

**UNTERSUCHUNGEN ZUR PERSISTENZ VON
MASTOMYS NATALENSIS PAPILLOMVIRUS
IM NATÜRLICHEN WIRT**

MYRIAM IBBERSON



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2008

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Virologie, Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Heinz-Jürgen Thiel

und

dem Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg

Angewandte Tumorstudiologie

Betreuer: Prof. Dr. Frank Rösl

**Untersuchungen zur Persistenz von *Mastomys natalensis*
Papillomvirus im natürlichen Wirt**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Myriam Ibberson

Tierärztin aus Heidelberg

Gießen 2008

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

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

Prof. Dr. F. Rösl

Tag der Disputation: 27.05.2008

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.

Vorab veröffentlichte Teilergebnisse dieser Arbeit:

„A novel rodent Papillomavirus isolated from anogenital lesions in its natural host”

Julia Nafz, Kai Schäfer, Su Feng Chen, Ignacio Bravo, Myriam Ibberson, Ingo Nindl, Eggert Stockfleth and Frank Rösl

Virology, akzeptiert 2007

„Persistence of *Mastomys natalensis* Papillomavirus in multiple organs identifies novel targets for infection“

Julia Nafz, Anja Köhler, Myriam Ohnesorge, Ingo Nindl, Eggert Stockfleth and Frank Rösl

Journal of General Virology, 2007

„Imiquimod treatment of papilloma virus and DMBA/TPA-induced cutaneous skin cancer in *Mastomys coucha*: an unique animal model system useful for preclinical studies“

Julia Nafz, Myriam Ohnesorge, Eggert Stockfleth, Frank Rösl and Ingo Nindl

British Journal of Dermatology, 2007

Vorab öffentlich präsentierte Teilergebnisse dieser Arbeit:

23rd International Papillomavirus Conference, September 2006, Prag

Julia Nafz, Myriam Ibberson, Ignacio G. Bravo, Anja Köhler, Ingo Nindl, Eggert Stockfleth and Frank Rösl

Poster: „Isolation and characterisation of a novel papillomavirus from anal lesions of the rodent *Mastomys coucha*“

HPV and Cancer Conference, September 2005, Berlin

Julia Nafz, Myriam Ohnesorge, Anja Köhler, Ingo Nindl, Eggert Stockfleth and Frank Rösl

Poster: „*Mastomys coucha*: A natural animal model to study papillomavirus-induced skin carcinogenesis“

22nd International Papillomavirus Conference, Mai 2005, Vancouver

Julia Nafz, Myriam Ohnesorge, Anja Köhler, Ingo Nindl, Eggert Stockfleth and Frank Rösl

Poster: „*Mastomys coucha*: A natural animal model to study papillomavirus-induced skin carcinogenesis“

International symposium on cutaneous HPV infection and development of skin cancer, Oktober 2004, Venedig

Julia Nafz, Myriam Ohnesorge, Anja Köhler, Ingo Nindl, Eggert Stockfleth and Frank Rösl

Poster: „Characterisation of a rodent model naturally infected with *Mastomys natalensis* Papillomavirus“

Microbes in Malignancy, Oktober 2004, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg

Julia Nafz, Myriam Ohnesorge, Anja Köhler, Ingo Nindl, Eggert Stockfleth and Frank Rösl

Poster: „Characterisation of a rodent model naturally infected with *Mastomys natalensis* Papillomavirus“

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungen	1
2	Einleitung	4
2.1	Taxonomie und Phylogenie von Papillomviren.....	4
2.2	Aufbau und Eigenschaften von Papillomviren	6
2.3	Replikation der Papillomviren	7
2.3.1	Der Zellzyklus.....	8
2.3.2	Der virale Lebenszyklus	8
2.4	Veterinärmedizinische Relevanz von Papillomvirus-Infektionen	9
2.4.1	Das bovine Papillomvirus (BPV).....	10
2.4.2	Equine Sarkoide	10
2.4.3	Das Hundepapillomvirus	11
2.4.4	Das Papillomvirus der Hauskatze.....	11
2.5	Tiermodelle für Papillomvirus-Infektionen.....	11
2.5.1	Das Baumwollschwanzkaninchen.....	11
2.5.2	Die Vielzitzenmaus <i>Mastomys coucha</i>	12
2.6	Papillomvirus-bedingte Erkrankungen beim Menschen	12
2.6.1	Die mukosalen HPV-Typen.....	13
2.6.2	Bedeutung von HPV beim Gebärmutterhalskrebs	14
2.6.3	Die kutanen HPV-Typen	15
2.6.4	Bedeutung von kutanen HPV-Typen bei Hautkrebs	16
2.7	Transformierende Eigenschaften der Papillomviren bei Tieren.....	18
2.8	Auswirkungen einer systemischen Immunsuppression.....	18
2.9	Das Immunsuppressivum Cyclosporin A versus Rapamycin im Hinblick auf Tumorentstehung.....	19
2.10	Prävention und Therapie Papillomvirus-bedingter Erkrankungen	20
2.10.1	Prophylaxe und Therapie des Zervixkarzinoms.....	20
2.10.2	Therapie Papillomvirus-induzierter Hautläsionen	21
2.10.3	Behandlung mit immunmodulierenden Substanzen.....	21
2.10.4	Therapie Papillomvirus-bedingter Krankheitsbilder beim Tier.....	21
2.10.5	Schutz gegen Papillomvirus-bedingte Erkrankungen durch Vakzinierung	21
2.11	Das Tiermodell <i>Mastomys coucha</i> zur Untersuchung der Papillomvirus-induzierten Hautkarzinogenese.....	23

2.12	Zielsetzung dieser Arbeit.....	27
3	Material	28
3.1	Chemikalien und Reagenzien	28
3.2	Arbeitsmaterial.....	30
3.3	Geräte	31
3.4	cDNS für Hybridisierung	31
3.5	Primersequenzen und Lokalisation	32
3.5.1	Primer für PCR-Analysen	32
3.5.2	Primer für Realtime-PCR mit LightCycler Instrument 1,0 (LC)	32
3.5.3	Aktin-Primer	32
3.6	Lösungen	33
4	Methoden.....	36
4.1	Tierexperimente	36
4.1.1	Haltung der Tiere.....	36
4.1.2	Tötung der Tiere bzw. Ausscheiden aus einem Versuch.....	36
4.1.3	Verabreichung der Immunsuppressiva Cyclosporin A und Rapamycin	36
4.1.4	Allgemeinanästhesie bei <i>Mastomys coucha</i>	37
4.1.5	Blutentnahme aus dem retrobulbären Venenplexus	37
4.1.6	Entnahme von Augenabstrichen.....	37
4.1.7	Entnahme von Haarproben	38
4.1.8	Chirurgische Entfernung von Hautbiopsien bzw. Tumoren	38
4.1.9	Das Protokoll der Zwei-Stufen-Karzinogenese	38
4.1.10	Sektion der Tiere	39
4.2	Weiterverarbeitung der Organe bzw. des Blutes	39
4.2.1	Organe.....	39
4.2.2	Blut	39
4.3	DNS	40
4.3.1	Isolierung von DNS aus Gewebe	40
4.3.2	DNS-Extraktion aus Haarfollikeln	41
4.3.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung der DNS	41
4.3.4	Restriktionsspaltung von DNS	42
4.3.5	Behandlung mit RNase A	42
4.3.6	Elektrophoretische Auftrennung von DNS in Agarose-Horizontalgelen	42
4.4	DNS-Blot-Hybridisierung nach Southern	43

4.4.1	Herstellung einer radioaktiven Sonde.....	43
4.4.2	Hybridisierung.....	43
4.5	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	44
4.5.1	Design der Primer.....	44
4.5.2	Prinzip der PCR.....	44
4.5.3	Durchführung der PCR-Reaktion.....	45
4.5.4	Bestimmung der Viruslast mittels Realtime-PCR.....	46
4.6	<i>In situ</i> -Hybridisierung	47
4.6.1	Biotin-Nick-Translation (Roche)	47
4.6.2	Deparaffinisierung und Antigen-Rückgewinnung	48
4.6.3	Verdau und Abstoppen	48
4.6.4	Hybridisierung.....	48
4.6.5	Amplifizierung des Signals.....	48
4.6.6	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	49
4.7	Elektronenmikroskopie	49
4.7.1	Prinzip der Elektronenmikroskopie.....	49
4.7.2	Fixierung und Einbettung des Probenmaterials	49
4.7.3	Vorbereitung der Probennetze.....	50
4.8	Statistische Auswertungen.....	50
4.8.1	Mittelwert.....	50
4.8.2	Median	50
4.8.3	Der Log Rang-Test	50
4.8.4	Kaplan-Maier-Schätzer.....	50
5	Ergebnisse	51
5.1	Das Tiermodell <i>Mastomys coucha</i>	51
5.1.1	Beobachtungen der Tumorentwicklung.....	51
5.1.2	Erhöhte Tumorinzidenz bei männlichen Tieren.....	53
5.1.3	Augenentzündungen - ist MnPV ätiologisch beteiligt?	54
5.1.4	Erhebung von Daten über Tumorinzidenz und Häufigkeit von Augeninfektionen anhand der Beobachtung eines Kollektivs	55
5.1.5	Tumorentwicklung nach Anwendung der klassischen Zwei-Stufen-Karzinogenese	57
5.2	Ausbreitung von MnPV in verschiedenen Geweben	58
5.2.1	Das Risiko der Kontamination bei der Sektion.....	58

5.2.2	Ergebnisse der PCR-Analysen	60
5.2.3	Ergebnisse der Southern Blot-Analysen	62
5.2.4	MnPV-Nachweis in Gehirnen	64
5.2.5	Daten von PCR- und Southern Blot-Analysen im Vergleich	66
5.2.6	Übertragungswege von MnPV	70
5.2.7	<i>In situ</i> -Hybridisierung.....	71
5.2.8	Darstellung von Viruspartikeln im Elektronenmikroskop.....	74
5.3	Induktion einer systemischen Immunsuppression bei <i>Mastomys coucha</i> und ein Vergleich der Immunsuppressiva Cyclosporin A und Rapamycin im Hinblick auf die Tumorentstehung	75
5.3.1	Ausscheiden von Tieren aus dem Versuch	75
5.3.2	Auswirkungen auf die Tumorentstehung.....	77
5.3.3	Auftreten von Augeninfektionen.....	79
5.3.4	Geschlechtsspezifische Unterschiede bei der Tumorentstehung und beim Auftreten von Augeninfektionen	80
5.3.5	Bestimmungen der Viruslast in Haarfollikeln	81
6	Diskussion	85
6.1	<i>Mastomys coucha</i> - ein Tiermodell für die Papillomvirus-induzierte Hautkarzinogenese.....	85
6.1.1	Lokalisation von Tumoren.....	86
6.1.2	Übertragungswege von MnPV	88
6.1.3	Ausbreitung von MnPV im Organismus	88
6.1.4	Augeninfektionen	92
6.1.5	Tumorentwicklung nach Anwendung der klassischen Zwei-Stufen-Karzinogenese	93
6.2	MnPV-induzierte Tumorentstehung unter Immunsuppression	93
6.2.1	Ausscheiden von Tieren aus dem Versuch	94
6.2.2	Zeitpunkt des Auftretens erster Tumore	95
6.2.3	Vergleich der Tumorinzidenzen in den Gruppen Rapa, CsA und Kontrolle.....	95
6.2.4	Interpretation der Viruslast-Analyse	96
6.2.5	Anwendung des Immune-Response-Modifiers Imiquimod.....	97
6.3	Die Latenz der Papillomvirus-Infektion.....	98
6.4	Ausblick.....	98
7	Zusammenfassung	100

8	Summary	102
9	Literatur.....	103
10	Anhang	115
10.1	Daten untersuchter Tiere	115
10.2	Die Sequenz des MnPV-Genoms.....	117
10.3	Untersuchungen unter Immunsuppression	121
10.3.1	Daten der untersuchten Tiere	121
10.3.2	Tumor und Augenentzündung.....	122
10.3.3	Kontrolle der Wirkstoffspiegel im Blut.....	124
11	Danksagung	125

1 Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
Bp	Basenpaare
BPV	Bovines Papillomvirus
BSA	Bovines Serumalbumin
CdK	Cyclin dependent protein kinase
CIN	Zervikale intraepitheliale Neoplasie
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzenimeter
cm ³	Kubikzenimeter
COPV	Canine oral papilloma virus
CP	Crossing point
CRPV	Cottontail rabbit papilloma virus
CsA	Cyclosporin A
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMBA	7,12-Dimethylbenzanthrazen
DNA	Desoxyribonucleic acid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E	Early
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EV	<i>Epidermodysplasia Verruciformis</i>
FdPV	<i>Felis domesticus</i> Papillomvirus
FIV	Felines Immundefizienzvirus

h	hour (Stunde)
HCl	Hydrochlorsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HPV	Humane Papillomviren
ICTV	International Committee of the Taxonomy of Viruses
Kb	Kilobasen
L	Late
LCR	Long Control Region
Lpm	Liter pro Minute
M	Molar
m	männlich
McPV2	<i>Mastomys coucha</i> Papillomvirus 2
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
MMTV	Mouse mammary tumour virus
MnPV	<i>Mastomys natalensis</i> Papillomvirus
mTOR	mammalian target of rapamycin
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NMSC	Non-melanoma skin cancer
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat Buffered Saline
pg	Picogramm
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PV	Papillomviren
Rapa	Rapamycin
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
sec	Sekunde
S-Phase	Synthesephase
sssDNA	shredded single stranded salmon sperm DNA

Tab.	Tabelle
TAE	Tris Acetat EDTA Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TE	Tris EDTA Puffer
TNE	Tris Natriumchlorid EDTA Puffer
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat
Tris	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	Unit
URR	Upstream Regulatory Region
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
w	Weiblich
x	fach

2 Einleitung

2.1 Taxonomie und Phylogenie von Papillomviren

Papillomviren (PV) zählen zu den wichtigsten Vertretern von DNS-Viren, die mit der Entstehung von Krebserkrankungen in Verbindung gebracht werden. Sie bilden die Familie *Papillomaviridae*. Diese wird, basierend auf den durch das „International Committee on the Taxonomy of Viruses“ (ICTV) festgelegten Kriterien, in verschiedene Genera unterteilt. Die Unterteilung in Genera orientiert sich an einer Übereinstimmung der Nukleotidsequenz der L1-Gene (kodieren für das Hauptstrukturprotein L1, siehe Kap. 2.2.2) von weniger als 60% (de Villiers *et al.*, 2004); die Genera werden mit griechischen Buchstaben bezeichnet.

Innerhalb eines Genus erfolgt weiterhin eine Unterteilung in Spezies, die auf einer Homologie der L1-Gene von 60-70% beruht (de Villiers *et al.*, 2004). Virustypen werden anhand von Sequenzunterschieden der L1-Gene von mindestens 10% klassifiziert, Subtypen von 2-10% und Varianten von maximal 2% (de Villiers *et al.*, 2004).

Bei aktuellen Untersuchungen zahlreicher PV (darunter 18 humane und 35 animale PV) hinsichtlich evolutionärer Virus-Wirt-Beziehungen wurden die phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse neu diskutiert (Gottschling *et al.*, 2007). Hierbei erfolgte ein Vergleich der Nukleotidsequenzen sowie der Aminosäuresequenzen der zu untersuchenden PV-Genome, wobei letztere aufgrund einer geringeren Varianz zur Analyse herangezogen wurden (Gottschling *et al.*, 2007). Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde ein neuer phylogenetischer Baum der PV erstellt (siehe Abb. 1). Dieser zeigt die 53 untersuchten Virustypen, deren zugehörige Genera (hier als Supertaxa bezeichnet) sowie die Wirte und deren Ordnungen (Gottschling *et al.*, 2007). Supertaxa sind wiederum übergeordneten Gruppen zugehörig. Humane PV (HPV) sind in mehreren Supertaxa vertreten (α , β , μ , ν), die den Gruppen A, B, C, E und F angehören. Die PV des Rindes (Bovine PV=BPV) sind drei Supertaxa (δ , ϵ , ξ) der Gruppen B und D zugehörig. Das *Mastomys natalensis* Papillomvirus (MnPV) bildet das Supertaxon der iota-PV (ι). MnPV ist, wie einige weitere animale PV, keiner Gruppe zuzuordnen (siehe Abb. 1).

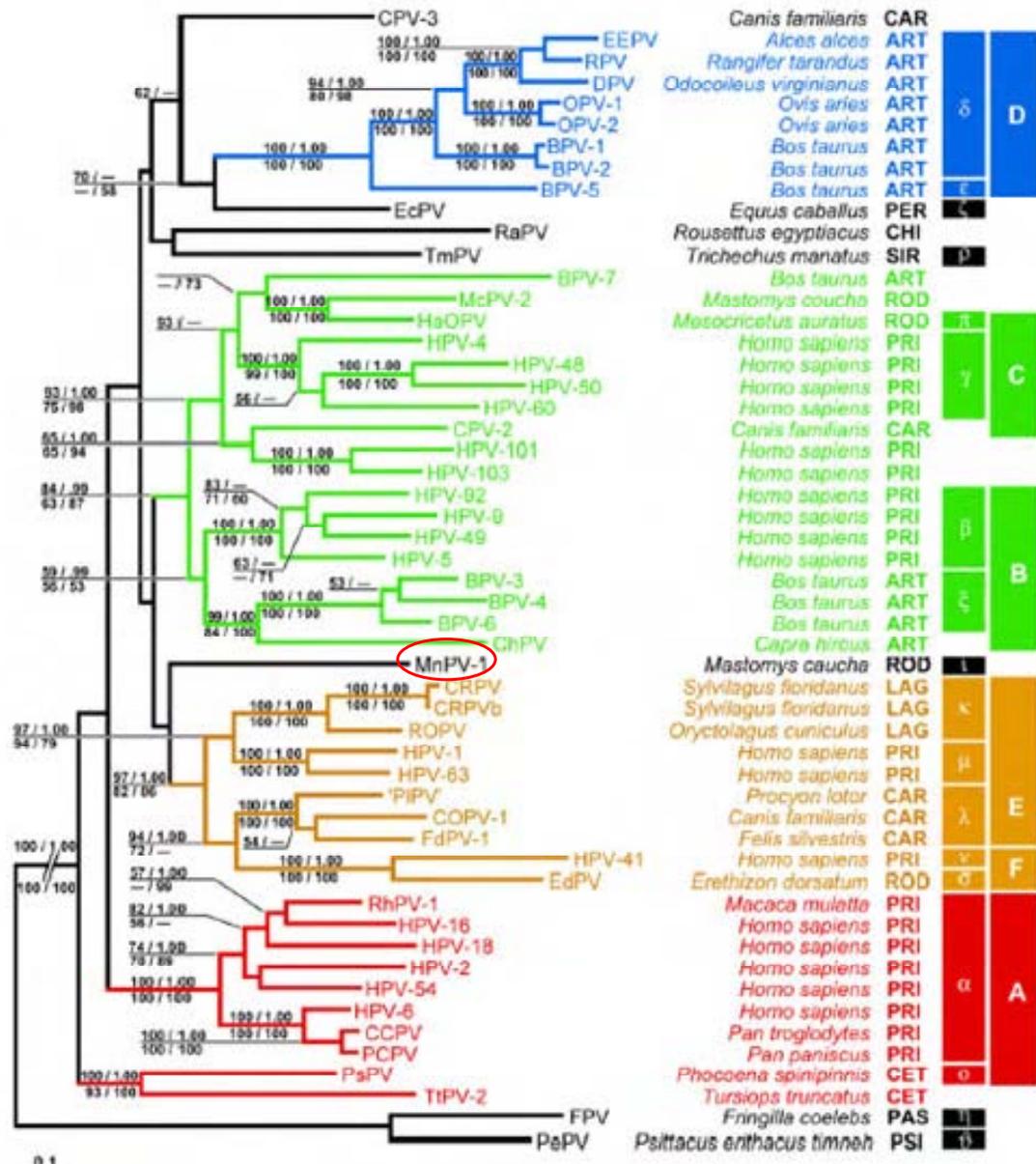


Abb. 1: Gezeigt ist ein phylogenetischer Baum von 53 repräsentativen Papillomviren (PV), darunter 18 humane und 35 animale PV, basierend auf der Analyse der E1-E2-L1-Aminosäuresequenzen [(Gottschling *et al.*, 2007), modifiziert]. Die Papillomvirusgenera sind mit griechischen Buchstaben bezeichnet (de Villiers *et al.*, 2004). Diese sind wiederum übergeordneten Gruppen zugehörig (A-F). Einzelne Genera (in schwarzer Schrift) sind keiner Gruppe zuzuordnen. Das *Mastomys natalensis* Papillomvirus (MnPV; siehe rote Markierung) gehört dem Genus *iota*-PV an. Die Ordnungen der Viruswirte sind folgendermaßen abgekürzt: ART, *Artiodactyla* (Paarhufer); CAR, *Carnivora* (Fleischfresser); CET, *Cetacea* (Wale); CHI, *Chiroptera* (Fledertiere); LAG, *Lagomorpha* (Hasenartige); PAS, *Passeriformes* (Sperlingsvögel); PER, *Perissodactyla* (Unpaarhufer); PRI, Primaten; PSI, *Psittaciformes* (Papageienvögel); ROD, *Rodentia* (Nagetiere); SIR, *Sirenia* (Seekühe). Die Nummern bezeichnen Bootstrap-Werte.

2.2 Aufbau und Eigenschaften von Papillomviren

PV infizieren das Epithelgewebe in Haut und Schleimhaut (Howley und Lowy, 2007). Eine ihrer Eigenschaften ist ihre strenge Wirtsspezifität. Die Viruspartikel der PV haben einen Durchmesser von ca. 55 nm. Sie bilden ein ikosaedrisches Kapsid, bestehend aus 72 Protein-Kapsomeren ohne Lipidhülle (Howley und Lowy, 2007). Das Genom liegt in zirkulär geschlossener doppelsträngiger DNS mit einer Länge von 6800-8400 Basenpaaren (Bp) vor und ist mit zellulären Histonen assoziiert (Favre *et al.*, 1977; Rösl *et al.*, 1986). Es wird in eine kodierende und eine nicht kodierende Region eingeteilt. Der nicht kodierende Bereich wird aufgrund seiner regulatorischen Funktionen als „Long Control Region“ (LCR) oder „Upstream Regulatory Region“ (URR) bezeichnet (Howley und Lowy, 2007). Neben dem Replikationsursprung („origin of replication“) enthält die URR Promotorregionen sowie *cis*-Elemente, die für die Regulation der Genexpression nötig sind (Longworth und Laimins, 2004). Die Bindungsstellen für zelluläre und virale Transkriptionsfaktoren variieren bei diversen PV-Typen; Gemeinsamkeiten bezeichnen Viren mit ähnlichen Eigenschaften (García-Vallvé *et al.*, 2006).

Im kodierenden Bereich befinden sich die auf einem DNS-Strang angeordneten offenen Leserahmen. Man unterscheidet die der frühen („early“, E1, E2, E4, E5, E6 und E7) sowie der späten Gene („late“, L1 und L2). Die frühen Gene kodieren für Proteine, die in der frühen Phase der DNS-Replikation gebildet werden und regulatorische Eigenschaften bei der viralen DNS-Replikation (siehe Kap. 2.3.2) sowie der Kontrolle der Transkription ausüben. Im Einzelnen vertreten sie folgende Aufgaben: E1 kodiert für ein zelluläres Bindungsprotein, bindet an die virale URR, hat ATPase- und Helikase-Aktivität und initiiert die DNS-Replikation (Hughes und Romanos, 1993). E2 kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der die frühe Genexpression reguliert und ebenfalls einen Kofaktor in der Virusreplikation darstellt (Demeret *et al.*, 1997). E2 besitzt mehrere Bindungsstellen an der URR. Die Expression des E4-Gens erfolgt als Fusionsprotein mit einer Teilsequenz von E1, da in den meisten Fällen sein Startkodon fehlt. E1/E4 wird mit Beginn der viralen Genomamplifikation exprimiert und kennzeichnet die Einleitung der späten Phase der Virusreplikation (Wilson *et al.*, 2005; Fang *et al.*, 2006). E5 fehlt bei den meisten PV-Hauttypen. Bei BPV stellt es hingegen ein transformierendes Protein dar (DiMaio *et al.*, 1986; Schiller *et al.*, 1986). Seine Rolle in anderen PV-Typen ist bislang jedoch nicht geklärt. Die Proteine der E6- und E7-Gene halten die Zellen in Zellteilung, sodass in differenzierendem Gewebe ausreichende Mengen proliferierender Zellen vorhanden sind.

Die späten Gene kodieren für die beiden spät im Replikationszyklus synthetisierten Strukturproteine L1 und L2, die das virale Kapsid bilden. Das L1-Protein stellt den Hauptanteil des Kapsids dar und bildet durch Selbst-Zusammenschluss virusähnliche Partikel (Chen *et al.*, 2000). Das L2-Protein bindet die virale DNS und verpackt diese im Viruskapsid (Holmgren *et al.*, 2005).

Die Genomorganisation von PV ist exemplarisch anhand der Genome von MnPV sowie BPV-1 in Abb. 2 gezeigt. Die Anzahl der Leseraster der frühen Gene variiert. Das MnPV-Genom wurde bereits sequenziert (Tan *et al.*, 1994), die Funktionen der einzelnen Leseraster sind jedoch noch nicht hinreichend geklärt. Vermutet werden aber ähnliche Eigenschaften wie bei den HPV. MnPV ist bei den kutanen PV-Typen einzuordnen (de Villiers *et al.*, 2004), da es aus Hautläsionen isoliert wurde.

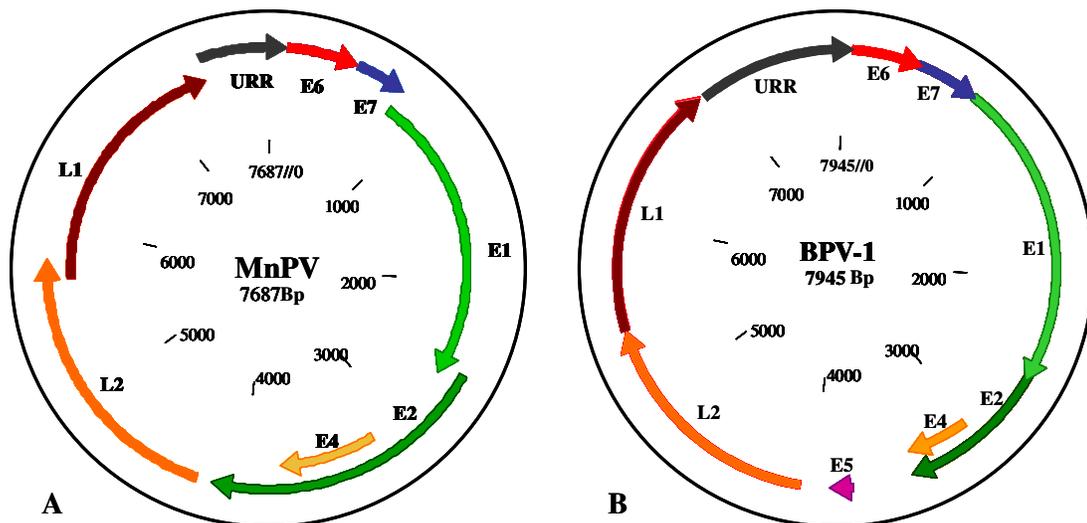


Abb. 2: Das Genom von *Mastomys natalensis* Papillomvirus (MnPV) als Beispiel für die Genomorganisation von Papillomviren (A); [(Tan *et al.*, 1994), modifiziert]. Das Genom ist zirkulär dargestellt. Die Buchstaben kennzeichnen die offenen Leseraster der frühen (E1, E2, E4, E6 und E7) und der späten (L1 und L2) Gene. Wie bei den meisten anderen PV-Hauttypen fehlt auch hier E5. Die URR (Upstream Regulatory Region) bezeichnet den nicht-kodierenden Bereich. Die Nummern stehen für die Nukleotidpositionen, die Gesamtlänge beträgt 7687 Basenpaare (Bp).

Im Vergleich dazu ist das Genom von BPV-1 gezeigt (B); [(Linz und Baker, 1988), modifiziert]. Die Gesamtlänge beträgt hier 7945 Bp. Dem E5-Protein von BPV werden transformierende Eigenschaften zugeschrieben.

2.3 Replikation der Papillomviren

PV sind streng gewebsspezifisch. Viren gelangen über Mikroläsionen in die Haut, wo sie Basalzellen des mehrschichtigen Plattenepithels der Epidermis und der Schleimhäute infizieren.

Die Virusreplikation ist stark abhängig von der Differenzierung infizierter Epithelzellen (Favre *et al.*, 1977).

2.3.1 Der Zellzyklus

Der Zellzyklus spielt sowohl für die Replikation der PV sowie für deren transformierende Eigenschaften eine entscheidende Rolle. Der Zellzyklus eukaryotischer Zellen ist in vier Phasen unterteilt. Nach der Zellteilung in der Mitosephase (M-Phase) folgt eine Zwischenphase, die G₁-Phase (englisch: gap=Lücke), die eine postmitotische Wachstumsphase darstellt. Im Anschluß daran findet die Synthesephase (S-Phase) statt, in der die Reduplikation der DNS stattfindet. Danach folgt eine zweite Zwischenphase, die G₂-Phase, die als kurze prämitotische Vorbereitungsphase zu bezeichnen ist. Verlassen Zellen den Zellzyklus, endet somit ihre Proliferation und sie gehen in einen Ruhezustand über, die sogenannte G₀-Phase (Malumbres und Barbacid, 2001).

Um sicher zu stellen, dass die Phasen in der richtigen Reihenfolge genau einmal durchlaufen werden, passiert die Zelle bestimmte Kontrollpunkte am G₁/S-Übergang, in der S-Phase und in der Mitosephase. Somit wird gewährleistet, dass kritische Vorgänge während der entsprechenden Zellzyklusphase abgeschlossen wurden, bevor eine neue Phase beginnt. Damit wird die Entstehung bzw. Teilung genetisch abnormer Zellen verhindert (King und Cidlowski, 1998).

Für die Steuerung der Zellzykluspassage sind im Wesentlichen zwei Proteinfamilien verantwortlich: Die Cyclin-abhängigen Proteinkinasen (CdK=Cyclin-dependent protein kinase) und die Cycline. Die CdKs erlauben ein Fortschreiten durch die verschiedenen Phasen, indem sie bestimmte Proteine phosphorylieren. Ihre Kinaseaktivität ist abhängig vom Vorhandensein aktivierender Untereinheiten, den Cyclinen. Deren Menge hängt wiederum vom Bedarf in der jeweiligen Phase ab (King und Cidlowski, 1998).

2.3.2 Der virale Lebenszyklus

Im viralen Lebenszyklus unterscheidet man eine frühe und eine späte Phase (siehe Abb. 3). In der frühen Phase werden die frühen Gene E1 und E2 im *Stratum basale* exprimiert, die dafür sorgen, dass das Virusgenom in kleiner Kopienzahl (50-100 Kopien pro Zelle) vorliegt. Nach der Zellteilung verlassen die virustragenden Tochterzellen die Basalschicht und wandern in Richtung *Stratum spinosum*, um dort zu reifen Keratinozyten zu differenzieren. Die Expression der viralen Proteine E6 und E7 verzögert jedoch die Zelldifferenzierung, indem diese mit dem Zellzyklus interagieren und die Zellen der Suprabasalschicht in der S-Phase halten, was zu einer

starken Zunahme der viralen Kopien führt. Gleichzeitig wirkt E2 negativ regulierend auf die E6/E7-Expression, woraufhin die Zellen die S-Phase verlassen können.

Die späte Phase beginnt bei der weiteren Differenzierung der infizierten Zelle während ihrer Wanderung in Richtung Epitheloberfläche. Zeitgleich mit der Amplifizierung der Virus-DNS werden die späten Gene L1 und L2 exprimiert, die das Kapsid bilden. Im *Stratum granulosum* erfolgt der Zusammenbau der Virionen („assembly“) und infektiöse Viren verlassen das *Stratum corneum* durch Ablösen abgestorbener Zellen der oberen Epithelschicht.

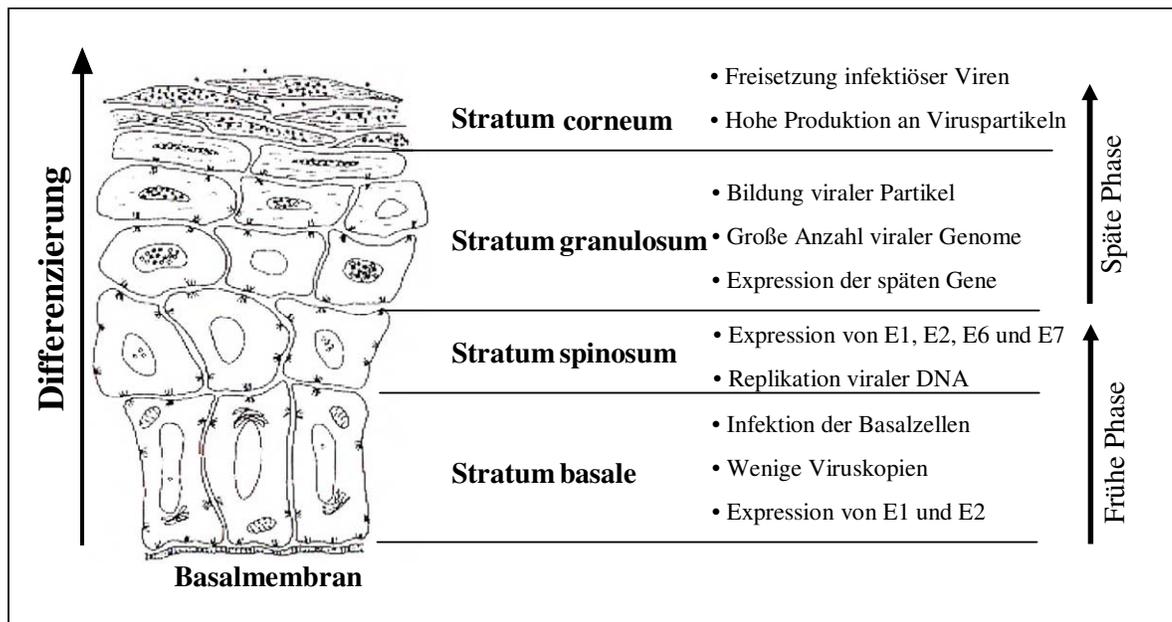


Abb. 3: Schematische Darstellung der Epidermis [(Modrow und Falke, 1997), modifiziert]. Der Lebenszyklus von Papillomviren (PV) ist eng an den Differenzierungsstatus der Epithelzellen gebunden. Es werden eine frühe und eine späte Phase unterschieden. Die Infektion mit PV erfolgt in den Basalzellen (*Stratum basale*). Das Virusgenom wird in niedriger Kopienanzahl aufrecht erhalten, bis die Zelle mit ihrer Wanderung an die Epitheloberfläche beginnt. In weiter differenzierten Schichten werden die frühen Gene (*Stratum spinosum*) sowie die späten Gene (*Stratum granulosum*), die das Viruskapsid bilden, exprimiert. Parallel erfolgt die Amplifizierung des Virusgenoms. Im *Stratum corneum* werden die reifen Viren freigesetzt.

2.4 Veterinärmedizinische Relevanz von Papillomvirus-Infektionen

PV sind im Tierreich weit verbreitet. Anhand epidemiologischer Studien wird vermutet, dass alle Säugetiere sowie zahlreiche Vögel mit PV infiziert sind (Bernard *et al.*, 1997). Die PV-Infektion Wirbelloser konnte bislang nicht bewiesen werden (Howley und Lowy, 2007). Dabei kann ein Wirt gleichzeitig mehrere spezies-spezifische PV bzw. Subtypen beherbergen (Sundberg *et al.*, 1996; Antonsson und Hansson, 2002). Sie infizieren Epithelgewebe mukosalen oder kutanen Ursprungs (Howley und Lowy, 2007) und verursachen bei einer

großen Reihe von Tierarten sowohl gutartige als auch bösartige Läsionen in Haut und Schleimhaut (Sundberg *et al.*, 1996). Die Entdeckung zahlreicher neuer PV und PV-Subtypen durch systematische Untersuchungen unauffälliger Hautproben zahlreicher Wirbeltierspezies führt zur Annahme, dass ähnlich wie bei den humanen PV-Haut-Typen auch bei Tieren kutane PV-Typen allgegenwärtig sind (Antonsson und Hansson, 2002).

Aus veterinärmedizinischer Sicht sind besonders die papillomatösen Erkrankungen bei Rindern (siehe Kap. 2.4.1) und Hunden (siehe Kap. 2.4.3) sowie die equinen Sarkoide bei Pferden und anderen Equiden (siehe Kap. 2.4.2) von großem Interesse. Auch bei der Hauskatze wurde ein PV-bedingtes Krankheitsbild festgestellt (siehe Kap. 2.4.4.).

2.4.1 Das bovine Papillomvirus (BPV)

Bislang sind sechs verschiedene BPV-Typen (BPV-Typ 1-6) bekannt, die für das Auftreten von Papillomen bzw. Fibropapillomen bei Rindern an unterschiedlichen Lokalisationen verantwortlich sind. Häufig erfolgt eine spontane Regression der Papillome.

BPV-Infektionen lösen bei Rindern Hautwarzen und Papillome in der Harnblase (Typen 1 und 2), die Papillomatose des oberen Verdauungstraktes (Typen 3 und 4) und die Papillomatose der Zitzen und des Euters (Typen 1, 5 und 6) sowie des Penis (Typ 1) aus (Campo, 2002).

Je nach Schweregrad und Lokalisation der Papillomatose sind die Tiere bei der Futteraufnahme und beim Atmen derart gehindert, dass in der Vergangenheit Einzeltiere oder sogar ganze Herden gekault werden mussten (Campo, 2002). Häufige Lokalisation der Papillome sind Zitzen und Euter, was durch Behinderungen beim Melken und beim Säugen der Kälber zu wirtschaftlichen Einbußen führen kann (Campo, 2002). Ebenso stellen Mastitiden und verlegte Strichkanäle als Folge der Papillomatose ein wirtschaftliches Problem dar (Campo, 2002). Papillome am Penis behindern Bullen beim Deckakt und führen zum Verlust des wirtschaftlichen Nutzens (Campo, 2002).

Beim Rind kann auch eine maligne Entartung der Papillome in der Harnblase und im oberem Verdauungstrakt vorkommen, die mit der wiederholten Aufnahme von Adlerfarn bzw. mit dessen Inhaltsstoffen mit karzinogener und immunsuppressiver Wirkung in Zusammenhang zu stehen scheint (Jarrett *et al.*, 1978; Carter und Galloway, 1997); (siehe Kap. 2.7).

2.4.2 Equine Sarkoide

Im Hinblick auf die Spezies-Spezifität der PV gibt es eine Ausnahme: Pferde und andere Equiden entwickeln die sogenannten equinen Sarkoide als Folge einer Infektion mit den BPV-Typen 1 und 2 (Olson und Cook, 1951). Das equine Sarkoid stellt die häufigste Hauterkrankung

beim Pferd dar. Charakteristisch für diese fibroblastischen Hauttumore ist ein lokal invasives Wachstum ohne Metastasierung. Wie bei Papillomen beim Rind ist auch hier die wirtschaftliche Bedeutung nicht zu unterschätzen. Es handelt sich um eine abortive Infektion, bei der keine Virusreplikation stattfindet. Aufgrund des Vorliegens zahlreicher Kopien der Virus-DNS wird vermutet, dass BPV ätiologisch eine Rolle bei der Entstehung der Sarkoide spielt (Nasir und Reid, 1999).

2.4.3 Das Hundepapillomvirus

Das „Canine oral papilloma virus“ (COPV) führt insbesondere bei jungen Hunden zur Bildung von Papillomen im Rachenbereich sowie in der Mundschleimhaut. Meist findet nach vier bis acht Wochen eine Spontanregression statt. Es besteht jedoch das Risiko einer malignen Entartung zu Plattenepithelkarzinomen (Nicholls *et al.*, 1999), die eine Streuung in andere Organe zur Folge haben kann. Unter Immunsuppression wurden beim Hund neben oralen auch kutane Papillome festgestellt (Sundberg *et al.*, 1994). Die epidemiologische Bedeutung des Zusammenhangs von Haut- und Schleimhauttumoren beim Hund und PV-Infektionen ist bislang ungewiss. In einer Studie wurden 42 Haut- und Schleimhauttumore verschiedener Lokalisationen von Hunden unterschiedlicher Rassen untersucht, in neun dieser 42 Fälle (21,4%) war eine Beteiligung von PV nachzuweisen (Zaugg *et al.*, 2005).

2.4.4 Das Papillomvirus der Hauskatze

Das *Felis domesticus* Papillomvirus (FdPV) wurde aus einer Hauskatze mit kutaner Papillomatose isoliert und ist auch in oralen papillomatösen Veränderungen zu finden (Sundberg *et al.*, 2000). FdPV ist eng mit COPV verwandt (Terai und Burk, 2002). Gelegentlich wurden neben PV-Infektionen bei Katzen Immundefizienzen der Tiere festgestellt, die zum Teil genetisch bedingt sind (Carney *et al.*, 1990) oder auf eine Infektion mit dem feline Immundefizienzvirus (FIV) zurückzuführen waren (Egberink *et al.*, 1992). Darüber hinaus wurden PV bei Großkatzen wie Rotluchs, Panther, asiatischer Löwe und Schneeleopard aus Läsionen in der Mundschleimhaut sowie der Zunge isoliert (Sundberg *et al.*, 2000; Rector *et al.*, 2007).

2.5 Tiermodelle für Papillomvirus-Infektionen

2.5.1 Das Baumwollschwanzkaninchen

Der Zusammenhang zwischen warzenartigen Hautveränderungen und einer Virusätiologie wurde erstmals durch Richard Shope gezeigt, der 1933 ein Papillomvirus aus dem im mittleren

Westen der USA wild lebendem Baumwollschwanzkaninchen (Cottontail rabbit) isolierte (Rous und Beard, 1935). Eine Infektion mit dem „Cottontail rabbit papilloma virus“ (CRPV) äußert sich in der Ausbildung gutartiger Papillome, die zum Großteil eine Spontanregression zeigen. Nur ein geringer Anteil der Papillome im natürlichen Wirt neigt zur Progression zum Karzinom (Rous und Beard, 1935).

Bereits 1935 wurden Hauskaninchen experimentell mit CRPV infiziert, die daraufhin Plattenepithelkarzinome entwickelten (Rous und Beard, 1935). Bei dieser Infektion eines artverwandten Wirtes handelt es sich um eine abortive Infektion ohne Ausbildung vollständiger Viruspartikel. Im natürlichen Wirt ist in den Papillomen eine starke Produktion von Viruspartikeln zu finden, in seinen Karzinomen hingegen nicht (Wettstein *et al.*, 1987). Das CRPV-infizierte Hauskaninchen wurde als Tiermodell zur Untersuchung der Progression von Papillom zum Karzinom genutzt (Syverton, 1952; Wettstein *et al.*, 1987).

In diesem Tiermodell konnten epitheliale Stammzellen in Haarfollikeln als CRPV-Zielzellen identifiziert werden (Schmitt *et al.*, 1996). Desweiteren konnten diese Tumore nicht nur durch CRPV-Viruspartikel, sondern auch durch „unverpackte“ virale DNS induziert werden (Brandsma und Xiao, 1993). Darüber hinaus wurde anhand dieses Modells die Bedeutung der einzelnen offenen Leserahmen für die Tumorentstehung untersucht (Brandsma *et al.*, 1992; Han *et al.*, 1998).

Beim Hauskaninchen wurde außerdem das sogenannte „Rabbit oral papilloma virus“ (ROPV) aus der Mundschleimhaut isoliert, das im Gegensatz zu CRPV kein onkogenes Potential besitzt (Parsons und Kidd, 1943; Wilgenburg *et al.*, 2005).

2.5.2 Die Vielzitzenmaus *Mastomys coucha*

Die am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) Heidelberg lebende *Mastomys coucha*-Kolonie ist latent mit dem spezies-spezifischen *Mastomys natalensis* Papillomvirus (MnPV) infiziert und eignet sich aufgrund der Spontanentwicklung gutartiger Hautläsionen zur Untersuchung der PV-bedingten Hautkarzinogenese (siehe Kap. 2.11).

2.6 Papillomvirus-bedingte Erkrankungen beim Menschen

Beim Menschen wurde bereits in den zwanziger Jahren des letzten Jahrhunderts mit der Entdeckung der erblich bedingten Erkrankung *Epidermodysplasia verruciformis* erstmals der Zusammenhang zwischen einer Infektion mit HPV und dem Auftreten von Hautkrebs beschrieben (Lewandowsky und Lutz, 1922). Anhand dieser Erkrankung gelang der erste Beweis einer Beteiligung von HPV-Infektionen bei der Hautkrebsentstehung (Orth *et al.*,

1978b; Jablonska und Majewski, 1994). Desweiteren spielt HPV-induzierter Hautkrebs eine Rolle bei Patienten unter Immunsuppression (Walder *et al.*, 1971; Boyle *et al.*, 1984), die z.B. aufgrund einer Organtransplantation medikamentell erzeugt wird, um eine Transplantatabstoßung zu verhindern (siehe Kap. 2.8).

Die Bedeutung von HPV bei der Entstehung des Gebärmutterhalskrebses wurde hingegen lange Zeit nicht erkannt. Erst in den siebziger Jahren des letzten Jahrhunderts wurde eine Beteiligung von HPV bei der Ätiologie des Zervixkarzinoms postuliert (zur Hausen *et al.*, 1974; zur Hausen, 1976; zur Hausen, 1977). Einige Jahre später gelang der Nachweis viraler Partikel in Vorstufen von Gebärmutterhalskrebs (Della Torre *et al.*, 1978; Laverty *et al.*, 1978; Meisels *et al.*, 1981). Weitere Erkenntnisse über die mögliche Beteiligung von HPV bei Tumoren in der Schleimhaut des Anogenitalbereichs sowie anderer Organe brachte die Erforschung der Heterogenität der Papillomvirus-Familie (Gissmann und zur Hausen, 1976; Gissmann *et al.*, 1977; Orth *et al.*, 1978a) sowie die Isolierung spezifischer HPV-Typen aus Genitalwarzen und Kehlkopfpapillomen (Gissmann und zur Hausen, 1980; Gissmann *et al.*, 1982).

In den folgenden Jahren wurde intensiv geforscht, um die Bedeutung von HPV im Zusammenhang mit Krebserkrankungen zu erschließen. Mittlerweile zählen die PV zu den wichtigsten Vertretern von DNS-Tumorviren. Bislang wurden mehr als 118 PV-Typen identifiziert (zur Hausen, 2000; de Villiers *et al.*, 2004), wobei HPV die am besten erforschte Gruppe der PV darstellen. HPV werden in mukosale und kutane Typen unterschieden (Kaya *et al.*, 2001; Pfister *et al.*, 2003; Harwood *et al.*, 2004).

2.6.1 Die mukosalen HPV-Typen

Unter den mukosalen HPV-Typen unterscheidet man die sogenannten Niedrigrisikotypen („Low risk“) und Hochrisikotypen („High risk“). Übertragen werden mukosale HPV meist über Sexualkontakte.

Infektionen mit den „Low risk“-Typen wie HPV 6 und 11 können zu gutartigen Läsionen in der Schleimhaut des Anogenitaltraktes führen, die man als Kondylome bzw. *Condylomata acuminata* (Feigwarzen) bezeichnet. Morphologisch erscheinen diese als papilläre Wucherungen, die der Haut breitbasig aufsitzen (Bühling *et al.*, 1995). Bevorzugt kommen diese bei sexuell aktiven jungen Erwachsenen vor (Howley und Lowy, 2007). Dieselben HPV-Typen (HPV 6 und 11) sind bei Veränderungen in der Schleimhaut anderer Organe wie Mund, Speiseröhre und Kehlkopf zu finden, bei denen es nur sehr selten zu einer malignen Entartung

kommt (Clifford *et al.*, 2003; Howley und Lowy, 2007). Hier wird eine Übertragung von der Mutter auf das Kind während der Geburt diskutiert (Syrjanen und Puranen, 2000).

Die „High risk“-Typen sind assoziiert mit sogenannten zervikalen intraepithelialen Neoplasien (CIN), die zu Plattenepithelkarzinomen im Gebärmutterhals entarten können. HPV-Hochrisikotypen werden in mehr als 95% aller Zervixkarzinome gefunden (van den Brule *et al.*, 1990; Bosch und Munoz, 2002). Besonders häufig sind die Typen 16 (>50%) und 18 (bis zu 20%) anzutreffen (Burk, 1999; Walboomers *et al.*, 1999). Desweiteren sind HPV-Hochrisikotypen auch mit Krebserkrankungen im Kopf- und Halsbereich (Parkin *et al.*, 1993; Gillison *et al.*, 2000) sowie mit Karzinomen an Penis (McCance *et al.*, 1986) und Vulva (Pinto *et al.*, 1999; Daling *et al.*, 2002) in Verbindung zu bringen.

2.6.2 Bedeutung von HPV beim Gebärmutterhalskrebs

Gebärmutterhalskrebs ist weltweit die zweithäufigste Krebserkrankung bei der Frau. In Entwicklungsländern stellt das Zervixkarzinom die häufigste Krebsart bei der Frau dar und hat eine hohe Sterblichkeitsrate (Parkin *et al.*, 1993; Munoz *et al.*, 2003).

Wie bereits erwähnt, erfolgt die Übertragung genitaler HPV-Typen durch Sexualkontakte, wobei u. a. Faktoren wie die Anzahl der Sexualpartner (Karlsson *et al.*, 1995; Franceschi *et al.*, 2002; Winer *et al.*, 2003) sowie Immunsuppression (Kiviat *et al.*, 1993; Ho *et al.*, 1994; Palefsky, 2000) das Risiko der Entwicklung von Gebärmutterhalskrebs erhöhen können. Die Infektion mit HPV ist jedoch als notwendige Ursache zur Entstehung des Zervixkarzinoms anzusehen (Gissmann *et al.*, 1984; Munoz *et al.*, 1992; Bosch und Munoz, 2002).

Die meisten HPV-Infektionen werden zwar ohne jegliche Symptomatik durchlaufen (Ho *et al.*, 1998; Woodman *et al.*, 2001; Molano *et al.*, 2003), dennoch können Infektionen lange Zeit persistieren und stellen den größten Risikofaktor für die Entwicklung von Gebärmutterhalskrebs dar. Die Persistenz des Virus kann unter Umständen mit einer zufälligen Integration der viralen DNS in das Wirtszellgenom einhergehen (Münger und Howley, 2002). Diese ist meist mit dem Verlust der Funktion des E2-Protein verbunden, was eine unkontrollierte Expression der viralen Onkogene E6 und E7 zur Folge hat (Jeon und Lambert, 1995). Bei Zervixkarzinomen wird in den meisten Fällen eine Integration der viralen DNS der HPV-Hochrisikotypen ins Zellgenom beobachtet. Diese ist mit einer hohen Expression der Proteine E6 und E7 assoziiert, die die Entartung zum Zervixkarzinom begünstigt (Jeon *et al.*, 1995). Das transformierende Potential dieser Proteine beruht im Wesentlichen auf deren Interaktion mit den zellulären Tumorsuppressorproteinen p53 und pRB. p53 wird bei Vorliegen von DNS-Schäden induziert und führt zu einem Zellzyklusarrest in der G₁-Phase (siehe Kap.

2.3.1), wodurch notwendige Reparaturmechanismen in der Zelle ermöglicht werden. Bei irreversibler DNS-Schädigung induziert es Apoptose, um die geschädigte Zelle zu eliminieren. E6 bindet an p53 und führt zu dessen proteasomalen Abbau (Scheffner *et al.*, 1993). E7 interagiert mit den Retinoblastomproteinen pRB und p107 (Dyson *et al.*, 1989), die an den Transkriptionsfaktor E2F binden. Die Interaktion von E7 mit pRB führt zur Freisetzung von E2F, wodurch die Transkription von Genen, die die Zellproliferation positiv regulieren, induziert werden kann.

Außerdem wurde gezeigt, dass die E6- und E7-Proteine von HPV-Hochrisikotypen in der Lage sind, die Immortalisierung primärer Keratinozyten herbeizuführen (Dürst *et al.*, 1987; Wazer *et al.*, 1995). Die viralen Onkogene können auch unabhängig voneinander Zellen immortalisieren; ihr Zusammenwirken verstärkt jedoch ihre transformierenden Eigenschaften. Das Zusammenkommen zahlreicher Faktoren ist nötig, um letztendlich die maligne Transformation der Zelle zu erreichen (zur Hausen, 2002). Im Falle des Zervixkarzinoms können bis zu diesem Schritt zehn bis 40 Jahre nach der Infektion vergehen.

2.6.3 Die kutanen HPV-Typen

Die Infektion mit kutanen Typen erfolgt durch direkten Hautkontakt oder über kontaminierte Gegenstände (Antonsson *et al.*, 2003). Die Viren dringen über Mikroläsionen in die Haut ein und infizieren dort die Basalzellen. Die meisten Infektionen verlaufen symptomlos. Eine typische Manifestation kutaner HPV-Typen tritt in Form gutartiger Warzen (*Verruca juvenilis*, *Verruca vulgaris*, *Verruca plantaris*) auf, die sich erst Monate bis Jahre nach der Infektion entwickeln und bei Kindern und Jugendlichen weit verbreitet sind. Warzen, die durch die HPV-Typen 1 und 2 verursacht werden, befinden sich meist an Händen und Beinen sowie im Gesicht, aber auch an den Fußsohlen. Häufig tritt eine spontane Regression auf (Akgül *et al.*, 2006). Es wurde festgestellt, dass bei Metzgern und Fleischhändlern Handwarzen außergewöhnlich häufig vorkommen, es gibt jedoch keinen Hinweis auf einen Zusammenhang mit PV von Tieren (Howley und Lowy, 2007).

Unter der besonderen Situation einer Immunsuppression, z.B. nach einer Organtransplantation (Walder *et al.*, 1971; Boyle *et al.*, 1984) sowie bei Vorliegen der bereits erwähnten erblichen Krankheit *Epidermodysplasia verruciformis* (Lewandowsky und Lutz, 1922; Akgül *et al.*, 2006) wird ein Zusammenhang zwischen Hautkrebs und HPV-Infektionen diskutiert. Inwiefern HPV-Infektionen jedoch bei Hautkrebserkrankungen immunkompetenter Patienten eine Rolle spielen, ist bislang unklar.

2.6.4 Bedeutung von kutanen HPV-Typen bei Hautkrebs

Hautkrebs wird in „melanozytären“ sowie „nicht-melanozytären“ Hautkrebs (NMSC = non-melanoma skin cancer) eingeteilt. Im Folgenden ist mit Hautkrebs der „nicht-melanozytäre“, der sogenannte „helle“ Hautkrebs gemeint.

Hautkrebs ist die häufigste Krebsart in der hellhäutigen Bevölkerung mit ständig zunehmendem Auftreten (Biliris *et al.*, 2000), was auf ein verändertes Verhalten der Menschen gegenüber Sonnenlicht sowie eine höhere Lebenserwartung der Bevölkerung zurückzuführen ist. Die Sterblichkeitsrate ist zwar relativ gering, dennoch ist die weitere Erforschung möglicher Ursachen, Vorbeugung sowie die Entwicklung neuer Therapieansätze unbedingt notwendig (Iftner *et al.*, 2003).

Da die Mehrheit der Fälle von Hautkrebs, zu dem aktinische Keratose und Plattenepithel- sowie Basalzellkarzinome einzuordnen sind, an Sonnenlicht-exponierten Körperpartien auftreten, wird UV-Licht als Hauptrisikofaktor betrachtet (Biliris *et al.*, 2000; Duerr *et al.*, 2001). Aktinische Keratose ist meist an Kopf, Armen und Händen von Patienten fortgeschrittenen Alters zu finden. Sie zeigt sich anfangs durch erythematöse, atrophische Herde, die später bräunlich werden und möglicherweise ein Hauthorn bilden (Bühling *et al.*, 1995). Eine maligne Entartung zum Plattenepithelkarzinom ist möglich, daher wird sie als *Carcinoma in situ* klassifiziert (Pfister *et al.*, 2003). Basalzellkarzinome (auch Basaliom genannt), die im Gegensatz zu Plattenepithelkarzinomen keine Neigung zur Metastasierung ausweisen, kommen fünf mal häufiger vor als diese (Ulrich *et al.*, 2002). Beide Tumorarten treten hauptsächlich bei Patienten höheren Alters auf. Basaliome stellen morphologisch ein derbes hautfarbendes Knötchen dar, das sich über Monate bis Jahre zu einem glasigen, zentral atrophierenden Tumor entwickeln kann (Bühling *et al.*, 1995). Das Plattenepithelkarzinom zeigt sich typischerweise in Form eines unscharf begrenzten, derben, teils oberflächlich ulzerierenden Tumors; teilweise sind sogenannte Hornperlen erkennbar (Bühling *et al.*, 1995).

Bei UV-Licht unterscheidet man UV-A-Strahlung (320-400 nm) und UV-B-Strahlung (280-320 nm). Die Effekte der UV-A-Strahlung bestehen in einer lokalen Immunsuppression sowie der Hyperproliferation von Epithelzellen durch die Aktivierung bestimmter Rezeptoren wie z.B. EGFR (Epidermal growth factor receptor). UV-B-Strahlung verursacht DNS-Schäden, wodurch die Aktivierung von p53 induziert wird. p53 bewirkt eine Arretierung des Zellzyklus bei Vorliegen von geschädigter DNS, um deren Reparatur zu ermöglichen. Liegt jedoch eine Mutation von p53 als Folge der UV-Strahlung vor (Brash *et al.*, 1996), kann es zum Überleben und zur Vermehrung mutierter Zellen kommen. Die Hautkrebsentstehung ist als Kaskade anzusehen, an deren Beginn ein p53-Defekt steht, der sich in der Haut manifestiert (Nakazawa

et al., 1994). UV-Licht stellt den Hauptfaktor für die Hautkrebsentstehung dar (Biliris *et al.*, 2000; Duerr *et al.*, 2001), als mögliche Kofaktoren werden genetische Prädisposition, chemische Karzinogene sowie die Infektion mit HPV angesehen.

Eine besondere Situation liegt bei Patienten mit der seltenen Krankheit *Epidermodysplasia verruciformis* (EV) vor, die auf einer genetischen Prädisposition basiert und autosomal-rezessiv vererbt wird. Anhand dieser Erkrankung wurde erstmals ein Zusammenhang von HPV und Hautkrebs beschrieben (Lewandowsky und Lutz, 1922; Akgül *et al.*, 2006). Bei EV-Patienten tritt schon in der Kindheit eine multiple Warzenformation am ganzen Körper auf. Anfänglich handelt es sich um gutartige Hautveränderungen, die jedoch an lichtexponierten Körperregionen in 60% der Fälle zu Plattenepithelkarzinomen entarten (Lutzner *et al.*, 1984; Fuchs *et al.*, 1986). Im Gegensatz zu Plattenepithelkarzinomen, die normalerweise bei Patienten hohen Alters auftreten, entwickeln sie sich bei EV-Patienten bereits in einem Alter von 30-40 Jahren (Orth *et al.*, 1978b; Jablonska und Majewski, 1994). In mehr als 90% dieser Plattenepithelkarzinome sind die HPV-Typen 5 und 8 zu finden (Orth *et al.*, 1978b; Jablonska und Majewski, 1994), aber auch die HPV-Typen 38 und 47 u.v.a. kommen häufig vor und werden daher als EV-Typen bezeichnet. EV-Patienten haben eine defekte zelluläre Immunantwort gegenüber HPV-infizierten Keratinozyten, die zum Teil auf eine verminderte Aktivität natürlicher Killerzellen (Majewski *et al.*, 1990) und zytotoxischer T-Zellen (Cooper *et al.*, 1990) zurückzuführen ist. Außerdem wurde ein DNS-Lokus sowie die Gene EVER 1 und EVER 2 mit EV-assoziierten Mutationen entdeckt (Ramos *et al.*, 2002; Tate *et al.*, 2004).

Während der kausale Zusammenhang zwischen den HPV-Hochrisikotypen beim Gebärmutterhalskrebs aufgrund derer Präsenz in mehr als 95% der Fälle unbestritten ist (van den Brule *et al.*, 1990; Bosch und Munoz, 2002), ist beim Hautkrebs die genaue Rolle von HPV noch nicht geklärt. So weisen die E6- und E7-Proteine von HPV-EV-Typen im Gegensatz zu denen genitaler Hochrisikotypen *in vitro* nur ein geringes Transformationspotential auf. Dennoch kann die Hemmung der UV-induzierten Apoptose durch kutane HPV-Typen zu einer Anhäufung genetisch veränderter Zellen in der Haut führen und letztendlich die Entstehung von Hautkrebs zur Folge haben. HPV kann bei Hautkrebs immunkompetenter Patienten nur in ca. 30% der Fälle (Shamanin *et al.*, 1996; Biliris *et al.*, 2000) nachgewiesen werden. Bei Immunsupprimierten steigen die Zahlen auf 70-80% der Fälle und bei EV-Patienten sogar darüber an (Harwood *et al.*, 2000; Purdie *et al.*, 2005).

2.7 Transformierende Eigenschaften der Papillomviren bei Tieren

Auch bei Tieren ist die Entstehung maligner Tumore durch PV bekannt. Bei Rindern wurden Karzinome im oberem Verdauungstrakt gefunden, die mit der wiederholten Aufnahme von Adlerfarn in der Nahrung in Zusammenhang stehen (Jarrett *et al.*, 1978; Campo, 1997). Die maligne Entartung der durch BPV4 verursachten Papillome basiert auf den Interaktionen des Virus und der im Adlerfarn enthaltenen Inhaltsstoffe, die sowohl karzinogene als auch immunsuppressive Eigenschaften haben (Campo, 1997). Bei gesunden und immunkompetenten Tieren würden sich die anfänglich gutartigen Hyperproliferationen aufgrund der zellvermittelten Immunantwort zurückbilden. Bedingt durch die immunsuppressiven Inhaltsstoffe findet jedoch keine effektive Immunantwort statt. Somit können sich die Papillome ausbreiten. Der Einfluss der ebenso enthaltenen chemischen Karzinogene führt schließlich durch Transformation zum Karzinom (Jarrett *et al.*, 1978; Campo, 2002). Darüber hinaus konnten Neoplasien in der Harnblase in Verbindung mit einer Fütterung von Adlerfarn festgestellt werden (Campo und Jarrett, 1986). Wie beim Hauskaninchen und in equinen Sarkoiden führt die Progression zum Karzinom im Rind zu einer abortiven PV-Infektion. Es liegen zwar viele BPV-Kopien episomal vor, doch es erfolgt nur die Expression früher Gene; Viruspartikel sind nicht nachzuweisen (Nasir und Reid, 1999).

Wie bereits erwähnt, führt die experimentelle Infektion von Hauskaninchen mit CRPV zur vermehrten malignen Entartung zunächst gutartiger Papillome. Im natürlichen Wirt erfolgt meist eine spontane Regression, nur bei etwa 23% der Fälle wird eine maligne Entartung beobachtet (Rous und Beard, 1935). Bei CRPV-infizierten Hauskaninchen ist die Situation umgekehrt: In ca. 80% der Fälle entarten die entwickelten Papillome nach sechs bis 14 Monaten zu invasiv wachsenden Karzinomen (Syverton, 1952; Wettstein *et al.*, 1987). Im weiteren Verlauf sind ebenfalls Metastasenbildung insbesondere in der Lunge und den regionalen Lymphknoten zu beobachten. Hierbei ist die maligne Entartung nicht an einen Kofaktor wie die Aufnahme von Adlerfarn gebunden, ein Zusammenhang zwischen abortiver, wirtsfremder Infektion und erhöhter Karzinogenese ist jedoch sehr wahrscheinlich.

2.8 Auswirkungen einer systemischen Immunsuppression

Krebserkrankungen stellen ein schwerwiegendes Problem bei Patienten nach einer Organtransplantation dar (Walder *et al.*, 1971; Boyle *et al.*, 1984). Dazu gehören sowohl die Entwicklung neuer Neoplasien als auch Rezidive bereits vorausgegangener Krebserkrankungen (Guba *et al.*, 2002). Zur Krebsentstehung trägt die lebenslange systemische Immunsuppression bei, die nach einer Organtransplantation nötig ist, um die Abstoßung des Fremdorgans zu

verhindern. Sie wird medikamentell durch die dauerhafte Gabe von Immunsuppressiva (z.B. Cyclosporin A, Azathioprin) induziert (Aktories *et al.*, 2005).

Hautkrebs ist wiederum die häufigste Krebsart bei Organ-transplantierten Patienten und steht in Zusammenhang mit HPV-Infektionen (Ulrich *et al.*, 2002). Die Immunsuppression bewirkt eine Reaktivierung latent vorliegender HPV-Infektionen, die bei gesunden Menschen durch das Immunsystem kontrolliert werden. Die Folge ist das Auftreten multipler Warzen sowie Hautkrebs bei 40% der Organempfänger innerhalb der ersten fünf Jahre nach der Transplantation (Ulrich *et al.*, 2002). Organ-transplantierte Patienten haben im Vergleich zur normalen Bevölkerung ein bis zu 200-fach erhöhtes Risiko für Plattenepithelkarzinome und ein bis zu 10-fach erhöhtes Risiko für Basalzellkarzinome (Stockfleth *et al.*, 2001).

2.9 Das Immunsuppressivum Cyclosporin A versus Rapamycin im Hinblick auf Tumorentstehung

Unter Immunsuppression sind neben der gewünschten Wirkung der Transplantaterhaltung unvermeidlich auch wichtige Mechanismen der Immunabwehr betroffen (Aktories *et al.*, 2005). Es gibt unterschiedliche Wirkungsweisen von Immunsuppressiva, wobei hier nur auf diese der im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Wirkstoffe Cyclosporin A (CsA) und Rapamycin (Rapa) eingegangen werden soll.

Eine wirksame Immunsuppression wird dadurch erreicht, dass die Anzahl der im Körper vorhandenen T-Lymphozyten vermindert wird (Aktories *et al.*, 2005). Diese haben eine zentrale Bedeutung für die Regulation der zellspezifischen Immunantwort und die Erkennung bzw. Eliminierung virusinfizierter Zellen oder Tumorzellen (Modrow und Falke, 1997). Das Lymphokin Interleukin-2, das für T-Lymphozyten einen essentiellen Wachstumsfaktor darstellt, wird selbst wiederum von einer Gruppe der T-Lymphozyten gebildet (Aktories *et al.*, 2005).

CsA zählt zur Gruppe der Inhibitoren der Interleukin-2-Synthese. Seine Wirkung führt zu einer Arretierung der Zellen in der G₀-Phase des Zellzyklus (siehe Kap. 2.3.1). Durch seine Bindung an den zytosolischen Rezeptor Cyclophilin wird durch die Hemmung der Proteinphosphatase Calcineurin die Interleukin-2-Transkription verhindert und somit die T-Lymphozyten-Proliferation gehemmt (Schreiber und Crabtree, 1992).

Rapa (auch Sirolimus genannt) hingegen gehört der Gruppe der Inhibitoren der Interleukin-2-induzierten Zellproliferation an. Das bedeutet, es hemmt nicht wie CsA die Produktion von Interleukin-2, sondern die durch Interleukin-2 vermittelte Zellproliferation und verhindert somit den Übergang des Zellzyklus von der G₁- in die S-Phase (siehe Kap. 2.3.1). Rapa bindet an den zytosolischen Rezeptor FKBP-12, der mit hoher Affinität an mTOR-Rezeptoren

(mTOR=mammalian target of rapamycin) bindet. Das führt zu einer Hemmung von mTOR, einer Serin-/Threonin-Kinase. Daraufhin wird die für die Proteinsynthese und den Zellzyklus notwendige Aktivierung der S6-Kinase unterbunden (Wiederrecht *et al.*, 1995). Diese Blockierung der Interleukin-2-stimulierten Lymphozytenteilung ist die Basis für den erfolgreichen klinischen Einsatz von Rapa zur Verhinderung der Transplantatabstoßung (Kahan, 2000).

Desweiteren hemmt Rapa die durch Wachstumsfaktoren induzierte Proliferation verschiedener Nicht-Immunzellen und vermindert Tumorwachstum sowie Angiogenese (Aktories *et al.*, 2005). Die anti-angiogene Wirkung von Rapa basiert auf der reduzierten Produktion von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) sowie der Blockade von VEGF-induzierten Endothelzellsignalen (Guba *et al.*, 2002). VEGF ist einer der zentralen Regulatoren bei der Entwicklung von Blutgefäßen. Im Allgemeinen ist Tumorwachstum maßgeblich auf die Angiogenese angewiesen (Guba *et al.*, 2002).

Eine Immunsuppression unter CsA gilt als förderlich für die Krebsentstehung (Ondrus *et al.*, 1999; Guba *et al.*, 2002). Im Vergleich der beiden Immunsuppressiva in Tierversuchen wurden in Hinblick auf die Tumorentstehung gegensätzliche Effekte ermittelt (Guba *et al.*, 2002). Unter Rapa waren sowohl Vaskularisierung als auch Tumorwachstum sowie Metastasenbildung im Vergleich zu CsA in einem geringeren Ausmaß festzustellen (Guba *et al.*, 2002).

Mit der anti-angiogenen (Guba *et al.*, 2002), anti-proliferativen (Bjornsti und Houghton, 2004) sowie anti-metastasierenden (Luan *et al.*, 2002) Wirkungsweise von Rapa besteht die Hoffnung auf den Einsatz eines Immunsuppressivums, mit dessen Hilfe die Tumorentstehung auch bei langfristiger Verabreichung kontrollierbar wird.

2.10 Prävention und Therapie Papillomvirus-bedingter Erkrankungen

2.10.1 Prophylaxe und Therapie des Zervixkarzinoms

Zur Eindämmung des Auftretens von Zervixkarzinomen hat sich regelmäßiges Screening nach transformierten Zellen am Muttermund bewährt, was beispielsweise in den USA zu einer Senkung um 80% führte (Lowy und Schiller, 2006). Dieses ermöglicht die frühzeitige Erkennung von Dysplasien an der Zervix. Milde Dysplasien sind gewöhnlicherweise nicht behandlungsbedürftig, da sie meist spontan verschwinden (Howley und Lowy, 2007). Die Therapie des Zervixkarzinoms besteht aus chirurgischer Entfernung, Bestrahlung bzw. Chemotherapie (Howley und Lowy, 2007).

2.10.2 Therapie Papillomvirus-induzierter Hautläsionen

Warzen werden üblicherweise durch die lokale Applikation von ätzenden Substanzen wie z.B. Salizylsäure behandelt. Desweiteren werden zur Therapie benigner und maligner Läsionen mit Hautlokalisation Kryotherapie, chirurgische Entfernung, Chemotherapie oder Laserbehandlung angewandt (Howley und Lowy, 2007). Außerdem finden teilweise immunmodulierende Substanzen Anwendung (siehe Kap. 2.10.3).

2.10.3 Behandlung mit immunmodulierenden Substanzen

Die immunmodulierenden Substanzen Imiquimod und Interferon wurden bereits erfolgreich bei der lokalen Behandlung von Genitalwarzen eingesetzt (Cirelli und Tyring, 1994; Edwards *et al.*, 1998; Beutner *et al.*, 1999b). Die Wirkung von Imiquimod beruht auf einer Bindung an Toll-like-Rezeptor-7, woraufhin eine Immunantwort ausgelöst wird, die durch Induktion von Zytokinen wie Interferon α , Tumornekrosefaktor α sowie einiger Interleukine eine Th-1-Antwort hervorruft. Die Aktivierung dieser Zytokine bewirkt wiederum die Wanderung Antigen-präsentierender Zellen in die regionalen Lymphknoten (Sauder, 2004).

Die Anwendung der Interferontherapie war hingegen bei der Behandlung der respiratorischen Papillomatose weniger erfolgreich (Howley und Lowy, 2007).

2.10.4 Therapie Papillomvirus-bedingter Krankheitsbilder beim Tier

Zur Behandlung der oralen Papillomatose des Hundes werden Einzeltiervakzinen, die Formalin-inaktivierte COPV-*Virionen* enthalten, angewandt (Bell *et al.*, 1994).

Auch beim Rind finden aus Warzenextrakt hergestellte Einzeltier- bzw. stallspezifische Vakzinen Anwendung. Je nach Lokalisation der Papillome (z.B. an den Zitzen) werden diese chirurgisch entfernt.

Die Therapie des equinen Sarkoids erfolgt chirurgisch bzw. durch Kryobehandlung. Allerdings zeigen sich die Sarkoide oftmals therapieresistent bzw. neigen nach chirurgischer Entfernung zur Rezidivierung (Campo, 1997).

2.10.5 Schutz gegen Papillomvirus-bedingte Erkrankungen durch Vakzinierung

Impfungen stellen im Allgemeinen den effektivsten Schutz gegenüber Viruserkrankungen dar und sind somit auch zur Prophylaxe und Therapie virusbedingter Tumorerkrankungen sehr erfolgsversprechend.

Erste Vakzinierungsversuche gegen PV-Infektionen wurden anhand von BPV, CRPV sowie COPV durchgeführt. Mit Hilfe von Lebendimpfstoffen gegen BPV-2 und BPV-4 konnte eine

typen-spezifische Immunantwort ausgelöst werden, die zur Produktion neutralisierender Antikörper führte (Campo, 1994). Ebenso wurde mit Subunit-Vakzinen, die auf den Strukturproteinen L1 und L2 von BPV-2, sowie den Proteinen L2 und E7 von BPV-4 basierten, eine effektive Infektionsprophylaxe und Antikörperbildung erreicht (Campo, 1994).

Anhand von Versuchen mit Tiermodellen für PV-Infektionen konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe von Vakzinen, die auf VLPs (VLP=Virus-like particle, virusähnlicher Partikel) basieren, aufgrund der Produktion typen-spezifischer neutralisierender Antikörper ein effektiver Schutz vor einer Infektion induziert wird. Diese Erkenntnis war der Beginn der Entwicklung von Vakzinen gegen PV-Infektionen beim Menschen.

Mittlerweile sind Impfstoffe gegen HPV-Infektionen auf dem Markt, die auf von L1-Kapsidproteinen gebildeten VLPs basieren. Die Impfungen erfolgen in Form von drei intramuskulären Injektionen über den Zeitraum von sechs Monaten (Lowy und Schiller, 2006). Es ist sowohl eine bivalente Kombinationsvakzine gegen HPV 16 und 18 („Cervarix“, GlaxoSmithKline) als auch eine quadrivalente gegen HPV 16, 18, 6 und 11 („Gardasil“, Merck) erhältlich (Lowy und Schiller, 2006). Die quadrivalente Vakzine kombiniert die Typen, die für das Zervixkarzinom verantwortlich sind (HPV 16 und 18) und HPV 6 und 11 als ursächliches Agens für *Condylomata acuminata* (Lowy und Schiller, 2006). Möglicherweise liegt der größte Erfolg der Impfung in der Prävention einer HPV-Infektion, somit würden Mädchen und junge Frauen vor Beginn ihrer sexuellen Aktivität die primäre Zielgruppe für die Vakzinierung darstellen. Erhofft wird u.a. aber auch ein Schutz vor Genitalwarzen bei Männern (Lowy und Schiller, 2006). Zukünftig werden epidemiologische Studien den Effekt dieser Kombinationsimpfungen hervorheben. Allerdings ist bereits klar, dass zur Vorsorge von Gebärmutterhalskrebs regelmäßiges Screening nach transformierten Zellen am Muttermund unumgänglich ist. In Entwicklungsländern ist Gebärmutterhalskrebs jedoch die häufigste Krebsart der Frau und weist eine hohe Sterblichkeitsrate auf. Diese Tatsache ist auf die mangelnde Teilnahme der Frauen an regelmäßigen Vorsorgeuntersuchungen zurückzuführen. Besonders dort wäre die prophylaktische Vakzinierung sehr vielversprechend.

2.11 Das Tiermodell *Mastomys coucha* zur Untersuchung der Papillomvirus-induzierten Hautkarzinogenese

Mit der *Mastomys coucha*-Kolonie steht dem DKFZ ein einmaliges Tiermodell zur Untersuchung der papillomvirusinduzierten Hautkarzinogenese zur Verfügung. Die Kolonie ist die einzige, die mit dem spezies-spezifischen MnPV persistent infiziert ist. Bei den Tieren handelt es sich um Vertreter der Spezies „*Mastomys coucha*“, das Virus wurde jedoch nach den



Abb. 4: Eine *Mastomys* (oben) neben einer Maus der Spezies „Black Six“ (unten).

sehr engen Verwandten „*Mastomys natalensis*“ benannt. Dieses resultiert aus der Tatsache, dass zum Zeitpunkt der Entdeckung des Virus eine Unterscheidung der Spezies „*coucha*“ und „*natalensis*“ noch nicht bekannt war (Green *et al.*, 1980; Haag *et al.*, 2000). *Mastomys* werden aufgrund ihrer zahlreichen Zitzen (16-24) auch als „Vielzitzenmaus“ bezeichnet. Die Vielzitzenmaus ist größtmäßig zwischen Ratte und Maus einzuordnen (siehe Abb. 4), zählt jedoch weder

zur Gattung Maus (*Mus*) noch zur Gattung Ratte (*Rattus*), sondern bildet innerhalb der Familie der Langschwanzmäuse (*Muridae*) der Ordnung Nagetiere (*Rodentia*) eine eigene Gattung. Abb. 6 zeigt die Einordnung in den Stammbaum.

Die Tiere kommen in verschiedenen Fellfarben vor. Man unterscheidet eine braune Variante und eine auf einer Mutation beruhende sandfarbene Variante sowie in seltenen Fällen Schecken. Abb. 5 zeigt einen weiblichen (links) sowie einen männlichen (rechts) Vertreter. Beide Tiere sind ausgewachsen und ungefähr gleichen Alters.

Der natürliche Lebensraum von *Mastomys* ist in Afrika, südlich der Sahara. Als Labortiere werden sie bereits seit langer Zeit gerne zur Untersuchung von Tropenkrankheiten wie Lassa-Fieber genutzt (Randeria, 1978).

Dem DKFZ steht das Tiermodell *Mastomys* bereits seit 1969 zur Verfügung. Die Tiere stammen vom Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität in Gießen, wo auch die sandfarbene, rotäugige Variante durch Inzucht erzeugt wurde. Die Vorfahren der Kolonie in Heidelberg wurden von der Zucht in Gießen abgespalten, bevor dort die Reinzucht der Mutante begonnen wurde. Somit sind in der *Mastomys*-Kolonie im DKFZ sowohl braune als auch sandfarbene Fellfarben zu finden.

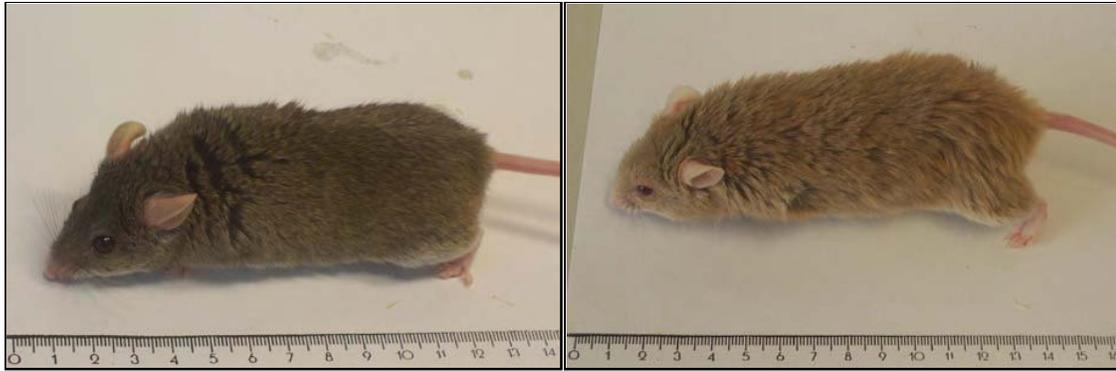


Abb. 5: *Mastomys coucha*. Links ist ein Weibchen, rechts ein Männchen zu sehen. Es handelt sich um adulte Tiere. Die sandfarbene Variante (rechts) wurde durch Inzucht erzeugt und beruht auf einer Mutation. Tiere mit sandfarbenem Fell haben stets rote Augen.

Für die Krebsforschung wurden *Mastomys* aufgrund der Beobachtung interessant, dass ein Teil der Tiere ab einem Alter von einem Jahr Magenkarzinome entwickelt (Oettlé, 1957). Als Ursache hierfür wird ein genetischer oder exogener Faktor wie ein Virus oder Karzinogene im Futter postuliert (Simmers *et al.*, 1968). In der Kolonie am DKFZ ist bislang kein Fall eines spontanen Magenkarzinoms aufgetreten.

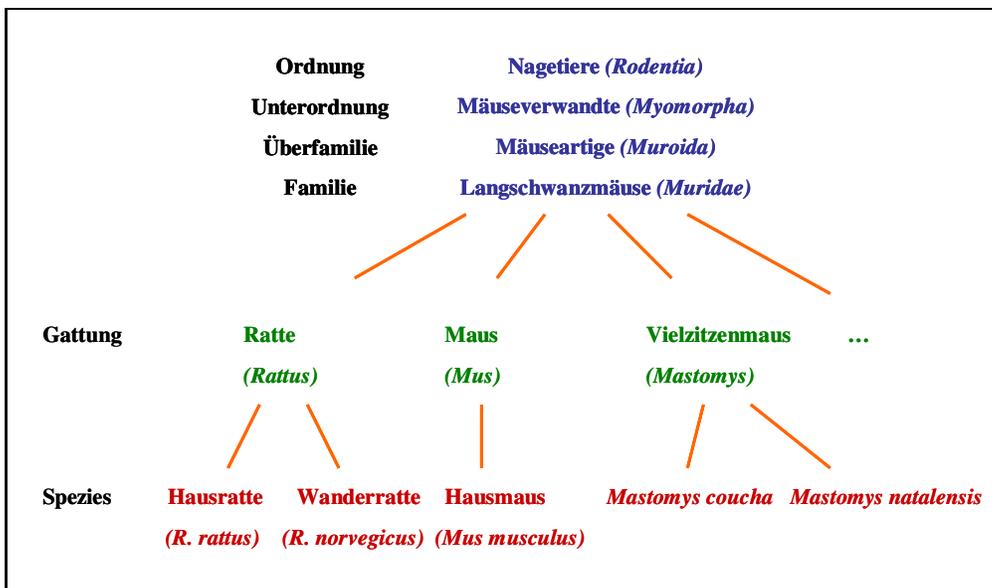


Abb. 6: Die Einordnung von *Mastomys* in der Systematik. *Mastomys* bildet neben Ratte und Maus eine eigene Gattung.



Abb. 7: Ein Beispiel für eine Keratoakanthom-artige Hautläsion einer *Mastomys*. Typisch für das Keratoakanthom ist die kraterförmige Einsenkung seiner Oberfläche und der zentrale Hornpfropf.

(Bühling *et al.*, 1995). Mit zunehmenden Alter sind bei den Tieren vermehrt Hautläsionen festzustellen.

Bereits in den 1970er Jahren wurden zahlreiche Viruspartikel in spontanen Hautläsionen in keratinisierten Zellen des *Stratum granulosum* und *Stratum corneum* (siehe Abb. 22) festgestellt (Reinacher *et al.*, 1978) und es gelang die Isolation von MnPV-DNS und viralen Partikeln aus Hautläsionen. Die Übertragung von Viruspartikeln auf nicht-infizierte Tiere führte ebenfalls zur Entwicklung von Hauttumoren, aus denen wiederum MnPV-DNS isoliert werden konnte. Wurden jedoch die Virionen vor der Übertragung mit einem Anti-MnPV-Serum behandelt, blieb die Tumorentwicklung aus. Somit wurde MnPV als infektiöses Agens charakterisiert (Müller und Gissmann, 1978).

In der Vergangenheit wurden einige Studien durchgeführt, um die Tumorzinzidenz zu steigern und das Auftreten von Plattenepithelkarzinomen zu induzieren. Die oberflächliche Applikation des Tumorpromotors TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat) führte zu einer deutlich erhöhten Inzidenz gutartiger Hautläsionen, doch nur die wiederholte Anwendung mit dem Karzinogen DMBA (7, 12-Dimethylbenzanthrazen) führte schließlich zum Auftreten maligner Tumore (Wayß *et al.*, 1981). Eine erhöhte Inzidenz benigner Tumore wurde auch durch chronische Hautirritationen, die zu entzündlichen und hyperproliferativen Reaktionen der Epidermis führten, ausgelöst (Siegmund *et al.*, 1991).

Desweiteren wurde in vorausgegangenen Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe ein MnPV-E6 transgenes Mausmodell etabliert. Nach Anwendung der Zwei-Stufen-Karzinogenese (siehe Methoden Kap. 3.1.9) entwickelten mehr als 99% der Tiere Plattenepithelkarzinome, im Vergleich zu nur 10% der nicht-transgenen Artgenossen (Helfrich *et al.*, 2004). Hierbei konnte

Die im DKFZ lebenden *Mastomys* bilden die weltweit einzige persistent mit MnPV infizierte Kolonie. Ein Teil der Tiere entwickelt ab einem Alter von ca. zehn Monaten spontan gutartige Hautveränderungen (Burtscher *et al.*, 1973) wie Papillome und Kerato-akanthome (Rudolph und Thiel, 1976), die meist am Kopf, an Schnauze und Ohren sowie am Rumpf lokalisiert sind (siehe Abb. 7). Keratoakanthome unterscheiden sich von den warzenartigen Papillomen durch die kraterförmige Einsenkung ihrer Oberfläche und den zentralen

gezeigt werden, dass das MnPV-E6-Protein, das bei dem Tiermodell in den basalen Hautschichten exprimiert wurde, an der Entwicklung von Karzinomen beteiligt ist.

Außerdem lässt das Tiermodell einen Vergleich zur Papillomvirus-induzierten Hautkrebsentstehung bei immunsupprimierten Patienten zu. Wie bereits erwähnt, stehen bei Menschen, die nach einer Organtransplantation lebenslang immunsupprimiert werden, latente HPV-Infektionen in möglichem Zusammenhang mit der Hautkrebsentstehung. In dieser Hinsicht eignet sich das *Mastomys*-Modell aufgrund der persistenten MnPV-Infektion für einen Vergleich mit der Hautkarzinogenese bei humanen Organempfängern. Zur Untersuchung der Tumorentwicklung unter Immunsuppression können den Tieren Medikamente mit immunsuppressiver Wirkung verabreicht werden, die auch in der Humanmedizin Verwendung finden.

2.12 Zielsetzung dieser Arbeit

Obwohl das Tiermodell *Mastomys coucha* bereits seit mehr als 30 Jahren existiert, ist bislang nur wenig über die Ursachen der Tumorentstehung bekannt. Die kausalen Faktoren der Reaktivierung latenter Infektionen als Auslöser für die Tumorentstehung sind weitgehend ungeklärt. Darüber hinaus ist auch der Weg der Verbreitung des Virus innerhalb der Kolonie nicht bekannt. Das *Mastomys*-Modell bietet ein optimales Modellsystem zur Erforschung der Papillomvirus-bedingten Hautkarzinogenese, sowohl unter natürlichen Bedingungen als auch unter medikamentell induzierter Immunsuppression, und soll zur Klärung vieler offener Fragen beitragen.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Tumorinzidenz bei den MnPV-infizierten Tieren. Es wurden geschlechtsspezifische Unterschiede beim Auftreten von Tumoren betrachtet. Hauptaugenmerke wurden auf die Verteilung des Virus im Organismus durch Untersuchung von Haut, Hautläsionen sowie inneren Organen auf das Vorkommen von MnPV-DNS gesetzt. Desweiteren wurde der physikalische Status der Virus-DNS im Hinblick auf eine Integration ins Wirtszellgenom oder episomales Vorliegen untersucht.

Mittels *in situ*-Hybridisierung wurde die Lokalisation MnPV-positiver Zellen im Gewebe untersucht.

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigte sich mit dem Einfluss von Immunsuppressiva auf die Persistenz von PV. Hierbei wurde das etablierte Tiermodell verwendet, um die immunsuppressiv wirkenden Substanzen Rapamycin und Cyclosporin A im Hinblick auf ihre Auswirkungen auf die Tumorentstehung bei *Mastomys coucha* zu vergleichen.

3 Material

3.1 Chemikalien und Reagenzien

[$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP 10 mCi/ml	Amersham, Freiburg
10x PCR-Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
2-Propanol, Isopropanol	Merck, Darmstadt
AEC, 3-Amino-9-Ethylcarbazol	Sigma-Aldrich, München
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Altromin 1324 N FORTI (Haltungsfutter für Ratten und Mäuse)	Altromin GmbH, Lage
Ammoniumacetat	Sigma-Aldrich, München
Biogel P30	BioRad, München
Biomax Röntgenfilme	Kodak, Cedex, Frankreich
Biotin-Nick-Translations-Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
Bovines Serum Albumin Fraktion V (BSA)	Biomol, Hamburg
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, München
Cacodylat	Sigma-Aldrich, München
Chloroform	Merck, Darmstadt
Corbitbalsam	Fa. Hecht, Kiel
Cyclosporin A	Fagron, Barsbüttel
Dextranblau	Sigma-Aldrich, München
DMBA (7,12-Dimethylbenzanthrazen)	Sigma-Aldrich, München
DNA Quant Off	MP Biomedicals, Heidelberg
DNS-Marker	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
dNTPs (für PCR)	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Roche Diagnostics, Mannheim
Eosin	Roth, Karlsruhe
Epoxidharz	Sigma-Aldrich, München
Ethanol absolut	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid 95%	Sigma-Aldrich, München
Ficoll (Typ 400)	Sigma-Aldrich, München
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt

Glucose	Sigma-Aldrich, München
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich, München
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glyzin	Sigma-Aldrich, München
H ₂ O ₂	Merck, Darmstadt
Hämatoxylin	Roth, Karlsruhe
Hexa Labelling Kit	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
Hexamer Primer	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
Hypochlorsäure	Merck, Darmstadt
Immu-mount	Thermo, Shandon, USA
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isofluran	Baxter Medication, Unterschleißheim
LightCycler/Fast Start Master SYBR Green I	Roche, Mannheim
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Meyers Häkalaun	AppliChem, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Natriumziträt	Sigma-Aldrich, München
Nucleospin 96 Genomic Extraction Kit	Macherey Nagel, Düren
Osmiumtetroxyd	Sigma-Aldrich, München
Polyvinylpyrolidon	Sigma-Aldrich, München
Proteinase K	Sigma-Aldrich, München
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
Rapamycin, Rapamune	Wyeth Pharma, Münster
Restriktionsenzym HindIII	New England Biolabs, Frankfurt
RNase A	Qiagen, Hilden
Roti-Phenol	Roth, Karlsruhe
SDS (Sodium-Dodecylsulfat)	Sigma-Aldrich, München
sssDNS (Shredded single stranded salmon sperm DNA)	Eppendorf, Hamburg
Standardfutter für Haltung von Ratten und	SSNIFF Spezialdiäten, Soest

Mäusen V 1534 10 mm Pellets (als Futterbasis für Rapa/CsA bzw. Kontrollgruppe)	
Taq-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat)	Sigma-Aldrich, München
Tris-Base	Sigma-Aldrich, München
tRNA	Sigma-Aldrich, München
TSA amplification kit	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
Uranylacetat	Sigma-Aldrich, München

3.2 Arbeitsmaterial

Autoradiographie-Kassetten (Kodak)	Siemens, Stuttgart
Baby-EDTA-Röhrchen (2 ml)	Kindbeither, Heidelberg
Deckgläschen 18mm	Roth, Karlsruhe
Einmalpinzetten, steril	Wenzel, Heidelberg
Einmalskalpelle	Sigma-Aldrich, München
Falcon-Röhrchen (15 ml, 20 ml)	Greiner, Frickenhausen
Frischhaltefolie	Igefa, Bremen
GeneScreen plus Membran	Perkin-Elmer, Rodgau-Jügesheim
Glaspipetten	Renner, Darmstadt
Glaswolle, silikonisiert	Serva, Heidelberg
Hyperfilm ECL (18x24cm)	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Kryo-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
Objektträger, beschichtet	Roth, Karlsruhe
Operationsbesteck	Eickemeyer, Tuttlingen
Papierfalthandtücher	Roth, Karlsruhe
Phase Lock System (2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Steinbrenner, Heidelberg
Plastikspritzen, steril (1 ml, 2 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Sterilfilter, 2 µm	Millipore, Eschborn
Vicryl Nahtmaterial, steril	Ethicon, Norderstedt
Whatman-Papier	Schleicher & Schuel, Madeland, England

3.3 Geräte

Analysenwaage 2004 MP	Sartorius, Göttingen
Elektronenmikroskop EM10A	Zeiss, Jena
Elektrophoresekammer, horizontal	Renner, Darmstadt
Geigerzähler LB1210	Berthold, Wildbad
Hybridisierungsöfen	Helmut Baur, Reutlingen
Leica DMRD Fluoreszenzmikroskop	Leitz, Wetzlar
LightCycler Instrument 1,0	Roche, Mannheim
Mikroskop CK2	Olympus, Hamburg
Narkosegerät LABVET für Labortiere	Eickemeyer, Tuttlingen
pH-Meter Calimatic 765	Knick, Berlin
Photometer Ultraspec 3000	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Power Supply EPS 600	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Sterile Werkbank BioGard Hood	Baker Company, Sanford, USA
Thermal Cycler PT200	Biorad, München
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Vortexer	Heidolph, Rust
Waage 1216 MP	Julabo, Seelbach
Zentrifuge 2K15	Sigma-Aldrich, München
Zentrifuge Megafuge 1,0	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Minifuge RF	Heraeus, Hanau

3.4 cDNS für Hybridisierung

MnPV	Komplettes Genom	Accession-Nr. U01834
------	------------------	----------------------

3.5 Primersequenzen und Lokalisation

3.5.1 Primer für PCR-Analysen

Interner Name	Bezeichnung	Sequenz	Position	Produktgröße in Basenpaaren (Bp)
ATV 71	MnPV E6 forward	act cct ttg tgg agc ggc tg	117-136	378
ATV 72	MnPV E6 reverse	caa att ctg cac cgt gcc ctc	495-475	
ATV 73	MnPV E7 forward	gct gtc tca ccg gcg aaa ct	532-551	269
ATV 74	MnPV E7 reverse	ttc aag atc ttc cat tct tct g	801-780	
MnE1 F	MnPV E1 forward	cga tga cgg aac aca aac ac	912-931	263
MnE1 R	MnPV E1 reverse	acc tga aac ccc gaa gaa gt	1175-1156	
MnE2 F	MnPV E2 forward	aaa cat tgg ggc ttg ttg ag	2627-2646	341
MnE2 R	MnPV E2 reverse	gcc att tgg atc agc aaa gt	2968-2949	
MnE4 F	MnPV E4 forward	aca gca gca gca acc aga ta	3228-3247	233
MnE4 R	MnPV E4 reverse	ccg gtg gtt ttg tcc tgt ag	3461-3442	
MnL1 F	MnPV L1 forward	tct aca ccc gtc att gtc ca	5738-5757	379
MnL2 R	MnPV L1 reverse	gcc acg agc tat ctc cac tc	6117-6098	
MnL2 F	MnPV L2 forward	tcc acc ctg tac ctc ctg ac	4672-4691	350
MnL2 R	MnPV L2 reverse	gtg gtg tgc tgg tcc tac ct	5022-5003	

3.5.2 Primer für Realtime-PCR mit LightCycler Instrument 1,0 (LC)

Interner Name	Bezeichnung	Sequenz	Position	Produktgröße (in Bp)
LC E7 F	MnPV E7 forward LC	tgc agt ggc tgg ttt gat ag	820-839	94
LC E7 R	MnPV E7 reverse LC	tcg aac atg tcc gca ata ga	914-895	

3.5.3 Aktin-Primer

Interner Name	Bezeichnung	Sequenz	Position	Produktgröße (in Bp)
ATV 49	Aktin forward	acc cac act gtg ccc atc tac ga	Exon 3 Aktin (Maus)	600 (ohne Introns)
ATV 50	Aktin reverse	ctt gct gat cca cat ctg ctg ga	Exon 5 Aktin (Maus)	1000 (mit Introns)

3.6 Lösungen

Biogel-Suspension	1x TE-Puffer 5 mM NaCl 0,2% SDS 50% Biogel P30
Cacodylat-Puffer 0,05 M	10,7 g Cacodylat pH7,2 (angepasst mit HCl) ad 1000 ml H ₂ O
Denaturierungspuffer für Southern Blot	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH
Denhardt-Lösung	5% BSA 5% Ficoll Typ 400 5% Polyvinylpyrrolidon 25
DNS-Ladepuffer (6x)	0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylen-Zyanol 15% Ficoll (Typ 400)
DNS-Lyse-Puffer	100 mM NaCl 100 mM Tris, pH8 25 mM EDTA 0,5% SDS 40 mM DTT
Formalinlösung mit Phosphatpuffer	3,7/4% Formaldehyd 29 mM NaH ₂ PO ₄ (4 g/l) 46 mM Na ₂ HPO ₄ (6,5 g/l)
Glutaraldehyd-Lösung 2,5%ig	2,5 ml Glutaraldehyd Ad 25 ml Cacodylat-Puffer
Glyzinpuffer für <i>in situ</i> -Hybridisierung	0,05 M Glyzin in 1xTBS
H ₂ O ₂ -Lösung für <i>in situ</i> -Hybridisierung	0,3% H ₂ O ₂ in 1xTBS

Hybridisierungslösung <i>in situ</i> -Hybridisierung	50% Formamid 2x SSC 1mg/ml sssDNS 0,05 M NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ 1 mM EDTA
Hybridisierungslösung Southern Blot	50% Formamid 10 U/ml tRNA 5x SSC 0,1% Denhardt-Lösung 0,05 M Natriumphosphatpuffer, pH6,5
Lyse-Puffer zur Extraktion von DNS aus Blut	155 mM NH ₄ Cl 10 mM KHCO ₃ 0,1 mM EDTA pH 7,4
Natriumacetat pH4,8	3 M Natriumacetat, angeglichen mit HCl
Natriumzitatpuffer <i>in situ</i> -Hybridisierung	82 mM Natriumzitat (Stock 0,1 M, 82 ml/l) 18 mM Zitronensäure (Stock 0,1 M, 18 ml/l)
Neutralisationspuffer für Southern Blot	1,5 M NaCl 0,5 M Tris, pH7,0
Osmiumtetroxyd-Lösung 2%ig	1 g Osmiumtetroxyd 25 ml Aqua bidest. 25 ml Cacodylat-Puffer
PBS	123 mM NaCl 7,6 mM Di-Natrium-Hydrogenphosphat-Dihydrat 10 mM Kalium-Dihydrogenphosphat pH7,2-7,8
Phosphatpuffer für <i>in situ</i> -Hybridisierung	10 mM NaH ₂ PO ₄ 37 mM Na ₂ HPO ₄
SSC (20x)	3 M NaCl 0,3 M Tri-Natriumzitat-Dihydrat

TAE (1x)	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA
TBS (1x)	20 mM Tris/HCl 137 mM NaCl 1 M Hydrochloresäure pH 7,6
TE (1x)	10 mM Tris/HCl 1 mM EDTA pH8,0
TNE (1x)	10 mM Tris/HCl pH8,0 20 mM EDTA 200 mM NaCl 0,4% SDS 0,1% Bromphenolblau 0,5% Dextranblau
Trypanblau-Lösung	0,25% Trypanblau
Uranylacetat-Lösung 2%ig	1 g Uranylacetat ad 50 ml H ₂ O
Waschpuffer für Southern Blot	2x SSC 0,1% SDS

4 Methoden

4.1 Tierexperimente

4.1.1 Haltung der Tiere

Die Haltung der *Mastomys coucha*-Kolonie erfolgte unter konventionellen Bedingungen bei einer Raumtemperatur von 21-24°C, 55% relativer Luftfeuchte sowie 12-16 Luftwechsel pro Stunde. Als Futter stand den Tieren eine standardisierte Diät für Ratten und Mäuse (Altromin 1324 N FORTI) *ad libidum* zur Verfügung, Wasser wurde in Trinkflaschen angeboten. Nach Absetzen vom Muttertier in einem Alter von vier Wochen lebten die Tiere nach Geschlechtern getrennt, je nach sozialer Verträglichkeit in kleinen Gruppen oder einzeln.

4.1.2 Tötung der Tiere bzw. Ausscheiden aus einem Versuch

Ab einem Alter von ca. zehn Monaten entwickelte ein Großteil der Tiere spontan gutartige Hautläsionen. Bei Erreichen einer Tumorgöße von 15 mm im Durchmesser erfolgte die Tötung des Tieres. Ebenso wurde ein Tier getötet, wenn ein Tumor durch seine Lokalisation, wie z.B. am Mund, das Tier erheblich beeinträchtigte. Ebenso wurde ein Tier getötet, wenn ein anderer Grund festgestellt wurde, der das Wohlbefinden des Tieres störte, wie z.B. eine schwere Augenentzündung. Die Tötung der Tiere erfolgte mit CO₂.

4.1.3 Verabreichung der Immunsuppressiva Cyclosporin A und Rapamycin

70 Tiere ungefähr gleichen Alters wurden in die Gruppen Rapamycin (Rapa), Cyclosporin A (CsA) und Kontrolle eingeteilt. Die Verteilung der Tiere in den Gruppen ist dem Anhang 10.3.1 zu entnehmen. Wenn möglich, kamen Geschwistertiere in die CsA- und Rapa-Gruppe, um eine eventuelle Tumorentstehung bei genetisch möglichst ähnlichen Bedingungen beurteilen zu können. Die Tiere wurden in kleinen Gruppen von zwei bis fünf Tieren zusammen gehalten. Bei Unverträglichkeit erfolgte die Trennung der Tiere und Einzelhaltung.

Die Wirkstoffe CsA und Rapa wurden vom Futtermittelhersteller in den Konzentrationen von 266 mg/kg (CsA) bzw. 2,5 mg/kg (Rapa) in die Futtermasse eingemischt, so daß eine gleichmäßige Verteilung im pelletierten Futter gewährleistet war. Als Futterbasis diente eine standardisierte Diät für Ratten und Mäuse. Die optimale Wirkstoffkonzentration war zuvor in Vorversuchen ausgetestet worden. Der gewünschte Wirkstoffspiegel im Blut richtete sich nach Referenzwerten der immunsuppressiven Dosen von Rapa und CsA bei Mäusen (Guba *et al.*, 2005; Koehl *et al.*, 2006). Das Futter sowie Wasser in Trinkflaschen wurden den Tieren *ad*

libidum angeboten. Die Kontrollgruppe erhielt identisches Futter ohne die Beimischung von Wirkstoff.

Während der gesamten Versuchsdauer wurden wöchentliche Gewichtskontrollen jedes einzelnen Tieres durchgeführt, um Gewichtsabnahmen durch eventuelle Futterverweigerung oder schlechten Allgemeinzustand auszuschließen. Außerdem wurden in regelmäßigen Abständen sowie jeweils beim Einsatz einer neuen Futtercharge stichprobenartig Kontrollen der Wirkstoffspiegel im Blut durchgeführt (siehe Anhang 10.3.3). Beim Ausscheiden eines Tieres aus dem Versuch wurde eine Sektion sowie eine Kontrolle des Wirkstoffspiegels im Blut durchgeführt (siehe Anhang 10.3.3).

Die Versuchsdauer betrug zehn Monate. Bei Versuchsende erfolgte die Tötung und Sektion aller verbliebenen Tiere.

4.1.4 Allgemeinanästhesie bei *Mastomys coucha*

Zur Allgemeinanästhesie wurde eine Inhalationsnarkose unter Verwendung des Narkosegerätes „LABVET“ durchgeführt. Als Trägergas für das Narkosegas Isofluran diente Sauerstoff. Zur Narkoseeinleitung wurden die Tiere in ein mit dem Narkosegerät verbundenes Glas gesetzt. Anfangs wurde Isofluran auf höchstmöglicher Stufe mit dem Trägergas Sauerstoff in einem Volumen von 0,5 Liter pro min (Lpm) in das Glas eingeleitet. Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte mit Hilfe einer Atemmaske, die Isofluranzufuhr wurde gedrosselt (am Gerät „LABVET“ auf Stufe 2-3), während die Sauerstoffzufuhr unverändert blieb. Zur Aufhebung der Narkose wurde die Atemmaske entfernt und das Tier der normalen Raumluft ausgesetzt.

4.1.5 Blutentnahme aus dem retrobulbären Venenplexus

Zur Blutentnahme wurde das Tier in Allgemeinanästhesie (siehe Kap. 4.1.4) versetzt. Mit einer Hand wurde das Tier stabil im Nacken fixiert, mit der anderen wurde mit Hilfe einer Glaspipette der retrobulbäre Venenplexus punktiert. Aufgrund von Kapillarkräften wurde das Blut in die Pipette aufgezogen. Eine Menge von ca. 300 µl Blut wurde entnommen und je nach weiterer Bestimmung in ein EDTA-Röhrchen bzw. ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt (siehe Kap. 4.2.2). Die Blutung wurde durch kurzzeitige Kompression auf das Auge gestoppt.

4.1.6 Entnahme von Augenabstrichen

Die Entnahme von Augenabstrichen erfolgte entweder in Allgemeinnarkose (siehe Kap. 4.1.4) oder am toten Tier. Hierzu wurde mit einer sterilen Pipettenspitze eine minimale Menge

Schleimhaut von der Konjunktiva abgeschabt und das Probenmaterial umgehend in DNS-Lyse-Puffer verbracht.

4.1.7 Entnahme von Haarproben

Zur Bestimmung der Viruslast in Haarfollikeln wurde einer Gruppe von Tieren zu bestimmten Zeitpunkten ca. 50 Haare vom Nacken durch ruckartiges Zupfen mit Hilfe einer Klemme entnommen.

4.1.8 Chirurgische Entfernung von Hautbiopsien bzw. Tumoren

Hierzu wurden die Tiere in Allgemeinanästhesie (siehe Kap. 4.1.4) versetzt. Das zu entnehmende Hautareal wurde mit Hilfe einer Schermaschine geschoren. Mit Einmalskalpell wurde ein Hautschnitt an der entsprechenden Stelle durchgeführt sowie gegebenenfalls auch die Unterhaut freipräpariert, bis das zu entnehmende Hautareal gelöst war. Der Verschluss der Haut erfolgte mit Einzelheften mit resorbierbarem Nahtmaterial (Vicryl).

4.1.9 Das Protokoll der Zwei-Stufen-Karzinogenese

Tiere im Alter von sechs Wochen wurden der Behandlung nach dem Protokoll der klassischen Zwei-Stufen-Karzinogenese (Fürstenberger und Kopp-Schneider, 1995) unterzogen, um ein früheres Auftreten von Hautläsionen sowie maligne Tumore hervorzurufen. Hierbei wurde als initiiertes Karzinogen 7,12-Dimethylbenz[a]-anthracen (DMBA) und als Tumorpromotor 12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat (TPA) verwendet.

Den Tieren wurde vor Beginn der Behandlung mit einer Schermaschine am Rücken auf einer Fläche von ca. 4 x 2 cm das Fell entfernt. Die Initiation erfolgte eine Woche nach dem Scheren durch einmalige topische Applikation von DMBA (500 nM), gelöst in Azeton, auf die geschorene Rückenhaut. Die Tiere wurden in Einmal-Käfige gesetzt. Aufgrund der Karzinogenität der Substanz DMBA wurde die Applikation unter einer Werkbank mit geeignetem Abzug durchgeführt, wobei die behandelnde Person spezielle, karzinogenbeständige Handschuhe trug. Die Tiere verblieben nach der Behandlung 30 min unter dem Abzug.

Ab der darauffolgenden Woche erfolgte die Applikation des Tumorpromotors TPA (20 nM), ebenfalls in Azeton gelöst, zwei mal wöchentlich (dienstags und donnerstags) für einen Zeitraum von 17 Wochen auf der geschorenen Haut am Rücken. Diese Behandlung fand ebenso unter dem Abzug statt, jedoch war die Verwendung von Einmal-Käfigen nicht mehr angezeigt.

Bei Auftreten heftiger Entzündungsreaktionen an der behandelten Stelle wurde die Behandlung eingestellt. Der Behandlung folgte ein Beobachtungszeitraum von zwölf Monaten.

4.1.10 Sektion der Tiere

Zur Sektion wurden die Tiere in Rückenlage auf Eis plaziert und Brust- und Bauchhöhle mit einem Längsschnitt eröffnet. Bei der Sektion wurde aufgrund der rasch einsetzenden Gerinnung mit der Blutentnahme aus dem Herzen begonnen. Es folgte die Entnahme von Herz, Lunge, Leber, Milz, Nieren, Magen mit Vormagenanteil, Dünn- und Dickdarm, Gehirn, Ohren sowie einem Hautareal vom Rücken und Nacken. Da MnPV vor allem in der Haut vorliegt, wurde diese zuletzt entnommen, um eine Kontamination der Organe mit Virus-DNS zu verhindern.

Um Kontaminationen von Organ zu Organ zu vermeiden, wurde das Sektionsbesteck zwischen den einzelnen Organen erneuert und vor erneuter Verwendung gründlich gereinigt. Hierzu bewährte sich die Reinigung in einer Seifenlösung mit anschließender Desinfektion mit Ethanol (70%) sowie Abflammen in der Flamme des Bunsenbrenners. Im Anschluss daran wurde das Besteck mit dem DNS-Dekontaminationsmittel „DNA Quant Off“ behandelt.

4.2 Weiterverarbeitung der Organe bzw. des Blutes

4.2.1 Organe

Die einzelnen Organe wurden mit Einmal-Skalpellen in einem Wägeschälchen auf Eis in kleine Stücke von ca. 3 mm³ geschnitten. Je nach weiterer Bestimmung wurden die Aliquots umgehend in Flüssigstickstoff schockgefroren, in DNS-Lyse-Puffer verbracht bzw. in Formalinlösung eingelegt. Bis zur Weiterbearbeitung wurden die Aliquots (bis auf die Formalin-fixierten) bei -80°C aufbewahrt.

4.2.2 Blut

Je nach Bestimmung wurde mit den Blutproben unterschiedlich verfahren. Diente das Blut zur DNS-Extraktion, wurde es schon bei der Entnahme mit EDTA versetzt, um die Gerinnung zu verhindern und bis zur Weiterversorgung auf Eis belassen. Danach wurde die Blutprobe in einem Verhältnis von 1:3 mit Lyse-Puffer zur Extraktion von DNS aus Blut versetzt. Zur Lyse der Erythrozyten wurde der Ansatz für 15 min in Eis belassen und gelegentlich leicht geschüttelt. Im Anschluß daran folgte die Zentrifugation bei 3000 rpm für 10 min. Nach Abgießen des Überstandes konnte das Zellpellet bei -70°C eingefroren werden oder gleich, wie anderes Gewebe auch, nach dem Protokoll der DNS-Extraktion aus Gewebe weiterbehandelt werden.

Wurde das Blut zur Bestimmung des Rapa- bzw. CsA-Wirkstoffspiegels herangezogen, erfolgte die Blutentnahme in EDTA-Röhrchen (2 ml). Im Falle von Rapa wurde das Blut umgehend auf Trockeneis verbracht und anschließend bei -80°C aufbewahrt, im Falle von CsA folgte die Kühlung auf Eis bzw. bei 4°C. Die Bestimmung der Wirkstoffspiegel erfolgte im Universitätsklinikum Regensburg in der Klinik und Poliklinik für Chirurgie, Abteilung Experimentelle Chirurgie.

4.3 DNS

4.3.1 Isolierung von DNS aus Gewebe

4.3.1.1 DNS-Extraktion mit Phenol/Chloroform

Zum Gewebeverdau wurde dem DNS-Lyse-Puffer mit dem Gewebealiquot 100 µg Proteinase K pro ml Puffer zugesetzt, der Verdau erfolgte für mindestens 6 h in einem Thermoblock bei 55°C und Schütteln (1000 rpm).

Die Extraktion der DNS erfolgte zweimalig mit Phenol im gleichen Volumen sowie einmal mit Phenol/Chloroform (1:1) im gleichen Volumen (Sambrook, 2001). Zwischen den Phenol- bzw. Phenol/Chloroform-Zugaben wurde die wässrige Phase von der organischen Phase getrennt. Jeweils der hydrophile Anteil wurde weiterverwendet. Bei der letzten Trennung wurde das „Phase lock system“ (Eppendorf) zu Hilfe genommen. Hierbei legt sich bei der Zentrifugation eine Gelschicht aufgrund der Dichteunterschiede der beiden Phasen zwischen diese und erleichtert die saubere Trennung. Zwischen den einzelnen Schritten erfolgte die Zentrifugation bei 6000 rpm für 5 min bei Raumtemperatur.

Die Fällung der DNS erfolgte durch Zugabe von einem Volumen Isopropanol (alternativ 2,5 Volumen Ethanol) sowie 2,5 M Ammoniumacetat. Die Mischung wurde bis zum sichtbaren Ausfällen eines DNS-Fadens geschüttelt. Zur Fällung wurde die Probe entweder für 30 min auf Eis oder über Nacht in -20°C gestellt. Danach folgte eine Zentrifugation bei 13000 rpm für 5 min bei 4°C. Das daraus hervorgegangene Pellet wurde zweimalig mit Ethanol (70%) gewaschen. Nach anschließender Trocknung wurde das Pellet in 0,1x TE aufgenommen und bei 4°C oder -20°C aufbewahrt.

4.3.1.2 DNS-Extraktion mit Kit

Alternativ wurde zur DNS-Isolierung das „Nucleospin 96 Genomic Extraction Kit“ nach Angaben des Herstellers verwendet. Das Prinzip dieses Kits beruht auf der Bindung von Nukleinsäuren an Silicamembranen. Mit Hilfe eines chaotropen Salzes

(Guanodiniumhydrochlorid) wird die DNS an eine Silicamembran gebunden und verbliebene Proteinreste zerstört.

Die Zerkleinerung der Gewebeproben von ca. 20 mg erfolgte in einer 96-Well-Platte. Zum Gewebeerddau wurde der Probe 180 µl Lysispuffer T1 mit 25 µl Proteinase K-Mix zugegeben und der Ansatz für mindestens 16 h bei 50°C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 200 µl des Puffers BQ1 sowie 200 µl Ethanol. Nach Zentrifugation bei 4800 rpm für 5 min wurde der Überstand auf die zu verwendende Säule überführt. Es erfolgte erneut eine Zentrifugation bei 4.800 rpm für 10 min. Im Anschluss daran folgte die Zugabe von 500 µl Waschpuffer BW und eine Zentrifugation bei 4800 rpm für 2 min. Danach wurden 700 µl Waschpuffer B5 zugegeben und bei 4800 rpm für 6 min zentrifugiert. Im Anschluss an die Waschschrirte erfolgte die Zugabe von 120 µl auf 70°C vorgeheiztem Elutionspuffer EB. Durch eine abschließende Zentrifugation bei 4800 rpm für 3 min wurde das Eluat gewonnen. Das Eluat wurde bei 4°C aufbewahrt.

4.3.2 DNS-Extraktion aus Haarfollikeln

Zur DNS-Extraktion aus Haarfollikeln wurde das QIAamp DNA Mini Kit verwendet und die Anleitung des Herstellers befolgt. Das Prinzip dieses Kits beruht ebenfalls auf der Bindung von Nukleinsäuren an Silicamembranen, wie in Kap. 4.3.1.2 beschrieben. Den zu untersuchenden Haarfollikeln (ca. 50 Stück) wurden 20 µl Proteinase K und 200 µl Lysispuffer AL zugesetzt, durchmischt und für 10 min bei 56°C in einem Thermomixer inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Ethanol und kräftigem Mischen wurde der Ansatz auf eine QIAamp Spin Säule überführt. Nach Zentrifugation bei 8000 rpm für 1 min wurde die Säule in ein frisches Sammelgefäß überführt und 500 µl Waschpuffer AW1 zugegeben. Es folgte eine weitere Zentrifugation unter identischen Bedingungen. Im Anschluss daran erfolgte die Zugabe von Waschpuffer AW2 sowie eine weitere Zentrifugation für 3 min bei 14000 rpm. Abschließend wurde die Säule in ein Reaktionsgefäß (1,5 ml) überführt, 50 µl AE-Puffer zugegeben und nach einer einminütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur für 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Damit wurde die in der Membran gebundene DNS eluiert, die Lagerung des Eluats erfolgte bei -20°C.

4.3.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung der DNS

Die photometrische Messung bestimmt die Absorption in Lösung befindlicher Stoffe bei verschiedenen Wellenlängen und gibt Auskunft über die Konzentration sowie den Reinheitsgrad einer Nukleinsäure-Lösung. Nukleinsäuren verfügen über ein Absorptionsmaximum von 260 nm, im Vergleich dazu weisen Proteine ihr Maximum bei 280

nm auf. 1 OD₂₆₀ entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNS bzw. 33 µg/ml einzelsträngiger Oligonukleotid-DNS. Um den Reinheitsgrad von Nukleinsäuren festzustellen, werden deren Absorptionen bei verschiedenen Wellenlängen gemessen. Eine Absorption bei 230 nm weist z.B. auf eine Kontamination mit organischen Lösungsmitteln hin. Die Ratio 260:280 zeigt eine mögliche Proteinkontamination an (Sambrook, 2001).

Die DNS wurde in gefiltertem Wasser verdünnt und zur Konzentrationsbestimmung in Quarzküvetten verbracht. Als Referenzwert wurde gefiltertes Wasser verwendet.

4.3.4 Restriktionsspaltung von DNS

Die Spaltung der DNS erfolgte mit Restriktionsenzymen (Restriktionsendonukleasen) unter Verwendung des mitgelieferten 10x Puffers nach Angabe des Herstellers. Pro Ansatz wurden 5-10 µg genomische DNS mit 5-10 Einheiten/µg des Restriktionsenzymen versetzt.

4.3.5 Behandlung mit RNase A

Um eventuelle RNS-Rückstände zu eliminieren, erfolgte eine Behandlung mit RNase A in einer Konzentration von 1 mg RNase A pro ml Probenvolumen bei 37°C für 20 min im Anschluss an die Restriktionsspaltung.

4.3.6 Elektrophoretische Auftrennung von DNS in Agarose-Horizontalgelen

Agarose-Gelsysteme mit einer Konzentration von 1% wurden zur Auftrennung und Analyse linearisierter DNS sowie zur präparativen Isolierung von DNS-Fragmenten verwendet. Zur Bereitung des Gels wurde die Agarose eingewogen und mit dem entsprechenden Volumen an 1x TAE-Puffer im Mikrowellenherd aufgeköcht. Nach Abkühlen wurde der flüssigen Masse Ethidiumbromid zugesetzt (Endkonzentration 1 µg/ml) und diese in einen Gelschlitten gegossen. Zum Aussparen der Taschen wurde der Gelschlitten mit einem Kamm versehen. Nach Erstarren des Gels wurde 1x TAE-Puffer als Laufpuffer in die Kammer gefüllt und der Kamm entfernt. Die DNS-Proben wurden mit 10x Ladepuffer versetzt und die Geltaschen damit beladen. Zur Bestimmung der Bandengröße wurde ein Referenz-Größenmarker aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 5 V pro cm Elektrodenabstand für 3-4 h. Durch die Interkalation des Ethidiumbromids zwischen den DNS-Basen konnten die DNS-Banden unter UV-Licht bei 260 nm sichtbar gemacht und fotografiert werden.

PCR-Produkte wurden in Abhängigkeit von deren Größe in höherprozentigen Agarose-Gelen (1,5-3%) nach demselben Prinzip aufgetrennt.

4.4 DNS-Blot-Hybridisierung nach Southern

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung im horizontalen Agarosegelsystem wurde das Gel dreimalig für je 20 min in Denaturierungspuffer gelegt und im Anschluß daran über Nacht auf eine „GeneScreen plus“-Membran gebロットet. Der Transfer der DNS auf die Membran erfolgte durch Kapillarkräfte. Das Gel wurde ohne Lufteinschlüsse auf der Membran plaziert, die sich auf drei Lagen Whatman-Papier befand. Diese lagen wiederum auf einem Stapel Papierhandtüchern. Der gesamte Aufbau wurde in Frischhaltefolie eingewickelt. Über Nacht eine Glasplatte mit einem Gewicht auf den Stapel gelegt. Am nächsten Tag wurde die Membran für 3 min in Neutralisationspuffer verbracht und anschließend getrocknet.

4.4.1 Herstellung einer radioaktiven Sonde

Hierzu wurde das „Hexalabelling Kit“ nach Anleitung des Herstellers verwendet. DNS in der Menge von 50-100 ng wurde für 5 min bei 99°C hitzedenaturiert und zur Stabilisierung des denaturierten Zustandes der DNS auf Eis abgekühlt. Es wurden 10 µl 5x Hexanukleotidpuffer (enthält die Hexamere), 3 µl dNTP-Mix (dATP, dTTP, dGTP), 1 U Klenow-Fragment sowie 2 µl [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP 10 mCi/ml zugegeben, gut gemischt und für 30 min bei 37°C belassen. Durch Zugabe von 2x TNE wurde die Reaktion gestoppt. Um freie Nukleotide von der markierten DNS zu trennen, wurde eine Säule aus einer Einmilliliterspritze hergestellt, die mit einem Volumen von 0,1 ml Glaswolle gefüllt war. Die Spritze wurde mit Biogel-Suspension aufgefüllt und zwei mal für 3 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Die radioaktive Sonde wurde in die so gewonnene Säule gegeben, 3 min lang bei 2000 rpm zentrifugiert und mit 50 µl 1x TE ausgewaschen. Freie Nukleotide wurden in der Säule zurückgehalten, wohingegen die Sonde die Biogelstruktur aufgrund ihrer Größe passieren konnte. Eine erfolgte Trennung von Sonde und Nukleotiden wurde durch den Farbunterschied zwischen Dextranblau und Bromphenolblau sichtbar.

4.4.2 Hybridisierung

Vor Zugabe der radioaktiven Sonde wurde die Membran mindestens 2 h lang bei 42°C in Hybridisierungspuffer (0,1 ml/cm²) prähybridisiert. Der Puffer enthielt tRNA, um unspezifische Bindung der Sonde an die positiv geladene Oberfläche der Membran zu verhindern, sowie Formamid, um bei einer niedrigeren Temperatur die Stringenz zu verstärken. Die in der Säule gereinigte Sonde wurde für 5 min bei 99°C erhitzt und in Eiswasser für 3 min abgekühlt, bevor sie zum Hybridisierungspuffer gegeben wurde. Die Reaktion erfolgte in einem Hybridisierungs-ofen über Nacht bei 42°C.

Am darauffolgenden Tag wurde die Membran zwei bis drei mal in vorgeheiztem Waschpuffer bei 68°C gewaschen, um unspezifisch gebundene DNS zu entfernen. Nach dem Trocknen wurde die Membran in einer Röntgenkassette fixiert und ein Röntgenfilm eingelegt.

4.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

4.5.1 Design der Primer

Die verwendeten Primer wurden alle mit Hilfe des Programms Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) entworfen und in der Abteilung für DNS-Sequenzierung im DKFZ hergestellt.

4.5.2 Prinzip der PCR

Mit Hilfe der PCR kann von einer spezifischen DNS-Sequenz *in vitro* eine beliebige Anzahl von Kopien hergestellt werden. Das Prinzip der PCR beruht auf einer spezifischen Amplifikation eines DNS-Abschnitts, der zwischen zwei bekannten Sequenzen liegt. Man nutzt die Fähigkeit der DNS-Polymerase, einzelsträngige DNS als Matrize zur Synthese des komplementären DNS-Stranges zu verwenden. Da die DNS-Polymerase eine freie 3'-Hydroxyl-Gruppe für die Bildung der Phosphodiester-Bindung zum nachfolgenden Nukleosidtriphosphat benötigt, muss ein kurzer doppelsträngiger Bereich als Primer zur Verfügung stehen. Dieser wird durch chemisch synthetisierte Oligonukleotide bereitgestellt, die komplementär an ausgewählte DNS-Sequenzen binden, die den zu amplifizierenden Bereich abgrenzen. Die spezifische Amplifikation des durch die Oligonukleotid-Primer festgelegten DNS-Fragments erfolgt unter zyklischer Abfolge von Denaturierung, Primer-Anlagerung (Annealing) und deren Verlängerung durch die DNS-Polymerase (Elongation) komplementär zu Matrize. Aufgrund der Hitzebeständigkeit der verwendeten DNS-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* kann dieser Prozess in mehreren Zyklen wiederholt werden. Bei jeder Wiederholung des Zyklus wird der definierte DNS-Abschnitt verdoppelt und somit exponentiell vervielfältigt. Die PCR-Reaktion zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität aus. Für die Spezifität der Amplifikation sind die Primer, die Annealing-Temperatur sowie die vorherrschenden Salzkonzentrationen entscheidend. Die Primer sollten so gewählt werden, dass sie spezifisch nur an die zu amplifizierende DNS binden, da sonst keine Selektivität gegeben wäre. Die Annealing-Temperatur wird so stringent wie möglich gewählt. Das bedeutet, sie sollte nur 2-3°C unter dem Schmelzpunkt der Primer liegen. Der Einsatz der benötigten Salze, inklusive Magnesiumchlorid, wird durch die Verwendung des 1x PCR-Puffers (wird mit der Taq-Polymerase mitgeliefert) gewährleistet.

4.5.3 Durchführung der PCR-Reaktion

Es wurden dünnwandige PCR-Reaktionsgefäße mit einem Volumen von 0,5 ml verwendet, die eine schnelle Wärmeleitung in die Lösung sicherstellen. Der Reaktionsansatz wurde in einem Gesamtvolumen von 50 µl auf Eis erstellt und beinhaltete folgende Bestandteile:

100-250 ng genomische DNS

1,5 mM MgCl₂

200 µM dNTPs

0,3 µM je Primer

1x PCR-Puffer

1 U Taq-Polymerase

sowie Aqua bidest.

Zur PCR-Reaktion wurde ein Perkin-Elmer PTC-200 Thermocycler mit integriertem Heizdeckel verwendet. Zu Beginn jedes Durchgangs erfolgte die Denaturierung der Template-DNS durch Erhitzen auf 94°C für 4 min. Jeder weitere einsetzende Zyklus begann mit einer Erhitzung auf 94°C zur Denaturierung des Reaktionsansatzes während der Amplifikation (I). Im nächsten Schritt fand die Anlagerung der Primer durch Abkühlung auf die spezifische Annealing-Temperatur statt (II). Danach folgte die Elongation bei einer für die Taq-Polymerase optimalen Temperatur von 72°C für 0,5-1 min (III). Nach dem Ablauf der Zyklen erfolgte eine Inkubation bei 74°C für 10 min, bei der alle verbliebenen einzelsträngigen DNS-Abschnitte in den doppelsträngigen Zustand überführt wurden. Im Anschluß daran wurde die Reaktion auf 4°C heruntergekühlt. In der Regel wurden 25 PCR-Zyklen durchlaufen. Zur Analyse der PCR-Produkte erfolgte eine gelelektrophoretische Auftrennung von jeweils 15 µl des PCR-Produkts in einem 1,5-3%igem Agarose-Gel mit 1x TAE-Puffer (siehe Kap. 4.3.6). Die PCR-Produkte wurden mit Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht sichtbar gemacht.

In jeder PCR-Reaktion wurde eine Positiv- sowie eine Negativ-Kontrolle mitgeführt (Daten nicht gezeigt). Als Positiv-Kontrolle wurde MnPV-positive DNS, die aus *Mastomys coucha* isoliert worden war, eingesetzt. Als Negativ-Kontrolle wurde eine sogenannte Wasserkontrolle verwendet (PCR-Ansatz ohne DNA), um eine Kontamination des PCR-Ansatzes auszuschließen.

Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

Denaturierung: 94°C für 4 min

25 Zyklen

I) 94°C 30 sec

II) 58°C 30 sec

III) 72°C 0,5-1 min (je nach Fragmentgröße)

Effizienz der Taq-Polymerase: 1000 Bp/min

Extension am Ende: 72°C für 10 min

4.5.4 Bestimmung der Viruslast mittels Realtime-PCR

4.5.4.1 Grundlagen der Realtime-PCR

Die quantitative Realtime-PCR wurde verwendet, um die Viruslast von MnPV in Haarfollikeln von *Mastomys coucha* zu bestimmen. Das Prinzip beruht auf der Einlagerung eines Farbstoffes in doppelsträngige DNS („SYBR Green“), der eine Steigerung der Fluoreszenz zur Folge hat. Die Entwicklung der Fluoreszenz wurde mit jedem neuen Zyklus verfolgt und aufgezeichnet. Die Reaktion wurde im „LightCycler-Instrument 1,0“ durchgeführt. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte dabei automatisch.

Aus den gemessenen Werten wird durch eine Recheneinheit eine Kurvenfunktion ermittelt und aufgrund des Signal-/Hintergrund-Verhältnisses ein Schwellenwert festgelegt, an dem das Fluoreszenzsignal den Hintergrund verlässt. Der Schnittpunkt von Schwellenwert und Fluoreszenzsignal wird als Kreuzpunkt (englisch: Crossing point, CP) bezeichnet und dient als Messwert. Er ist abhängig von der Effizienz der PCR und der Menge an eingesetzter DNS. Für die Ermittlung der DNS-Menge einer unbekanntes Probe wurde eine Standardkurve aus bekannten DNS-Konzentrationen erzeugt und mit Hilfe der erhaltenen Geradengleichungen der unbekanntes Proben bestimmt (LightCycler Operator's Manual, Version 3.5, Roche).

Nach Beendigung aller Amplifizierungsschritte der PCR wurde zur Kontrolle eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Diese gewährleistet, dass spezifische Amplikons gemessen wurden und nicht Nebenprodukte wie Oligonukleotid-Dimere.

4.5.4.2 Durchführung der Realtime-PCR

Der „LightCycler-Fast Star Master SYBR Green I“ wurde nach Angaben des Herstellers angesetzt. Der Amplifizierungsansatz (20 µl) enthielt bis zu 5 µl der Matrizen-DNS, 500nM jedes Primers, 2µl „LightCycler FastStart Reaction Mix SYBR Green I“ (Roche), 3mM MgCl₂, und PCR-Wasser. Im „LightCycler-Instrument 1,0“ wurde die Mischung für 10 min auf 95°C

erhitzt, gefolgt von 45 Zyklen (95°C für 10 sec, 58-65°C für 5 sec, und 72°C für 15 sec). Die Annealing-Temperatur für β -Aktin lag bei 63°C, die für MnPV bei 60°C.

Es wurden Standardreihen von Zehnfach-Verdünnungen von MnPV-Plasmiden mit jeweils 10.000, 1000, 100 und 10 Viruskopien mit einem Hintergrund von 1 ng genomischer DNS (isoliert aus MnPV-negativem Gewebe von *Mastomys coucha*) hergestellt und spezifische E7-Primer verwendet (LC E7). Ein weiteres Aliquot jeder Probe wurde mit spezifischen β -Aktin-Primern amplifiziert und mit der Standardkurve von 100, 10, 1, 0,1 und 0,01 ng genomischer MnPV-negativer DNS von *Mastomys coucha* verglichen.

Neben der Schmelzkurvenanalyse wurden die PCR-Produkte zur Überprüfung ihrer Spezifität in einem 3%igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, um die Amplikongröße zu dokumentieren. Von allen Proben wurden in einem Experiment Dublikate gemessen und jedes Experiment wurde zweifach durchgeführt.

4.5.4.3 Bestimmung der Viruslast

Durch die Generierung von Standardreihen bekannter DNS-Mengen (0,1-100 ng) wurden die entsprechenden CP-Werte ermittelt. Da präzise Angaben bezüglich der Genomgröße für *Mastomys coucha* nicht existierten, wurde der Wert aus den bekannten Genomgrößen von Maus (*Mus musculus*, 5,6 pg, NCBI Genom-Projekt Nr. txid10090) und Ratte (*Rattus norvegicus*, 5,8 pg, NCBI Genom-Projekt Nr. txid10116) abgeleitet und auf 5,7 pg DNS pro Körperzelle festgelegt.

Die Realtime-PCR-Analysen wurden durch Frau Anja Köhler, Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Charité Berlin, durchgeführt.

4.6 *In situ*-Hybridisierung

4.6.1 Biotin-Nick-Translation (Roche)

Bei der hier verwendeten Methode der *in situ*-Hybridisierung wurde zur indirekten Detektion markierter DNS die Enzymaktivität der Streptavidin-gebundenen Meerrettichperoxidase genutzt.

Die Biotin-Markierung der Sonde, die zur Virus-DNS komplementär war, erfolgte in zwei Schritten: Eine enzymatische Spaltung mit DNase I und dem Einbau markierter Nukleotide durch Polymerase I. Die DNase I verursacht Strangbrüche („Nicks“) und die Polymerase I entfernt Nukleotide vom 5'Ende. Die fehlenden Nukleotide werden durch Biotin-markierte UTP und nicht-markierte Nukleotide ersetzt. Die neu synthetisierte DNS hat eine Länge von ca. 100-

300 Bp und enthält Biotin, das spezifisch an Streptavidin bindet. Hierbei erfolgt eine indirekte Detektion der Virus-DNS.

4.6.2 Deparaffinisierung und Antigen-Rückgewinnung

Paraffinschnitte mit einer Dicke von 2-5 μm wurden auf beschichtete Objektträger aufgelegt und über Nacht bei 56°C fixiert. Zur Deparaffinisierung wurden die Schnitte zwei mal für 10 min in Xylol inkubiert. Danach folgte die Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe und PBS (Sambrook, 2001). Um die Antigenstrukturen rückzugewinnen, wurden die Schnitte für 10 min in Natriumacetatpuffer in der Mikrowelle gekocht.

4.6.3 Verdau und Abstoppen

Der Verdau erfolgte mit Proteinase K (8 $\mu\text{g/ml}$, 0,05 M Tris/HCl pH7,5) für 10-12 min. Durch Zugabe von Glyzinpuffer wurde die Reaktion abgestoppt. Gegen die überschüssige Aktivität der Meerrettichperoxidase erfolgte eine Behandlung der Schnitte mit einer 0,3%-igen H_2O_2 -Lösung.

4.6.4 Hybridisierung

Die Hybridisierungslösung enthält sssDNS, die unspezifische Bindungen eingeht. Nach einer Prähybridisierung von 30 min wurden die Schnitte mit der Hybridisierungslösung überdeckt, der 500 ng/ml Biotin-markierte MnPV-DNS zugegeben worden war. Die Schnitte wurden auf einer Heizplatte für 7 min auf 98°C erhitzt und dann über Nacht bei 42°C in einer sogenannten „Feuchten Kammer“ belassen. Hierzu wurde eine mit feuchten Papierfalthandtüchern ausgelegte, lichtundurchlässige Plastikbox zum Feuchthalten der Untersuchungspräparate verwendet.

4.6.5 Amplifizierung des Signals

Nach mehreren Waschschritten mit SSC (2x, 1x und 0,5x) wurden die Schnitte mit einer BSA-enthaltenden Blockierungslösung bedeckt und dann das verdünnte Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Konjugat (Verdünnung 1:500) zugegeben. Die Anweisungen im TSA-Amplifizierungs-Kit wurden befolgt, die Schnitte wurden gewaschen und das Signal mit Hilfe von Biotinyltyramid (Verdünnung 1:50) verstärkt. Dieses Molekül besitzt sowohl Streptavidin-Bindungsstellen als auch weitere Biotinmoleküle an seiner Oberfläche. Durch die Bindung von Biotinyltyramid an die Biotin-markierte DNS steigt die Zahl freier Biotinmoleküle, die in einer weiteren Inkubation vom Streptavidin-Konjugat gebunden werden können. Unter Verwendung

von AEC wird die DNS in Form eines roten Präzipitats sichtbar gemacht. Die Zellkerne wurden mit Hämalaun gegengefärbt.

4.6.6 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Nach der Deparaffinierung in Xylol (zwei mal 3 min) und der Rehydrierung in der absteigenden Alkoholreihe, wurden die Schnitte für 3 min in reinem Wasser belassen. Die Färbung in Hämatoxylin erforderte bis zu einer Minute. Nach dem Spülen der Schnitte in deionisiertem Wasser wurde Leitungswasser für die Farbentwicklung verwendet. Die Färbung mit Eosin wurde für 30 sec durchgeführt, danach folgte eine Dehydrierung in der aufsteigenden Alkoholreihe (Sambrook, 2001) und eine Inkubation in Xylol. Auf die Schnitte wurde Corbitbalsam aufgetragen und ein Deckgläschen aufgelegt.

4.7 Elektronenmikroskopie

4.7.1 Prinzip der Elektronenmikroskopie

Viruspartikel können im Elektronenmikroskop direkt sichtbar gemacht werden. Im Transmissionselektronenmikroskop werden Elektronen ausgesandt. Treffen diese auf das zu untersuchende Probenmaterial, wird durch die dadurch verursachte Streuung der Elektronen ein Bild erzeugt. Um die Intensität dieses Bildes zu verstärken, wird ein Kontrastmittel (z.B. Schwermetallsalz) verwendet (Negativ-Kontrastierung). Das Kontrastmittel bildet aufgrund seiner Oberflächenspannung um die Partikel herum einen elektronendichten Saum. Die Viruspartikel selbst werden nicht angefärbt, sondern erscheinen hell mit dunklem Rand.

Zur Untersuchung eignen sich z.B. Virussuspensionen. Handelt es sich beim Probenmaterial um Gewebe, ist eine spezielle Vorbereitung des Probenmaterials nötig (siehe Kap. 4.7.2).

4.7.2 Fixierung und Einbettung des Probenmaterials

Das zu untersuchende Probenmaterial (Tumorgewebe und Haut) wurde mit 2,5%-igem Glutaraldehyd fixiert, pelletiert, mit 2%-igem Osmiumtetroxyd erneut fixiert und eine Kontrastierung mit Uranylacetat durchgeführt. Im Anschluß daran wurde die Probe in einer aufsteigenden Ethanloreihe dehydriert (Sambrook, 2001) und bei 60°C in Epoxidharz eingebettet. Von den Blöcken konnten nun Ultradünnschnitte von 50 nm Dicke hergestellt werden.

4.7.3 Vorbereitung der Probennetze

Bei den Objektträgern für die Elektronenmikroskopie handelt es sich um kleine Metallnetze, deren Maschen mit einem dünnen Kunststofffilm beschichtet sind. Diese wurden mit Kohlenstoffatomen bedampft, um die mechanische Festigkeit des Kunststofffilms zu verbessern. Da die Oberfläche der Netze hydrophob ist, mussten die Netze zusätzlich beglimmt werden, um eine Benetzung des Films mit dem Probenmaterial zu ermöglichen. Die vorbereiteten Netze wurden mit dem Probenmaterial für einige min inkubiert und im Anschluss daran für eine min mit dem Kontrastmittel (Uranylacetat) versetzt. Nach Abtrocknen der Netze konnten diese im Elektronenmikroskop betrachtet werden.

Die Durchführung der elektronenmikroskopischen Arbeiten erfolgte durch Frau Birgit Hub, Abteilung für Tumovirus-Charakterisierung, DKFZ.

4.8 Statistische Auswertungen

4.8.1 Mittelwert

Der Mittelwert, auch arithmetisches Mittel bezeichnet, beschreibt den Durchschnitt. Er wird ermittelt, indem die Summe der zu untersuchenden Werte durch deren Anzahl geteilt wird.

4.8.2 Median

Der Median bezeichnet die Grenze zwischen zwei Hälften und wird auch als Zentralwert bezeichnet. Der Median halbiert eine Stichprobe. Gegenüber dem Mittelwert hat der Median den Vorteil, dass er gegenüber abweichenden Werten nicht so empfindlich reagiert wie es der Mittelwert tun würde.

4.8.3 Der Log Rang-Test

Der Log Rang-Test ist ein hypothetischer Test, um die Überlebensverteilungen zweier Kollektive zu vergleichen.

4.8.4 Kaplan-Maier-Schätzer

Der Kaplan-Maier-Schätzer dient zum Schätzen der Wahrscheinlichkeit, dass bei einem Versuchsobjekt ein bestimmtes Ereignis innerhalb eines Zeitintervalls nicht eintritt. Er ist als eine Form der Überlebenszeitanalyse zu bezeichnen.

Die in Kap. 4.8.3 und 4.8.4 beschriebenen statistischen Auswertungen wurden durch die Abteilung für Biostatistik des DKFZ durchgeführt.

5 Ergebnisse

5.1 Das Tiermodell *Mastomys coucha*

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Beobachtung der Spontanentwicklung gutartiger Hauttumore beim Tiermodell *Mastomys coucha*. Die im Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) lebende Kolonie ist die weltweit einzige, die mit dem spezies-spezifischen *Mastomys natalensis* Papillomvirus (MnPV) infiziert ist. Aufgrund der persistenten Infektion entwickelt ein Großteil der Tiere ab einem bestimmten Alter gutartige Hautläsionen (Burtscher *et al.*, 1973), die bereits als Papillome und Keratoakanthome diagnostiziert wurden (Rudolph und Thiel, 1976).

5.1.1 Beobachtungen der Tumorentwicklung

Die Spontanentwicklung gutartiger Hauttumore war ab einem Alter von ca. zehn Monaten zu beobachten. Im zweiten Lebensjahr stieg die Tumorinzidenz stark an. Bevorzugte Lokalisationen der Läsionen waren im Kopfbereich an Schnauze und Ohr sowie an Nacken und Rücken, aber auch an Haut-Schleimhaut-Übergängen wie Augenlid, Mund sowie im Anogenitalbereich. Phänotypisch unterschieden sich die stark keratinisierten Tumore der Haut von denen, die an Haut-Schleimhaut-Übergängen lokalisiert waren. Sie waren deutlich über die Hautoberfläche erhaben, stark verhornt und enthielten eine Masse aus nekrotischem Material und Keratin (siehe Abb. 8). Sie ähnelten im Aussehen stark den beim Menschen auftretenden Keratoakanthomen. Teilweise saßen die Läsionen der Haut breitbasig auf, manchmal waren jedoch auch „hörnchenartige“ Ausprägungen zu sehen (siehe Abb. 8D). Die Läsionen an Haut-Schleimhaut-Übergängen waren hingegen eher von warzenähnlicher Gestalt mit einer weichen Oberfläche (siehe Abb. 8C und Abb. 9).

Eine neue Beobachtung war das Auftreten von Hautläsionen im Anogenitalbereich (siehe Abb. 9), das bisher bei *Mastomys* nicht beschrieben war. Es wurden warzenähnliche Tumore an After, Präputium und Vulva beobachtet, die in Aussehen und Lokalisation an *Condylomata acuminata* beim Menschen erinnerten. Dabei handelt es sich um benigne, beerenartige, papilläre Wucherungen im Anogenitalbereich (Feigwarzen). Teilweise traten diese Läsionen bei *Mastomys* auf, die noch weitere Tumore wie Papillome/Keratoakanthome zeigten, teilweise jedoch auch als einzige Hautläsionen. Im Gegensatz zu Beobachtungen beim Menschen konnte bei den Hauttumoren unseres Tiermodells niemals eine Spontanregression festgestellt werden,

sondern ein ständig fortschreitendes Wachstum der Tumore. Darüber hinaus war die Neubildung weiterer Hautläsionen beim selben Tier die Regel.

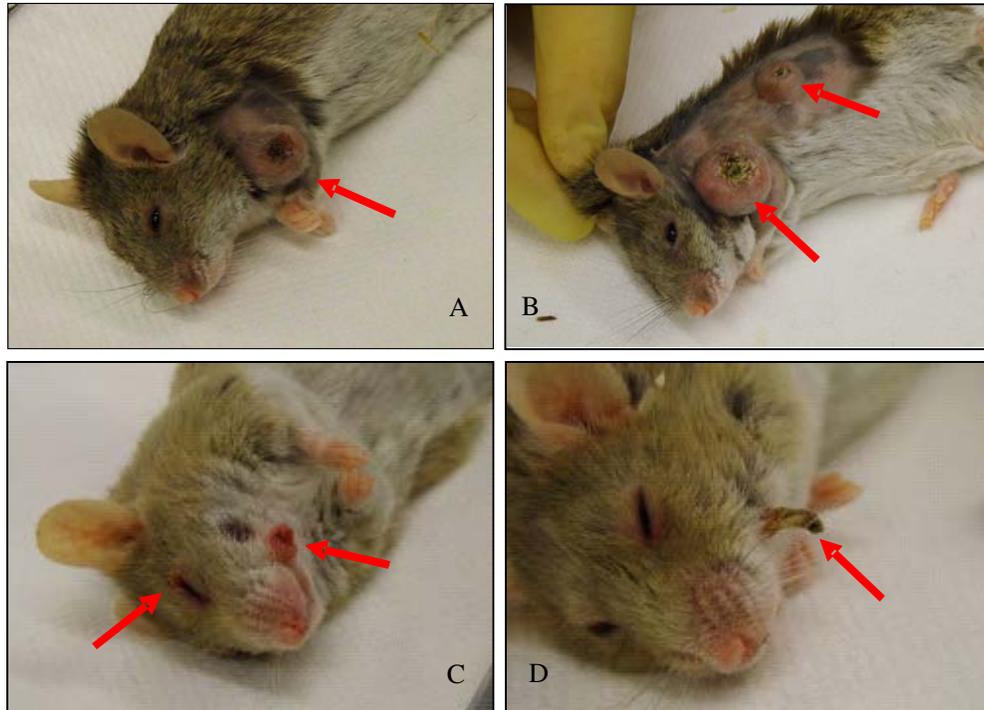


Abb. 8: *Mastomys coucha* mit spontan entwickelten Papillomen/Keratoakanthomen an verschiedenen Lokalisationen. Das Tier in **A** hat ein Papillom im Bereich der Schulter. Zu sehen ist eine typische Ausprägungsform eines stark keratinisierten Tumors. Einige Wochen später ist beim selben Tier ein weiteres Papillom aufgetreten (**B**). **C** zeigt Papillome am Augenlid sowie Schnauze. In **D** ist ein „hörchenartiges“ Papillom abgebildet.

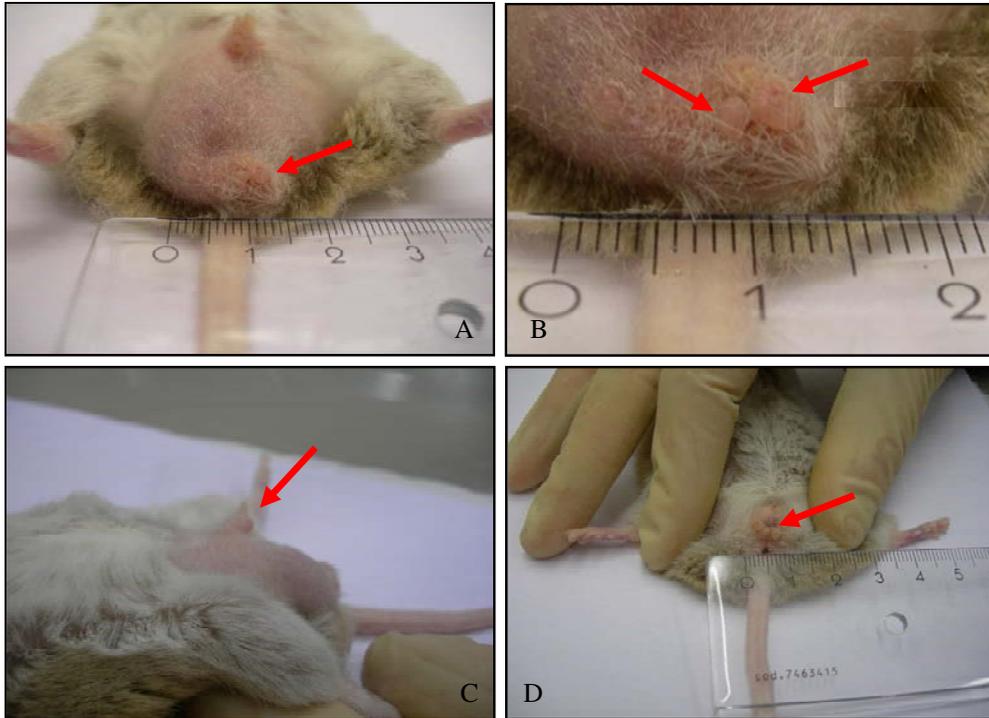
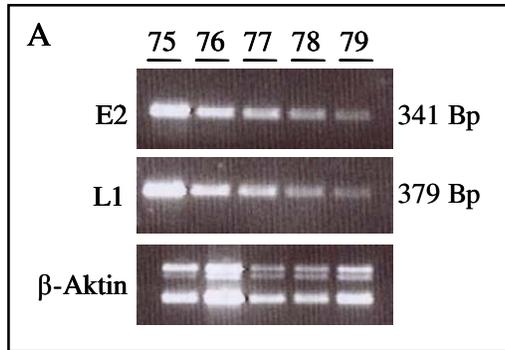


Abb. 9: Hautläsionen im Anogenitalbereich bei *Mastomys coucha*. **A** und **B** zeigen Papillome am After. Bei **C** ist ein Papillom am Penis zu sehen. **D** zeigt ein sogenanntes Kondylom an der Vulva. Hautläsionen im Anogenitalbereich bei *Mastomys coucha* wurden im Rahmen dieser Arbeit erstmals gezeigt.

5.1.2 Erhöhte Tumorinzidenz bei männlichen Tieren

Auffällig war eine wesentlich höhere Inzidenz für Tumore bei männlichen Tieren im Vergleich zu weiblichen. Vermutlich ist diese Geschlechtsdisposition auf Rankenkämpfe unter den Böcken zurückzuführen, bei denen sich die Tiere wiederholt Kratz- und Bisswunden zuziehen, die eine Infektion der basalen Zellschichten ermöglichen und die Vermehrung bereits infizierter Zellen durch Anregung der Zellteilung fördern. Zur Überprüfung dieser Annahme wurden fünf männliche *Mastomys* unterschiedlichen Alters, die seit dem Absetzen vom Muttertier im Alter von vier Wochen einzeln gehalten wurden, ausgewählt. In operativ (siehe Abb. 10). Außerdem wurden den Tieren unter Narkose auf dem geschorenen Rücken einmalig Läsionen mit dem Skalpell zugefügt. In einem elf Monate langem Beobachtungszeitraum entwickelte keines der Tiere eine Hautläsion, wobei das Alter der Tiere bei Beobachtungsende zwischen 12,5 und 21 Monate betrug und somit weit über dem Durchschnittsalter einer Tumorentwicklung lag. Dies führte zu dem Schluss, dass eine MnPV-Infektion *per se* und einmalige Verletzungen der Haut nicht ausreichen, um Tumore zu induzieren, sondern lässt als notwendigen Kofaktor chronische Hautirritationen vermuten.



B

Identifizierung	Alter des Tieres in Monaten bei Setzen der Hautläsionen	Alter des Tieres in Monaten bei Beobachtungsende
#75	9	20
#76	10	21
#77	6,5	17,5
#78	9	20
#79	1,5	12,5

Abb. 10: Um den Einfluss von Bisswunden durch Rankenkämpfe auf die Tumorentstehung zu überprüfen, wurden fünf *Mastomys*-Böcke (Tier #75-79) untersucht, die seit dem Absetzen vom Muttertier im Alter von vier Wochen einzeln gehalten wurden. **A** zeigt die PCR-Analyse der Hautproben der Tiere #75-79. MnPV ist in allen fünf Proben mittels PCR nachweisbar. Die PCR-Analyse wurde mit den MnPV-Primern E2, L1 und β -Aktin durchgeführt. Die Zahlen (rechts) bezeichnen die Größen der PCR-Produkte. Der Tabelle in **B** ist das Alter der Tiere zum Zeitpunkt des Setzens der Mikroläsionen sowie bei Beobachtungsende zu entnehmen. Keines der Tiere zeigte während des Beobachtungszeitraums Hautveränderungen.

Wie in Methoden (Kap. 4.4) erwähnt, erfolgte jede PCR-Analyse mit Positiv- und Negativkontrolle (Daten nicht gezeigt).

5.1.3 Augenentzündungen - ist MnPV ätiologisch beteiligt?

Bei Beobachtung der Kolonie fielen bei einer großen Anzahl von Tieren Augeninfektionen auf (siehe Abb. 11A). Diese traten klinisch in unterschiedlicher Gestalt und Schweregrad auf. Meist war eine Entzündung der Bindehäute (Konjunktivitis) sowie der Augenlider (Blepharitis) festzustellen, was sich durch gerötete und stark angeschwollene Bindehäute und Augenlider äußerte. Häufig war ein vermehrter Augenausfluss (Epiphora) zu sehen, der oft zu einem Verkleben der Augenlider führte. Die Epiphora wies serösen bis mukösen Charakter auf und war meist eitrig. Gelegentlich lag auch eine Entzündung der Hornhaut (Keratitis) vor, was sich in einer Korneatrübung manifestierte. In schweren Fällen führten die Augeninfektionen zur Erblindung. Tiere mit massiven Augenentzündungen wurden aus Gründen des Tierschutzes getötet, da die starken Entzündungen das Allgemeinbefinden der Tiere beeinträchtigten. Zum Teil geschah dies, bevor eine Tumorentwicklung zu beobachten war.

Zur Abklärung einer möglichen Beteiligung von PV an der Ätiologie der Augenentzündungen bei *Mastomys coucha* wurden bei einigen Tieren Abstriche der Konjunktiven genommen und von den gewonnenen Proben PCR-Analysen durchgeführt. In allen Proben konnte MnPV-DNS detektiert werden (siehe Abb. 11B), wodurch eine Beteiligung von MnPV an den Augenentzündungen nicht auszuschließen ist.

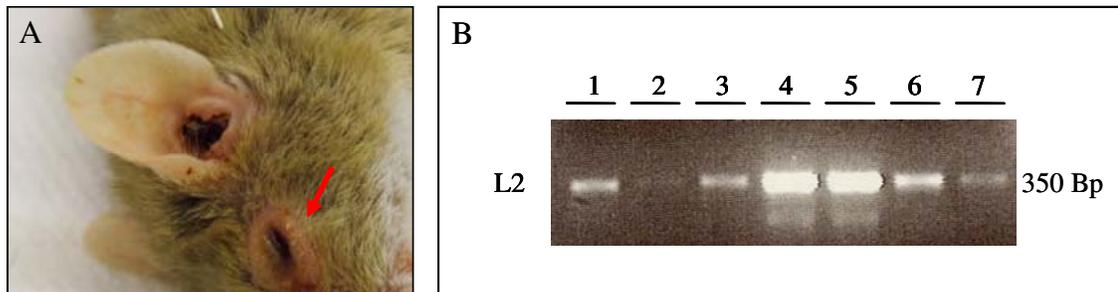


Abb. 11: Die Abbildung (A) zeigt eine *Mastomys* mit einer massiven Augeninfektion. Die Augenlider des Tieres sind stark angeschwollen (Blepharitis). **B** zeigt das Ergebnis der mittels PCR unter Verwendung eines L2-Primer-Paares getesteten Proben der Konjunktivalabstriche. In allen Proben wurde MnPV-DNS nachgewiesen. Die Zahl am rechten Rand bezeichnet die Größe des PCR-Produktes.

5.1.4 Erhebung von Daten über Tumorzinzidenz und Häufigkeit von Augeninfektionen anhand der Beobachtung eines Kollektivs

Bislang existierten keine konkreten Zahlen über die Tumorzinzidenz bei *Mastomys*, bisherige Angaben beruhten auf Schätzungen. Zur Ermittlung tatsächlicher Zahlen im Hinblick auf das Auftreten von Tumoren sowie Augenentzündungen wurde ein Kollektiv von 22 Tieren (darunter acht Weibchen und 14 Männchen) über einen Zeitraum von mehr als zwölf Monaten bzw. bis zum Erreichen eines Lebensalters von 70 Wochen beobachtet und ab einem Alter von fünf Monaten wöchentlich auf das Auftreten von Hautläsionen untersucht. Die Haltung der Tiere erfolgte während des Beobachtungszeitraums unter natürlichen Bedingungen in kleinen Gruppen, die aus zwei bis vier Wurfgeschwistern bestanden, und jeweils nach Geschlechtern getrennt waren. Bei sozialer Unverträglichkeit wurden die Tiere in Einzelhaltung umgesetzt.

Die ersten Tumore traten im Alter von 39 Lebenswochen bei zwei männlichen Tieren auf, die Inzidenz betrug somit 9%. Mit 43 Wochen stieg diese mit drei weiteren tumortragenden Tieren auf 23% an. In Woche 47 und 49 kam jeweils ein weiterer Tumorträger hinzu, somit betrug die Tumorzinzidenzen 27% (Woche 47) bzw. 32% (Woche 49). Die Tumorzinzidenz stieg in Woche 54 auf 41%, in Woche 57 auf 45% sowie in Woche 64 auf 50%. Bis zu diesem Zeitpunkt waren alle Tumorträger männlich. Der einzige Tumor bei einem weiblichen Tier während der Beobachtungsphase wurde im Alter von 69 Wochen festgestellt. Zum

Beobachtungsende mit 70 Lebenswochen hatten 12 der 22 Tiere Tumore entwickelt, somit betrug die Tumorinzidenz 55%. Bei Betrachtung der Geschlechtsunterschiede wiesen Männchen eine Tumorfrequenz von 78,6% im Gegensatz zu 12,5% bei Weibchen auf. Hierbei blieb unberücksichtigt, ob es sich um einzeln oder multipel auftretende Tumore handelte, sondern es wurde nur das Kriterium „Tumorträger“ herangezogen.

Anders zeigte sich hingegen die Verteilung der Augeninfektionen. Hier fiel als erstes ein Weibchen im Alter von 36 Wochen auf, die Inzidenz betrug 5%. Mit 41 Wochen folgten fünf weitere Tiere, darunter zwei Männchen und drei Weibchen, was einen Anstieg der Inzidenz auf 25% zur Folge hatte. Mit 43 Wochen fiel ein weiteres Männchen auf, die Inzidenz betrug dann 32%. Die letzten beiden Fälle von Augenentzündungen wurden im Alter von 50 Wochen bei männlichen Tieren festgestellt und führten zu einer Inzidenz von 41%. Insgesamt waren in diesem Kollektiv von 22 Tieren neun Tiere mit Augeninfektionen vertreten, darunter vier Weibchen und fünf Männchen. Die Inzidenz für Augenentzündung bei Weibchen betrug somit 50%, die der Männchen 35,7%.

Bei dieser Aufstellung wurde nicht berücksichtigt, dass während des Beobachtungszeitraums einige Tiere getötet wurden. Die Neuerkrankungen (Tumor/Augenentzündung) wurden zu den bereits gezählten Tieren addiert. In folgendem Diagramm (Abb. 12) ist die Verteilung der Tumorinzidenz sowie der Augeninfektionen schematisch dargestellt.

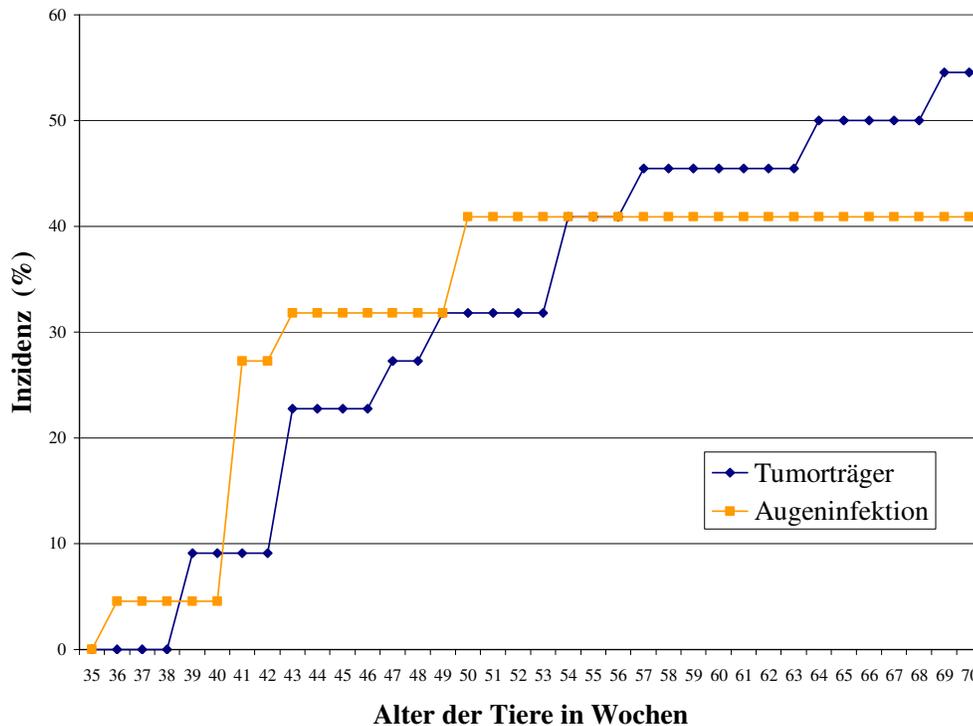


Abb. 12: Die Verteilung der Tumorzinzidenz sowie Auftreten von Augeninfektionen in Abhängigkeit vom Lebensalter in Wochen. Beobachtet wurde ein Kollektiv von 22 Tieren, darunter acht Weibchen und 14 Männchen. Das Ausscheiden einiger Tiere während des Beobachtungszeitraums blieb unberücksichtigt, die neu erkrankten Tiere (Tumor/Augenentzündung) wurden dazu addiert. Ebenso wurde nicht die Tumoranzahl pro Tier berücksichtigt, sondern es wurde nur das Kriterium „tumortragend“ herangezogen.

5.1.5 Tumorentwicklung nach Anwendung der klassischen Zwei-Stufen-Karzinogenese

Ziel der Anwendung des Protokolls der klassischen Zwei-Stufen-Karzinogenese (siehe Methoden Kap. 4.1.9) war, ein früheres Auftreten von Hautläsionen sowie eine Induktion maligner Tumore wie Plattenepithelkarzinome zu erreichen. Der gewünschte Effekt einer zeitlich abgestimmten Tumorentwicklung blieb aus, jedoch gelang es, das Auftreten eines Tumors zu einem früheren Zeitpunkt im Leben des Tieres als bei Spontanentwicklung zu induzieren. Bei behandelten Tieren zeigte sich das Tumoraufreten selten in Form einer einzelnen Hautläsion, sondern es handelte sich meist um multiple Läsionen, die den gesamten Rücken der Tiere bedeckten. Die Entwicklung von malignen bzw. invasiv wachsenden Tumoren konnte bis auf eine Ausnahme (Tier #29) nicht festgestellt werden. Hierbei handelte es sich um ein Fibrosarkom, welches subkutan im Bereich der seitlichen Bauchwand zu finden war und sich somit stark von den üblichen, an der Hautoberfläche wachsenden, keratinisierten Tumoren unterschied. Die PCR-Analyse dieses Tumors ergab für MnPV kein positives

Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Es handelte sich in diesem Fall um einen chemisch induzierten Tumor, bei dem Papillomviren ätiologisch keine Rolle spielen.

5.2 Ausbreitung von MnPV in verschiedenen Geweben

Eines der Hauptaugenmerke dieser Arbeit war die Untersuchung der Präsenz von MnPV-DNS in verschiedenen Geweben. Durch frühere Studien am Tiermodell war bereits bekannt, dass mittels Southern Blot-Analyse MnPV-DNS nicht nur in Haut bzw. Hauttumoren, sondern auch in anderen Organen wie beispielsweise Lunge, Nieren und Verdauungstrakt nachweisbar ist (Wayss *et al.*, 1981; Amtmann *et al.*, 1984). Bislang waren jedoch keine systematischen Untersuchungen zur MnPV-Verteilung mit der sensitiven Methode PCR durchgeführt worden.

5.2.1 Das Risiko der Kontamination bei der Sektion

Die hohe Sensitivität der PCR birgt das Risiko der Ermittlung falsch-positiver Ergebnisse aufgrund von Verschleppung viraler DNS bei der Probengewinnung. Die Gefahr der Kontamination bestand schon zum Zeitpunkt der Sektion bei der Entnahme der einzelnen Organe.

Beispielhaft sei hier eine PCR-Analyse eines sehr jungen Tieres (vier Wochen alt) gezeigt, bei dem aufgrund des frühen Zeitpunktes der Untersuchung im Leben des Tieres positive Signale für MnPV-DNS in keinen oder nur in wenigen Organen zu erwarten wäre (Abb.13 A). Zwischen den einzelnen Sektionsschritten wurde das Skalpell lediglich mit einem Tuch gereinigt. Getestet wurden die inneren Organe Herz, Lunge, Leber, Milz, Niere, Vormagen, Magen, Dünndarm und Dickdarm sowie Haut von verschiedenen Lokalisationen (Ohr, Rücken und Nacken) im Rahmen einer dynamischen PCR mit 25, 30, 35 und 40 Zyklen. Im Ergebnis zeigten sich alle Proben positiv für MnPV-DNS. Bereits nach 25 PCR-Zyklen waren in jedem getesteten Organ Signale festzustellen. Im Vergleich dazu wird die PCR-Analyse eines ebenso vier Wochen alten Tieres dargestellt, die das zu erwartende DNS-Verteilungsmuster gemäß des jungen Alters repräsentiert (Abb. 13 B). Neben positiven Ergebnissen in einzelnen Organen (Leber, Dünndarm, Haut Rücken, Haut Nacken, Gehirn) war hier in einigen Organen (Herz, Lunge, Niere, Vormagen, Dickdarm) MnPV-DNS nicht nachweisbar.

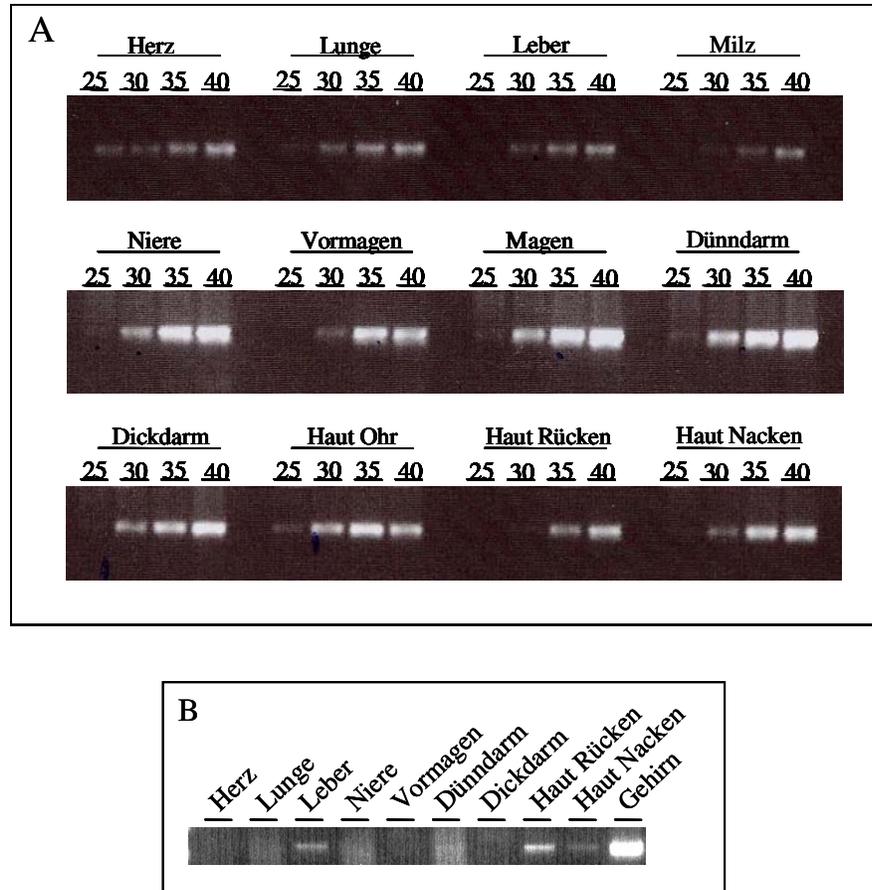


Abb. 13: **A** zeigt das Ergebnis einer dynamischen PCR-Analyse einer vier Wochen alten *Mastomys* mit falsch-positiven Ergebnissen aufgrund von DNS-Verschleppung bei der Sektion. Die PCR jedes getesteten Organs wurde jeweils mit 25, 30, 35 und 40 Zyklen durchgeführt. In **B** ist im Vergleich dazu die PCR-Analyse eines Tieres gleichen Alters dargestellt, die das altersgemäß zu erwartende DNS-Verteilungsmuster eines jungen Tieres repräsentiert.

Nach dieser Feststellung galt es, eine Methode der Sektion sowie der Vorbereitung zur PCR zu etablieren, bei der falsch-positive Ergebnisse durch Kontamination ausgeschlossen werden konnten. Nun wurde während der Sektion zwischen den einzelnen Organentnahmen das Besteck gewechselt und vor erneuter Benutzung einer gründlichen Reinigung unterzogen. Hierzu hatte sich die Reinigung in SDS, gefolgt von Ethanol und anschließendem Abflammen über dem Bunsenbrenner bewährt. Abschließend wurde das Besteck noch mit dem DNS-Dekontaminationsmittel „DNA Quant Off“ behandelt. Die Zerkleinerung der Organe erfolgte in Plastik-Wägschälchen mit Hilfe von Einmalskalpellen sowie Einmalpinzetten. Im Anschluss an die Sektion wurde der Arbeitsplatz ebenso mit dem DNS-Dekontaminationsmittel behandelt. Durch diese Behandlung sowie Kontrollen (Negativ-Kontrollen, Daten nicht gezeigt) konnte im Rahmen der Sektion die Kontaminierung der Proben mit Virus-DNS ausgeschlossen werden.

5.2.2 Ergebnisse der PCR-Analysen

Um Aussagen über die Virus-Ausbreitung treffen zu können, wurden PCR-Analysen der DNS diverser Organe wie Herz, Lunge, Leber, Milz, Niere, Vormagen, Magen, Dünndarm, Dickdarm, Gehirn, Blut, Lymphknoten, Zunge sowie Haut von verschiedenen Stellen (Ohr, Rücken, Nacken) und Hautläsionen unter den in Kap. 5.2.1 erwähnten Bedingungen durchgeführt. Für PCR-Analysen wurden Primer verwendet, die zwei verschiedene offene Leserahmen des Virusgenoms detektieren können. Als Kontrolle der eigentlichen DNS-Menge wurde in jeder Probe zusätzlich das β -Aktin-Gen untersucht. Beim Vorliegen von Signalen MnPV-spezifischer Amplifikationsprodukte wurde das Ergebnis als positiv gewertet. Die hier gezeigten PCRs wurden mit 25 Zyklen durchgeführt.

Exemplarisch werden die PCR-Daten von vier Tieren gezeigt (Abb. 14). Bei Tier #58 handelte es sich um ein 20 Monate altes Weibchen, das ein Papillom am Rücken sowie am Augenlid und im Ohr aufwies. Die PCR-Analyse zeigte eine hohe Inzidenz für MnPV-DNS in allen untersuchten Organen, wobei unterschiedlich starke Signale für variierende Kopienzahlen der viralen DNS sprechen. Erwartungsgemäß wurden die stärksten Signale in der Haut und den Hautläsionen gefunden, wobei bei diesem Tier auch in der Lunge, im Vormagen und in der Zunge sehr starke Signale festzustellen waren. Herz, Leber, Milz, Magen und Gehirn waren als schwach positiv einzuordnen.

Tier #30 war ein elf Monate altes Männchen, das als einzige Auffälligkeit ein großes Papillom im Ohr hatte. Das PCR-Ergebnis unterschied sich deutlich von dem vorher gezeigten älteren Weibchen, das mehrere Tumore aufwies. Hier wurden nur in der Haut und dem Papillom positive Signale für MnPV festgestellt. Als einziges inneres Organ konnte im Vormagen ein schwach positives Signal für MnPV-DNS festgestellt werden.

Bei Tier #18 handelte es sich um ein zwölf Monate altes Weibchen, das neben einer Hautläsion an der Schnauze Papillome am Augenlid, Bauch sowie After zeigte. Bei der PCR-Untersuchung war ein deutlich positiver Nachweis für MnPV-DNS in der Haut sowie in den Hautläsionen festzustellen. Vormagen, Magen, Lymphknoten und Blut wurden bei diesem Tier ebenso positiv für MnPV-DNS getestet.

Insgesamt stellte sich eine höhere Inzidenz von MnPV-DNS in der Haut sowie in Hautläsionen im Vergleich zu den inneren Organen heraus. Die Präsenz von Virus-DNS in inneren Organen fiel sehr unterschiedlich aus. Das am häufigsten mittels PCR positiv getestete innere Organ war der Vormagen, gefolgt vom Magen.

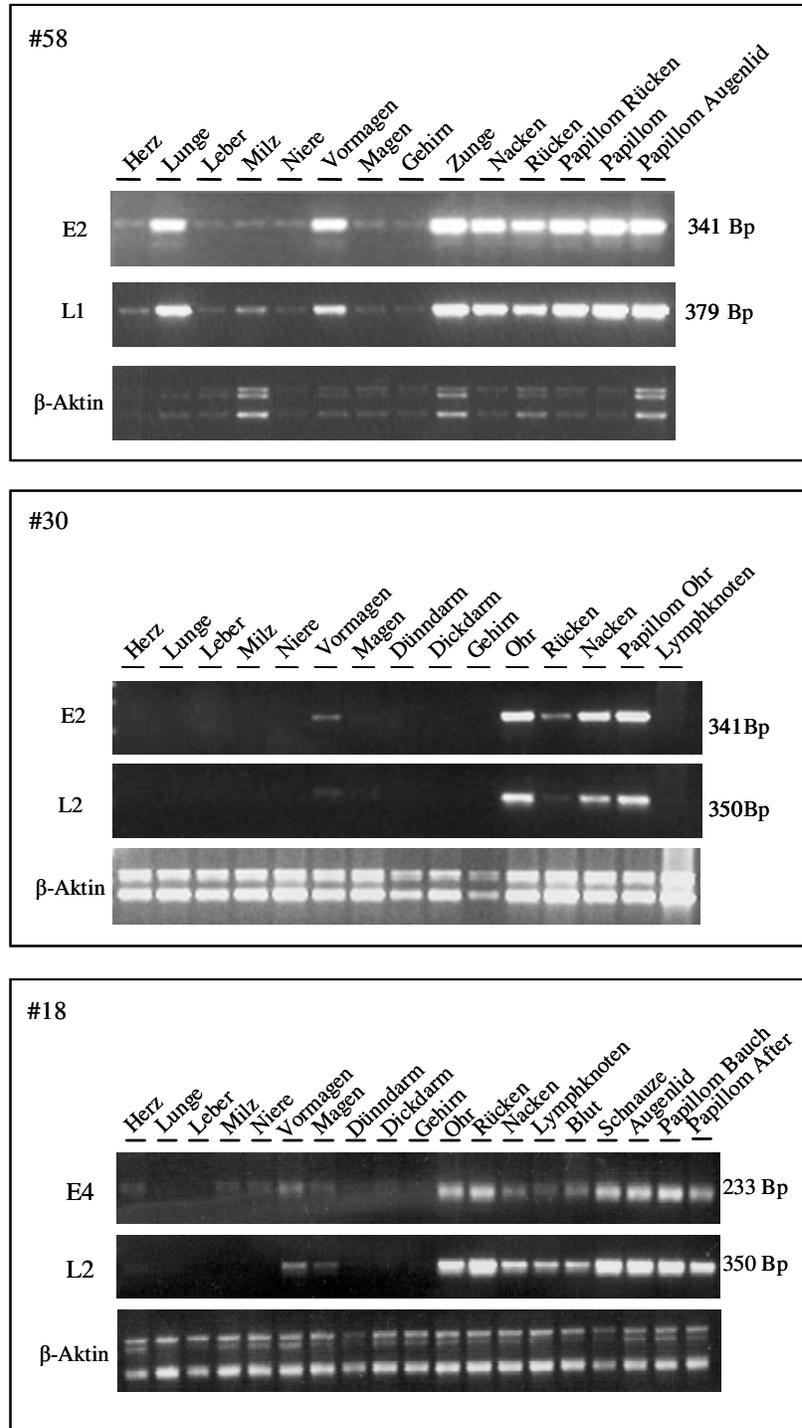


Abb. 14: Exemplarisch werden die PCR-Analysen von drei Tieren gezeigt. Alle Tiere zeigten bereits Papillome. Bei Tier #58 ist eine hohe Inzidenz für MnPV sowohl in den inneren Organen als auch in der Haut und Hautläsionen festzustellen. Bei den Tieren #30 und #18 ist ein ähnliches Verteilungsmuster erkennbar. Haut und Hautläsionen zeigen deutlich positive Signale für MnPV, während bei den inneren Organen nur der Vormagen (#30) bzw. neben Vormagen auch Magen, Blut und Lymphknoten (#18) positiv sind. Die PCR wurde mit 25 Zyklen durchgeführt. Am linken Rand sind die verwendeten Primerpaare angegeben. Die Zahlen am rechten Rand bezeichnen die Größen der PCR-Produkte.

Völlig anders sah das Verteilungsmuster bei Tier #33 aus (siehe Abb. 15). Es handelte sich um ein acht Monate altes Weibchen, das zur Zucht verwendet worden war. Die einzige Auffälligkeit, die dieses Tier zeigte, war eine warzenähnliche Läsion an der Vulva, die in ihrer Ausprägung an ein Kondylom beim Menschen erinnerte (siehe Einleitung Kap. 2.6.1). Aufgrund dessen wird im Folgenden die Bezeichnung „Kondylom“ verwendet. Überraschend war das Ergebnis der PCR-Analyse: Es war weder in der Haut, noch in inneren Organen sowie im Lymphknoten ein positives Signal für MnPV festzustellen. Auch in dem Kondylom konnte keine MnPV-DNS nachgewiesen werden. Somit musste angenommen werden, dass bei diesem Tier MnPV nicht das ursächliche Agens für das Auftreten der Hautläsion sein konnte.

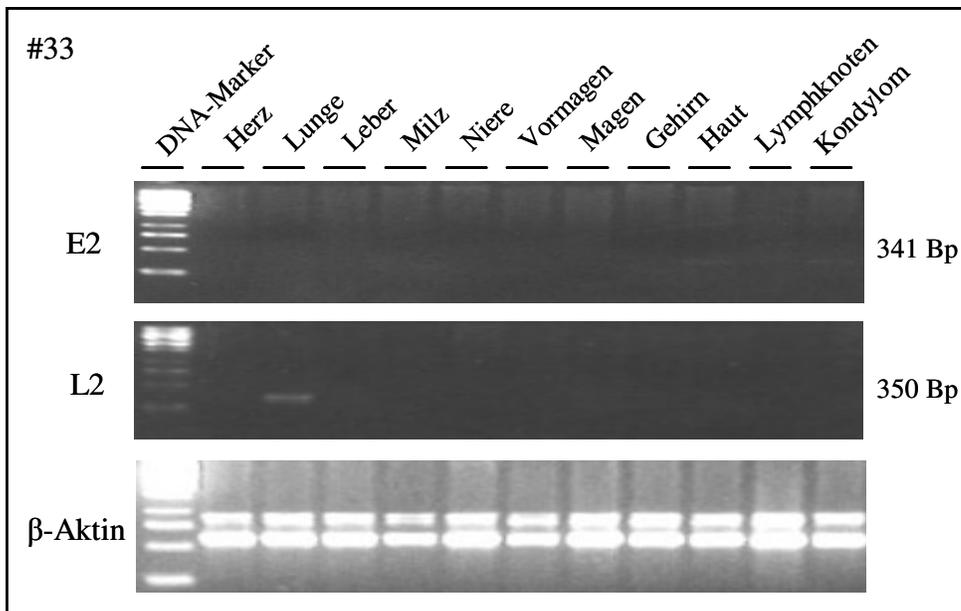


Abb. 15: Das PCR-Ergebnis eines acht Monate alten Weibchens, das zur Zucht verwendet worden war. Das Verteilungsmuster unterschied sich deutlich von den bisher gezeigten. MnPV war hier nicht nachzuweisen und war somit nicht das ursächliche Agens für das Kondylom an der Vulva. Die verwendeten Primerpaare sowie die Produktgrößen sind jeweils angegeben. Diese Daten wurden in Zusammenarbeit mit Julia Nafz, DKFZ, erstellt.

5.2.3 Ergebnisse der Southern Blot-Analysen

Zur Bestätigung der Ergebnisse der sehr sensitiven PCR-Analysen bzw. zum Ausschluß falsch positiver Ergebnisse wurden zusätzlich Southern Blot-Analysen durchgeführt.

Desweiteren sollten die Southern Blot-Analysen zur Beurteilung des physikalischen Status der DNS im Hinblick auf Episomalität bzw. Integration des Virus in das Wirtszellgenom herangezogen werden.

In den hier gezeigten Southern Blots betrug die Menge der eingesetzten DNS 2,5 µg pro Spur. Wenn nicht anders gekennzeichnet, wurde zuvor die DNS mit Hilfe des Restriktionsenzym Hind III linearisiert. Hind III schneidet im MnPV-Genom einmal („single cut“-Enzym).

Exemplarisch werden die Southern Blot-Analysen von zwei Tieren gezeigt (siehe Abb. 16). Die inneren Organe (Herz, Lunge, Leber, Milz, Niere, Vormagen, Magen, Dünndarm, Dickdarm und Gehirn) sowie Blut (im Folgenden bei den inneren Organen gezeigt) sind jeweils getrennt von Haut und Hautläsionen abgebildet. Bei Tier #8 handelte es sich um ein elf Monate altes Männchen, das bereits multiple Hautläsionen besaß, darunter Papillome an Augenlid und Rücken. Auffällig war hier das deutlich positive Signal im Herzen, wobei das ebenso untersuchte Blut kein Signal zeigte. Somit wurde die virale DNS tatsächlich im Herzmuskelgewebe detektiert und ist nicht mit im Herzen verbliebenen Blutresten in Verbindung zu bringen. Als weiteres inneres Organ zeigte die Lunge ein positives Signal, das allerdings in der Stärke deutlich schwächer war als das im Herz. In den anderen inneren Organen war MnPV nicht nachzuweisen. Die unauffällige Haut, die Hautläsion sowie die Papillome an Augenlid und Rücken zeigten hingegen deutlich positive Signale für MnPV-DNS.

Im Vergleich dazu wurde der Southern Blot des Tieres #10 betrachtet. Hier handelte es sich um ein zwölf Monate altes männliches Tier, das ein Papillom an der Flanke und eines im Ohr sowie eine weitere Hautläsion aufwies. Bei der Sektion fielen die Lymphknoten durch eine Anschwellung auf, was auf eine Aktivierung des Immunsystems hindeutet. Überraschend war das positive Ergebnis im Gehirn, das bisher mittels Southern Blot nicht festgestellt wurde. Ein weiteres positives Signal war in der Probe des Vormagens zu sehen. In den übrigen inneren Organen dieses Tieres war MnPV nicht nachzuweisen. Deutlich positive Signale waren wiederum in der Haut, in den Papillomen sowie der Hautläsion zu finden. Trotz des aktivierten Zustandes der Lymphknoten war in deren DNS MnPV nicht nachweisbar.

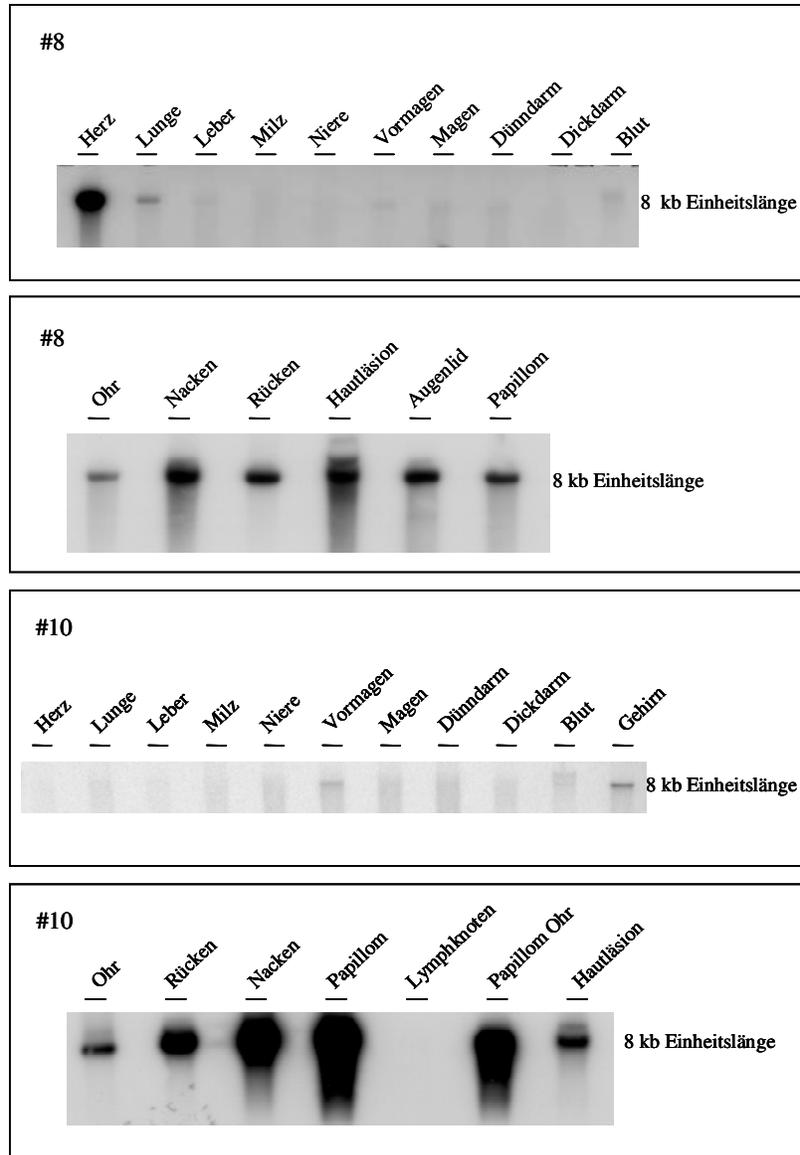


Abb. 16: Die Abbildung zeigt Beispiele von Southern Blot-Analysen. Es werden zwei ca. einjährige Tiere miteinander verglichen, die beide schon Hautläsionen aufwiesen. Haut und Hautläsionen sind bei beiden Tieren positiv für MnPV, wohingegen das Verteilungsmuster von MnPV in den inneren Organen variiert. Die DNS ist im linearisierten Zustand mit einer Einheitslänge von 8 kb gezeigt.

5.2.4 MnPV-Nachweis in Gehirnen

Eine neue und überraschende Feststellung war die Detektion von MnPV-DNS im Gehirn. In Abb. 17 sind die Southern Blot-Analysen von Gehirnen von drei Tieren gezeigt, die dem DMBA/TPA-Protokoll (siehe Methoden Kap. 4.1.9) unterzogen worden waren und ein oder mehrere Papillome aufwiesen. Das Alter der Tiere betrug 9,5-10 Monate, Tier #45 war weiblich, #44 und #46 männlich.

Das stärkste Signal zeigte sich bei #46. Im Vergleich dazu erschienen die Signale bei #44 und #45 schwächer, was auf quantitative Unterschiede zurückzuführen ist. Bislang war MnPV-DNS noch nie im Gehirn festgestellt worden.

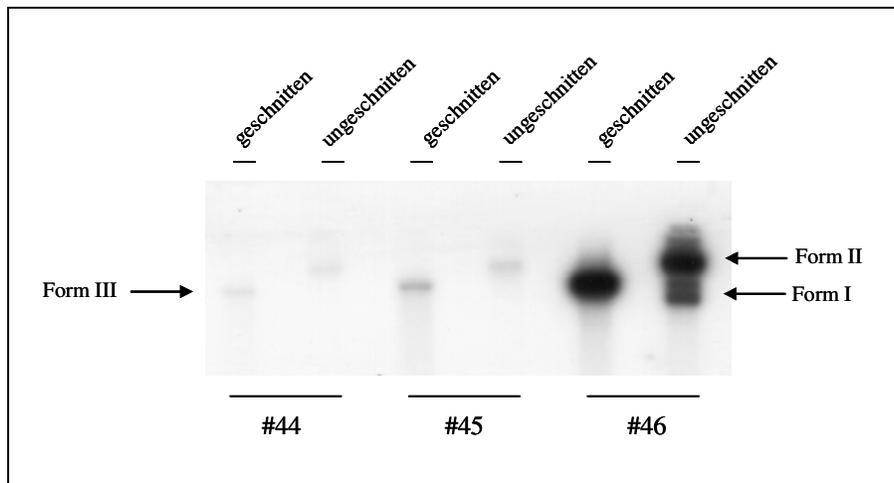


Abb. 17: Die Abbildung zeigt die Southern Blot-Analysen von Gehirnen von drei *Mastomys*. In allen Proben ist ein für MnPV positives Signal zu erkennen. Die DNS wurde sowohl mit als auch ohne enzymatische Behandlung (Hind III) aufgetrennt. Im ungeschnittenen Zustand sind die Formen „supercoiled“ (Form I) und „relaxiert“ (Form II), nach enzymatischer Behandlung „linear“ (Form III) zu erkennen.

Die DNS wurde sowohl im unbehandelten Zustand als auch durch Hind III geschnitten aufgetrennt und ließ somit den direkten Vergleich des Musters ungeschnittener versus geschnittener DNS zu. Die DNS trat in den Formen „supercoiled“ (Form I), „relaxiert“ (Form II) sowie „linear“ (Form III) auf. Die Positionen der einzelnen Formen sind in Abb. 17 mit Pfeilen gekennzeichnet. Die geschnittene DNS hatte eine Einheitslänge von 8 kb (entspricht Form III).

Eine Integration der MnPV-DNS ins Wirtsgenom wäre durch Banden zu erkennen, die größer oder kleiner als Form III sind (sogenannte „off size“-Banden). Episomalität liegt vor, wenn nach enzymatischer Behandlung ausschließlich die Form III (Einheitslänge) detektiert wird.

Bei keiner der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Southern Blot-Analysen konnte eine Integration der Virus-DNS festgestellt werden, weder in der Haut oder in sonstigen Geweben, noch in Tumormaterial.

5.2.5 Daten von PCR- und Southern Blot-Analysen im Vergleich

Zur systematischen Analyse wurde ein Kollektiv von 21 Tieren herangezogen, bei denen sowohl PCR- als auch Southern Blot-Analysen durchgeführt worden waren. Zu beachten ist, dass die bisher gezeigten Beispiele für PCR- und Southern Blot-Analysen nicht von Tieren stammten, die diesem Kollektiv angehörten.

Das Durchschnittsalter dieses Kollektivs betrug 10,5 Monate, es bestand aus acht weiblichen und 13 männlichen Tieren. Es waren sowohl tumortragende als auch äußerlich unauffällige Tiere vertreten. Die Abbildungen 18, 19 und 20 zeigen die Zusammenfassungen der ermittelten Ergebnisse. Den Tabellen sind die Anzahl der untersuchten Organe, die Anzahl der positiv für MnPV-DNS getesteten Organe mittels PCR sowie Southern Blot im Vergleich sowie die prozentualen Anteile für das Vorliegen von MnPV zu entnehmen. Zu beachten ist, dass die Anzahl der untersuchten Organe variiert, da nicht von jedem Organ Daten erhoben wurden. Die untersuchten Gewebe wurden zur besseren Übersichtlichkeit in „Innere Organe“ (Abb. 18), „Haut“ (Abb. 19) und „Hauttumore“ (Abb. 20) eingeteilt.

Bei den inneren Organen waren Zunge, Vormagen, Magen und Lymphknoten die am häufigsten für MnPV positiv getesteten Organe. Deren Inzidenzen für MnPV bewegten sich zwischen 78-100% in der PCR und 33-100% im Southern Blot. Diejenigen von Herz, Lunge und Gehirn betragen ca. 70% in der PCR und zwischen 33-43% im Southern Blot. Die übrigen untersuchten Organe Leber, Milz, Niere, Dünn- und Dickdarm sowie das Blut wiesen Inzidenzen für MnPV von 29-44% in der PCR und 11-33% im Southern Blot auf.

Bei den Proben unauffälliger Haut von unterschiedlichen Lokalisationen (Ohr, Rücken, Nacken) war im Vergleich zu den inneren Organen eine deutlich höhere Inzidenz festzustellen. Diese betrug zwischen 86-100% in der PCR und 71-82% im Southern Blot.

Bei der Untersuchung der Hauttumore wurde bei den Läsionen unterschiedlicher Lokalisationen (Augenlid, Mund, Haut, After, Vorhaut) bei beiden Untersuchungsmethoden eine 100%ige Inzidenz für MnPV ermittelt.

Erwartungsgemäß zeigte sich eine durch PCR ermittelte höhere Inzidenz für MnPV als im Southern Blot, die auf eine deutlich höhere Sensitivität der Methode zurückzuführen ist. Dennoch war ein konstantes Verteilungsmuster erkennbar. So war in allen untersuchten inneren Organen (Herz, Lunge, Leber, Milz, Niere, Vormagen, Magen, Dünndarm, Dickdarm, Gehirn, Lymphknoten und Zunge) sowie Blut MnPV-DNS vorzufinden, jedoch variierten die Inzidenzen.

Hervorzuheben ist, dass die zuvor exemplarisch gezeigten PCR- und Southern Blot-Analysen (siehe Abb. 14, 15, 16 und 17) nicht von Tieren stammten, die dem Kollektiv zur

Erhebung dieser systematischen Analyse angehört. Es konnte jedoch anhand dieser Auswertung bestätigt werden, dass ein großer Anteil der untersuchten Proben von Vormagen und Magen MnPV-DNS aufwies, wie bereits bei den exemplarisch gezeigten PCR-Analysen (siehe Abb. 15) festzustellen war.

Innere Organe		Herz	Lunge	Leber	Milz	Niere	Vormagen	Magen	Dünndarm	Dickdarm	Gehirn	Blut	Lymphknoten	Zunge
PCR	getestet	9	7	9	9	8	9	9	7	6	20	6	3	3
	positiv	6	5	4	4	3	8	7	2	2	14	2	3	3
	Prozent	67%	71%	44%	44%	38%	89%	78%	29%	33%	70%	33%	100%	100%
Southern Blot	getestet	8	7	9	9	9	9	9	7	6	21	6	3	1
	positiv	3	3	1	1	1	5	4	2	2	7	2	1	1
	Prozent	38%	43%	11%	11%	11%	56%	44%	29%	33%	33%	33%	33%	100%

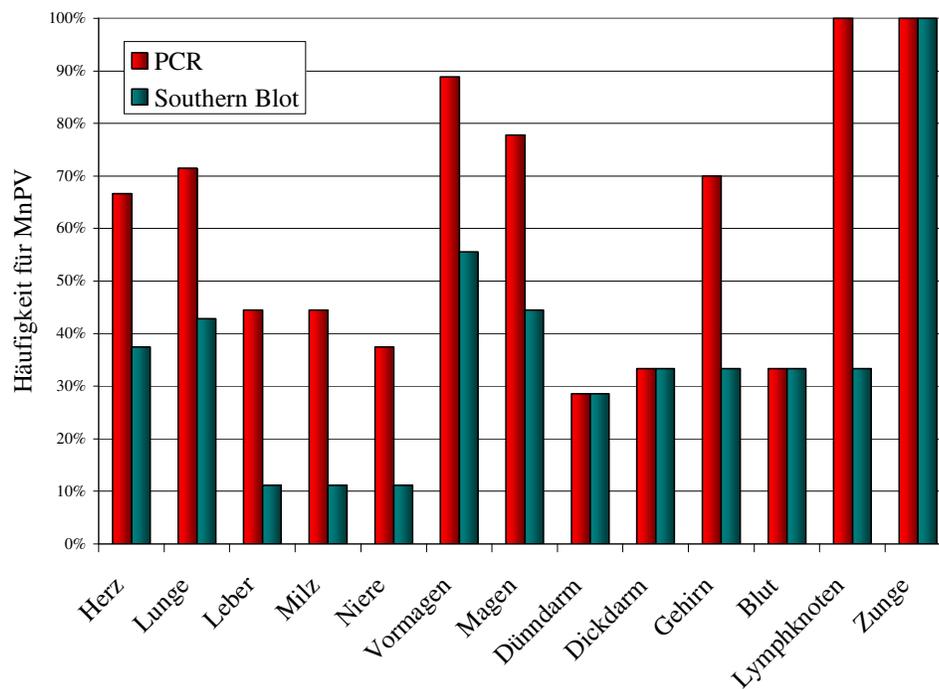


Abb. 18: PCR- und Southern Blot-Daten im Vergleich. Es wurde ein Kollektiv von 21 Tieren (acht Weibchen und 13 Männchen) mit einem Durchschnittsalter von 10,5 Monaten untersucht. In dem Kollektiv waren sowohl tumortragende als auch äußerlich unauffällige Tiere vertreten. Der Tabelle sind die Anzahl der untersuchten Organe, die Anzahl der MnPV-positiv getesteten Organe mittels PCR und Southern Blot im Vergleich sowie die prozentualen Anteile für MnPV-Präsenz zu entnehmen. Im Säulendiagramm repräsentieren die roten Säulen die PCR-Analysen, die grünen die mit Hilfe von Southern Blots erhobenen Daten.

Gezeigt ist das Ergebnis der Analyse von inneren Organen (Herz, Lunge, Leber, Milz, Niere, Vormagen, Magen, Dünndarm, Dickdarm, Gehirn und Lymphknoten) sowie Blut. Die Erhebung dieser Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Julia Nafz, DKFZ.

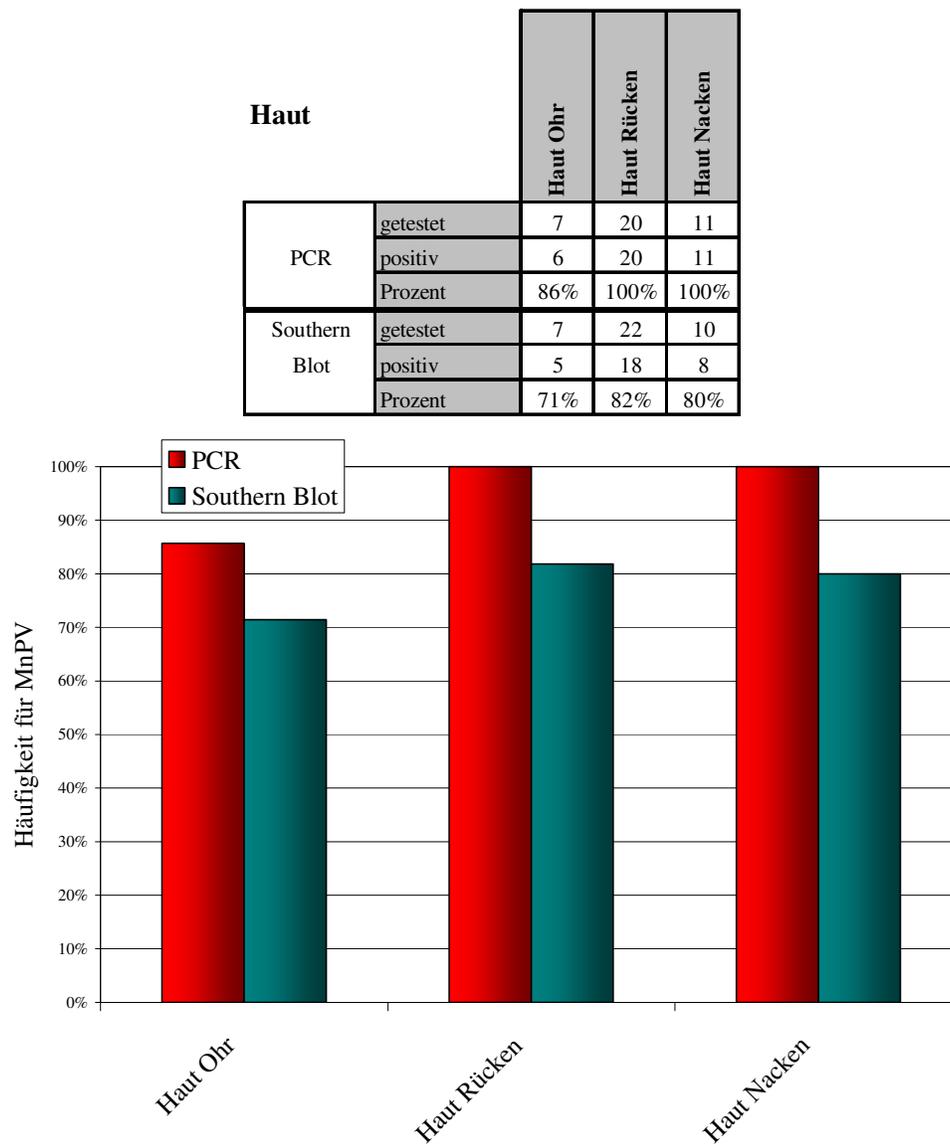


Abb. 19: In der Abbildung ist das Ergebnis der Analyse von Hautproben unterschiedlicher Lokalisationen gezeigt. Das untersuchte Kollektiv ist identisch mit dem in Abb. 18. Der Tabelle sind die Anzahl der untersuchten Organe, die Anzahl der MnPV-positiv getesteten Organe mittels PCR und Southern Blot im Vergleich sowie die prozentualen Anteile für MnPV-Präsenz zu entnehmen. Im Säulendiagramm repräsentieren die roten Säulen die PCR-Analysen, die grünen die mit Hilfe von Southern Blots erhobenen Daten. Die Erhebung dieser Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Julia Nafz, DKFZ.

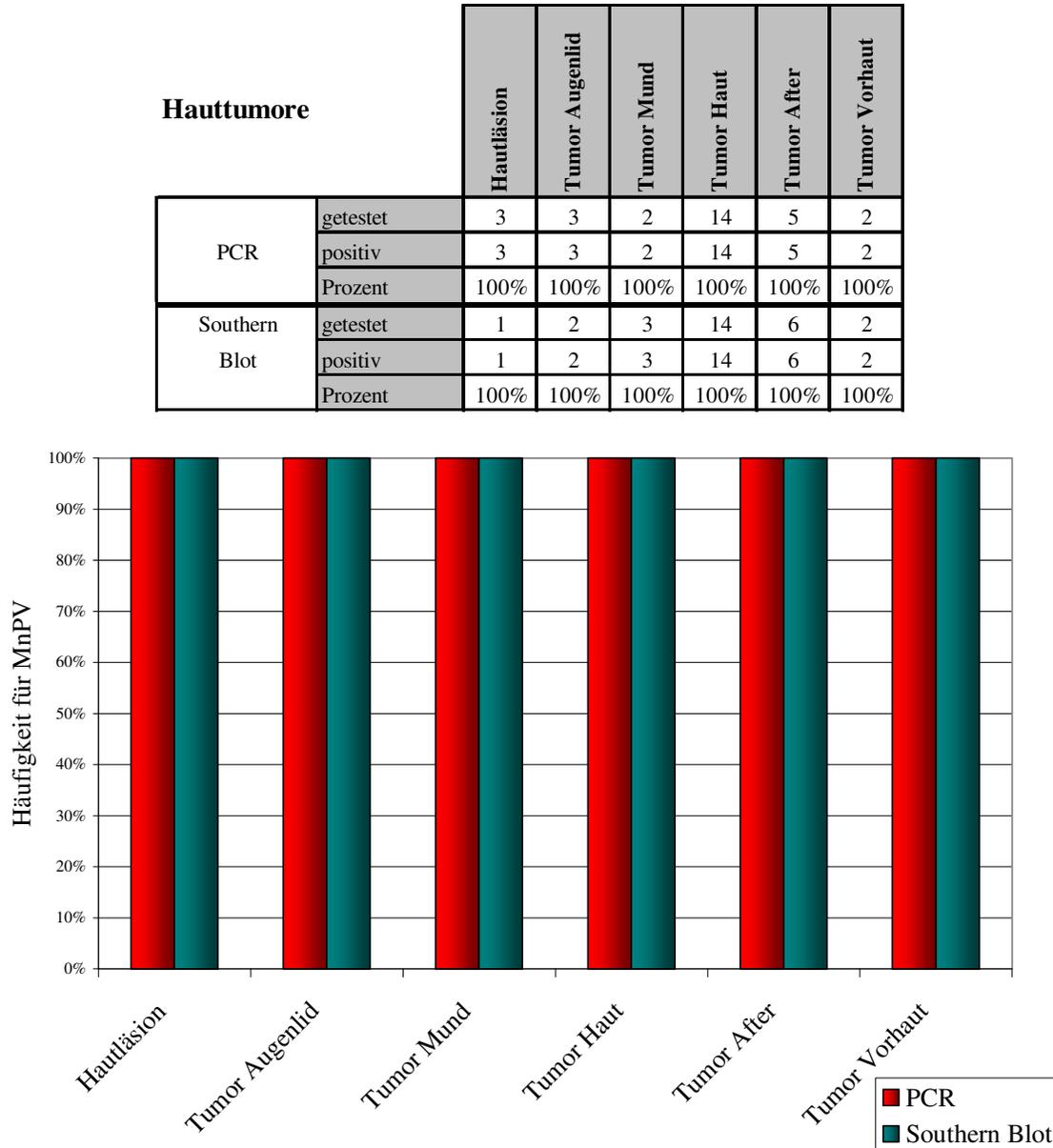


Abb. 20: Gezeigt sind die Ergebnisse der PCR- und Southern Blot-Analysen von Hauttumoren. Das untersuchte Kollektiv ist identisch mit dem in Abb.18 und 19. Der Tabelle sind die Anzahl der untersuchten Organe, die Anzahl der MnPV-positiv getesteten Organe mittels PCR und Southern Blot im Vergleich sowie die prozentualen Anteile für MnPV-Präsenz zu entnehmen. Im Säulendiagramm repräsentieren die roten Säulen die PCR-Analysen, die grünen die mit Hilfe von Southern Blots erhobenen Daten. Die Erhebung dieser Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Julia Nafz, DKFZ.

5.2.6 Übertragungswege von MnPV

Der Übertragungsweg von MnPV ist bislang ungeklärt. Die Möglichkeit einer vertikalen Weitergabe von MnPV vom Muttertier auf den Embryo oder Fötus ist nicht auszuschließen.

Zur Klärung dieser Frage wurden Sektionen zweier gravider Weibchen durchgeführt. Beide Tiere zeigten äußerlich keine Auffälligkeiten. Tier #73 befand sich in der ersten Hälfte der Trächtigkeit. Das Tier trug vier Föten im Uterus. Sowohl in der Haut als auch in der Zunge des Muttertieres wurde MnPV mittels PCR festgestellt. Die vier Föten sowie zwei untersuchte Plazenten waren in der PCR negativ für MnPV (Abb. 21).

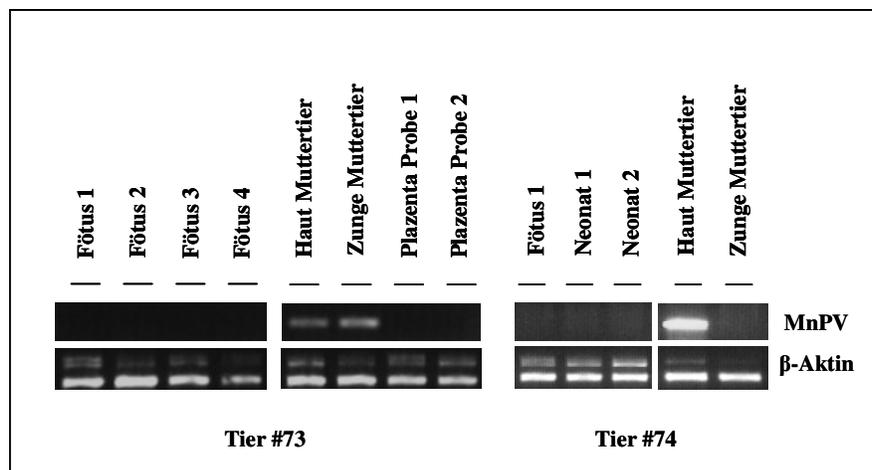


Abb. 21: Zur Untersuchung des Übertragungsweges von MnPV wurden zwei trächtige Weibchen sezirt und mittels PCR auf MnPV untersucht. Bei Tier #73 waren die Haut und Zunge des Muttertieres positiv für MnPV, die vier untersuchten Föten sowie zwei Plazenta-Proben jedoch negativ. Bei Tier #74 waren zum Zeitpunkt der Sektion zwei Tiere bereits geboren worden, ein Fötus wurde dem Uterus entnommen. Das Muttertier wies in der Haut ein deutlich positives, in der Zunge ein schwach positives Signal für MnPV auf. Der Fötus und die Neonaten waren MnPV-negativ.

In dem anderen Fall (Tier #74) befand sich das Tier gerade in der Geburt. Zwei Neonaten waren bereits auf natürlichem Weg geboren worden, eine weitere Frucht war zum Zeitpunkt der Sektion noch im Uterus verblieben. Auch bei diesem Muttertier wurde in der Haut ein deutlich positives Signal, in der Zunge jedoch kein Signal festgestellt. Sowohl der noch nicht geborene Fötus als auch die beiden Neonaten waren negativ. Die DNS für die PCR-Analyse wurde aus den kompletten Föten bzw. Neonaten und somit einem Querschnitt aller Organe extrahiert. Anhand dieser Ergebnisse ist eine vertikale Übertragung während Gravidität oder Geburt nicht wahrscheinlich.

5.2.7 *In situ*-Hybridisierung

Zur Detektion der Lokalisation der MnPV-DNS im Gewebe wurde die Methode der *in situ*-Hybridisierung herangezogen. Es wurden Proben von unveränderter Haut sowie von Hautläsionen untersucht. Außerdem wurde die Untersuchung von Schnitten einzelner Organe wie Gehirn und Vormagen, die im Southern Blot ein deutlich positives Signal ergeben hatten, durchgeführt.

Abb. 22 zeigt Schnitte von Tumoren nach Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung sowie *in situ*-Hybridisierung. Aufgrund von Hyperkeratose sind in Schnitten von Tumorgewebe die verschiedenen Schichten der Epidermis differenzierbar und somit auch die Lokalisation der MnPV-positiven Zellen zu bestimmen. Die Präsenz von MnPV ist an der Rotfärbung der Zelle erkennbar. In den Schichten des *Stratum spinosum* und *Stratum granulosum* ist die Mehrzahl positiver Zellen zu finden. Die Rotfärbung ist im gesamten Zellkern diffus verteilt. Dieses deutet auf ein episomales Vorliegen der viralen DNS hin (Evans *et al.*, 2002), die bereits im Southern Blot nachgewiesen wurde. Wäre das virale Genom in die zelluläre DNS integriert, könnte man die Rotfärbung als punktuell Signal im Zellkern detektieren (Evans *et al.*, 2002).

In einigen Fällen konnte in unveränderter Haut MnPV mittels *in situ*-Hybridisierung nachgewiesen werden. In Abb. 23 ist MnPV-positive Haut gezeigt (erkennbar an der Rotfärbung). Im Gegensatz zum Tumor liegt in unveränderter Haut keine Hyperkeratose vor, somit ist eine Unterscheidung einzelner Schichten nur bedingt möglich.

Der Nachweis viraler DNS mittels *in situ*-Hybridisierung gelang nicht in allen Fällen unauffälliger Haut (Abb. 23D), obwohl die entsprechende Probe sowohl in der PCR- als auch in der Southern Blot-Analyse ein deutliches Signal für MnPV gezeigt hatte.

Der Vormagen war das einzige innere Organ, in dem die MnPV-Detektion mittels *in situ*-Hybridisierung gelang (Abb. 24). Dass mit dieser Methode die Darstellung von MnPV in Schnitten anderer Gewebe, wie z.B. Gehirn, trotz positiver Signale im Southern Blot nicht möglich war, lag vermutlich an den in diesen Geweben vorliegenden geringen viralen Kopienzahlen, die unterhalb des Detektionsminimums unserer Methode lagen.

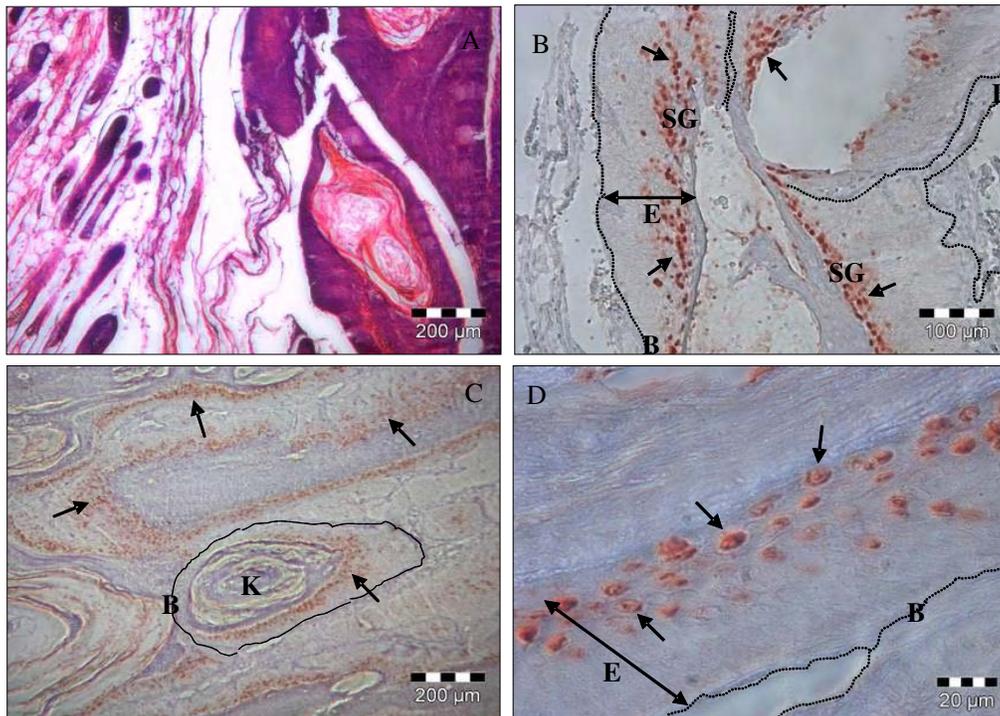


Abb. 22: *in situ*-Hybridisierung von Tumoren (**B-D**). Rotfärbung weist auf das Vorliegen von MnPV-DNS hin. Positive Areale sind mit Pfeilen hervorgehoben. Die MnPV-positiven Zellen befinden sich in den Parabasalschichten der Epidermis (=E), insbesondere im *Stratum granulosum* (=SG). B sowie die gestrichelte Linie kennzeichnen die Basalmembran.

A zeigt den Hämatoxylin-Eosin (HE)-gefärbten Schnitt eines Papilloms. In B ist der identische Ausschnitt nach *in situ*-Hybridisierung abgebildet. C und D zeigen Ausschnitte eines Papilloms in unterschiedlichen Vergrößerungen. Bei C sind keratinisierte Anteile (=K) im Inneren des Tumors zu erkennen. Bei D ist gut zu sehen, dass die Rotfärbung im gesamten Zellkern diffus verteilt ist, was auf ein episomales Vorliegen der viralen DNS hinweist.

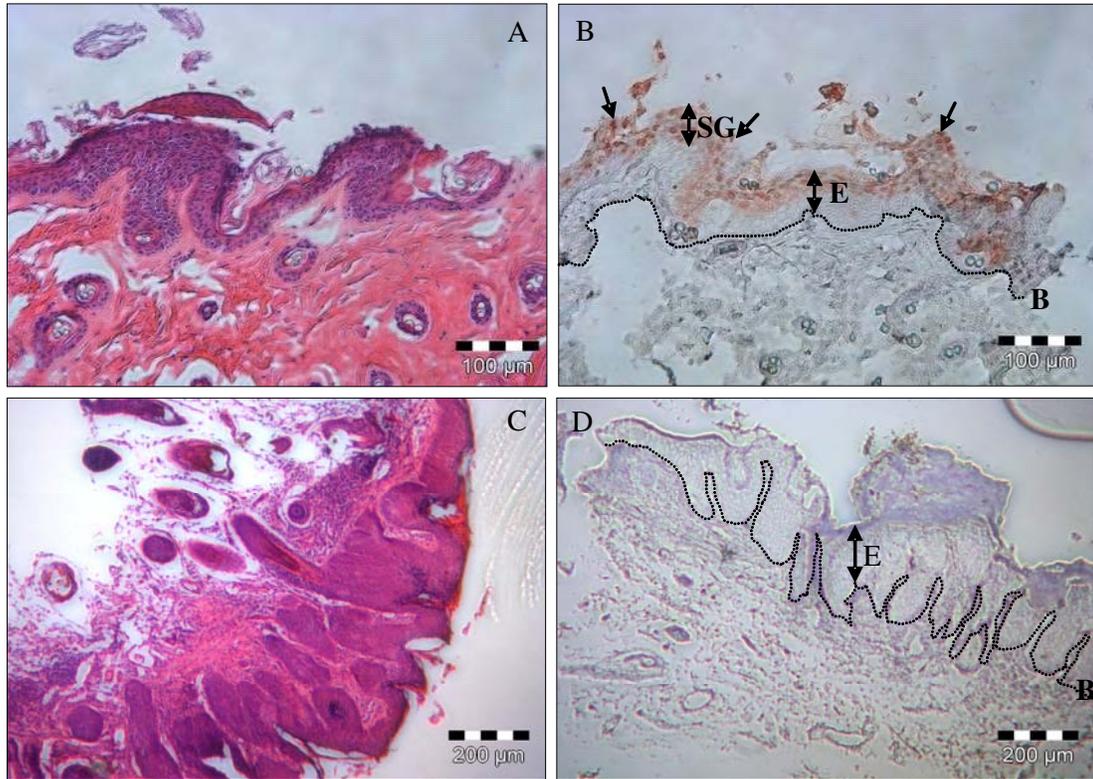


Abb. 23: Hämatoxylin-Eosin (HE)-gefärbte Schnitte (A und C) und *in situ*-Hybridisierung (B und D) von unauffälliger Haut tumortragender Tiere. A und B zeigen den identischen Ausschnitt eines Hautpräparates. Hier ist MnPV nachweisbar, erkennbar an der Rotfärbung. Die Pfeile deuten auf positive Bereiche. Insbesondere im *Stratum granulosum* (=SG) sind positive Zellen lokalisiert. Die Epidermis (=E) ist im Vergleich zu Tumorgewebe nicht hyperkeratotisch. B sowie die gestrichelte Linie kennzeichnen die Basalmembran. C und D zeigen den identischen Ausschnitt eines anderen Hautschnittes. Trotz positivem MnPV-Nachweis mittels PCR- und Southern Blot-Analyse der entsprechenden Probe ist hier keine virale DNS nachweisbar (D). E kennzeichnet die Epidermis, B die Basalmembran.

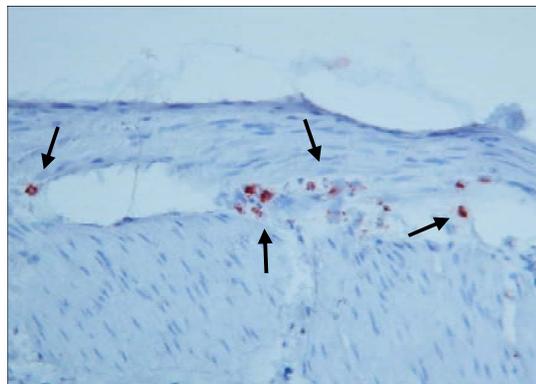


Abb. 24: *in situ*-Hybridisierung von Vormagengewebe. Die Pfeile deuten auf MnPV-positive Zellen. Der positive Nachweis ist an der Rotfärbung erkennbar.

5.2.8 Darstellung von Viruspartikeln im Elektronenmikroskop

In Tumoren waren Viruspartikel im Elektronenmikroskop darstellbar (Abb. 25). Die viralen Partikel befanden sich in kleinen Inseln in keratinisiertem, ausdifferenziertem Tumorgewebe.

Trotz positivem Nachweis von MnPV-DNS in der Haut mittels PCR, Southern Blot und *in situ*-Hybridisierung waren im Elektronenmikroskop in gesunder Haut keine viralen Partikel darstellbar. Da letztere Methode ein geringes Detektionslimit besitzt, wäre für einen positiven Nachweis eine höhere Anzahl an Virionen notwendig.

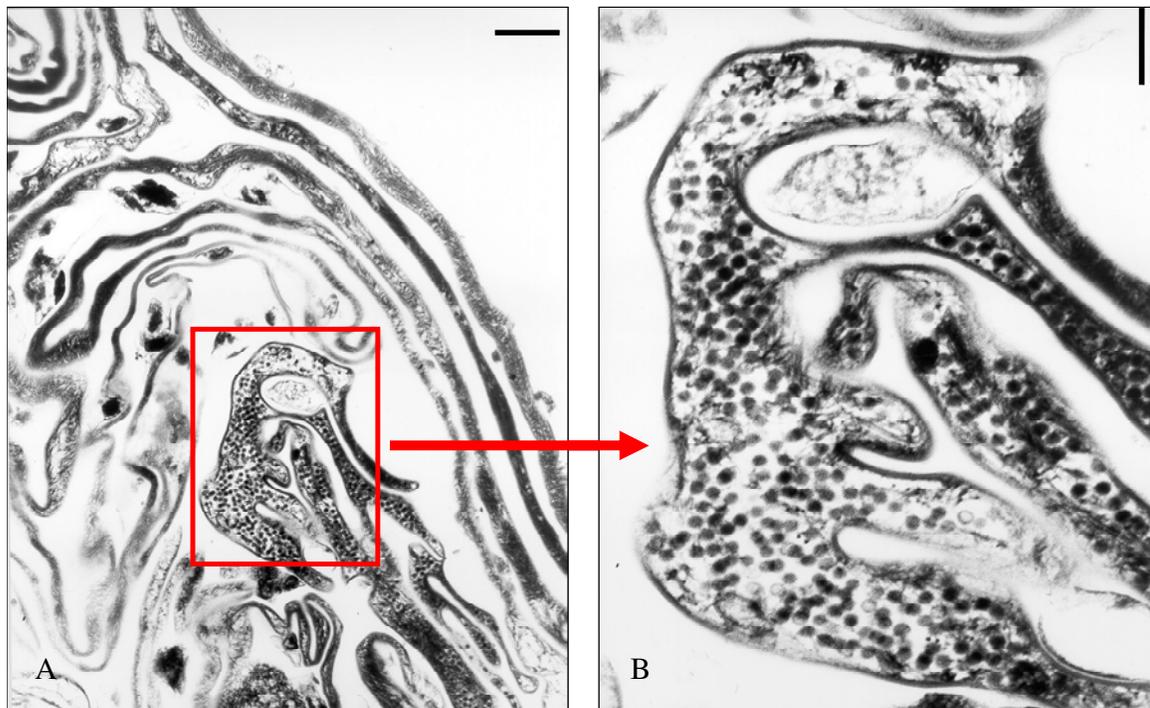


Abb. 25: Darstellung viraler Partikel im Elektronenmikroskop. Gezeigt sind Ausschnitte der Aufnahme eines Papilloms in verschiedenen Vergrößerungen. **A:** Zu sehen sind mehrere Inseln viraler Partikel, umgeben von keratinisiertem Gewebe. Der Eichstrich entspricht einer Länge von 500 nm. **B** stellt den rot markierten Ausschnitt von **A** dar. In diesem Areal sind zahlreiche virale Partikel erkennbar. Hier kennzeichnet der Eichstrich eine Länge von 200 nm.

5.3 Induktion einer systemischen Immunsuppression bei *Mastomys coucha* und ein Vergleich der Immunsuppressiva Cyclosporin A und Rapamycin im Hinblick auf die Tumorentstehung

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit dem Einfluss von Immunsuppressiva auf die persistente MnPV-Infektion bei *Mastomys coucha*. Anhand des Tiermodells wurden die Immunsuppressiva Cyclosporin A und Rapamycin hinsichtlich ihrer Einwirkung auf die Tumorentstehung verglichen.

Es wurden 70 Tiere annähernd gleichen Alters ausgewählt und in drei Gruppen eingeteilt: Rapamycin (Rapa), Cyclosporin A (CsA) und Kontrolle (Anhang 10.3.1). Zu Versuchsbeginn betrug das Alter der Tiere der Rapa- und CsA-Gruppe zwischen 3,5 und 5,5 Monaten. Die Tiere der Kontrollgruppe waren etwas älter (3,5 bis 6,5 Monate). Zur Induktion einer systemischen Immunsuppression bekamen die Tiere der Gruppen Rapa und CsA immunsuppressive Wirkstoffe *per os* verabreicht, die in zuvor ermittelten Konzentrationen (siehe Methoden Kap. 4.1.3) in das Futter der Tiere eingebacken wurden. Futter stand den Tieren *ad libidum* zur Verfügung. Somit wurde eine permanente Wirkstoffaufnahme und ein damit verbundener konstanter Wirkspiegel gewährleistet. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten identisches Futter jedoch ohne eingebackenen Wirkstoff.

Die Versuchsdauer betrug zehn Monate. Während dieser Zeit wurden wöchentlich Gewichtskontrollen durchgeführt, um eine Abnahme des Körpergewichts aufgrund eines gestörten Allgemeinzustandes oder einer Futtermittelverweigerung auszuschließen (Daten nicht gezeigt). Außerdem wurden in regelmäßigen Abständen sowie beim Einsatz einer neuen Futtercharge stichprobenartig Kontrollen des Wirkstoffspiegels im Blut durchgeführt (Anhang 10.3.3).

5.3.1 Ausscheiden von Tieren aus dem Versuch

Es gab verschiedene Gründe für das Ausscheiden eines Tieres aus dem Versuch. Tiere wurden getötet, sobald eine Tumorgröße von 15 mm erreicht war oder der Tumor das Tier maßgeblich beeinträchtigte. Weitere Gründe für die Tötung eines Tieres waren massive Augeninfektionen oder ein schlechter Allgemeinzustand. Wenige Tiere sind auch von selbst verstorben. Beim Ausscheiden eines Tieres wurde eine Sektion sowie eine Blutkontrolle der Wirkstoffe durchgeführt (Anhang 10.3.3).

Der nachfolgenden Tabelle sind die Anzahl der Tiere sowie die prozentualen Anteile an der Gesamtzahl der jeweiligen Gründe für das Ausscheiden aus dem Versuch zu entnehmen (Abb.

26). Die prozentualen Anteile wurden zum Vergleich der drei Gruppen außerdem in Form eines Säulendiagramms dargestellt.

Todesursache	Anzahl der Tiere	Rapa	CsA	Kontrolle
		23	22	25
gestorben	Anzahl	1	1	5
	Anteil an Gesamtzahl (%)	4	5	20
Tumor	Anzahl	4	6	9
	Anteil an Gesamtzahl (%)	17	27	36
Augeninfektion	Anzahl	10	6	1
	Anteil an Gesamtzahl (%)	43	27	4
schlechter Allg.Zustand	Anzahl	0	4	1
	Anteil an Gesamtzahl (%)	0	18	4
Versuchsende	Anzahl	8	5	9
	Anteil an Gesamtzahl (%)	35	23	36

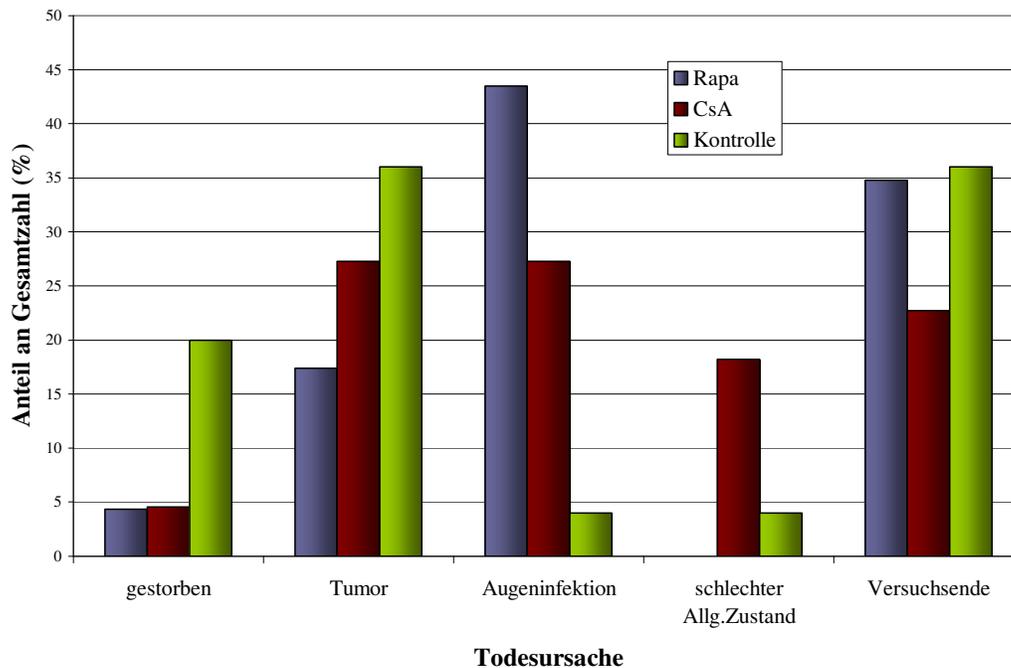


Abb. 26: Der Tabelle sind die Anzahl der Tiere in den einzelnen Gruppen, die Anzahl sowie die Anteile in Prozent an der Gesamtzahl der jeweiligen Gründe für das Ausscheiden aus dem Versuch zu entnehmen. Die prozentualen Anteile wurden gerundet. Zum Vergleich der drei Gruppen wurden die prozentualen Anteile in Form eines Säulendiagramms dargestellt.

Beim Vergleich der einzelnen Gruppen waren die meisten spontanen Todesfälle in der Kontrollgruppe, unter den immunsupprimierten Tieren waren in dieser Hinsicht keine wesentlichen Unterschiede festzustellen. Ebenso in der Kontrollgruppe war der größte Anteil der aufgrund von Tumoren getöteten Tiere zu finden, gefolgt von CsA. Bei den in Folge von Augeninfektionen getöteten Tieren war die Rapa-Gruppe mit einem sehr großen Anteil an erster

Stelle zu nennen, gefolgt von der CsA-Gruppe. Bei den Kontrolltieren wurden wenige Tiere wegen der Augenentzündungen getötet. Ein schlechter Allgemeinzustand als Grund für die Tötung war am häufigsten unter CsA festzustellen, gefolgt von den Kontrolltieren. Unter Rapa wurde kein Tier wegen eines schlechten Allgemeinzustandes getötet. Beim Überleben der Tiere bis zum Versuchsende gab es zwischen den Kontrolltieren und der Rapa-Gruppe keinen großen Unterschied, der Anteil überlebender Tiere unter CsA war hingegen geringer.

Zu beachten ist, dass bei allen folgenden Auswertungen das Ausscheiden eines Tieres aus dem Versuch unberücksichtigt blieb. Bereits verstorbene oder getötete Tiere wurden gezählt, als wären sie weiterhin im Versuch geblieben.

5.3.2 Auswirkungen auf die Tumorentstehung

Es sollte untersucht werden, ob die Spontanentwicklung der MnPV-induzierten Hautläsionen (Papillome/Keratoakanthome) unter Immunsuppression zu einem früheren Zeitpunkt auftrat als bei immunkompetenten Tieren. Außerdem wurde ein Vergleich der beiden Immunsuppressiva CsA und Rapa im Hinblick auf die Tumorentstehung angestrebt. Bei dieser Untersuchung war lediglich der Zeitpunkt des Auftretens des ersten Tumors von Interesse. Bei dieser Auswertung wurden die Anzahl der Tumore pro Tier, das Tumorwachstum sowie das Geschlecht nicht beachtet.

Bereits in Woche sechs nach Versuchsbeginn war das Auftreten des ersten Tumors in der Kontrollgruppe zu beobachten, gefolgt von weiteren Tumoren bei den Wurfgeschwistern des Tumorträgers in Woche sieben. Unter den Kontrolltieren waren erst ab Woche 19 des Experiments weitere Tumore festzustellen. Insgesamt betrug die Anzahl der Tumorträger in der Kontrollgruppe 15 von 25 Tieren, das entsprach einer Tumorzinzidenz von 60%. Alle tumortragenden Tiere waren männlich.

In der CsA-Gruppe trat der erste Tumor in Woche sieben der Immunsuppression auf. Weitere Tumore in dieser Gruppe waren in den Wochen 19 bis 22 zu beobachten. Es folgten in Woche 27 sowie in den Wochen 37 bis 39 weitere Tumorträger. Insgesamt entwickelten 13 von 22 Tieren in der CsA-Gruppe Tumore, was einer Tumorzinzidenz von 59% entsprach. Drei der tumortragenden Tiere waren weiblich.

In der Rapa-Gruppe war das Auftreten des ersten Tumors in Woche 19 nach Beginn der Immunsuppression zu beobachten. In den Wochen 22, 23 und 27 folgten weitere Tumorträger. Weitere tumortragende Tiere wurden in den Wochen 37 und 39 festgestellt. Die Gesamtzahl der Tumorträger in der Rapa-Gruppe betrug neun von insgesamt 23 Tieren, davon waren drei Tiere Weibchen. Die Tumorzinzidenz betrug hier 39%.

Mittels Log-Rang-Test waren zwar keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festzustellen ($p=0,5$), dennoch fiel eine zeitliche Trennung der Tumorentstehung auf (siehe Abb. 27). Die ersten Tumore waren bei einer Geschwistergruppe unter den Kontrolltieren festzustellen, wobei es sich um ein sehr frühes Auftreten von Tumoren handelte. Unter den immunsupprimierten Tieren war eine zeitliche Differenz von zwölf Wochen zwischen dem Auftreten des ersten Tumors in der CsA-Gruppe in Woche sieben und dem in der Rapa-Gruppe in Woche 19 festzustellen. Bei Vergleich der ermittelten Tumorzinzenzen von 39% unter Rapamycin, 59% unter CsA sowie 60% bei den Kontrolltieren zeigte sich eine geringere Tumorfrequenz bei Verwendung von Rapa im Vergleich zu CsA, wie auch in vorherigen Versuchen gezeigt wurde.

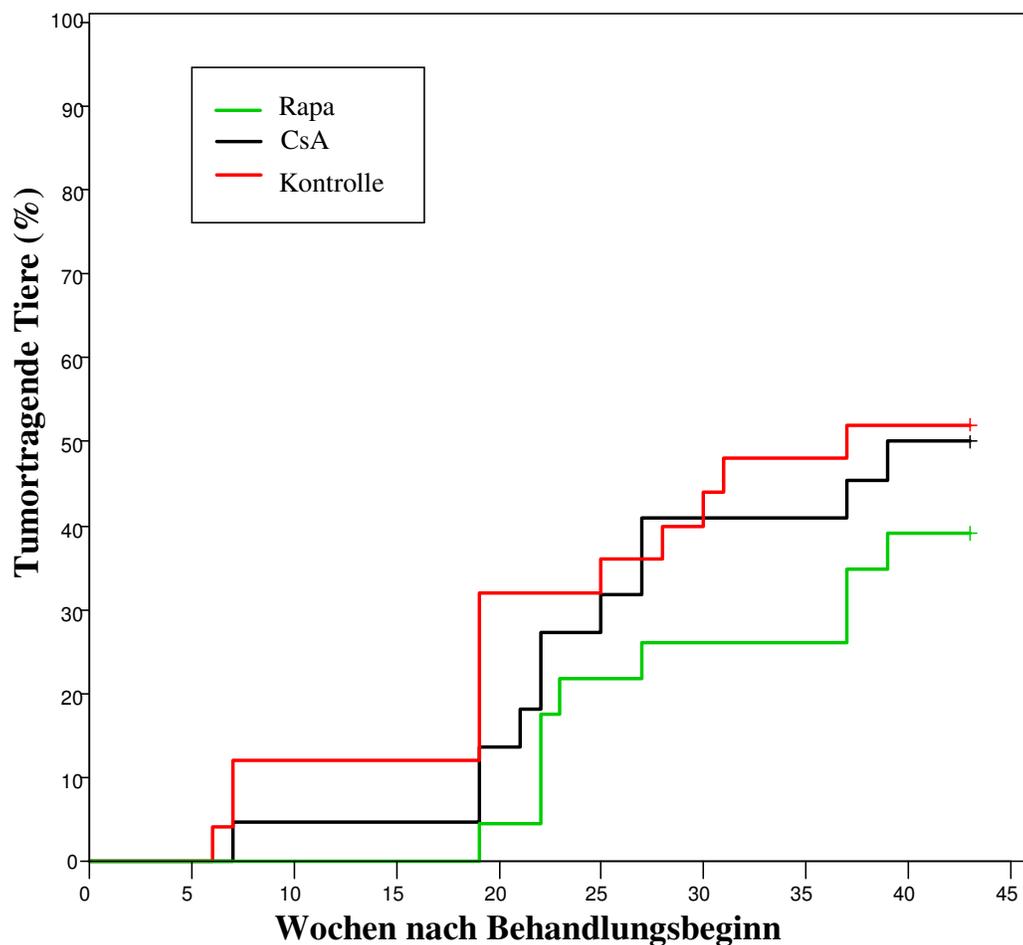


Abb. 27: Gezeigt ist ein Kaplan-Meier-Schätzer für die Zeit bis zum Auftreten des ersten Tumors. Mittels Log-Rang-Test war kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen Rapa, CsA und Kontrolle zu ermitteln ($p=0,5$).

5.3.3 Auftreten von Augeninfektionen

Wie schon bei den allgemeinen Beobachtungen der *Mastomys*-Kolonie berichtet, entwickelte ein nicht unerheblicher Teil der Tiere Augeninfektionen, die häufig Anlass für die Tötung eines Tiers waren. Unter Immunsuppression traten Augenentzündungen vermehrt auf. Auch hier mussten einige Tiere aufgrund massiver Augeninfektionen getötet werden, teilweise bevor ein Tumoraufreten zu beobachten war.

Im Folgenden sind die Inzidenzen für das Auftreten von Tumoren sowie von Augenentzündungen vergleichend gezeigt (Abb. 28). Das Geschlecht der Tiere wurde nicht berücksichtigt. Die Inzidenz für das Auftreten von Augeninfektionen war in der Rapa-Gruppe am höchsten.

Gesamtgruppe		Rapa	CsA	Kontrolle
Anzahl der Tiere		23	22	25
Tiere mit Tumor	Anzahl	9	13	15
	Inzidenz (%)	39	59	60
Tiere mit Augenentzündung	Anzahl	16	9	10
	Inzidenz (%)	70	41	40

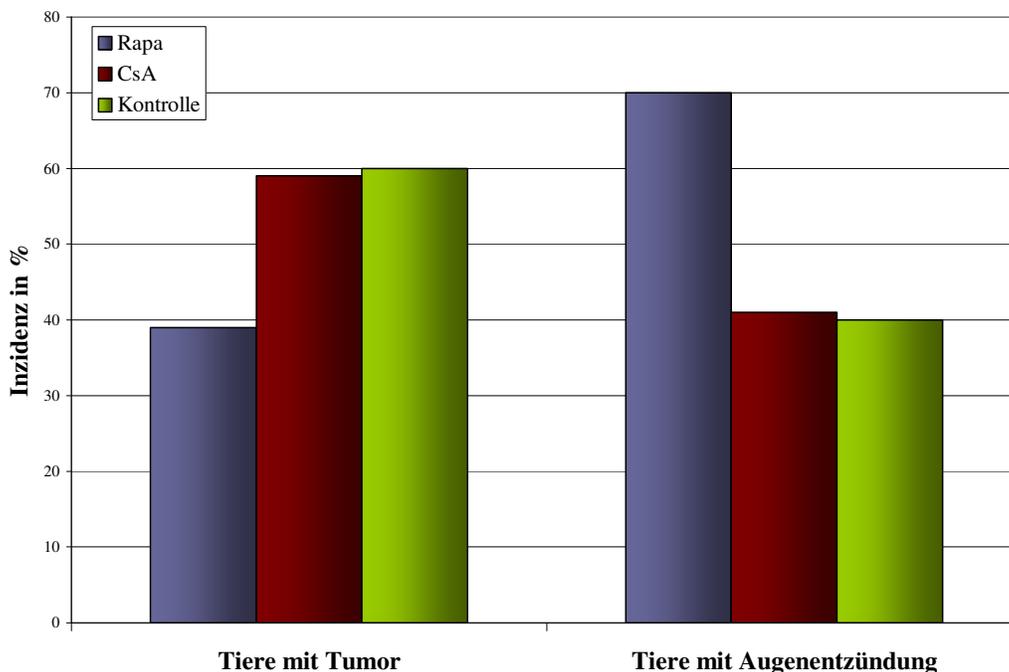


Abb. 28: Der Tabelle sind die jeweilige Anzahl der Tiere in den Gruppen Rapa, CsA und Kontrolle, die Anzahl der Tiere mit Tumor bzw. Augenentzündung und die jeweiligen Inzidenzen in Prozent zu entnehmen. Das Diagramm zeigt schematisch die unterschiedliche Verteilung der Inzidenz für das Auftreten von Tumor bzw. Augenentzündung für die Gruppen Rapa, CsA und Kontrolle.

5.3.4 Geschlechtsspezifische Unterschiede bei der Tumorentstehung und beim Auftreten von Augeninfektionen

Bei den in Kap. 5.3.4 gezeigten Ergebnissen blieben geschlechtsspezifische Unterschiede beim Auftreten von Tumoren sowie Augeninfektionen unberücksichtigt. Dabei ist bekannt, dass männliche *Mastomys* eine deutlich erhöhte Tumorzinzidenz aufweisen als ihre weiblichen Artgenossen. Daher wurden die bereits gezeigten Daten hinsichtlich geschlechtlicher Unterschiede erneut betrachtet (Abb. 29).

Die Inzidenz für Tumorentstehung betrug bei männlichen Tieren unter Rapamycin 40%, unter CsA 67% und bei den Kontrolltieren 88%. Bei den weiblichen Tieren lag diese mit 38% in der Rapa- und 43% in der CsA-Gruppe wesentlich niedriger. Bei den weiblichen Kontrolltieren war sogar kein Tumoraufreten zu beobachten.

Umgekehrt verhielt sich die Situation bei den Augeninfektionen. Die Inzidenz betrug bei den Männchen der Rapa-Gruppe 60%, bei denen der CsA-Gruppe 47% und bei den Kontrolltieren 35%. Bei den Weibchen hingegen betrug die Inzidenz unter Rapa 88%, 29% unter CsA und 50% bei den Kontrolltieren. Auffällig war hier wieder die erstaunlich hohe Inzidenz für Augeninfektionen unter Rapa, insbesondere bei weiblichen Tieren.

Männliche Tiere		Rapa	CsA	Kontrolle
Anzahl der Tiere		15	15	17
Tiere mit Tumor	Anzahl	6	10	15
	Inzidenz (%)	40	67	88
Tiere mit Augenentzündung	Anzahl	9	7	6
	Inzidenz (%)	60	47	35
Weibliche Tiere				
Anzahl der Tiere		8	7	8
Tiere mit Tumor	Anzahl	3	3	0
	Inzidenz (%)	38	43	0
Tiere mit Augenentzündung	Anzahl	7	2	4
	Inzidenz (%)	88	29	50

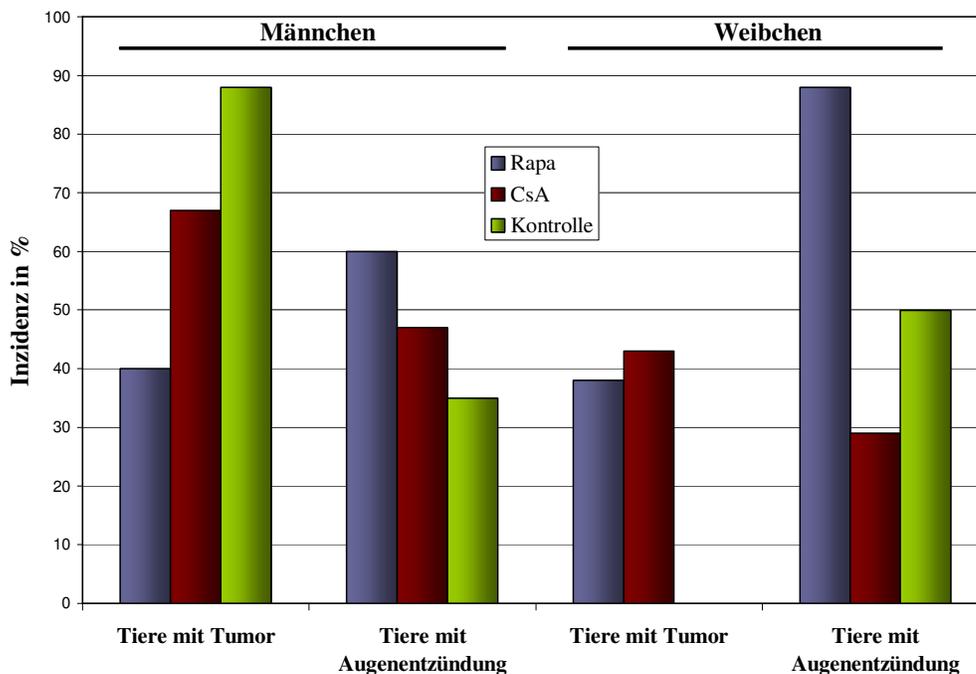


Abb. 29: Die Tabelle gibt die Anzahl der männlichen und weiblichen Tiere in der jeweiligen Gruppe (Rapa, CsA, Kontrolle), die Anzahl der Männchen bzw. Weibchen mit Tumor bzw. Augenentzündung sowie die Inzidenz in Prozent an. Das Diagramm zeigt schematisch die unterschiedliche Verteilung der Inzidenz für das Auftreten von Tumor und Augenentzündung bei männlichen und weiblichen *Mastomys* für die Gruppen Rapa, CsA und Kontrolle.

5.3.5 Bestimmungen der Viruslast in Haarfollikeln

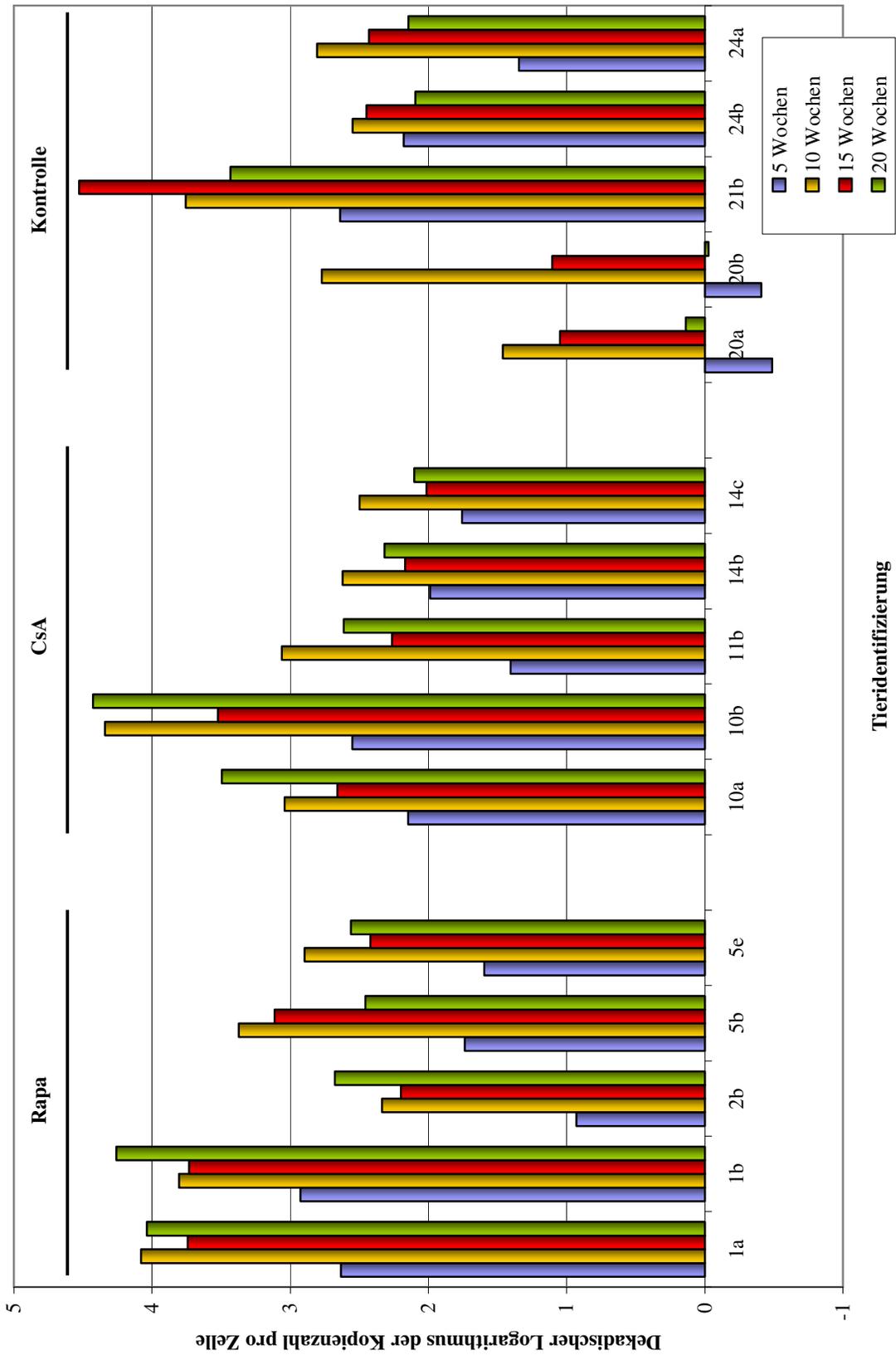
Um die Auswirkungen der Immunsuppression auf die Anzahl viraler Genomkopien pro Zelle zu untersuchen, wurde mit Hilfe von Realtime-PCR die Viruslast in von *Mastomys coucha* entnommenen Haarfollikeln ermittelt. Die Haarproben wurden jeweils fünf Tieren (drei

Männchen, zwei Weibchen) aus jeder Gruppe zu bestimmten Zeitpunkten (fünf, zehn, 15 und 20 Wochen nach Beginn der Immunsuppression) entnommen.

Folgende Tabelle zeigt jeweils die Viruslast der einzelnen Tiere zu den definierten Zeitpunkten sowie Mediane und Mittelwerte der drei Gruppen Rapa, CsA und Kontrolle (Abb. 30). Im Diagramm (siehe nächste Seite) sind die MnPV-Kopienzahlen pro Zelle der einzelnen Tiere zu den entsprechenden Zeitpunkten logarithmisch dargestellt.

Gruppe	Tier	Geschlecht	MnPV-Genome in einer Zelle			
			5 Wochen	10 Wochen	15 Wochen	20 Wochen
Rapa	1a	m	430	11.997	5527	10.904
	1b	m	843	6.366	5372	18.048
	2b	m	9	216	159	474
	5b	w	54	2.357	1299	286
	5e	w	40	789	262	364
	Median		54	2357	1299	474
	Mittelwert		275	4345	2524	6015
CsA	10a	m	140	1.096	455	3.127
	10b	m	355	21.865	3323	26.634
	11b	m	25	1.146	183	410
	14b	w	97	418	147	208
	14c	w	57	315	103	126
	Median		97	1096	183	410
	Mittelwert		135	4968	842	6101
Kontrolle	20a	m	0,33	29	11	1
	20b	m	0,39	592	13	1
	21b	m	436	5.691	33687	2.704
	24b	w	151	353	280	124
	24a	w	22	639	270	139
	Median		22	592	270	124
	Mittelwert		122	1461	6852	594

Abb. 30: Mittels Realtime-PCR wurde die Viruslast in Haarfollikeln bestimmt. Der Tabelle sind die Anzahl der MnPV-Genome pro Zelle, der untersuchten Tiere sowie Mediane und Mittelwerte der einzelnen Gruppen zu entnehmen. Die Entnahme der Haarproben erfolgte jeweils fünf, zehn, 15 und 20 Wochen nach Beginn der Immunsuppression. Im Diagramm (siehe nächste Seite) sind die Viruslasten der einzelnen Tiere jeweils zum definierten Zeitpunkt mittels dekadischem Logarithmus dargestellt. Die Zeitpunkte der Haarproben-Analysen sind farblich unterschiedlich hervorgehoben: Fünf (blau), zehn (gelb), 15 (rot), 20 (grün) Wochen; die zeitliche Angabe bezieht sich auf Wochen nach Beginn der Immunsuppression. Die technische Durchführung der Untersuchungen erfolgte durch Anja Köhler, Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Charité Berlin.



Tieridentifizierung

Bei der ersten Bestimmung der Viruslast fünf Wochen nach Beginn der Immunsuppression lag diese bei allen drei Gruppen unter 1000 Kopien pro Zelle. Zehn Wochen nach Versuchsbeginn waren die Viruskopienzahlen ausnahmslos bei allen Tieren stark angestiegen, wobei bei den immunsupprimierten Tieren höhere Werte festzustellen waren als in der Kontrollgruppe. Bei der dritten Bestimmung (15 Wochen nach Immunsuppression) waren die Werte in der Rapa- und CsA-Gruppe im Vergleich zur vorherigen Messung stark zurückgegangen. Bei den Kontrolltieren war ein leichter Rückgang der Viruslast zu erkennen, jedoch mit der Ausnahme eines Tieres (21b), welches einen sehr hohen Wert zeigte. Die letzte Bestimmung fand 20 Wochen nach Beginn der Immunsuppression statt. Die Viruslast der immunsupprimierten Tiere war im Vergleich zur vorherigen Messung stark angestiegen, die der Kontrolltiere deutlich zurückgegangen.

Die Viruslast pro Zelle zeigte in den einzelnen Gruppen eine große Schwankungsbreite, wobei insbesondere die Werte in der Kontrollgruppe stark variierten. Die Unterschiede zwischen den beiden immunsupprimierten Gruppen waren gering. Insgesamt war unter Immunsuppression im Vergleich zur Kontrollgruppe eine höhere Viruslast festzustellen. Außerdem lag die Anzahl der Viruskopien pro Zelle bei der letzten Bestimmung über den bei der ersten Bestimmung ermittelten Werten, wobei unter Immunsuppression ein deutlich größerer Anstieg festzustellen war als unter den Kontrolltieren. Diese Unterschiede konnten statistisch jedoch nicht als signifikant gewertet werden.

6 Diskussion

6.1 *Mastomys coucha* - ein Tiermodell für die Papillomvirus-induzierte Hautkarzinogenese

Obwohl das Tiermodell *Mastomys coucha* schon seit über 30 Jahren existiert, sind insbesondere im Hinblick auf die latente Infektion mit dem spezies-spezifischen *Mastomys natalensis* Papillomvirus (MnPV) der Kolonie am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) noch zahlreiche Fragen offen. Aufgrund dieser MnPV-Infektion entwickelt ein Großteil der Tiere spontan gutartige Hauttumore (Müller und Gissmann, 1978; Amtmann *et al.*, 1984), die als Papillome und Keratoakanthome diagnostiziert wurden (Burtscher *et al.*, 1973). Diese Vorhersehbarkeit der Tumorentwicklung macht *Mastomys coucha* zu einem einzigartigen Tiermodell zur Untersuchung der Papillomvirus (PV)-induzierten Hautkarzinogenese. Da diese insbesondere bei immunsupprimierten Menschen von Bedeutung ist, wird durch Induktion einer Immunsuppression bei *Mastomys* eine vergleichbare Situation geschaffen.

Bei Beobachtung der *Mastomys*-Kolonie fiel ein unterschiedliches Verhalten von männlichen und weiblichen Tieren im Hinblick auf soziale Verträglichkeit auf. Nach dem Absetzen vom Muttertier im Alter von vier Wochen werden die Tiere nach Geschlechtern getrennt in kleinen Gruppen gehalten. Sie verbleiben somit in Gesellschaft ihrer gleichgeschlechtlichen Wurfgeschwister. Bei Erreichen der Geschlechtsreife finden unter den Männchen jedoch häufig Rankämpfe statt, bei denen sie sich gegenseitig Bissverletzungen und Kratzwunden zufügen. Im Vergleich dazu blieben diese Verletzungen in Gruppen weiblicher Tiere sowie bei Paarbildungen zur Weiterzucht aus. Weibchen können sogar in Gruppen bis zu fünf Tieren gemeinsam gehalten werden.

Bereits bei jungen Tieren konnte mittels PCR MnPV nachgewiesen werden, was für eine frühe Infektion mit dem Virus spricht. Da bis auf wenige Ausnahmen alle im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Tiere für MnPV positiv waren, ist von einer Durchseuchung des gesamten Bestandes auszugehen. Hinsichtlich des Infektionsstatus mit MnPV waren keine Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Tieren zu beobachten.

Bei Betrachtung der Häufigkeit von Tumoren waren hingegen deutliche geschlechtsspezifische Unterschiede festzustellen. So wiesen Männchen eine wesentlich höhere Tumorzinzidenz als ihre weiblichen Artgenossen auf. Diese ist wahrscheinlich auf das unterschiedliche Sozialverhalten zurückzuführen. Wie bereits erwähnt, werden unter *Mastomys*-Böcken Rankämpfe vollzogen, die mehrfach zu gegenseitigen Biss- und Kratzwunden führen.

Diese Mikroläsionen der Haut sind wiederum eine Eintrittspforte für MnPV. Ein wiederholtes Auftreten von Läsionen führt zu einer gesteigerten Proliferationsrate, was die Vermehrung Papillomvirus-infizierter Zellen begünstigt (Doorbar, 2006). Es konnte bereits gezeigt werden, dass chronische mechanische Hautirritationen die Tumorzinzidenz steigern (Siegmund *et al.*, 1991). Zur Manifestation dieser Aussage wurden fünf *Mastomys*-Böcke herangezogen, die seit dem Absetzen vom Muttertier im Alter von vier Wochen einzeln gehalten wurden und somit keinen Kratz- und Bissverletzungen durch ihre Käfiggenossen ausgesetzt waren. Es erfolgte einmalig das Setzen von Mikroläsionen mit einem Skalpell in Narkose. Während des gesamten Beobachtungszeitraums von elf Monaten zeigte keines der Tiere das Auftreten einer Hautläsion, obwohl das Alter der Tiere bei Beobachtungsende zwischen 14 und 21 Monaten betrug und damit über dem durchschnittlichen Alter bei Tumorentwicklung lag. Bei allen fünf Tieren konnte MnPV-DNS mittels PCR in entnommenen Hautproben nachgewiesen werden (siehe Abb. 10). Da Tumorentwicklung ausblieb, ist von einer latenten Infektion auszugehen. Aus diesen Ergebnissen konnte geschlossen werden, dass eine einmalige Mikroläsion trotz bestehender MnPV-Infektion nicht zur Tumorentwicklung ausreicht, sondern dass wiederholte Hautirritationen als zur Tumorentstehung notwendige Kofaktoren anzusehen sind.

Da die bisherigen Angaben über Tumorzinzidenzen bei *Mastomys* nur auf Schätzungen beruhten, wurde zur Ermittlung konkreter Zahlen ein Kollektiv von 22 Tieren über ein Jahr lang beobachtet. Anhand dessen wurde die bisherige Annahme bestätigt, dass die Tumorzinzidenz mit steigendem Alter zunimmt (siehe Abb. 12). Da man bei *Mastomys* in der Labortierhaltung von einer durchschnittlichen Lebenserwartung von zwei Jahren ausgehen kann, darf man aufgrund unserer Beobachtungen annehmen, dass mehr als die Hälfte der Tiere Tumore entwickelt.

Unter Berücksichtigung der Geschlechter zeigten die Tumorzinzidenzen bei männlichen und weiblichen Tieren maßgebliche Unterschiede. Dies bestätigte wiederum bisherige Beobachtungen erhöhten Tumorauftritts bei *Mastomys*-Männchen im Vergleich zu weiblichen Artgenossen.

6.1.1 Lokalisation von Tumoren

Tumore traten sowohl an behaarter Haut als auch an Haut-Schleimhaut-Übergängen auf (siehe Abb. 8 und 9). Die Läsionen unterschieden sich phänotypisch voneinander, wobei diejenigen, die in behaarter Haut lokalisiert waren, eine Keratoakanthom-artige Ausprägung zeigten, während die an Haut-Schleimhaut-Übergängen ein warzenartiges Aussehen und eine

weiche Oberfläche besaßen. Diese waren beispielsweise am Augenlid, am Mund sowie im Anogenitalbereich vorzufinden (siehe Abb. 8, 9 und 11).

Neu war die Feststellung von Hautläsionen im Anogenitalbereich bei *Mastomys*. Die warzenähnlichen Tumore waren an After, am Präputium und an der Vulva zu finden und erinnerten in Aussehen und Lokalisation sehr an die beim Menschen im Anogenitalbereich auftretenden *Condylomata acuminata*. Phänotypisch unterschieden sie sich dadurch sehr von den stark keratinisierten Hautläsionen, die als Papillome bzw. Keratoakanthome zu bezeichnen waren. Eine Gemeinsamkeit war jedoch bei allen Hautläsionen unseres Tiermodells festzustellen: Bei *Mastomys* konnte niemals eine spontane Regression der Hauttumore beobachtet werden, sondern sie zeichneten sich durch ein stetiges Wachstum aus. PV-induzierte Hautläsionen beim Menschen zeigen im Gegensatz dazu häufig Spontanregressionen (Akgül *et al.*, 2006). Darüber hinaus wurde häufig die Neubildung weiterer Hautläsionen bei einem bereits tumortragenden Tier festgestellt.

Wie bereits erwähnt, waren die PCR- und Southern Blot-Analysen von Haut und Tumoren in den meisten Fällen positiv für MnPV. Eine der wenigen Ausnahmen stellte Tier #33 dar, bei dem weder in den inneren Organen noch in der Haut sowie dem Kondylom MnPV-DNS mittels PCR nachweisbar war (siehe Abb. 14). Aufgrund dieses überraschenden Ergebnisses wurden weitere Untersuchungen angestellt, die letztendlich zur Entdeckung eines neuen Virus führten (Nafz *et al.*, 2007). Das neu entdeckte Virus wurde *Mastomys coucha* PV2 (McPV2) genannt, da mittlerweile klar ist, dass die Tiere der Kolonie am DKFZ dem Genus *Mastomys coucha* angehören. Es stellte sich heraus, dass MnPV und McPV2 nicht einer gemeinsamen Untergruppe zuzuordnen sind, sondern McPV2 phylogenetisch eine enge Verwandtschaft zum PV des Hamsters („Hamster oral papilloma virus“=HaOPV) aufweist (siehe Abb. 1).

Systematische Analysen der Verteilung von MnPV und McPV2 zeigten in vielen Geweben eine inverse Korrelation positiver Ergebnisse, wobei in inneren Organen die Präsenz von MnPV vorherrschte (Nafz *et al.*, 2007). In Haut- und Tumorproben wurden häufig beide Viren angetroffen (Nafz *et al.*, 2007). Darüber hinaus wurde in weiteren Untersuchungen gezeigt, dass McPV2 besonders häufig in Hautläsionen des Anogenitalbereichs vertreten war (Schäfer, 2006). Desweiteren konnte McPV2 in einem Großteil der warzenähnlichen Läsionen an der Zungenunterseite nachgewiesen werden (Kai Schäfer, persönliche Mitteilung).

Die Entdeckung eines zweiten Virus im Wirt *Mastomys* lässt vermuten, dass Nagetiere zahlreiche PV beherbergen, die bislang unentdeckt sind. Auch beim Hunde-PV wurden kürzlich neue Virustypen isoliert (Zaugg *et al.*, 2005). Mit Hilfe modernster Labortechniken werden

mehr und mehr PV und PV-Typen in bereits bekannten Wirten bzw. darüber hinaus in neuen Wirtssystemen entdeckt (Antonsson und Hansson, 2002).

6.1.2 Übertragungswege von MnPV

Es ist bereits bekannt, dass PV über Mikroläsionen der Haut die Basalzellen des Epithels infizieren (Schmitt *et al.*, 1996; Bouwes Bavinck *et al.*, 2001). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass Viruspartikel in den Epithelschichten vorkommen (siehe Abb. 25). Diese werden beim Ablösen der Zellen freigesetzt und gelangen somit in die Umwelt. Eine Verbreitung der viralen Partikel in der Umgebung über Staub ist denkbar. HPV-DNS ist z.B. auf vielen Oberflächen häufig berührter Gegenstände nachweisbar (Antonsson *et al.*, 2003).

Der Übertragungsweg von MnPV ist bislang ungeklärt. Da bereits bei jungen Tieren (jünger als ein Monat) MnPV nachzuweisen war, ist von einer frühen Infektion mit dem Virus auszugehen. Eine horizontale Übertragung durch engen Kontakt von Tier zu Tier oder durch die Umwelt wie beispielsweise über Staub ist möglich. Auch eine vertikale Weitergabe von MnPV während der Embryonal- oder Fötalentwicklung bzw. mit der Muttermilch ist denkbar. Anhand der Untersuchungen von Muttertieren, deren Föten bzw. Neonaten sowie Plazenten (siehe Abb. 21) ist eine vertikale Übertragung von MnPV bereits im Muttertier bzw. während der Geburt auszuschließen. Vielmehr könnte man eine postnatale Infektion mit MnPV durch die körperliche Nähe zum Muttertier sowie intensive Pflege wie Belecken der Haut des Neugeborenen und Säugen vermuten. Analog zu dieser Annahme wurde in einer humanmedizinischen Studie gezeigt, dass die Ansteckung von Säuglingen mit humanen PV (HPV) kurz nach der Geburt erfolgt (Antonsson *et al.*, 2003). Die meisten der auf der Haut der Neugeborenen gefundenen HPV-Typen stimmen mit denen der Mutter überein, wohingegen weitere, in der Umwelt des Kindes festgestellte HPV-Typen nicht in den Proben des Säuglings nachweisbar waren (Antonsson *et al.*, 2003). Ein früher Kontakt mit MnPV ist also zu vermuten, wie auch beim sogenannten „Mouse mammary tumour virus“ (MMTV), bei dem die Übertragung durch Säugen beschrieben wurde (Luther und Acha-Orbea, 1997). Bislang wurde jedoch nicht untersucht, ob auch eine laktogene Übertragung von MnPV möglich ist.

6.1.3 Ausbreitung von MnPV im Organismus

Die Untersuchung der Verbreitung von MnPV im Wirtsorganismus war eines der Hauptaugenmerke dieser Arbeit. Frühere Studien am Tiermodell haben bereits gezeigt, dass MnPV nicht nur in der Haut oder Hautläsionen nachweisbar ist, sondern auch in anderen

Organen, wie z.B. in Lunge, Nieren und Verdauungstrakt (Wayß *et al.*, 1981; Amtmann *et al.*, 1984). MnPV-DNS war mittels PCR und Southern Blot in allen untersuchten Hautläsionen sowie in einem Großteil der Hautproben tumortragender Tiere nachweisbar, obwohl die Haut äußerlich unverändert erschien. Es wurden Hautproben unterschiedlicher Lokalisationen (Ohr, Rücken und Nacken) untersucht, um zu klären, ob das Virus nur lokal oder in der gesamten Haut nachweisbar ist. In den meisten Fällen waren die Hautproben übereinstimmend positiv (siehe Abb. 19), so daß eine lokale Infektion nicht anzunehmen ist. Vielmehr spricht der MnPV-Nachweis in unterschiedlichen Hautpartien für eine Ausbreitung des Virus über die gesamte Haut.

Darüber hinaus war der Nachweis von MnPV-DNS in allen untersuchten inneren Organen möglich, jedoch waren unterschiedliche Häufigkeiten festzustellen (siehe Abb. 18, 19 und 20). Die Inzidenzen für MnPV im Southern Blot lagen unter denen der PCR, wie aufgrund der höheren Sensitivität der PCR-Methode zu erwarten war. Das Verteilungsmuster der beiden Untersuchungsmethoden stimmte jedoch überein. Falsch-positive Ergebnisse aufgrund verschleppter Virus-DNS bei der Sektion können durch äußerst vorsichtiges Vorgehen während der Probenentnahme und -weiterbearbeitung ausgeschlossen werden (siehe Methoden Kap. 4.1.10, 4.2.1).

PV infizieren in erster Linie kutanes und mukosales Epithelgewebe. Jedoch sind auch innere Organe mit Epithelien bedeckt, was den Nachweis der MnPV-DNS hier erklären könnte. Transkripte waren hingegen in keinem der inneren Organe nachweisbar (Julia Nafz, persönliche Mitteilung). Das weist darauf hin, dass der virale Lebenszyklus bei Infektion dieser Organe unvollendet bleibt, da die Virusreplikation der PV auf die Differenzierung der Epithelzellen angewiesen ist (Favre *et al.*, 1977).

Es sollte geklärt werden, ob analog der Situation beim Gebärmutterhalskrebs, bei dem häufig eine Integration der DNS der HPV-Hochrisikotypen ins Wirtzellgenom erfolgt (Münger und Howley, 2002), auch die MnPV-DNS ins Zellgenom integriert wird. Bei keiner der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen war jedoch eine Integration der MnPV-DNS in das Genom der Wirtszelle festzustellen, sondern das MnPV-Genom persistiert episomal (siehe Abb. 17).

Eines der inneren Organe mit der größten Inzidenz für MnPV (siehe Abb. 15 und Abb. 18) war der Magen bzw. dessen Vormagenanteil. Dieser war auch das einzige innere Organ, in dem der MnPV-Nachweis mittels *in situ*-Hybridisierung gelang (siehe Abb. 24). Die viralen Partikel wurden möglicherweise mit der Nahrung aufgenommen bzw. durch die bei Nagern übliche Fellpflege abgeleckt. Bereits vor 50 Jahren wurde das Auftreten von Magentumoren in der

Mastomys-Kolonie in Gießen beschrieben (Oettlé, 1957). In der DKFZ-Kolonie, die von den Tieren in Gießen abstammt, konnte jedoch niemals ein Fall eines Magentumors beobachtet werden. Daher wird vermutet, dass neben der PV-Infektion weitere Faktoren zur Krebsentstehung im Magen der Tiere in Gießen beigetragen haben, wie z.B. eine bestimmte Zusammensetzung des Futters. Ein Beispiel für Krebsentstehung, die auf der Kombination einer PV-Infektion sowie dem Einfluss der Nahrung beruht, liefern BPV-infizierte Rinder, die bei der Aufnahme von Adlerfarn durch dessen immunsuppressive und karzinogene Inhaltsstoffe Karzinome im Digestionstrakt entwickeln (Campo und Jarrett, 1986).

Auch in der Zunge konnte MnPV festgestellt werden (siehe Abb. 18). Teilweise waren warzenähnliche Veränderungen an der Zungenunterseite festzustellen. PV-Infektionen der oralen Schleimhaut sowie dadurch induzierte Läsionen wurden auch bei anderen Tierarten beschrieben. Das bekannteste Beispiel dafür ist wohl COPV, das bei jungen Hunden zur Bildung von Papillomen im Rachenbereich und in der Mundschleimhaut führt. Zudem wurden aus den Läsionen an den Zungen bzw. Lippen einiger Großkatzen spezies-spezifische PV-Typen isoliert (Rector *et al.*, 2007).

Zur Infektion der Lungen könnte es hingegen durch aerogene Aufnahme von Viruspartikeln gekommen sein. Auch beim Menschen sind Papillome im Respirationstrakt bekannt. Die durch die HPV-Typen 6 und 11 hervorgerufenen Läsionen treten insbesondere bei Kindern auf (Clifford *et al.*, 2003; Howley und Lowy, 2007). Besonders häufig handelt es sich um Kehlkopfpapillome, die aufgrund ihrer Lokalisation im Respirationstrakt gefährlich werden können, jedoch weniger durch das geringe Risiko maligner Entartung. Obwohl der Infektionsweg bislang unklar ist, vermutet man eine vertikale Ansteckung während der Geburt (Syrjanen und Puranen, 2000).

Der Weg der Verbreitung von MnPV innerhalb des Organismus ist noch nicht geklärt. Ein hämatogener Infektionsweg ist möglich, da MnPV auch im Blut nachweisbar war (siehe Abb. 15 und 16). Bei HPV-Infektionen existiert jedoch keine virämische Phase und man geht nicht von einer Verbreitung des Virus über das Blut aus. Außerdem wurde bei unseren Untersuchungen festgestellt, dass bei Tieren, deren Herz MnPV positiv war, nicht zwangsläufig auch im Blut MnPV-DNS nachweisbar war (siehe Abb. 16). Das bedeutet, das Herz war tatsächlich mit MnPV infiziert und das Signal war nicht auf im Herzen verbliebene Blutreste zurückzuführen.

Die Virusausbreitung könnte auch über das lymphatische System erfolgen. Sowohl in Milzgewebe als auch in einigen untersuchten Lymphknoten war MnPV nachweisbar. Somit

könnten die Viruspartikel sowohl über den hämatogenen als auch über den lymphogenen Infektionsweg im Organismus verbreitet worden sein.

Offen bleibt jedoch die Frage, wie MnPV ins Gehirn gelangte. Bislang war der Nachweis eines PV im Gehirn nicht beschrieben worden. Ob MnPV in der Lage ist, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren, ist unklar. Nur sehr wenigen Viren gelingt es, diese Barriere zu überwinden. In der Humanmedizin sind die neurotrophen DNS-Viren JC (Khalili *et al.*, 2006) und BK (White *et al.*, 2005) bekannt, die bei immunsupprimierten Patienten Myelinproduzierende Oligodendrozyten infizieren und degenerative Enzephalitiden auslösen. Die klinische Relevanz der Präsenz von MnPV im Gehirn ist jedoch ungewiss. MnPV war mit Hilfe von PCR und Southern Blot im Gehirn zu detektieren, jedoch war bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *in situ*-Hybridisierungen kein Nachweis von MnPV im Gehirn möglich. Trotz deutlich positiven Signals der entsprechenden Probe im Southern Blot (siehe Abb. 17) lag die Kopienzahl von MnPV vermutlich unterhalb der Detektionsgrenze der verwendeten Methode. Mit Anwendung einer modifizierten Art der *in situ*-Hybridisierung mit höherer Sensitivität wäre sicherlich ein Nachweis von MnPV im Gehirn und anderen, in PCR- und Southern Blot positiv getesteten Organen möglich. Derzeit laufende Studien beschäftigen sich damit, eine sensitivere Methode zu etablieren sowie die Art infizierter Zellen durch Immunhistochemie zu bestimmen.

Das Detektionslimit bei der von uns angewandten Art der *in situ*-Hybridisierung bzw. eine geringere Kopienzahl des Virusgenoms in unauffälliger Haut im Vergleich zu Tumorgewebe könnte erklären, weshalb in einigen Fällen ein MnPV-Nachweis per *in situ*-Hybridisierung in Haut gelang, in anderen Fällen jedoch nicht (siehe Abb. 23). In Tumorgewebe, wo eine höhere Kopienanzahl die Wahrscheinlichkeit für einen positiven Nachweis erhöht, waren MnPV-positive Zellen hauptsächlich im *Stratum spinosum* und *Stratum granulosum* vorzufinden (siehe Abb. 22). Aufgrund der starken Proliferation in Tumoren, die in unauffälliger Haut nicht vorhanden ist, sind die unterschiedlichen Schichten der Epidermis erkennbar und somit MnPV-positive Zellen lokalisierbar. Die diffuse Verteilung der Rotfärbung im gesamten Zellkern lässt auf ein episomales Vorliegen der Virus-DNS schließen, die auch im Southern Blot bestätigt wurde. Bei Integration ins Wirtszellgenom wäre die Rotfärbung als punktuell Signal im Zellkern zu erwarten (Evans *et al.*, 2002).

Ähnliche Ergebnisse wie die der *in situ*-Hybridisierung lieferten die elektronenmikroskopischen Untersuchungen. Hier waren bei der Betrachtung von Tumoren virale Partikel darstellbar, die sich in kleinen Inseln im keratinisierten, ausdifferenzierten Tumorgewebe befanden (siehe Abb. 25). In unauffälliger Haut war trotz positivem Ergebnis in

PCR und Southern Blot der Nachweis viraler Partikel im Elektronenmikroskop nicht möglich. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass virale Partikel in der Haut in einer geringeren Anzahl von Zellen vorliegen als im Tumorgewebe. Außerdem könnte die zur Betrachtung im Elektronenmikroskop erforderliche Aufbereitung der Proben zum Abschilfern der abgestorbenen Zellen und somit zum Verlust der viralen Partikel geführt haben.

6.1.4 Augeninfektionen

Bei Beobachtung der Kolonie fielen bei einer großen Anzahl von Tieren Augeninfektionen auf. Diese führten in einigen Fällen aus Tierschutzgründen zur vorzeitigen Tötung der erkrankten Tiere. Insbesondere in Langzeitbeobachtungen fiel deshalb ein nicht unerheblicher Anteil der Tiere aus, da die Tötung oftmals vor Auftreten der Tumorentwicklung vorgenommen werden musste (siehe Abb. 12).

Die Augenentzündungen zeigten sich in unterschiedlicher Gestalt. Meist waren die Bindehäute und Augenlider, manchmal auch die Hornhaut von der Entzündung betroffen. Häufig war eine eitrig-eitrige Epiphora festzustellen, wodurch eine bakterielle Beteiligung an der Genese anzunehmen ist. Bei Augeninfektionen handelt es sich meist um Mischinfektionen mit bakterieller und viraler Ätiologie. Im Allgemeinen sind bei Augenentzündungen bei Tieren Bakterien wie Subspezies von Staphylokokken, Streptokokken, Corynebakterien, Neisserien, Pseudomonaden, Bacillen, Mykoplasmen, Chlamydien sowie *Escherichia coli* beteiligt (Martin, 1995). Bei den Viren, die häufig bei Augenentzündungen bei Tieren vertreten sind, handelt es sich um Herpes-, Adeno-, Calici- und Reoviren (Martin, 1995). Zu berücksichtigen sind hier jedoch tierartliche Unterschiede. Eine Beteiligung von PV an der Ätiologie der Augeninfektionen war bislang nicht beschrieben worden. Diese kann jedoch aufgrund des MnPV-Nachweises mittels PCR in den Proben von Konjunktivalabstrichen einiger Tiere vermutet werden (siehe Abb. 11).

Im Vergleich zur Tumorzinzidenz, die bei *Mastomys*-Böcken deutlich höher ist als bei weiblichen Tieren, verhält sich das Auftreten von Augeninfektionen umgekehrt. Dieses Ergebnis könnte darauf zurückzuführen sein, dass männliche Tiere aufgrund der Entwicklung von Tumoren früher verstarben bzw. getötet werden mussten. Eine längere Überlebenszeit der Weibchen aufgrund einer geringeren Tumorzinzidenz könnte somit eine Erklärung für die höhere Inzidenz für Augeninfektionen darstellen.

6.1.5 Tumorentwicklung nach Anwendung der klassischen Zwei-Stufen-Karzinogenese

Die Anwendung des Protokolls der klassischen Zwei-Stufen-Karzinogenese (siehe Methoden Kap. 4.1.9) im Tiermodell *Mastomys coucha* erfolgte mit dem Ziel einer früheren Tumorentwicklung und einer Induktion maligner Tumore. Bei behandelten Tieren konnte die Ausbildung von Hautläsionen in einem jüngeren Alter beobachtet werden als unter normalen Bedingungen, jedoch erfolgte diese nicht zu einem definierten Zeitpunkt. Bei einigen Tieren, insbesondere bei Weibchen, blieb das Auftreten von Hautläsionen komplett aus (Daten nicht gezeigt). Dies ist mit der bereits beschriebenen Geschlechtsdisposition bei der Tumorentwicklung erklärbar. Ohne wiederholte Irritation der Haut durch Mikroläsionen, die die virale Eintrittspforte in das Epithelgewebe darstellen, trat selbst mit chemischen Karzinogenen und Tumorpromotoren eine Tumorentwicklung selten auf. Ebenso blieb die Entwicklung maligner Hauttumore wie Plattenepithel- oder Basalzellkarzinome aus. Ähnliche Versuche am Tiermodell wurden bereits in der Vergangenheit durchgeführt. Gutartige Hautläsionen waren einerseits mechanisch durch chronische Hautirritationen auslösbar (Siegmund *et al.*, 1991), aber auch chemisch durch die Anwendung des auch von uns verwendeten Tumorpromotors (Wayß *et al.*, 1981). Jedoch führte nur die Kombination des Tumorpromotors mit der wiederholten Anwendung eines Karzinogens schließlich zur Entwicklung maligner Tumore (Wayß *et al.*, 1981).

In einem einzigen Fall (Tier #29) wurde ein Fibrosarkom, welches subkutan im Bereich der seitlichen Bauchwand lokalisiert war, festgestellt. Da dieser Tumor bei der PCR-Analyse für MnPV negativ war (Daten nicht gezeigt), spielten PV ätiologisch in diesem Fall eher keine Rolle, sondern es handelte sich hierbei um einen chemisch induzierten Tumor, der auf die Anwendung des Karzinogens zurückzuführen war. Dass ein Zusammenspiel viraler Onkogene mit chemischen Karzinogenen die Entstehung maligner Tumore begünstigt, konnte in unserer Arbeitsgruppe anhand eines MnPV-E6-transgenen Mausmodells gezeigt werden (Helfrich *et al.*, 2004). Eine konstitutive Expression von MnPV E6 in Kombination mit der Zwei-Stufen-Karzinogenese führte in mehr als 99% der Tiere zu Plattenepithelkarzinomem, im Vergleich zu nur 10% der nicht-transgenen Artgenossen (Helfrich *et al.*, 2004).

6.2 MnPV-induzierte Tumorentstehung unter Immunsuppression

In Anlehnung an das Auftreten HPV-induzierter Hautläsionen bei immunsupprimierten Patienten wurde eine vergleichbare Situation im Tiermodell *Mastomys coucha* geschaffen, indem bei MnPV-infizierten Tieren eine Immunsuppression induziert wurde.

Es wurde untersucht, ob die Immunsuppression zu einem frühzeitigeren Auftreten spontaner, MnPV-induzierter Hautläsionen führt als unter normalen Bedingungen. Desweiteren wurde ein Vergleich der Immunsuppressiva Cyclosporin A (CsA) und Rapamycin (Rapa) im Hinblick auf die Tumorentstehung durchgeführt.

Durch die Verabreichung der immunsuppressiven Substanzen im Futter war eine permanente Wirkstoffaufnahme und ein konstanter Wirkspiegel gegeben, der stichprobenartig kontrolliert wurde (siehe Anhang 10.3.3). Die entsprechenden Wirkstoffkonzentrationen im Futter wurden aufgrund von Vorversuchen gewählt, um wirksame Spiegel analog zu Versuchen an Mäusen zu erzielen (Köhl *et al.*, 2006), die die für Immunsuppression effektiven Wirkstoffkonzentrationen widerspiegeln (Guba *et al.*, 2005; Köhl *et al.*, 2006).

6.2.1 Ausscheiden von Tieren aus dem Versuch

Verschiedene Kriterien führten zum Ausscheiden eines Tieres aus dem Versuch (siehe Abb. 26). Bis zum Versuchsende überlebende Tiere waren hauptsächlich in der Rapa- und in der Kontrollgruppe. Die meisten spontanen Todesfälle waren unter den Kontrolltieren festzustellen, was zum Einen auf deren höherem Alter zu Versuchsbeginn sowie zum Anderen auf eine längere Überlebenszeit während des Versuchs zurückzuführen sein könnte. Aufgrund eines Tumors wurden anteilig die meisten Tiere in der Kontrollgruppe getötet, gefolgt von der CsA-Gruppe. Im Vergleich der drei Gruppen war die geringste Zahl der aufgrund eines Tumors getöteten Tiere in der Rapa-Gruppe vertreten. Augeninfektionen waren hingegen in der Rapa-Gruppe das häufigste Ausscheidungskriterium, gefolgt von CsA. Ein schlechter Allgemeinzustand war hauptsächlich unter CsA ein Grund zur Tötung. Tiere der Kontroll- und Rapa-Gruppe waren hingegen hinsichtlich eines schlechten Allgemeinzustands nicht auffallend.

Beim Vergleich der beiden Immunsuppressiva untereinander lässt sich sagen, dass unter CsA mehr Tiere aufgrund eines Tumors oder eines schlechten Allgemeinzustands getötet wurden als unter Rapa. Aufgrund von Augeninfektionen wurden hingegen deutlich mehr Tiere der Rapa-Gruppe getötet als unter CsA, wobei jedoch die Überlebensrate bis zum Versuchsende in der Rapa-Gruppe deutlich höher war als unter CsA. Die hohe Zahl von Augeninfektionen unter Rapa ist somit auch auf deren lange Überlebenszeit während des Experiments zurückzuführen. Generell wurde das Auftreten der Augeninfektionen sicherlich durch die Immunsuppression begünstigt, was sich auch durch den geringeren Anteil der Augenentzündungen in der Kontrollgruppe erklären ließ, wobei diese auch, wie schon beschrieben, in der gesamten Kolonie eine Rolle spielen.

6.2.2 Zeitpunkt des Auftretens erster Tumore

Unerwartet war das beobachtete Auftreten der ersten Tumore nur wenige Wochen nach Versuchsbeginn in der Kontrollgruppe, wobei es sich bei den Tumorträgern um drei männliche Wurfgeschwister handelte. Das Auftreten weiterer Tumore wurde in der CsA-Gruppe beobachtet. Der erste Tumor in der Rapa-Gruppe trat zwölf Wochen später als in der CsA-Gruppe auf. Allerdings sind die mittels Log-Rang-Test ermittelten Unterschiede nicht als signifikant zu werten ($p=0,5$).

Ein so frühes Auftreten von Tumoren in der Kontrollgruppe wurde nicht erwartet. Das Alter der Geschwistertiere betrug bei der Tumorentstehung 31 bzw. 32 Wochen und lag somit unter dem geschätzten Durchschnittsalter bei der Spontanentwicklung von Hauttumoren von ca. zehn Monaten. Beim Vergleich mit vorhergehenden Beobachtungen der *Mastomys*-Kolonie könnte es sich hierbei um eine Ausnahmesituation handeln. Die frühe Tumorentwicklung der Geschwister könnte möglicherweise auf einer familiären Prädisposition basieren. Andere denkbare Möglichkeiten, die eine frühzeitige Tumorentwicklung begünstigt haben könnten, wären eine frühe Infektion in Kombination mit chronischer Hautirritation durch Bissverletzungen.

6.2.3 Vergleich der Tumorinzidenzen in den Gruppen Rapa, CsA und Kontrolle

Bei Vergleich der Tumorinzidenzen von 59% in der CsA-Gruppe und 39% in der Rapa-Gruppe wurde eine geringere Tumorwahrscheinlichkeit bei Verwendung von Rapa im Vergleich zu CsA bestätigt, wie auch durch Vorversuche gezeigt worden war (siehe 27 und 28). Unerwartet war hingegen die hohe Tumorinzidenz von 60% bei den Kontrolltieren.

Da hinsichtlich der Tumorinzidenz maßgebliche Unterschiede unter den Geschlechtern existieren, wurden die Tumorinzidenzen der einzelnen Gruppen unter diesen Kriterien erneut betrachtet (siehe Abb. 29). Diese betrug bei den Männchen der CsA-Gruppe 67%, bei denen der Rapa-Gruppe 40% und unter den männlichen Kontrolltieren 88%. Diese Werte verhalten sich proportional zu denen der Gesamtgruppe, da es sich bei der Mehrheit der tumortragenden Tiere um Männchen handelt.

Die bei den weiblichen Tieren ermittelten Tumorinzidenzen von 43% unter CsA und 38% unter Rapa wiesen hingegen geringere Unterschiede auf als bei den männlichen Artgenossen. Da kein weibliches Kontrolltier einen Tumor entwickelte, betrug hier die Inzidenz 0%. Somit lässt sich sagen, dass bei Weibchen die Immunsuppression zu einer erheblich stärkeren Tumorentwicklung führte als unter normalen Bedingungen.

Bei diesen Auswertungen wurden bewusst nur die Kriterien „Zeitpunkt des Auftretens des ersten Tumors bzw. Tumorinzidenz“ betrachtet. Unberücksichtigt blieb die Anzahl der Tumore pro Tier, da bereits bekannt war, dass es sich selten um einzeln, sondern meist multipel auftretende Hautläsionen handelt. Weiterhin wurde den Tumorgrößen bzw. dem Wachstum der Tumore keine Beachtung geschenkt, da es sich bei dem Tiermodell nicht um genetisch identische Tiere handelt. Ein Vergleich von Tumorgrößen bzw. –wachstum ist aufgrund der unterschiedlichen genetischen Hintergründe daher nicht möglich.

Anhand dieser Ergebnisse kann eine tumorhemmende Wirkung bzw. eine verzögerte Tumorentwicklung unter Rapa im Vergleich zu CsA bestätigt werden (siehe Abb. 27). Allerdings ist zu berücksichtigen, dass die statistischen Auswertungen keine signifikanten Unterschiede ergaben. Die hier ermittelten Ergebnisse verhalten sich somit mit vorausgegangen Tierversuchen konform, in denen unter Rapa sowohl die Vaskularisierung, das Tumorwachstum als auch die Metastasenbildung in einem geringeren Ausmaß im Vergleich zu CsA festzustellen waren (Guba *et al.*, 2002). Mit der anti-angiogenen (Guba *et al.*, 2002), anti-proliferativen (Bjornsti und Houghton, 2004) und anti-metastasierenden (Luan *et al.*, 2002) Wirkungsweise von Rapa ist mit seinem Einsatz zur Induktion einer Immunsuppression davon auszugehen, dass die Krebsentstehung auch bei langfristiger Verabreichung kontrollierbar wird.

6.2.4 Interpretation der Viruslast-Analyse

Um zu untersuchen, ob die Immunsuppression zu einer erhöhten Virus-Kopienzahl pro Zelle führt, wurde mittels quantitativer Polymerase-Ketten-Reaktion (Realtime-PCR) eine Bestimmung der Viruslast durchgeführt. Analog zur HPV-Typisierung beim Menschen (Meyer *et al.*, 2001) wurde als möglichst wenig invasive Methode eine Haarprobenentnahme zur Untersuchung der Haarfollikel-DNS gewählt und der chirurgischen Entnahme von Hautproben vorgezogen.

Bei Beurteilung der Ergebnisse der Viruslastbestimmung fiel in den einzelnen Gruppen eine große Schwankungsbreite auf, die sich jedoch besonders stark in der Kontrollgruppe zeigte (siehe Abb. 30). Es wurden jeweils fünf, zehn, 15 und 20 Wochen nach Beginn der Immunsuppression Bestimmungen der Viruslast in Haarfollikeln der Tiere durchgeführt. Zwischen den ersten beiden Bestimmungen war ein deutlicher Anstieg der Viruskopien pro Zelle erkennbar, der jedoch zwischen zweiter und dritter Bestimmung wieder abfiel. Die späteren Bestimmungen führten zu einem erneuten Anstieg. Insgesamt war unter Immunsuppression im Vergleich zur Kontrollgruppe grundsätzlich eine höhere Viruslast festzustellen, obwohl die Kontrolltiere älter als die immunsupprimierten Tiere waren. Diese

Unterschiede waren jedoch statistisch nicht als signifikant zu werten. Interessant ist ein Vergleich mit Untersuchungen der Viruslast in Haarfollikeln bei immunsupprimierten Menschen. Hier zeigt sich ein analoger Verlauf mit einer nach Beginn der Immunsuppression höheren Viruslast, die dann zwischenzeitlich abfällt und bei späteren Bestimmungen wieder ansteigt (Anja Köhler, Charité Berlin, persönliche Mitteilung).

6.2.5 Anwendung des Immune-Response-Modifiers Imiquimod

Wie einleitend erwähnt (siehe Einleitung Kap. 2.10.3), war die Anwendung des sogenannten Immune-Response-Modifiers Imiquimod bereits bei der Behandlung HPV-induzierter Genitalwarzen erfolgreich und wird mittlerweile auch zur Therapie von Basalzellkarzinomen eingesetzt (Beutner *et al.*, 1999a; Beutner *et al.*, 1999b). In unserer Arbeitsgruppe wurde die topische Anwendung von Imiquimod („Aldara“, 5%ige Creme, Fa. 3M) an Tumoren am Tiermodell *Mastomys coucha* untersucht. Die Wirkung von Imiquimod beruht auf der Induktion einer lokalen Immunantwort (siehe Einleitung Kap. 2.10.3). An unserem Tiermodell erfolgte die Anwendung von Imiquimod sowohl an spontan entwickelten als auch an chemisch induzierten Tumoren (siehe Methoden Kap. 4.1.9). Die Behandlung war nur zum Teil von Erfolg, wobei auffallend war, dass die chemisch induzierten Tumore eine bessere Reaktion zeigten als spontane (Nafz, 2006). Problematisch war beispielsweise die stark keratinisierte Oberfläche der Tumore, wodurch möglicherweise der Wirkstoff nicht komplett absorbiert wurde. Außerdem war bei den Tieren nicht zu verhindern, dass sie sich die Creme von den behandelten Stellen wieder ableckten. Mehr als die Hälfte der chemisch induzierten Tumore reagierten durch verlangsamtes Wachstum (im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren), einige zeigten sogar eine Komplettregression (Nafz, 2006). Auch bei spontan entwickelten Tumoren konnte das Tumorwachstum verlangsamt werden, Regression wurde jedoch extrem selten beobachtet (Nafz, 2006). Hier tat sich hingegen durch Hervorschießen weiterer, neuer Tumore ein Problem auf (Nafz, 2006). Das spontane Auftreten von Tumoren basiert vermutlich auf dem Verlust der Kontrolle des Immunsystems über die Virusinfektion, die möglicherweise auf eine Immuntoleranz gegenüber dem Virus zurückzuführen ist (Stanley, 2006). Bei chemisch induzierten Tumoren kann hingegen die Anwendung des Immune-Response-Modifiers zu einer effizienten lokalen Reaktion führen, wodurch die dabei beteiligten Zytokine die durch das Karzinogen geschädigten Zellen erkennen und eliminieren können. Darüber hinaus kommen für das bessere Ansprechen chemisch induzierter Tumore auf die Behandlung weitere Erklärungen wie das jüngere Alter der Tiere sowie eine kleinere Tumorgöße bei Behandlungsbeginn in Betracht (Nafz, 2006).

6.3 Die Latenz der Papillomvirus-Infektion

Entscheidend für eine antivirale Immunantwort ist das Erkennen von Antigenen durch immunologische Überwachungsmechanismen. Eine Persistenz infizierter Zellen wird durch eine niedrige Expressionsrate früher Gene während einer natürlichen Infektion und die geringe Oberflächenpräsentation gegenüber dem Immunsystem begünstigt (Stanley, 2006). Im Gegensatz zu den nur wenig immunogenen frühen Proteinen lösen die Kapsidproteine (L1 und L2) eine starke Immunantwort aus. Da diese Proteine jedoch erst in den ausdifferenzierten Epithelschichten (*Stratum spinosum* und *granulosum*) gebildet werden, kommt es zu keinem Kontakt mit den Antigen-präsentierenden Zellen der Haut (Carter und Galloway, 1997). Virionen, die eine Immunantwort hervorrufen, werden erst durch die Exfoliation terminal differenzierter, abgestorbener Epithelzellen an der Oberfläche der Epidermis freigesetzt. Im Gegensatz zu lytischen Viren, die aktiv ihre Wirtszellen zerstören, induzieren PV daher kein Entzündungssignal (Stanley, 2006).

In den meisten Fällen genitaler HPV wird eine Infektion symptomlos durchlaufen, und es gelingt dem Immunsystem, mit einer effektiven Antwort das Virus zu eliminieren. Häufig erfolgt die Bildung neutralisierender Antikörper. Latente HPV-Infektionen werden hauptsächlich bei Immunsupprimierten beobachtet, was bei einem Vergleich zu immunkompetenten Patienten vermuten lässt, dass die zellvermittelte Immunantwort von großer Bedeutung ist, um die HPV-Infektion zu kontrollieren (Stanley, 2006). Ebenso haben Immunsupprimierte auch ein erhöhtes Risiko für eine maligne Entartung (Stanley, 2006).

6.4 Ausblick

Ähnlich zur Situation beim Menschen sind wahrscheinlich auch die Latenz und Persistenz der MnPV-Infektion in unserer *Mastomys*-Kolonie auf eine unzureichende Immunantwort zurückzuführen. Derzeit laufen weitere Studien zur Untersuchung der Immunantwort gegenüber der PV-Infektion, um die Frage zu klären, weshalb der Organismus nicht in der Lage ist, die Infektion erfolgreich zu überwinden, sondern die Latenz der Viren toleriert. Es wurde bereits ein auf dem Strukturprotein L1 basierender ELISA etabliert, um die Antikörper-Titer der Tiere zu ermitteln. Hiermit wurde festgestellt, dass alle tumortragenden Tiere und auch einige Tiere ohne Tumor hohe L1-Antikörper-Titer aufweisen (Schäfer, 2006). Außerdem soll in der nahen Zukunft eine auf L1 basierende Vakzinierung durchgeführt werden um zu testen, ob sich dadurch die Tumorentstehung verhindern lässt.

Für diese Untersuchungen hat das Tiermodell *Mastomys coucha* eine große Bedeutung, da bislang kein weiteres Nagetier-Modell existiert, welches natürlich mit PV infiziert ist.

Außerdem lässt das Tiermodell basierend auf der Entwicklung gutartiger Tumore einen Vergleich mit der Situation beim Menschen, insbesondere unter Immunsuppression, zu.

Auch in Zukunft wird das Tiermodell *Mastomys coucha* von großem Nutzen für die weitere Erforschung PV-bedingter Erkrankungen sein.

7 Zusammenfassung

Ein kausaler Zusammenhang zwischen mukosalen humanen Papillomviren (HPV) und Gebärmutterhalskrebs steht aufgrund der Präsenz bestimmter HPV-Typen in über 99% der Fälle außer Frage. Eine Assoziation von hellem Hautkrebs und einigen HPV-Typen wird diskutiert und ist gerade bei der besonderen Situation einer Immunsuppression sehr wahrscheinlich. Bei immunsupprimierten Patienten, beispielsweise nach einer Organtransplantation, stellt Hautkrebs die häufigste Krebsart dar. Aber auch in der immunkompetenten, hellhäutigen Bevölkerung bedeutet Hautkrebs trotz geringer Sterblichkeit ein stetig wachsendes, kostenintensives Problem.

Zur Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der Entstehung von Hautkrebs und PV-Infektionen ist ein entsprechendes Tiermodell unverzichtbar. Aufgrund der persistenten Infektion mit dem spezies-spezifischen *Mastomys natalensis* PV (MnPV) und der damit verbundenen Entwicklung spontaner Hautläsionen bei einem Großteil der Tiere stellt die *Mastomys coucha*-Kolonie am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) ein solches Tiermodell dar. Bei den Läsionen, die sich sowohl in behaarter Haut als auch an Haut-Schleimhaut-Übergängen wie am Mund und im Anogenitalbereich befinden, handelt es sich um gutartige Tumore wie Papillome und Keratoakanthome.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Verteilung von MnPV im Organismus mittels verschiedener Untersuchungsmethoden analysiert. Es gelang die Detektion viraler DNS in diversen Geweben, jedoch in unterschiedlicher Häufigkeit. In beinahe allen Haut- und Tumorproben war MnPV-DNS nachweisbar, somit ist von einer Durchseuchung des gesamten Bestandes auszugehen. Eine Integration der Virus-DNS in das Wirtsgenom war hingegen nicht festzustellen. Da jedoch nicht 100% der Tiere Tumore entwickeln, werden hierfür weitere Faktoren vermutet als die MnPV-Infektion *per se*. Als begünstigend für die Tumorentstehung werden chronische Hautirritationen, die sich insbesondere männliche Tiere im Rahmen von Rankämpfen regelmäßig zufügen, angesehen. Möglicherweise erklärt das die deutlich höhere Tumorzinzidenz bei männlichen im Vergleich zu weiblichen Tieren. Außerdem wurde in der Kolonie ein weiteres, bisher unbekanntes PV (*Mastomys coucha* PV2) entdeckt, das nicht mit MnPV verwandt ist.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Untersuchung der Entwicklung spontaner Tumore unter Immunsuppression bzw. mit dem Vergleich der Immunsuppressiva Cyclosporin A und Rapamycin in Hinsicht auf die Tumorentstehung anhand des Tiermodells *Mastomys coucha*. Hierbei konnte ein vermindertes sowie verzögertes Tumoraufreten unter

Rapamycin im Vergleich zu Cyclosporin A bestätigt werden, wie bereits in vorausgegangenen Versuchen vermutet worden war.

Das Tiermodell *Mastomys coucha* ist aufgrund seiner natürlichen PV-Infektion einzigartig und lässt einen Vergleich zur PV-induzierten Hautkarzinogenese beim Menschen, sowohl unter normalen Bedingungen als auch unter Immunsuppression zu.

8 Summary

There is a clear causal relationship between mucosal human papilloma virus (HPV) and cervical cancer due to the presence of certain HPV-types in more than 99% of all cases. An association between Non-melanoma skin cancer (NMSC) and several HPV types is discussed and in the special situation of immunosuppression most likely. NMSC is the most frequent cancer type in immunosuppressed patients, for example after organ transplantation. Despite a low mortality rate, NMSC means a steadily growing, cost-intensive problem in the normal, fair skinned population as well.

To investigate the correlation between the formation of NMSC and PV infection an adequate animal model is needed. Due to the spontaneous development of skin lesions in the majority of the animals caused by the persistent infection with the species specific *Mastomys natalensis* PV (MnPV) such an animal model is presented by the *Mastomys coucha*-population at the German Cancer Research Center (DKFZ). These lesions which are located in hairy skin as well as in transitional zones between skin and mucous membrane for example the mouth and in the anogenital tract are benign tumours such as papillomas and keratoakanthomas.

In this project the distribution of MnPV in the organism was analysed by different methods. The detection of viral DNA in several tissues was possible but with different incidences. MnPV-DNA was found in almost all samples of skin and tumour which indicates the infection of the whole colony. Integration of the viral DNA into the host genome has never been observed. As not 100% of animals develop tumours it is assumed that there are further factors necessary for tumour development than the infection with MnPV by itself. For example chronical irritation of the skin due to repeated fights especially between male animals is assumed to support tumour formation. This might be an explanation for the much higher tumour incidence of male animals compared to females. Besides, a further, so far unknown PV (*Mastomys coucha* PV2) has been discovered which is not related with MnPV.

The second part of the project was to investigate the spontaneous tumour development under immunosuppression and to compare the immunosuppressive drugs Cyclosporin A and Rapamycin with regard to tumour formation in the animal model *Mastomys coucha*, respectively. Under Rapamycin compared to Cyclosporin A a reduced and delayed tumour formation was observed which confirmed the assumption of previous experiments.

The animal model *Mastomys coucha* is unique due to its natural PV infection and allows to compare with PV induced skin carcinogenesis in humans, under normal conditions as well as under immunosuppression.

9 Literatur

- Akgül B, Cooke JC, Storey A (2006) HPV-associated skin disease. *J Pathol* **208**(2): 165-175
- Aktories, Förstermann, Hoffmann, Starke (2005) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, pp 391-395, München / Jena: Elsevier Urban & Fischer.
- Amtmann E, Volm M, Wayss K (1984) Tumour induction in the rodent *Mastomys natalensis* by activation of endogenous papilloma virus genomes. *Nature* **308**(5956): 291-292
- Antonsson A, Hansson BG (2002) Healthy skin of many animal species harbors papillomaviruses which are closely related to their human counterparts. *Journal of Virology* **76**(24): 12537-12542
- Antonsson A, Karanfilovska S, Lindqvist PG, Hansson BG (2003) General acquisition of human papillomavirus infections of skin occurs in early infancy. *J Clin Microbiol* **41**(6): 2509-2514
- Bell JA, Sundberg JP, Ghim SJ, Newsome J, Jenson AB, Schlegel R (1994) A formalin-inactivated vaccine protects against mucosal papillomavirus infection: a canine model. *Pathobiology* **62**(4): 194-198
- Bernard HU, Chan SY, Myers G, Sverdrup F, Baker C, McBride A, Munger K, Bernhard HU, Meissner J (1997) Animal Papillomaviruses. In *Human Papillomaviruses 1997: A compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences*. Los Alamos: Theoretical Biology and Biophysics Los Alamos National Laboratory
- Beutner KR, Geisse JK, Helman D, Fox TL, Ginkel A, Owens ML (1999a) Therapeutic response of basal cell carcinoma to the immune response modifier imiquimod 5% cream. *J Am Acad Dermatol* **41**(6): 1002-1007
- Beutner KR, Wiley DJ, Douglas JM, Tyring SK, Fife K, Trofatter K, Stone KM (1999b) Genital warts and their treatment. *Clin Infect Dis* **28 Suppl 1**: S37-S56
- Biliris KA, Koumantakis E, Dokianakis DN, Sourvinos G, Spandidos DA (2000) Human papillomavirus infection of non-melanoma skin cancers in immunocompetent hosts. *Cancer Lett* **161**(1): 83-88
- Bjornsti MA, Houghton PJ (2004) The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **4**(5): 335-348
- Bosch FX, Munoz N (2002) The viral etiology of cervical cancer. *Virus Res* **89**(2): 183-190
- Bouwes Bavinck JN, Feltkamp M, Struijk L, ter Schegget J (2001) Human papillomavirus infection and skin cancer risk in organ transplant recipients. *J Invest Dermatol Symp Proc* **6**(3): 207-211
- Boyle J, MacKie RM, Briggs JD, Junor BJ, Aitchison TC (1984) Cancer, warts, and sunshine in renal transplant patients. A case-control study. *Lancet* **1**(8379): 702-705

- Brandsma JL, Xiao W (1993) Infectious virus replication in papillomas induced by molecularly cloned cottontail rabbit papillomavirus DNA. *J Virol* **67**(1): 567-571
- Brandsma JL, Yang ZH, DiMaio D, Barthold SW, Johnson E, Xiao W (1992) The putative E5 open reading frame of cottontail rabbit papillomavirus is dispensable for papilloma formation in domestic rabbits. *J Virol* **66**(10): 6204-6207
- Brash DE, Ziegler A, Jonason AS, Simon JA, Kunala S, Leffell DJ (1996) Sunlight and sunburn in human skin cancer: p53, apoptosis, and tumor promotion. *J Invest Dermatol Symp Proc* **1**(2): 136-142
- Bühling KJ, Lepenies J, Witt K (1995) *Intensivkurs: Allgemeine und spezielle Pathologie*, München / Wemding: Urban & Schwarzenberg.
- Burk RD (1999) Human papillomavirus and the risk of cervical cancer. *Hosp Pract (Minneap)* **34**(12): 103-111
- Burtscher H, Grunberg W, Meingassner G (1973) Infectious keratoacanthomas of the epidermis in Praomys (Mastomys) natalensis. *Naturwissenschaften* **60**(4): 209-210
- Campo MS (1994) Vaccination against papillomavirus in cattle. *Curr Top Microbiol Immunol* **186**: 255-266
- Campo MS (1997) Bovine papillomavirus and cancer. *Vet J* **154**(3): 175-188
- Campo MS (2002) Animal models of papillomavirus pathogenesis. *Virus Res* **89**(2): 249-261
- Campo MS, Jarrett WF (1986) Papillomavirus infection in cattle: viral and chemical cofactors in naturally occurring and experimentally induced tumours. *Ciba Found Symp* **120**: 117-135
- Carney HC, England JJ, Hodgins EC, Whiteley HE, Adkison DL, Sundberg JP (1990) Papillomavirus infection of aged Persian cats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **2**: 294-299
- Carter JJ, Galloway DA (1997) Humoral immune response to human papillomavirus infection. *Clin Dermatol* **15**(2): 249-259
- Chen XS, Garcea RL, Goldberg I, Casini G, Harrison SC (2000) Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. *Mol Cell* **5**(3): 557-567
- Cirelli R, Tyring SK (1994) Interferons in human papillomavirus infections. *Antiviral Res* **24**(2-3): 191-204
- Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Munoz N, Franceschi S (2003) Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *BrJCancer* **88**(1): 63-73
- Cooper KD, Androphy EJ, Lowy D, Katz SI (1990) Antigen presentation and T-cell activation in epidermodysplasia verruciformis. *J Invest Dermatol* **94**(6): 769-776

- Daling JR, Madeleine MM, Schwartz SM, Shera KA, Carter JJ, McKnight B, Porter PL, Galloway DA, McDougall JK, Tamimi H (2002) A population-based study of squamous cell vaginal cancer: HPV and cofactors. *Gynecol Oncol* **84**(2): 263-270
- de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H (2004) Classification of papillomaviruses. *Virology* **324**(1): 17-27
- Della Torre G, Pilotti S, de Palo G, Rilke F (1978) Viral particles in cervical condylomatous lesions. *Tumori* **64**(5): 549-553
- Demeret C, Desaintes C, Yaniv M, Thierry F (1997) Different mechanisms contribute to the E2-mediated transcriptional repression of human papillomavirus type 18 viral oncogenes. *J Virol* **71**(12): 9343-9349
- DiMaio D, Guralski D, Schiller JT (1986) Translation of open reading frame E5 of bovine papillomavirus is required for its transforming activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**(6): 1797-1801
- Doorbar J (2006) Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)* **110**(5): 525-541
- Duerr A, Kieke B, Warren D, Shah K, Burk R, Peipert JF, Schuman P, Klein RS (2001) Human papillomavirus-associated cervical cytologic abnormalities among women with or at risk of infection with human immunodeficiency virus. *Am J Obstet Gynecol* **184**(4): 584-590
- Dürst M, Dzarlieva-Petrusevska RT, Boukamp P, Fusenig NE, Gissmann L (1987) Molecular and cytogenetic analysis of immortalized human primary keratinocytes obtained after transfection with human papillomavirus type 16 DNA. *Oncogene* **1**(3): 251-256
- Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E (1989) The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* **243**(4893): 934-937
- Edwards L, Ferenczy A, Eron L, Baker D, Owens ML, Fox TL, Hougham AJ, Schmitt KA (1998) Self-administered topical 5% imiquimod cream for external anogenital warts. HPV Study Group. Human PapillomaVirus. *Arch Dermatol* **134**(1): 25-30
- Egberink HF, Berrocal A, Bax HA, van den I, Walter JH, Horzinek MC (1992) Papillomavirus associated skin lesions in a cat seropositive for feline immunodeficiency virus. *Vet Microbiol* **31**(2-3): 117-125
- Evans MF, Mount SL, Beatty BG, Cooper K (2002) Biotinyl-tyramide-based in situ hybridization signal patterns distinguish human papillomavirus type and grade of cervical intraepithelial neoplasia. *Mod Pathol* **15**(12): 1339-1347
- Fang L, Budgeon LR, Doorbar J, Briggs ER, Howett MK (2006) The human papillomavirus type 11 E1/E4 protein is not essential for viral genome amplification. *Virology* **351**(2): 271-279
- Favre M, Breitburd F, Croissant O, Orth G (1977) Chromatin-like structures obtained after alkaline disruption of bovine and human papillomaviruses. *J Virol* **21**(3): 1205-1209

- Franceschi S, Castellsague X, Dal Maso L, Smith JS, Plummer M, Chiacchareon S, Eluf-Neto J, Shah KV, Snijders PJF, Meijer CJLM, Bosch FX, Munoz N (2002) Prevalence and determinants of human papillomavirus genital infection in men. *Br J Cancer* **86**(705): 711
- Fuchs PG, Iftner T, Weninger J, Pfister H (1986) Epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus 8: genomic sequence and comparative analysis. *J Virol* **58**(2): 626-634
- Fürstenberger G, Kopp-Schneider A (1995) Malignant progression of papillomas induced by the initiation--promotion protocol in NMRI mouse skin. *Carcinogenesis* **16**(1): 61-69
- García-Vallvé S, Iglesias-Rozas JR, Alonso A, Bravo IG (2006) Different papillomaviruses have different repertoires of transcription factor binding sites: convergence and divergence in the upstream regulatory region. *BMC Evol Biol* **6**: 20
- Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, Zahurak ML, Daniel RW, Viglione M, Symer DE, Shah KV, Sidransky D (2000) Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* **92**(9): 709-720
- Gissmann L, Boshart M, Dürst M, Ikenberg H, Wagner D, zur Hausen H (1984) Presence of human papillomavirus in genital tumors. *J Invest Dermatol* **83**(1 Suppl): 26s-28s
- Gissmann L, Diehl V, Schultz-Coulon HJ, zur Hausen H (1982) Molecular cloning and characterization of human papilloma virus DNA derived from a laryngeal papilloma. *J Virol* **44**(1): 393-400
- Gissmann L, Pfister H, zur Hausen H (1977) Human papilloma viruses (HPV): characterization of four different isolates. *Virology* **76**(2): 569-580
- Gissmann L, zur Hausen H (1976) Human papilloma virus DNA: physical mapping and genetic heterogeneity. *Proc Natl Acad Sci USA* **73**(4): 1310-1313
- Gissmann L, zur Hausen H (1980) Partial characterization of viral DNA from human genital warts (*Condylomata acuminata*). *Int J Cancer* **25**(5): 605-609
- Gottschling M, Stamatakis A, Nindl I, Stockfleth E, Alonso A, Bravo IG (2007) Multiple evolutionary mechanisms drive papillomavirus diversification. *Mol Biol Evol* **24**(5): 1242-1258
- Green CA, Keogh HJ, Gordon DH, Pinto M, Hartwig EK (1980) The distribution, identification, and naming of the *Mastomys natalensis* species. *J zool* **192**: 17-23
- Guba M, Köhl GE, Neppl E, Doenecke A, Steinbauer M, Schlitt HJ, Jauch KW, Geissler EK (2005) Dosing of rapamycin is critical to achieve an optimal antiangiogenic effect against cancer. *Transpl Int* **18**(1): 89-94
- Guba M, von Breitenbuch P, Steinbauer M, Köhl G, Flegel S, Hornung M, Bruns CJ, Zülke C, Farkas S, Anthuber M, Jauch KW, Geissler EK (2002) Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat Med* **8**(2): 128-135

- Haag A, Wayss K, Rommelaere J, Cornelis JJ (2000) Experimentally induced infection with autonomous parvoviruses, minute virus of mice and H-1, in the African multimammate mouse (*Mastomys coucha*). *Comp Med* **50**(6): 613-621
- Han R, Cladel NM, Reed CA, Christensen ND (1998) Characterization of transformation function of cottontail rabbit papillomavirus E5 and E8 genes. *Virology* **251**(2): 253-263
- Harwood CA, Suretheran T, McGregor JM, Spink PJ, Leigh IM, Breuer J, Proby CM (2000) Human papillomavirus infection and non-melanoma skin cancer in immunosuppressed and immunocompetent individuals. *J Med Virol* **61**(3): 289-297
- Harwood CA, Suretheran T, Sasieni P, Proby CM, Bordea C, Leigh IM, Wojnarowska F, Breuer J, McGregor JM (2004) Increased risk of skin cancer associated with the presence of epidermodysplasia verruciformis human papillomavirus types in normal skin. *Br J Dermatol* **150**(5): 949-957
- Helfrich I, Chen M, Schmidt R, Fürstenberger G, Kopp-Schneider A, Trick D, Grone HJ, zur Hausen H, Rösl F (2004) Increased incidence of squamous cell carcinomas in *Mastomys natalensis* papillomavirus E6 transgenic mice during two-stage skin carcinogenesis. *J Virol* **78**(9): 4797-4805
- Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD (1998) Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* **338**(7): 423-428
- Ho GY, Burk RD, Fleming I, Klein RS (1994) Risk of human papillomavirus infection in woman with human immunodeficiency virus-induced immunosuppression. *Int J Cancer* **56**(788): 792
- Holmgren SC, Patterson NA, Ozbun MA, Lambert PF (2005) The minor capsid protein L2 contributes to two steps in the human papillomavirus type 31 life cycle. *J Virol* **79**(7): 3938-3948
- Howley PM, Lowy DR (2007) Papillomaviruses. In *Fields Virology* Vol. 5th, pp 2299-2354. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins
- Hughes FJ, Romanos MA (1993) E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ATPase. *Nucleic Acids Res* **21**(25): 5817-5823
- Iftner A, Klug SJ, Garbe C, Blum A, Stancu A, Wilczynski SP, Iftner T (2003) The prevalence of human papillomavirus genotypes in nonmelanoma skin cancers of nonimmunosuppressed individuals identifies high-risk genital types as possible risk factors. *Cancer Res* **63**(21): 7515-7519
- Jablonska S, Majewski S (1994) Epidermodysplasia verruciformis: immunological and clinical aspects. *Curr Top Microbiol Immunol* **186**: 157-175
- Jarrett WF, McNeil PE, Grimshaw WT, Selman IE, McIntyre WI (1978) High incidence area of cattle cancer with a possible interaction between an environmental carcinogen and a papilloma virus. *Nature* **274**(5668): 215-217

- Jeon S, Allen-Hoffmann BL, Lambert PF (1995) Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J Virol* **69**(5): 2989-2997
- Jeon S, Lambert PF (1995) Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**(5): 1654-1658
- Kahan BD (2000) Efficacy of sirolimus compared with azathioprine for reduction of acute renal allograft rejection: a randomised multicentre study. The Rapamune US Study Group. *Lancet* **356**(9225): 194-202
- Karlsson R, Jonsson M, Edlund K, Evander M, Gustafsson A, Boden E, Rylander E, Wadell G (1995) Lifetime number of partners as the only independent risk factor for human papillomavirus infection: a population-based study. *Sex Transm Dis* **22**(119): 127
- Kaya H, Kotiloglu E, Inanli S, Ekicioglu G, Bozkurt SU, Tutkun A, Kullu S (2001) Prevalence of human papillomavirus (HPV) DNA in larynx and lung carcinomas. *Pathologica* **93**(5): 531-534
- Khalili K, Gordon J, White MK (2006) The polyomavirus, JCV and its involvement in human disease. *Adv Exp Med Biol* **577**: 274-287
- King KL, Cidlowski JA (1998) Cell cycle regulation and apoptosis. *Annu Rev Physiol* **60**: 601-617
- Kiviat NB, Critchlow CW, Holmes KK, Kuypers J, Sayer J, Dunphy C, Surawicz C, Kirby P, Wood R, Daling JR (1993) Association of anal dysplasia and human papillomavirus with immunosuppression and HIV infection among homosexual men. *AIDS* **7**(1): 43-49
- Köhl GE, Gaumann A, Zülke C, Höhn A, Hofstädter F, Schlitt HJ, Geissler EK (2006) Development of de novo cancer in p53 knock-out mice is dependent on the type of long-term immunosuppression used. *Transplantation* **82**(6): 741-748
- Laverty CR, Russell P, Hills E, Booth N (1978) The significance of noncondylomatous wart virus infection of the cervical transformation zone. A review with discussion of two illustrative cases. *Acta Cytol* **22**(4): 195-201
- Lewandowsky F, Lutz W (1922) Ein Fall einer bisher nicht beschriebenen Hauterkrankung (Epidermodysplasia verruciformis). *Arch Dermatol Syph* **141**(2): 193-203
- Linz U, Baker CC (1988) Promoters of bovine papillomavirus type 1: in vitro activity and utilization. *J Virol* **62**(8): 2537-2543
- Longworth MS, Laimins LA (2004) Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**(2): 362-372
- Lowy DR, Schiller JT (2006) Prophylactic human papillomavirus vaccines. *J Clin Invest* **116**(5): 1167-1173

- Luan FL, Hojo M, Maluccio M, Yamaji K, Suthanthiran M (2002) Rapamycin blocks tumor progression: unlinking immunosuppression from antitumor efficacy. *Transplantation* **73**(10): 1565-1572
- Luther SA, Acha-Orbea H (1997) Mouse mammary tumor virus: immunological interplays between virus and host. *Adv Immunol* **65**: 139-243
- Lutzner MA, Blanchet-Bardon C, Orth G (1984) Clinical observations, virologic studies, and treatment trials in patients with epidermodysplasia verruciformis, a disease induced by specific human papillomaviruses. *J Invest Dermatol* **83**(1 Suppl): 18s-25s
- Majewski S, Malejczyk J, Jablonska S, Misiewicz J, Rudnicka L, Obalek S, Orth G (1990) Natural cell-mediated cytotoxicity against various target cells in patients with epidermodysplasia verruciformis. *J Am Acad Dermatol* **22**(3): 423-427
- Malumbres M, Barbacid M (2001) To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer* **1**(3): 222-231
- Martin CL (1995) *Augenkrankheiten bei Hund und Katze*, Kap. 5, 6 und 8, Hannover: Verlag M. und H. Schaper.
- McCance DJ, Kalache A, Ashdown K, Andrade L, Menezes F, Smith P, Doll R (1986) Human papillomavirus types 16 and 18 in carcinomas of the penis from Brazil. *Int J Cancer* **37**(1): 55-59
- Meisels A, Roy M, Fortier M, Morin C, Casas-Cordero M, Shah KV, Turgeon H (1981) Human papillomavirus infection of the cervix: the atypical condyloma. *Acta Cytol* **25**(1): 7-16
- Meyer T, Arndt R, Christophers E, Nindl I, Stockfleth E (2001) Importance of human papillomaviruses for the development of skin cancer. *Cancer Detect Prev* **25**(6): 533-547
- Modrow S, Falke D (1997) *Molekulare Virologie*, Kap. 7 und 19.3
- Molano M, van den Brule A, Plummer M, Weiderpass E, Posso H, Arslan A, Meijer CJ, Munoz N, Franceschi S (2003) Determinants of clearance of human papillomavirus infections in Colombian women with normal cytology: a population-based, 5-year follow-up study. *Am J Epidemiol* **158**(5): 486-494
- Müller H, Gissmann L (1978) Mastomys natalensis papilloma virus (MnPV), the causative agent of epithelial proliferations: characterization of the virus particle. *J Gen Virol* **41**(2): 315-323
- Münger K, Howley PM (2002) Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res* **89**(2): 213-228
- Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ (2003) Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* **348**(6): 518-527

- Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Tafur L, Izarzugaza I, Gili M, Viladiu P, Navarro C, Martos C, Ascunce N (1992) The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer: a population-based case-control study in Colombia and Spain. *Int J Cancer* **52**(5): 743-749
- Nafz J (2006) *Mastomys coucha*: A natural animal model for papillomavirus-induced skin carcinogenesis. University Heidelberg, Germany,
- Nafz J, Schäfer K, Feng Chen S, Bravo I, Ibberson M, Nindl I, Stockfleth E, Rösl F (akzeptiert 2007) A Novel Rodent Papillomavirus Inducing Anogenital Lesions In Its Natural Host. *Virology*
- Nakazawa H, English D, Randell PL, Nakazawa K, Martel N, Armstrong BK, Yamasaki H (1994) UV and skin cancer: specific p53 gene mutation in normal skin as a biologically relevant exposure measurement. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**(1): 360-364
- Nasir L, Reid SW (1999) Bovine papillomaviral gene expression in equine sarcoid tumours. *Virus Res* **61**(2): 171-175
- Nicholls PK, Klaunberg BA, Moore RA, Santos EB, Parry NR, Gough GW, Stanley MA (1999) Naturally occurring, nonregressing canine oral papillomavirus infection: host immunity, virus characterization, and experimental infection. *Virology* **265**(2): 365-374
- Oetlé AG (1957) Spontaneous carcinoma of the glandular stomach in *Rattus (mastomys) natalensis*, an African rodent. *Br J Cancer* **11**(3): 415-433
- Olson C, Jr., Cook RH (1951) Cutaneous sarcoma-like lesions of the horse caused by the agent of bovine papilloma. *Proc Soc Exp Biol Med* **77**(2): 281-284
- Ondrus D, Pribylincova V, Breza J, Bujdak P, Miklosi M, Reznicek J, Zvara V (1999) The incidence of tumours in renal transplant recipients with long-term immunosuppressive therapy. *Int Urol Nephrol* **31**(4): 417-422
- Orth G, Favre M, Jablonska S, Brylak K, Croissant O (1978a) Viral sequences related to a human skin papillomavirus in genital warts. *Nature* **275**(5678): 334-336
- Orth G, Jablonska S, Favre M, Croissant O, Jarzabek-Chorzelska M, Rzeska G (1978b) Characterization of two types of human papillomaviruses in lesions of epidermodysplasia verruciformis. *Proc Natl Acad Sci USA* **75**(3): 1537-1541
- Palefsky JM (2000) Anal squamous intraepithelial lesions in human immunodeficiency virus-positive men and women. *Semin Oncol* **27**: 471-479
- Parkin DM, Pisani P, Ferlay J (1993) Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. *Int J Cancer* **54**(4): 594-606
- Parsons RJ, Kidd JG (1943) Oral papillomatosis of rabbits: a virus disease. *Journal of Experimental Medicine* **77**: 233-250

- Pfister H, Fuchs PG, Majewski S, Jablonska S, Pniewska I, Malejczyk M (2003) High prevalence of epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus DNA in actinic keratoses of the immunocompetent population. *Arch Dermatol Res* **295**(7): 273-279
- Pinto AP, Lin MC, Mutter GL, Sun D, Villa LL, Crum CP (1999) Allelic loss in human papillomavirus-positive and -negative vulvar squamous cell carcinomas. *Am J Pathol* **154**(4): 1009-1015
- Purdie KJ, Suretheran T, Sterling JC, Bell L, McGregor JM, Proby CM, Harwood CA, Breuer J (2005) Human papillomavirus gene expression in cutaneous squamous cell carcinomas from immunosuppressed and immunocompetent individuals. *J Invest Dermatol* **125**(1): 98-107
- Ramos N, Rueda LA, Bouadjar B, Montoya LS, Orth G, Favre M (2002) Mutations in two adjacent novel genes are associated with epidermodysplasia verruciformis. *Nat Genet* **32**(4): 579-581
- Randeria JD (1978) The inbreeding of the Y and the Z strains of *Praomys natalensis* with special reference to the laboratory uses of the *Mastomys*. *J S Afr Vet Assoc* **49**(3): 197-199
- Rector A, Lemey P, Tachezy R, Mostmans S, Ghim SJ, Van Doorslaer K, Roelke M, Bush M, Montali RJ, Joslin J, Burk RD, Jenson AB, Sundberg JP, Shapiro B, Van Ranst M (2007) Ancient papillomavirus-host co-speciation in Felidae. *Genome Biol* **8**(4): R57
- Reinacher M, Müller H, Thiel W, Rudolph RL (1978) Localization of papillomavirus and virus-specific antigens in the skin of tumor-bearing *Mastomys natalensis* (GRA Giessen). *Med Microbiol Immunol (Berl)* **165**(2): 93-99
- Rösl F, Waldeck W, Zentgraf H, Sauer G (1986) Properties of intracellular bovine papillomavirus chromatin. *J Virol* **58**(2): 500-507
- Rous P, Beard JW (1935) The progression to carcinoma of virus-induced rabbit papillomas (Shope). *J Exp Med* **62**: 523-548
- Rudolph R, Thiel W (1976) Pathological anatomy and histology of spontaneous, epithelial skin tumors in *Mastomys natalensis*. *Zentralbl VeterinarmedA* **23**(05): 429-441
- Sambrook RR, D. (2001) *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sauder DN (2004) Mechanism of action and emerging role of immune response modifier therapy in dermatologic conditions. *J Cutan Med Surg* **8 Suppl 3**: 3-12
- Schäfer K (2006) Die humorale Immunantwort auf Papillomvirusinfektionen im Tiermodell *Mastomys coucha* und Herstellung virus-ähnlicher Partikeln. Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg,
- Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM (1993) The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* **75**(3): 495-505
- Schiller JT, Vass WC, Vousden KH, Lowy DR (1986) E5 open reading frame of bovine papillomavirus type 1 encodes a transforming gene. *J Virol* **57**(1): 1-6

- Schmitt A, Rochat A, Zeltner R, Borenstein L, Barrandon Y, Wettstein FO, Iftner T (1996) The primary target cells of the high-risk cottontail rabbit papillomavirus colocalize with hair follicle stem cells. *J Virol* **70**(3): 1912-1922
- Schreiber SL, Crabtree GR (1992) The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol Today* **13**(4): 136-142
- Shamanin V, zur Hausen H, Lavergne D, Proby CM, Leigh IM, Neumann C, Hamm H, Goos M, Haustein UF, Jung EG, Plewig G, Wolff H, de Villiers EM (1996) Human papillomavirus infections in nonmelanoma skin cancers from renal transplant recipients and nonimmunosuppressed patients. *J Natl Cancer Inst* **88**(12): 802-811
- Siegsmond M, Wayss K, Amtmann E (1991) Activation of latent papillomavirus genomes by chronic mechanical irritation. *J Gen Virol* **72** (Pt 11): 2787-2789
- Simmers MH, Ibsen KH, Berk JE (1968) Concerning the incidence of "spontaneous" stomach cancer in *Pracomys* (*Mastomys*) *natalensis*. *Cancer Res* **28**(8): 1573-1576
- Stanley M (2006) Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine* **24** Suppl 1: S16-S22
- Stockfleth E, Ulrich C, Meyer T, Arndt R, Christophers E (2001) Skin diseases following organ transplantation--risk factors and new therapeutic approaches. *Transplant Proc* **33**(1-2): 1848-1853
- Sundberg JP, Smith EK, Herron AJ, Jenson AB, Burk RD, Van Ranst M (1994) Involvement of canine oral papillomavirus in generalized oral and cutaneous verrucosis in a Chinese Sher Pei dog. *Veterinary Pathology* **31**: 183-187
- Sundberg JP, Van Ranst M, Burk RD, Jenson AB, von Krogh G, Gross G (1996) The nonhuman (animal) papillomaviruses: host range, epitope conservation, and molecular diversity. In *Human Papillomavirus Infections in Dermatology and Venereology*, pp 44-68. Boca Raton, FL: CRC Press
- Sundberg JP, Van Ranst M, Montali R, Homer BL, Miller WH, Rowland PH, Scott DW, England JJ, Dunstan RW, Mikaelian I, Jenson AB (2000) Feline papillomas and papillomaviruses. *Veterinary Pathology* **37**: 1-10
- Syrjanen S, Puranen M (2000) Human papillomavirus infections in children: the potential role of maternal transmission. *Crit Rev Oral Biol Med* **11**(2): 259-274
- Syvertson JT (1952) The pathogenesis of the rabbit papilloma-to-carcinoma sequence. *Ann NY Acad Sci* **54**(6): 1126-1140
- Tan CH, Tachezy R, Van Ranst M, Chan SY, Bernard HU, Burk RD (1994) The *Mastomys natalensis* papillomavirus: nucleotide sequence, genome organization, and phylogenetic relationship of a rodent papillomavirus involved in tumorigenesis of cutaneous epithelia. *Virology* **198**(2): 534-541
- Tate G, Suzuki T, Kishimoto K, Mitsuya T (2004) Novel mutations of EVER1/TMC6 gene in a Japanese patient with epidermodysplasia verruciformis. *J Hum Genet* **49**(4): 223-225

- Terai M, Burk RD (2002) *Felis domesticus* papillomavirus, isolated from a skin lesion, is related to canine oral papillomavirus and contains a 1.3 kb non-coding region between the E2 and L2 open reading frames. *J Gen Virol* **83**(Pt 9): 2303-2307
- Ulrich C, Christophers E, Sterry W, Meyer T, Stockfleth E (2002) Hauterkrankungen bei organtransplantierten Patienten. *Der Hautarzt* **8**: 524-533
- van den Brule AJ, Snijders PJ, Gordijn RL, Bleker OP, Meijer CJ, Walboomers JM (1990) General primer-mediated polymerase chain reaction permits the detection of sequenced and still unsequenced human papillomavirus genotypes in cervical scrapes and carcinomas. *Int J Cancer* **45**(4): 644-649
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N (1999) Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* **189**(1): 12-19
- Walder BK, Robertson MR, Jeremy D (1971) Skin cancer and immunosuppression. *Lancet* **2**(7737): 1282-1283
- Wayß K, Reyes-Mayes D, Volm M (1981) Chemical carcinogenesis by the two-stage protocol in the skin *Mastomys natalensis* (Muridae) using topical initiation with 7,12-dimethylbenz(a)anthracene and topical promotion with 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* **38**(1): 13-21
- Wazer DE, Liu XL, Chu Q, Gao Q, Band V (1995) Immortalization of distinct human mammary epithelial cell types by human papilloma virus 16 E6 or E7. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**(9): 3687-3691
- Wettstein FO, Barbosa MS, Nasser M (1987) Identification of the major cottontail rabbit papillomavirus late RNA cap site and mapping and quantitation of an E2 and minor E6 coding mRNA in papillomas and carcinomas. *Virology* **159**(2): 321-328
- White MK, Gordon J, Reiss K, Del Valle L, Croul S, Giordano A, Darbinyan A, Khalili K (2005) Human polyomaviruses and brain tumors. *Brain Res Brain Res Rev* **50**(1): 69-85
- Wiederrecht GJ, Sabers CJ, Brunn GJ, Martin MM, Dumont FJ, Abraham RT (1995) Mechanism of action of rapamycin: new insights into the regulation of G1-phase progression in eukaryotic cells. *Prog Cell Cycle Res* **1**: 53-71
- Wilgenburg BJ, Budgeon LR, Lang CM, Griffith JW, Christensen ND (2005) Characterization of immune responses during regression of rabbit oral papillomavirus infections. *Comp Med* **55**(5): 431-439
- Wilson R, Fehrmann F, Laimins LA (2005) Role of the E1--E4 protein in the differentiation-dependent life cycle of human papillomavirus type 31. *J Virol* **79**(11): 6732-6740
- Winer RL, Lee SK, Hughes JP, Adam DE, Kiviat NB, Koutsky LA (2003) Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am J Epidemiol* **157**(3): 218-226

Woodman CB, Collins S, Winter H, Bailey A, Ellis J, Prior P, Yates M, Rollason TP, Young LS (2001) Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. *Lancet* **357**(9271): 1831-1836

Zaugg N, Nespeca G, Hauser B, Ackermann M, Favrot C (2005) Detection of novel papillomaviruses in canine mucosal, cutaneous and in situ squamous cell carcinomas. *Vet Dermatol* **16**(5): 290-298

zur Hausen H (1976) Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Res* **36**(2 pt 2): 794

zur Hausen H (1977) Human papilloma viruses 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**(9): 690-698

zur Hausen H (2002) Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* **2**(5): 342-350

zur Hausen H, Meinhof W, Scheiber W, Bornkamm GW (1974) Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. *Int J Cancer* **13**(5): 650-656

10 Anhang

10.1 Daten untersuchter Tiere

Tier	Geburtsdatum	Alter bei Sektion	Geschlecht	Tumor	Lokalisation Tumor	Sonstige Auffälligkeiten
#1	18.09.2003	9 Mo.	W	+	linkes Ohr, Nase	-
#2	19.10.2003	8 Mo.	M	-		Lymphknoten aktiviert
#3	01.06.2004	4 Wo.	W	-		
#4	06.01.2004	6,5 Mo.	M	-		Bisswunde im Nacken
#5	08.02.2004	6,5 Mo.	W	-		
#6	01.06.2004	6 Wo.	M	-		
#7	18.09.2003	10,5 Mo.	M	+	Mund, Rücken	
#8	18.09.2003	11 Mo.	M	+	Rücken, Kinn, Augenlid	
#9*	07.04.2004	3,5 Mo.	M	-		
#10	18.09.2003	12 Mo.	M	+	Seite, Ohr	Lymphknoten aktiviert
#11	17.08.2004	4 Wo.	W	-		
#12	28.08.2004	2,5 Wo.	M	-		noch Milchkot
#13	19.09.2003	12 Mo.	M	+	Seite, Mund, Augenlid	Lymphknoten aktiviert
#14	19.09.2003	12 Mo.	M	+	Seite, Mund, Augenlid	
#15	31.08.2003	14 Mo.	M	-		Retrobulbärer Abszess
#16	27.12.2003	11 Mo.	M	-		
#17	19.10.2003	13 Mo.	M	+	Bauch, After	
#18	10.11.2003	12 Mo.	W	+	Augenlid	
#19	17.08.2004	3 Mo.	M	-		
#20	17.08.2004	3 Mo.	M	-		
#21	05.01.2004	10 Mo.	M	-		
#22	06.01.2004	10 Mo.	M	-		
#23	06.01.2004	10 Mo.	M	-		
#24	13.01.2004	10 Mo.	W	-		
#25	10.12.2003	11 Mo.	W	-		
#26	19.09.2003	14 Mo.	W	-		
#27	14.01.2004	10 Mo.	W	-		
#28	14.01.2004	10 Mo.	W	-		
#29*	07.05.2004	6 Mo.	M	+	Rücken	Fibrosarkom linke Seite
#30	10.12.2003	11 Mo.	M	+	Ohr	
#31	18.09.2003	15,5 Mo.	W	+	Auge, Mund, Ohr, After	
#32	22.12.2003	12,5 Mo.	M	+	After	
#33	28.05.2003	8 Mo.	W	+	Vulva	Zuchttier
#34	28.01.2005	1 T.	W	-		Neonat
#35	22.12.2003	14 Mo.	M	+	Backe	
#36	07.05.2004	9 Mo.	M	+	After	
#37**	22.12.2003	15 Mo.	M	+	gesamter Körper	
#38	07.05.2004	10 Mo.	M	+	gesamter Körper	
#39	21.01.2004	14 Mo.	W	+	Augenlid	
#40	07.11.2003	16,5 Mo.	W	+	Augenlid	
#41*/**	07.05.2004	10,5 Mo.	M	+	Nacken	
#42**	06.04.2004	11,5 Mo.	M	+	Seite	
#43**	17.02.2004	13 Mo.	M	+	Rücken	
#44*/**	01.06.2004	9,5 Mo.	M	+	Seite	
#45	01.06.2004	10 Mo.	W	+	Rücken	
#46*	01.06.2004	10 Mo.	M	+	Nacken	
#47*	01.06.2004	10 Mo.	M	+	Seite, Nacken	
#48*	01.06.2004	10 Mo.	M	+	Rücken	
#49	25.07.2004	8,5 Mo.	M	+	After	

Tier	Geburtsdatum	Alter bei Sektion	Geschlecht	Tumor	Lokalisation Tumor	Sonstige Auffälligkeiten
#50**	07.05.2004	11 Mo.	M	+	Seite, Mund, Bein, After	
#51*	07.05.2004	11 Mo.	M	+	Rücken	
#52**	07.05.2004	12 Mo.	M	+	Seite	
#53**	13.01.2004	16 Mo.	M	+	Seite	
#54*/**	07.05.2005	12 Mo.	M	+	Rücken, Nacken	
#55*/**	01.06.2005	11,5 Mo.	M	+	Seite	
#56*/**	01.06.2004	8,5 Mo.	W	+	Rücken	
#57**	12.03.2004	11 Mo.	M	+	Nacken	plötzlich verstorben, Aszites
#58**	09.11.2003	20 Mo.	W	+	Rücken, Augenlid, Ohr	
#59*/**	01.06.2004	14 Mo.	W	+	Rücken	
#60*/**	01.06.2004	14 Mo.	M	+	Rücken	
#61	01.06.2004	14 Mo.	M	+	After	
#62	10.11.2003	21 Mo.	W	+	Seite	Tumor subkutan
#63*/**	01.06.2004	15 Mo.	M	+	Rücken	
#64*	01.06.2004	15 Mo.	W	+	Rücken	
#65	09.11.2003	22,5 Mo.	W	+	Seite	Tumor subkutan
#66	10.04.2005	9 Mo.	M	+	Flanke, After	
#67	10.03.2005	9 Mo.	M	+	After	
#68	10.03.2005	9 Mo.	M	+	After, Vorhaut	
#69*	01.06.2004	18,5 Mo.	W	+	Ohr	Kachexie
#70	20.08.2004	15 Mo.	W	+	Mund	
#71	13.03.2004	22 Mo.	W	+	Oberschenkel links	Tumor subkutan
#72	03.08.2004	12 Mo.	M	+	gesamter Körper	
#73	29.07.2006	3,5 Mo.	W	-		trächtig
#74	02.07.2006	5 Mo.	W	-		trächtig
#75	18.09.2004	21 Mo.	M	-		seit Absetzen einzeln gehalten
#76	10.08.2004	20 Mo.	M	-		seit Absetzen einzeln gehalten
#77	09.12.2004	18 Mo.	M	-		seit Absetzen einzeln gehalten
#78	14.08.2004	20 Mo.	M	-		seit Absetzen einzeln gehalten
#79	15.05.2005	13 Mo.	M	-		seit Absetzen einzeln gehalten

* Tier wurde mit DMBA/TPA behandelt

** Tier wurde mit "Aldara" behandelt

Zeitangaben: T.=Tag, Wo.=Wochen, Mo.=Monate

Geschlecht: W=weiblich, M=männlich

Tumor: +=Tumor, -=kein Tumor

10.2 Die Sequenz des MnPV-Genoms

```

1 gcaacaatct cctctccata cttttttcca ctgcaccggt atcgtacaaa catatataag
61 aagaccccat tggctatgga tttgttactg cggtagccgg atggatagga ccgtgcactc
121 ctttgtggag cggtcggaa ttcctcggga ggacctcctg ctgccgtgca cattctgctc
181 gaggtttctt acccaggagg aattaactgc atttgacttt agtgctttta accttgtttg
E6 241 gagaggaagg tgtgcccatg gaatctgcac agcctgtgct cgtgtctgtg catccctaga
301 cctgtttctg caccatcaga attcgcgacc attagcagat gttctgctgg acgaaaatct
361 tacaactccac ggactgaaag cacgggtgctg cgtgtgcatg aagatactgt cagtgcaga
421 aaagctagag tgtgcagaaa gaggggaatc ctttgccaaa gtcaggggccc agtggagggc
481 acggtgcaga atttgcaaac ccgtgtaaaa tgataggacc tgaccaccag cgctgtctca
541 ccggcgaaac tcctgactcg gtcagcctgt attgtcacga agttctcgac gaggacgaat
E7 601 taaaagagcc aacagaggcg gctccgccac cggaacaata caccttgtag caggtactca
661 ttgagtgtcc tgagtgtaat aagacaattc ggctgacgtg cgcggcacaa gcaccaccaga
721 tccgtgggct agaacatcta ctgcttgacg ggctaagagt gatctgtccg cggtgtaacc
781 agaaga atgg aagatctga agaaggtact ggcgaaggtt gcagtggctg gtttgataga
841 gaagctatctt gtagtgacgg gtctagtgat gaggagccaa atgagtcctt tgaatctatt
901 gcggacatgt tcgatgacgg aacacaaaca cagggcaatt ccctagagtt gttccatacc
961 caggaaaagg aggagactag gacacagata caagctctaa agcgaaagta cattcccagt
1021 ccagaggcag gtggggatct ctaccacggt ctgagggcta tctctattac ccccaaaaaa
1081 aagaaacctc gcagacgggt gtttgagacc ccagaggata gcggcaacgg gagtcttggg
1141 aatgagacta cagatacttc ttcggggttt caggtagtag gggactcagc tgtggatgta
1201 tgcgatgcgg ggcggctgct taatctgaat ctgcttcaaa gccataatag ggtggcgagg
1261 ttgcttgctg tcttcaagga agcttatggg gtgtcataca aagagcttac acgggagtac
1321 aagagcgata aaacctgcaa tccagattgg gttatcgcat tgtactcctt gagtgcagcc
E1 1381 atcctaaatg cggcgcgac aacactacag ggaatttggt agtatgtggt tatgcaaagc
1441 cgccctacag cggcagccac agttgcttta ctaactgttc gctttaaatg cagtaaaagc
1501 agggagacag taagaaaaca aatgtgcggc atgttccact cagatccgct actctgctg
1561 tgtgatcccc ccaaggtcca aagtgtgcct gcagctctat actggtataa gaggagcatg
1621 tatagtggga cattcacaca cggagaggcg cctgagtggg tcaagagaca gaccatgatt
1681 acctgtgcaa tggagagac taaatttgac ctttcagaaa tgggtgcagt ggcatatgac
1741 aataactatg aggacgaatc ccaaatagca tttgaatatg ctagaacagc cactgagagc
1801 ctaaatgcga atgcctggct ggcttccaat gcacaagcta aacatgtgag ggactgtgct
1861 acaatggtga ggcattataa acgggaggag atgaaggcta tgagtatgct acagtgggta
1921 tggaaagtgt gtagagagga acctgaggag ggcacttggg cacctatttc cctatatctc
1981 gcgtccgaag ggggtggaagt gataagattt ctatctgcta tgaagagttg gttgoggggg
2041 attccaaaga aaaattgtct ggtattttac ggcctccaa atacagggaa gagtctgttt
2101 actatgagcc ttattaagt tttgagaggg cgagttatat catttgccaa tagcaaaagc
2161 catttctgga tgcagccact ggctgaggca aaggtagtgc ttttagatga tgccacaagg
2221 gccacatggg actatgtaga tacatatatg aggaatgcca tggatggaaa tccattatca
2281 attgattgca agtatagaac acctgtgcag gtaaaatgcc ccccatgctt tgtcacaaca

```

2341 aatgaggatg tgcacttgaa tgataggtgg cgctaccttc atagcagaat acaagtcttt
 2401 cacttaaagg aacctatgcc tatagacact gccgtaacc cagagtattc cttctcta
 2461 agacattgga aggcgtttt cgaaaagtta cagaagccac tagatctaag cgaggacgag
 2521 ggtgaccca aggacatgg agagcataca cagcogttaa gctgctgctc aagaggaact
 E2 2581 gatgtgatg tatgaggatg gggaggagac actggaggcc cagcttaaac attggggctt
 2641 gttgaggaaa gagcaagtct tgttacatgc agcacgccag catggacata acaaatagg
 2701 actgcaggcc gtgccccctc tttcagtgc ccagcagaat gccagaatg ctattgaaat
 2761 gcatttgctg ttgcaaagtc ttgcagagac accatatgct agggaagcat ggacactaag
 2821 ccagaccagc agggaaatgt atatggcagg tccatccggc accttcaaga aagacggcac
 2881 cattgtggag gttatatttg atggtgacaa gactaatatg atgacatata caaagtgggg
 2941 gaagatatac tttgctgatc caaatggcaa ttggagcaga acaacctccc atacggacat
 3001 taatggcata tattttaata agtctgggga taaggagtac tatgtgctg tcaaagagga
 3061 agcaaagagg tactcattaa caggaacttg ggaagtacat gatggactag agacacattc
 3121 ccttcttatt cctgtcacca gctctacacc gcagaccgga tttcctagag gggatccggt
 3181 acgccttcac gggaatacca ccacaggact gccataaccg cttcggaaaca gcagcagcaa
 3241 ccagatatta ctacgagagg gaagaggaga ctatccagac ggcgcacgcc gcgagacgag
 3301 gaggtactac caggggcaa caccgacgcc caggtctcta tctccccca tctaccgtcc
 3361 ccgccaagc tacgaagagt cgaggaggag gaggaaagta aggcgcgcc aagacgggag
 E4 3421 agtcaaatac cccgcgtctc cctacaggac aaaaccaccg ggggaaacca gcagcgacga
 3481 cgaagacgag gggagagggg ggcacgaacc ccgtcccag agacgactgc ccagaggcct
 3541 aagagaccgc ggagagcgtg caccgaaaag gaggagacc cagttcagg agggggagga
 3601 ggacgtggac ggcgtagggg ccttgcctga cgacctgaag ctgtaccaag aaccacctgg
 3661 agaccagtg gaggactcgg actcccagc cagtcgtctt acccccgcc dgccagacct
 3721 atctcggtac gactctacc ggttacaggt ggacgcggag agcagccctc ctaggacacc
 3781 cagaccggcc cccactctcg tggcagagtg cactcctggg agaccttctc cgcagactgg
 3841 aagcggacag caagcactgg gagaaccgcc ttctcggcct tcacgcggac attgccgga
 E2 3901 cctcggact gcctgcctt tgatcatcaa aggatcatca aatcaggta agtgcttgcg
 3961 atttagactt aatcctggc atcacagcct gtttctctac atcagacca catggcagtg
 4021 ggtccttca gtaggaagta ataggattgg acggtcacgc attctggtga tgtgtgagga
 4081 ctacgcgag atggacagat tcctatgtac tgtaagatc cctgctggtg tgacagttga
 4141 acagtgcagc atggcgtctg tctgatgcc cccccctcg cataacatac taacgcacac
 4201 tgcaataaag ttttctctt acacagtact aacctactaa tattagcatg tctagaagga
 4261 gaaagcgaca tacacgagtc cctcgtgact cggccactca catatatcaa acatgtaagc
 4321 aggcaggcac atgtccgct gatgtagtta ataaagtga aggcacaacc acagctgata
 4381 agattcttca atatggcggg gcggtgtat tctcgggtg ccttggtatt ggtacaggta
 L2 4441 ggggaagtgg tgggtcaaca gggatgtac cggtcggcga gacacctggt atttccgtgg
 4501 gtgcaagacc agttcctcga cctaattgtc ccttagaac tgttggtccc caggacctgt
 4561 ttctgtgga tgccattagg cctactgatc cttcgggtg tgatgtgcc agtgtgccta
 4621 ctcccactga cacctctatt aatgtaccg aggtggagg cattgctgag atcccacctg
 4681 tacctcctga cggtcctcc aacacaccaa caaccacaat taacacatca ggctcagggg
 4741 atgcagccat attagaggta gctcctgaac catcccagc cgtcaggact cgggtggagag

4801 ctagcaagac aaccttccat aatcctgctt ttcacagctt ctctctact ggttcaactg
 4861 taggcgaggc cacaggtatg gacaatattg ttgtttacag cggtagtggg gggaggacga
 4921 taggtgggga cagcatagag cttatgccct ttactagcag tgatacccta gatttaagta
 4981 ttgtggagga gacctcctt ggaggtagga ccagcacacc acgaaccaag cccctcctt
 5041 ctcggttgcc ttcccggagg tattatgaat atagagaaag cagtcttggg gagttatggt
 5101 cacctaggag ggctatgggt cccacgtata taaatcctgc ctttgaagct gaggatagta
 5161 tcctttttcc tgaatgtage atgcaggccg ctaatccaga ttacacagge attaccagge
 5221 ttggtcatct ctttgggtact gagcaggggt gccgtgtccg tattgggtct ctgggacaaa
 5281 agacatccct gcacacacgc agcggatggt caataggccc taaggcatac ttttataagg
 5341 acattttctag cttttctgtt gtcccagagg agagtataga actcagcacc tatacctcag
 5401 ctgccccttt ggggtgaggat gcaggataaa tagtggagga ctctatggag ggttcttttg
 5461 acaatatcac cctcagttct tggagtcatt gatccatgga cgggcttctt gaggatgatg
 L2 5521 ctagtattga ttttcacggc cacctgggtg ggggaacacg ccgtagctct aagcaaataa
 5581 gcatgccatt ccgccggtcg tggatcctg aaactgctgt gtacgtgcag gagggtgggt
 5641 ctgtaatgga tcctgaggct tctgcagagc tggttcccag tagggacagt gctcgtcccc
 5701 atgtcatata taggggctat aatgggacgg actattatct acaccgctca ttgtccagac
 5761 gcaggcgtaa cagcaggcat atctatcttt cagatggcgt **actggctgcc** taataaccag
 5821 aagttgtacc tgccccggc cccgggtgcag cgcatactgt ctacagatga atttactaca
 5881 cgaacagaca tatattacta tgctagtagt gacaggttat taactgttgg taatccatat
 5941 tatcctatac tggatgggga tactgttact gttcctaagg tcagtcctaa tcaatacagg
 6001 gtgttccggt gtaaattacc ggaccctaac cggtttgcatt ttggtgagaa gtcggtttac
 6061 gacctgaga agcaacggct tgcatggtgt atacggggag tggagatagc tcgtggccaa
 6121 cctctgggaa tagggattac tgggcatccc ctatataaca ggctagagga tgtggagaac
 6181 cctggaaagt atccatctgc tccgggcacg gacaatagac aaaatgtagg ccttgatccg
 6241 aagcagactc agatgtttat tgtcgggtgt gtacctgcac aggggtgagca ctggagtaga
 6301 gcacttacct gcagcaatca ggtggttaag aagggtgact gtccacctat tcagcggatg
 6361 tctgggatga ttgaggatgg tgacatgggg gacatagggt atggcaactt agacttccga
 6421 gtgttgacag aaaacaagtc agaggttccc ctcgaggtag ttgactctat ctgtaagtac
 L1 6481 cccgattatt taggaatgtc caaggaaacc cacggcaact catgcttctt ctatgctagg
 6541 caggcgagat tatacagcag gcacttcttt aaccgtgcag gtgttcaggg tgagactgtg
 6601 ccggagtcat tatacaagaa gggcaaggat ggacaggcac agagcacact ggcactagct
 6661 acatactcag ggactccgtc agggtcacta gtgtcatctg atgctgtact gttcaaccgt
 6721 ccatactggc ttgagagggc acaaggacaa aacaatggca ttctgtggaa taatgatttg
 6781 ttcgtgaccg tgctggacaa cactcgtggg acccatttct ccatcagcat tgctacacag
 6841 gatgaaaatg attacaccgc ctcaactac aagcaatata ctcgacatgt tgaagaattt
 6901 gagcttgaat ttatcttcca actgggttaag atcaaccttt ctactgaggt gctagcatac
 6961 ctgcatggga tggaccatc tatactggat aactggaact tgactctggg acccccact
 7021 gatggtagcc ttgctgataa gtacagattt atagaatccc ttgctacaaa atgcccgtac
 7081 aatgtggaag tcactaagcc tgatccctac aaaggacgga tattctggaa cattgacctg
 7141 actgaaagac tgacagctga tctggaccaa ttctcacttg gacggaagtt cctctaccag
 7201 cacgcgcgaa tttcaaaccg taaacggctc cttcctgctt ccagaaacg cggcgggaacc

7261 tcctcctctt ccaccaagcg gagaaaaaaaa tagttggaat aaagactgct gacactgcac
7321 ttgtgtcccg ctttttctta atcccgcctt tgctggggct gcagtacagc acgctgcaa
7381 gtttatggga ggtgctggaa cactgggdcg tgcttggatc cggaatgcgc cgccttggaa
7441 gccagcgcca gtcttgttca gacaccgaga cgccaggtgt gcagcttcat tggcgcaccg
7501 tgccaggtat acctctttcg gtgcagttct tatgccaagt ctattggtgc tttttgcaa
7561 ctcggtgagt aacatcctgc ttggcactgt ctgcgacgta cctgctgcag agacttgtac
7621 cgggtgcggt acttggcagt acaaacacaa ttaggtttgg acaagaccga tatgggtgtg
7681 aatggtg

10.3 Untersuchungen unter Immunsuppression

10.3.1 Daten der untersuchten Tiere

Rapa			CsA			Kontrolle		
Tier	Geschlecht	Geburtsdatum	Tier	Geschlecht	Geburtsdatum	Tier	Geschlecht	Geburtsdatum
1a	m	10.08.2005	10a	m	10.08.2005	20a	m	04.07.2005
1b	m	10.08.2005	10b	m	10.08.2005	20b	m	04.07.2005
2a	m	28.08.2005	11a	m	28.08.2005	21a	m	18.07.2005
2b	m	28.08.2005	11b	m	28.08.2005	21b	m	18.07.2005
3a	m	31.08.2005	12a	m	31.08.2005	22a	m	08.06.2005
3b	m	31.08.2005	12b	m	31.08.2005	22b	m	08.06.2005
4a	m	28.08.2005	13a	m	28.08.2005	22c	m	08.06.2005
4b	m	28.08.2005	13b	m	28.08.2005	22d	m	08.06.2005
5a	w	30.08.2005	14a	w	30.08.2005	23a	m	18.06.2005
5b	w	30.08.2005	14b	w	30.08.2005	23b	m	18.06.2005
5c	w	30.08.2005	14c	w	30.08.2005	23c	m	18.06.2005
5d	w	30.08.2005	14d	w	30.08.2005	24a	w	30.08.2005
5e	w	30.08.2005	14e	w	30.08.2005	24b	w	30.08.2005
6a	w	28.08.2005	15a	w	28.08.2005	25a	w	08.06.2005
6b	w	28.08.2005	15b	w	28.08.2005	25b	w	08.06.2005
6c	w	28.08.2005	16a	m	31.08.2005	25c	w	08.06.2005
7a	m	31.08.2005	16b	m	31.08.2005	26a	w	08.06.2005
7b	m	31.08.2005	17a	m	24.07.2005	26b	w	08.06.2005
8a	m	24.07.2005	17b	m	24.07.2005	26c	w	08.06.2005
8b	m	24.07.2005	17c	m	24.07.2005	27a	m	18.06.2005
8c	m	24.07.2005	18a	m	02.09.2005	27b	m	18.06.2005
9a	m	02.09.2005	18b	m	02.09.2005	27c	m	18.06.2005
9b	m	02.09.2005				28a	m	09.06.2005
						28b	m	09.06.2005
						28c	m	09.06.2005

Tiere mit gleichen Nummern bezeichnen Geschwister
 Geschlecht: m=männlich, w=weiblich

10.3.2 Tumor und Augenentzündung

Tier	Gruppe	Geschlecht	Zeitpunkt 1. Tumor in Wochen	Anzahl der Tumore pro Tier	Zeitpunkt Augenentzündung in Wochen	Grund für Tod	Todeszeitpunkt in Wochen
1a	R	m	22	3		1	29
1b	R	m	22	2		1	29
2a	R	m	37	3	26	4	43
2b	R	m	39	1		4	43
3a	R	m		0	23	2	39
3b	R	m		0	17	2	24
4a	R	m		0	23	2	26
4b	R	m		0	22	2	24
5a	R	w		0	26	4	43
5b	R	w		0	25	2	26
5c	R	w	37	1	22	4	43
5d	R	w		0	25	2	39
5e	R	w		0	26	2	39
6a	R	w	22	3	27	4	43
6b	R	w		0		4	43
6c	R	w	23	1	23	1	29
7a	R	m		0	23	2	39
7b	R	m	27	1	25	2	37
8a	R	m		0		0	4
8b	R	m		0	17	2	24
8c	R	m	19	2	17	1	24
9a	R	m		0		4	43
9b	R	m		0		4	43
10a	C	m	27	1	26	3	37
10b	C	m	27	7		1	32
11a	C	m	22	0	23	2	24
11b	C	m	21	3		1	28
12a	C	m		0	21	2	24
12b	C	m	21	3		1	24
13a	C	m	7	1		1	23
13b	C	m		0	26	2	39
14a	C	w		0		0	43
14b	C	w	22	1	25	2	37
14c	C	w		0	23	2	26
14d	C	w	39	1		4	43
14e	C	w		0		3	39
15a	C	w	25	2		3	40
15b	C	w		0		4	43
16a	C	m	19	2		1	23
16b	C	m	19	2	25	4	43
17a	C	m	21	1		1	24
17b	C	m		0	17	2	24
17c	C	m	37	1	26	4	43
18a	C	m		0		4	43
18b	C	m		0		3	37
20a	K	m	22	1	27	0	42
20b	K	m		0		4	43
21a	K	m	19	2	22	1	24
21b	K	m	19	4		0	31
22a	K	m	31	2		1	33
22b	K	m	28	3	26	1	39
22c	K	m	37	1	27	1	39
22d	K	m	22	2		1	24

Tier	Gruppe	Geschlecht	Zeitpunkt 1. Tumor in Wochen	Anzahl der Tumore pro Tier	Zeitpunkt Augenentzündung in Wochen	Grund für Tod	Todeszeitpunkt in Wochen
23a	K	m	19	5		1	24
23b	K	m	19	2	25	3	33
23c	K	m	19	1	25	0	31
24a	K	w		0	22	2	33
24b	K	w		0		4	43
25a	K	w		0		4	43
25b	K	w		0		4	43
25c	K	w		0		4	43
26a	K	w		0	18	4	43
26b	K	w		0	18	4	43
26c	K	w		0	18	4	43
27a	K	m	25	2		4	43
27b	K	m		0		0	33
27c	K	m	30	3		0	35
28a	K	m	6	6		1	10
28b	K	m	7	1		1	11
28c	K	m	7	2		1	11

Tiere: Bei den Tieren mit gleicher Nummer handelt es sich um Geschwister

Gruppe: R=Rapa, C=CsA, K=Kontrolle

Geschlecht: m=männlich, w=weiblich

Zeitpunkt 1. Tumor in Wochen nach Versuchsbeginn

Zeitpunkt Augenentzündung in Wochen nach Versuchsbeginn

Grund für Tod: 0=gestorben, 1=Tumor, 2=Augenentzündung, 3=schlechter Allgemeinzustand, 4=Versuchsende

Todeszeitpunkt in Wochen nach Versuchsbeginn

10.3.3 Kontrolle der Wirkstoffspiegel im Blut

Rapa (ng/ml)		
27,16	25,1	27,2
24,1	20,9	20,5
23	29,3	18,5
35,1	29,6	25,6
34,6	30,7	15,7
24,8	31,1	24,5
58,1	46,2	15,2
56,5	51,6	19,8
32,6	40	16
13,8	33,4	14,6
38,2	34,9	19,8
59,6	28,2	17,3
32,1	39,4	7,07
49,9	27,7	4,36
64,3	31	4,77
16,9	35,7	8,53
25,1	44,8	7,36
21,1	9,8	8,89
7,44	11,3	

CsA (ng/ml)	
867	116
707	195
366	261
308	172
352	286
521	177
264	183
396	225
332	185
144	332
242	203
324	238
264	170
168	188
318	213
314	171
98	161
300	219

Anzahl der Blutentnahmen

n=55

n=36

Mittelwert

27 ng/ml +- 2

277 ng/ml +- 26

Standardabweichung

15 (max: 64, min: 4)

154 (max 867, min 98)

11 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Frank Rösl vom Forschungsschwerpunkt Angewandte Tumorstudiologie am DKFZ Heidelberg danke ich herzlich für die Überlassung des Themas, die hervorragende Betreuung dieser Arbeit sowie die liebenswerte Aufnahme in seine Arbeitsgruppe.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Heinz-Jürgen Thiel vom Institut für Virologie, Fachbereich Veterinärmedizin, der Justus-Liebig-Universität Gießen danke ich sehr für die Vertretung dieser Arbeit am Fachbereich Veterinärmedizin und sein damit verbundenes Vertrauen.

Desweiteren gilt mein Dank unseren Kollaborationspartnern in der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Charité Berlin. Insbesondere danke ich Frau Anja Köhler für die Durchführung der Realtime-PCR-Analysen sowie die Einführung in die *in situ*-Hybridisierung.

Ebenso möchte ich mich bei unseren Kollaborationspartnern der Klinik und Poliklinik für Chirurgie, Abteilung Experimentelle Chirurgie des Universitätsklinikums Regensburg für die gute Zusammenarbeit im Rahmen des „Rapa/Cyclo“-Projektes bedanken. Insbesondere danke ich Frau Dr. Gudrun Köhl für die Untersuchung der Blutproben.

Vielen Dank an Frau Birgit Hub aus der Abteilung für Virus-Charakterisierung am DKFZ für die Durchführung der elektronenmikroskopischen Arbeiten. Darüber hinaus bin Frau PD Dr. Annette Kopp-Schneider, Abteilung für Biostatistik, DKFZ, für ihre Hilfe bei den statistischen Auswertungen zu Dank verbunden.

Ein herzliches Dankeschön geht an meine Laborkolleginnen Julia Nafz, Verena Fleig, Katalin Darvas, Andreea Csernok und Handan Karaduman für die phantastische Atmosphäre in der Arbeitsgruppe und das tapfere Zuhören bei meinen Erzählungen aus dem Tierarztalltag. Mein besonderer Dank gilt meinem Laborkollegen Kai Schäfer, der sich so heldenhaft allein unter Frauen gehalten hat, für unsere fruchtbaren Diskussionen in Sachen *Mastomys* und anderen Dingen.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Projekt-Mitstreiterin und Bench-Nachbarin Julia Nafz für ihre gründliche Einführung in die Laborwelt, ihre unendliche Geduld bei unzähligen Fragen und Problemen sowie ihre liebevolle Rückenstärkung bei der Fertigstellung und nicht zuletzt die sorgfältige Korrektur meiner Arbeit. Liebe Julia, Dich kennen zu lernen war die ganze Mühe wert!

Meiner Studienfreundin Barbara Bank-Wolf ein herzliches Dankeschön für ihre wertvollen Tipps zur Erstellung meiner Arbeit sowie ihr unermüdliches Korrektur lesen. Liebe Babsi, nach diversen Parallelen in unserem Leben, die wir erfolgreich zusammen gemeistert haben, werden wir hoffentlich auch zukünftige „Projekte“ gemeinsam bewältigen - und diese „traditionell“ feiern.

Großer Dank gilt auch meiner Schulfreundin Eva Porea, die mir jederzeit bei computertechnischen Fragen (und Katastrophen) zur Seite stand und mich aus so mancher verfahrenerer Situation gerettet hat. Liebe Eva, 1000 Dank, dass Du mich immer wieder ermutigt hast und von Anfang an an die Fertigstellung dieser Arbeit geglaubt hast!

Meinen besonderen Dank möchte ich meinen Eltern aussprechen, die mir mein Studium sowie die Erstellung dieser Arbeit ermöglicht und mich in meinen Ideen jederzeit bestärkt haben. Vielen lieben Dank, dass Ihr immer für mich da gewesen seid! Darüber hinaus danke ich auch meiner restlichen Familie, die mich mit guten Gedanken bei allen durchlebten Höhen und Tiefen unterstützt hat.

Last but not least I wish to thank my husband for his love and faith in me. Dear David, I really appreciate your support especially in the final episode of my thesis. I believe you were only able to stand my permanently changing moods due to your special kind of humour...Thank you ever so much for everything! Cheers!

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

ISBN 3-8359-5272-2

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de



9 17 8 3 8 3 5 11 9 5 2 7 2 0 1