.* **65**, 473-478.
- Haller, K, Stubenrauch, F und Pfister, H** (1995). Differentiation-dependent transcription of the epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus type 5 in benign lesions. *Virology.* **214**, 245-255.
- Hammes, A und Schedl, A** (2000). Generation of transgenic mice from plasmids, BACs and YACs. In *Mouse genetics and Transgenics- a practical approach*. (Jackson, I J and Abbott, C M, Eds.), Oxford University Press, New York: 217-245.
- Harwood, C A, Suretheran, T, McGregor, J M, Spink, P J, Leigh, I M, Breuer, J und Proby, C M** (2000). Human papillomavirus infection and non-melanoma skin cancer in immunosuppressed and immunocompetent individuals. *J Med Virol.* **61**, 289-297.
- Hawley-Nelson, P, Vousden, K H, Hubbert, N L, Lowy, D R und Schiller, J T** (1989). HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *Embo J.* **8**, 3905-3910.
- Hetherington, C M** (2000). Mouse care and husbandry. In *Mouse genetics and Transgenics- a practical approach*. (Jackson, I J and Abbott, C M, Eds.), Oxford University Press, New York: 1-25.
- Hiraiwa, A, Kiyono, T, Suzuki, S, Ohashi, M und Ishibashi, M** (1996). E7 proteins of four groups of human papillomaviruses, irrespective of their tissue tropism or cancer association, possess the ability to transactivate transcriptional promoters E2F site dependently. *Virus Genes.* **12**, 27-35.
- Holt, S E, Schuller, G und Wilson, V G** (1994). DNA binding specificity of the bovine papillomavirus E1 protein is determined by sequences contained within an 18-base-pair inverted repeat element at the origin of replication. *J Virol.* **68**, 1094-1102.
- Howley, P M** (1996). Papillomaviridae: The viruses and their replication. In *Fields Virology*. Raven Press, Philadelphia: 2045-2076.

Hudson, J B, Bedell, M A, McCance, D J und Laiminis, L A (1990). Immortalization and altered differentiation of human keratinocytes in vitro by the E6 and E7 open reading frames of human papillomavirus type 18. *J Virol.* **64**, 519-526.

Ibelgaufts, H (1993). *Gentechnologie von A-Z*. Verlag Chemie, Weinheim.

Iftner, T, Bierfelder, S, Csapo, Z und Pfister, H (1988). Involvement of human papillomavirus type 8 genes E6 and E7 in transformation and replication. *J Virol.* **62**, 3655-3661.

Iftner, T, Elbel, M, Schopp, B, Hiller, T, Loizou, J I, Caldecott, K W und Stubenrauch, F (2002). Interference of papillomavirus E6 protein with single-strand break repair by interaction with XRCC1. *Embo J.* **21**, 4741-4748.

Iftner, T, Sagner, G, Pfister, H und Wettstein, F O (1990). The E7 protein of human papillomavirus 8 is a nonphosphorylated protein of 17 kDa and can be generated by two different mechanisms. *Virology.* **179**, 428-436.

Innis, M A, Gelfand, D H (1990). *PCR Protocols- a Guide to Methods and Applications*. Academic Press.

Jablonska, S und Majewski, S (1994). Epidermodysplasia verruciformis: immunological and clinical aspects. *Curr Top Microbiol Immunol.* **186**, 157-175.

Jackson, S, Harwood, C, Thomas, M, Banks, L und Storey, A (2000). Role of Bak in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins. *Genes Dev.* **14**, 3065-3073.

Jones, D L, Alani, R M und Munger, K (1997). The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. *Genes Dev.* **11**, 2101-2111.

Kanda, T, Watanabe, S, Zanma, S, Sato, H, Furuno, A und Yoshiike, K (1991). Human papillomavirus type 16 E6 proteins with glycine substitution for cysteine in the metal-binding motif. *Virology.* **185**, 536-543.

Kiviat, N B (1999). Papillomaviruses in non-melanoma skin cancer: epidemiological aspects. *Semin Cancer Biol.* **9**, 397-403.

Kiyono, T, Hiraiwa, A und Ishibashi, M (1992). Differences in transforming activity and coded amino acid sequence among E6 genes of several papillomaviruses associated with epidermodysplasia verruciformis. *Virology.* **186**, 628-639.

Kiyono, T, Nagashima, K und Ishibashi, M (1989). The primary structure of major viral RNA in a rat cell line transfected with type 47 human papillomavirus DNA and the transforming activity of its cDNA and E6 gene. *Virology.* **173**, 551-565.

Knippers, R (1997). Transkription, Translation und der genetische Code. In *Molekulare Genetik*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York. **7**: 45-80.

Konkel, D A, Tilgham, S M und Leder, P (1978). The Sequence of the Chromosomal Mouse beta-globin Major Gene: Homologies in Capping, Splicing and Poly(A) Sites. *Cell*. **15**, 1125-1132.

Krause, A (2002). Untersuchung des zelltransformierenden Potentials des E7-Gens der Epidermodysplasia verruciformis-assoziierten humanen Papillomvirustypen HPV8 und HPV15. Virologie Universität zu Köln. Ref Type: Diplomarbeit.

Kuo, S R, Liu, J S, Broker, T R und Chow, L T (1994). Cell-free replication of the human papillomavirus DNA with homologous viral E1 and E2 proteins and human cell extracts. *J Biol Chem*. **269**, 24058-24065.

Kwok, S (1990). Procedures to minimize PCR-product carry-over. In *PCR-protocols: A guide to methods and applications*. (Innis, M A, Gelfand, D H, Sninsky, J J and White, T J, Eds.), Academic Press., San Diego: 142-145.

Lacey, M, Alpert, S, Hanahan, D (1986). Bovine papillomavirus genome elicits skin tumours in transgenic mice. *Nature* **322**, 609-612.

Lehman, C W und Botchan, M R (1998). Segregation of viral plasmids depends on tethering to chromosomes and is regulated by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95**, 4338-4343.

Leptak, C, Ramon y Cajal, S, Kulke, R, Horwitz, B H, Riese, D J, 2nd, Dotto, G P und DiMaio, D (1991). Tumorigenic transformation of murine keratinocytes by the E5 genes of bovine papillomavirus type 1 and human papillomavirus type 16. *J Virol*. **65**, 7078-7083.

Li, X und Coffino, P (1996). High-risk human papillomavirus E6 protein has two distinct binding sites within p53, of which only one determines degradation. *J Virol*. **70**, 4509-4516.

Liu, M, Wikonkal, N M und Brash, D E (1999). UV induces p21WAF1/CIP1 protein in keratinocytes without p53. *J Invest Dermatol*. **113**, 283-284.

Majewski, S und Jablonska, S (1995). Epidermodysplasia verruciformis as a model of human papillomavirus-induced genetic cancer of the skin. *Arch Dermatol*. **131**, 1312-1318.

Mansur, C P, Marcus, B, Dalal, S und Androphy, E J (1995). The domain of p53 required for binding HPV 16 E6 is separable from the degradation domain. *Oncogene*. **10**, 457-465.

Marcuzzi, G P (2001). Untersuchung zu Interaktionen der zelltransformierenden E7 Proteine hautspezifischer Papillomviren mit zellulären Faktoren. Virologie Universität zu Köln. Ref Type: Diplomarbeit.

- Massimi, P, Pim, D und Banks, L** (1997). Human papillomavirus type 16 E7 binds to the conserved carboxy-terminal region of the TATA box binding protein and this contributes to E7 transforming activity. *J Gen Virol.* **78**, 2607-2613.
- McBride, A A, Romanczuk, H und Howley, P M** (1991). The papillomavirus E2 regulatory proteins. *J Biol Chem.* **266**, 18411-18414.
- McGregor, J M und Proby, C M** (1996). The role of papillomaviruses in human non-melanoma skin cancer. *Cancer Surv.* **26**, 219-236.
- Modrow, S, Falke, D** (1989). Papovaviren. In *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Munger, K, Phelps, W C, Bubb, V, Howley, P M und Schlegel, R** (1989). The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol.* **63**, 4417-4421.
- Myers, G, Baker, C, Münger, K, Sverdrup, F, McBride, A und Bernhard, H U** (1997). *Papillomaviruses*. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico.
- Myers, G, Baker, C, Wheeler, C, Halpern, A, McBride, A und Doorbar, J** (1996). A complication and analysis of nuclei acids and amino acid sequences. In *Human Papillomaviruses*. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, USA.
- Nelson, M A, Einspahr, J G, Alberts, D S, Balfour, C A, Wymer, J A, Welch, K L, Salasche, S J, Bangert, J L, Grogan, T M und Bozzo, P O** (1994). Analysis of the p53 gene in human precancerous actinic keratosis lesions and squamous cell cancers. *Cancer Lett.* **85**, 23-29.
- Padlewska, K, Ramoz, N, Cassonnet, P, Riou, G, Barrois, M, Majewski, S, Croissant, O, Jablonska, S und Orth, G** (2001). Mutation and abnormal expression of the p53 gene in the viral skin carcinogenesis of epidermodysplasia verruciformis. *J Invest Dermatol.* **117**, 935-942.
- Palmiter, R D und Brinster, R L** (1985). Transgenic mice. *Cell.* **41**, 343-345.
- Pavey, S, Conroy, S, Russell, T und Gabrielli, B** (1999). Ultraviolet radiation induces p16CDKN2A expression in human skin. *Cancer Res.* **59**, 4185-4189.
- Pfister, H** (1984). Biology and biochemistry of papillomaviruses. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* **99**, 111-181.
- Pfister, H** (1992a). Human papillomaviruses and skin cancer. *Semin Cancer Biol.* **3**, 263-271.
- Pfister, H** (1992b). Papillomaviren, Krebs und Immunsuppression. *AIFO.* **3**, 115-124.
- Pfister, H** (1996). The role of human papillomavirus in anogenital cancer. *Obstet Gynecol Clin North Am.* **23**, 579-595.

Pfister, H (2003). Human Papillomavirus and Skin Cancer. In *Journal of the National Cancer Institute Monographs, No. 31*. Oxford University Press, Oxford: 52-56.

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

Pfister, H und Ter Schegget, J (1997). Role of HPV in cutaneous premalignant and malignant tumors. *Clin Dermatol.* **15**, 335-347.

Pirog, E C, Kleter, B, Olgac, S, Bobkiewicz, P, Lindeman, J, Quint, W G, Richart, R M und Isacson, C (2000). Prevalence of human papillomavirus DNA in different histological subtypes of cervical adenocarcinoma. *Am J Pathol.* **157**, 1055-1062.

Proby, C M, Churchill, L, Purkis, P E, Glover, M T, Sexton, C J und Leigh, I M (1993). Keratin 17 expression as a marker for epithelial transformation in viral warts. *Am J Pathol.* **143**, 1667-1678.

Purdie, K J, Pennington, J, Proby, C M, Khalaf, S, de Villiers, E M, Leigh, I M und Storey, A (1999). The promoter of a novel human papillomavirus (HPV77) associated with skin cancer displays UV responsiveness, which is mediated through a consensus p53 binding sequence. *Embo J.* **18**, 5359-5369.

Ramoz, N, Rueda, L A, Bouadjar, B, Montoya, L S, Orth, G und Favre, M (2002). Mutations in two adjacent novel genes are associated with Epidermodysplasia verruciformis. *Nat Genet.* **32**, 579-581.

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

Roth, D (2000). Untersuchungen des zelltransformierenden Potentials hautspezifischer humaner Papillomviren. Virologie Universität zu Köln. Ref Type: Diplomarbeit.

Ruhland, A und de Villiers, E M (2001). Opposite regulation of the HPV 20-URR and HPV 27-URR promoters by ultraviolet irradiation and cytokines. *Int J Cancer.* **91**, 828-834.

Saiki, R K, Walsh, P S, Levenson, C H, Ehrlich, H A (1989). Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci USA.* **86**, 6230-6234.

Sambrook, J, Fritsch, E F und Maniatis, T (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.

Scheffner, M, Werness, B A, Huibregtse, J M, Levine, A J und Howley, P M (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell.* **63**, 1129-1136.

Schmitt, A, Harry, J B, Rapp, B, Wettstein, F O und Iftner, T (1994). Comparison of the properties of the E6 and E7 genes of low- and high-risk cutaneous papillomaviruses reveals strongly transforming and high Rb-binding activity for the E7 protein of the low-risk human papillomavirus type 1. *J Virol.* **68**, 7051-7059.

Shah, K V und Howley, P M (1996). Papillomaviruses. In *Fields Virology*. Raven Press, Philadelphia: 2077-2109.

Sibbet, G, Romero-Graillet, C, Meneguzzi, G und Saveria Campo, M (2000). alpha6 integrin is not the obligatory cell receptor for bovine papillomavirus type 4. *J Gen Virol.* **81**, 1629.

Sippola-Thiele, M, Hanahan, D, Howley, P M (1989). Cell-heritable stages of tumor progression in transgenic mice harboring the bovine papillomavirus type 1 genome. *Mol Cell Biol.* **9**, 925-934.

Skiadopoulos, M H und McBride, A A (1998). Bovine papillomavirus type 1 genomes and the E2 transactivator protein are closely associated with mitotic chromatin. *J Virol.* **72**, 2079-2088.

Smola-Hess, S und Pfister, H (2002). Interaction of Papillomaviral oncoproteins with cellular factors. In *Structure-function relationship of human pathogenic viruses*. (Holzenburg, A and Bogner, E, Eds.), Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York: 431-464.

Smotkin, D u W, F. O. (1987). The major human papillomavirus protein in cervical cancers is a cytoplasmic phosphoprotein. *J. Virol.* **61**, 1686-1689.

Song, S, Pitot, H C und Lambert, P F (1999). The human Papillomavirus Type 16 E6 Gene alone is sufficient to induce carcinomas in transgenic animals. *J. Virol.* **73**, 5887-5893.

Southern, S A, McDicken, I W, Herrington, C S (2001). Loss of Cytokeratin 14 Expression is Related to Human Papillomavirus Type and Lesion Grade in Squamous Intraepithelial Lesions of the Cervix. *Human Pathology.* **32**, 1351-1355.

Steger, G, Ham, J, Thierry, F und Yaniv, M (1993). The E2 proteins of papillomavirus transcription and replication factors. In *Virus strategies*. (Doerfler, W and Böhm, P, Eds.), Verlag Chemie, Weinheim: 263-278.

Steger, G, Ham, J und Yaniv, M (1996). E2 proteins: modulators of papillomavirus transcription and replication. *Methods Enzymol.* **274**, 173-185.

Storey, A, Thomas, M, Kalita, A, Harwood, C, Gardiol, D, Mantovani, F, Breuer, J, Leigh, I M, Matlashewski, G und Banks, L (1998). Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature.* **393**, 229-234.

Suggs, S V, Wallace, R B, Hirose, T, Kawashima, E H, Itakura, K (1981). Use of synthetic oligonucleotides as hybridisation probes: isolation of cloned cDNA sequences for human beta2-microglobulin. *Biotechnology*. **24**, 140-144.

Sun, S, Thorner, L, Lentz, M, MacPherson, P und Botchan, M (1990). Identification of a 68-kilodalton nuclear ATP-binding phosphoprotein encoded by bovine papillomavirus type 1. *J Virol*. **64**, 5093-5105.

Sundberg, J P (1987). *Papillomavirus and Human Disease*. (Syrjänen, K, Gissmann, L and Koss, L G, Eds.), Springer Verlag Berlin, Heidelberg.

Thomas, J T und Laimins, L A (1998). Human papillomavirus oncoproteins E6 and E7 independently abrogate the mitotic spindle checkpoint. *J Virol*. **72**, 1131-1137.

Tinsley, J M, Fisher, C und Searle, P F (1992). Abnormalities of epidermal differentiation associated with expression of the human papillomavirus type 1 early region in transgenic mice. *J Gen Virol*. **73**, 1251-1260.

Ullmann, C G und Emery, V C (1996). Transforming proteins of human papillomaviruses. *Rev. Med. Virol*. **6**, 39-55.

van der Schroeff, J G, Evers, L M, Boot, A J und Bos, J L (1990). Ras oncogene mutations in basal cell carcinomas and squamous cell carcinomas of human skin. *J Invest Dermatol*. **94**, 423-425.

Vasioukhin, V, Degenstein, L, Wise, B und Fuchs, E (1999). The magical touch: genome targeting in epidermal stem cells induced by tamoxifen application to mouse skin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **96**, 8551-8556.

Vitaliano, P P und Urbach, F (1980). The relative importance of risk factors in nonmelanoma carcinoma. *Arch Dermatol*. **116**, 454-456.

Weißborn, S J, Funke, A M, Hellmich, M, Mallmann, P, Fuchs, P G, Pfister, H J, Wieland, U (2003). Oncogenic Human Papillomavirus DNA Loads in Human Immunodeficiency Virus-Positive Women with High-Grade Cervical Lesions Are Strongly Elevated. *Journal of Clinical Microbiology*. **41**, 2763-2767.

Wettstein, F O (1990). State of viral DNA and gene expression in benign vs. malignant tumors. In *Papillomaviruses and human cancer*. (Pfister, H, Eds.), CRS Press, Inc., Boca Raton, Fla.: 155-179.

Wieland, U und Pfister, H (2003, im Druck). Humane Papillomviren-Taxonomie und Virologie. In *HPV-Infektionen und Neoplasien der Haut: Immunologie und Immuntherapie*. UNI-MED Verlag, Bremen.

Yabe, Y, Sakai, A, Hitsumoto, T, Hanafusa, H, Jitsumori, Y und Ogura, H (1999). Human papillomavirus-5b DNA integrated in a metastatic tumor: cloning, nucleotide sequence and genomic organization. *Int J Cancer*. **80**, 334-335.

Yang, L, Mohr, I, Fouts, E, Lim, D A, Nohaile, M und Botchan, M (1993). The E1 protein of bovine papilloma virus 1 is an ATP-dependent DNA helicase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**, 5086-5090.

Ylitalo, N, Sørensen, P, Josefsson, A M, Magnusson, P K E, Adami, H-O, Gyllensten, U B, Pontén, J (2000). Consistent high viral load of human papillomavirus 16 and risk of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet.* **355**, 2194-2198.

Yoon, C S, Kim, K D, Park, S N und Cheong, S W (2001). alpha(6) Integrin is the main receptor of human papillomavirus type 16 VLP. *Biochem Biophys Res Commun.* **283**, 668-673.

Ziegler, A, Leffell, D J, Kunala, S, Sharma, H W, Gailani, M, Simon, J A, Halperin, A J, Baden, H P, Shapiro, P E, Bale, A E (1993). Mutation hotspots due to sunlight in the p53 gene of nonmelanoma skin cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**, 4216-4220.

zur Hausen, H (1977). Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr Top Microbiol Immunol.* **78**, 1-30.

zur Hausen, H (2000). Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* **92**, 690-698.

zur Hausen, H und de Villiers, E M (1994). Human papillomaviruses. *Annu Rev Microbiol.* **48**, 427-447.

IX. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BAP	<u>B</u> acterial <u>A</u> lkaline <u>P</u> hosphatase
bp	Basenpaar
BCC	Basaliome (engl. Basal cell carcinoma)
BI6	C57BL/6J
BPV	Bovines Papillomvirus
BSA	Bovines Serumalbumin
bw	rückwärts (engl. "backward")
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DBA/BI6	D2B6F1CrI
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DEPC	Diethyl-Pyrocarbonat-Stammlösung
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
E	früh (engl. „early“)
E6-AP	E6-assoziiertes Protein
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EV	Epidermodysplasia verruciformis
fw	vorwärts (engl. "forward")
F0	Founder-Generation
G/C	Guanin/Cytosin
hCG	human Choriogonadotropin
HE	Hämatoxylin/Eosin
hr	Hoch-Risiko (engl. high-risk)
HPV	Humanes Papillomvirus
K14	Keratin 14
kDA	kilo Dalton

kb	Kilobasen
L	„late“
lr	Niedrig-Risiko (engl. low-risk)
MOPS	3 (N-Morpholino)propansulfon-säure
mRNA	messenger-RNA
MW	Mittelwert
n	Anzahl
Nr.	Nummer
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCR	Nicht-kodierende Region (“non coding region”)
neg.	negativ
NMHK	Nicht melanozytärer Hautkrebs
nt	Nukleotid
OD	Optische Dichte
OdT	Oligo-dT-Primer
ORF	Offener Leserahmen (“open reading frame”)
PEC	Plattenepithelkarzinom
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMSG	Pregnant-Mare-Serum-Gonadotropin
Pos.	Position
pos.	positiv
PV	Papillomviren
Rb	Retinoblastom Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	reversen Transkription
STABW	Standardabweichung
TAFs	TBP assoziierte Faktoren
T _{ann.}	Annealingtemperaturen
TBP	TATA-bindendes Protein

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Tm	Schmelzpunkt
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	“Unit”=Enzymeinheit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
Vol.	Volumen
w	weiblich

Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem verstorbenen Betreuer Herrn Prof. P. G. Fuchs danken, der mich stets zu unterstützen verstand.

Herrn Prof. H. J. Pfister und Herrn Prof. H.-J. Thiel danke ich für die Betreuung meiner Arbeit.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Virologie der Universität zu Köln danke ich für das hervorragende Arbeitsklima, insbesondere Melanie Balduin und Nadine Sichtig für ihre sowohl moralisch-, als auch fachlich unterstützende Beratung und Regina Lindemann für ihre Mitarbeit.

Ulla Warthorst und Baki Akgül möchte ich zusätzlich für die Einführung in die Geheimnisse der Laborarbeit danken.

Bei Saleta Sierra-Aragon, Gian Paolo Marcuzzi und Thomas Müller möchte ich mich besonders für ihre Hilfeleistungen bei Computerproblemen bedanken.

Bei Herrn Wisslav und Herrn Smyth aus dem Institut für Biochemie und bei Herrn Dries und Herrn Kasper aus dem Institut für Pathologie möchte ich mich für fachliche Unterstützung bedanken.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium und die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht und mich stets unterstützt haben.

Meinem Freund Sönke Weißenborn möchte ich für seine ständige fachliche und seelische Unterstützung und in besonderem Maße für seine Geduld danken.

Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Gießen, den 5. August 2003

Vorträge und Preise

Schaper, I D, Smyth, N, Dries, v, Fuchs, P G, Pfister, H J (2002). Development of Skin Tumours in Mice Transgenic for Early Genes of Human Papillomavirus Type 8. Internationale Papillomvirus-Konferenz in Paris, Institute Pasteur. Vortrag.

Erhalt eines „Presentation Award“ im Rahmen der Internationalen Papillomvirus-Konferenz in Paris, Institute Pasteur.

Schaper, I D, Smyth, N, Dries, V, Kasper, U, Fuchs, P G, Pfister, H J (2003). Development of Skin Tumours in Mice Transgenic for Early Genes of Human Papillomavirus Type 8. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie in Berlin. Vortrag.