

1 EINLEITUNG

1.1 Nicht-melanozytäre Hauttumore

Die Entstehung nicht-melanozytärer Hauttumore (engl. *non-melanoma skin cancer*, NMSC; epithelialer Hautkrebs) wird von vielen Faktoren beeinflusst (Abbildung 1.1). Die überwiegend an Sonnenlicht-exponierten Arealen des Körpers hellhäutiger Menschen auftretenden Krebstumore entstehen vor allem durch die mutagene Wirkung ultravioletter (UV) Strahlung (Marks et al., 1988; Nindl et al., 2007). Durch die Schädigung der Ozonschicht und die vermehrt unter Sonneneinstrahlung stattfindenden Freizeitaktivitäten (Urlaub, Sport, Solarium), werden Menschen einer höheren Dosis an UV-Strahlung ausgesetzt als noch zu Beginn des 20. Jahrhunderts (Godar, 2005; Urbach, 2002). Zusätzlich stieg die durchschnittliche Lebenserwartung in den vergangenen 100 Jahren um etwa 40 Jahre (<http://www.destatis.de/presse/deutsch/pm2004/p4860022.htm>). Mit zunehmendem Alter, das mit einer Anhäufung von Mutationen verbunden ist, wird allgemein eine Zunahme der Krebserkrankungen beobachtet, insbesondere die Anzahl der NMSC (Ouhtit et al., 1997). Neben der Schädigung im Erbgut führt UV-Licht auch zu einer lokalen, zeitweisen Unterdrückung des Immunsystems, die zur Manifestierung geschädigter Zellen führt (de Gruijl, 1999; Green et al., 1999).

NMSC ist die häufigste Krebsart bei Menschen hellen Hauttyps (Hauttyp I-III nach Fitzpatrick, 1988). In der US-amerikanischen Bevölkerung kaukasischer Abstammung sind beispielsweise 30% aller Krebserkrankungen NMSC (Silverberg et al., 1990). Für Deutschland existieren aufgrund der fehlenden Registrierungspflicht nur wenige Angaben, europäische Studien zeigen jedoch vergleichbare Daten (Diepgen & Mahler, 2002; Katalinic et al., 2003). Die Häufigkeit maligner Melanome (schwarzer Hautkrebs) beträgt im Vergleich zu NMSC nur ein Zehntel (Katalinic et al., 2003). Zu den NMSC zählen Basalzellkarzinome (*basal cell carcinoma*, BCC), Plattenepithelkarzinome (*squamous cell carcinoma*, SCC), sowie deren Vorstufe, die Aktinische (oder Solare) Keratose (AK) (Nindl et al., 2007). Über 80% der nicht-melanozytären Hauttumore sind BCC, die damit die häufigste Krebserkrankung überhaupt darstellen (Diepgen & Mahler, 2002; Katalinic et al., 2003).

Bei der Entstehung kutaner SCC rückte in den letzten Jahren ein neuer Aspekt immer mehr in den Fokus der Untersuchungen – die Infektion nicht-melanozytärer Hauttumore mit humanen Papillomaviren (HPV). Humane Papillomaviren (HPV) können sowohl die

Reparatur von UV-geschädigter DNA (Giampieri & Storey, 2004; Smith et al., 1995) als auch den programmierten Zelltod (Apoptose) betroffener Zellen hemmen (Giampieri et al., 2004).

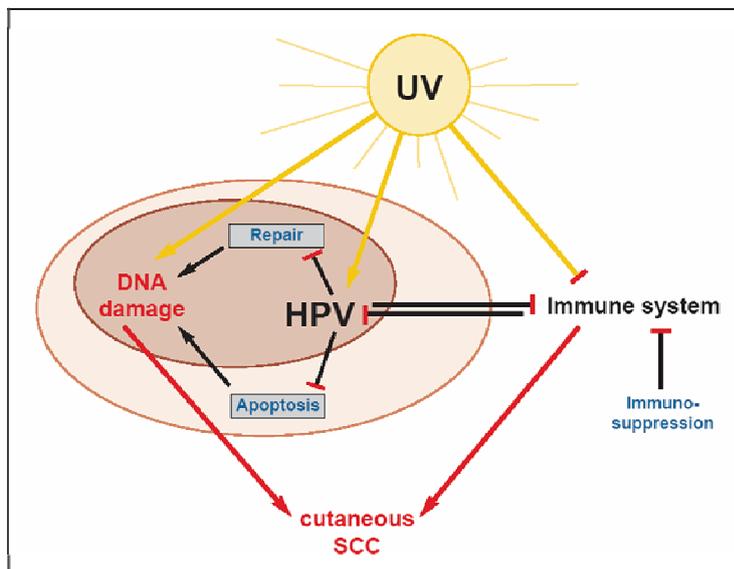


Abbildung 1.1: Die Risikofaktoren für die Entstehung von kutanen Plattenepithelkarzinomen (SCC). UV-Licht und der Immunstatus sind dabei die wichtigsten Faktoren. Daneben kann die Präsenz von Humanen Papillomaviren (HPV) die Reparatur von UV-geschädigter DNA hemmen als auch die Apoptose von Zellen.

Abbildung entnommen aus:
Nindl et al., 2007

1.2 Papillomavirus-assoziierte Krankheiten

Papillomaviren (PV) induzieren Läsionen, wobei Hautwarzen die wohl bekanntesten sind. Beschreibungen dieser auch als Papillome bezeichneten Wucherungen auf Haut und Schleimhaut des Menschen sind schon aus der Antike überliefert (Hippocrates, 400 BC, Celsus, 25 AD). Um die Wende zum 20. Jahrhundert wurde erstmals die Übertragung eines infektiösen Agens aus Warzen beschrieben (Ciuffo, 1907; Licht, 1894). Allerdings konnte die virale Natur des auslösenden Agens erst ein halbes Jahrhundert später durch elektronenmikroskopische Aufnahmen der Viren sowohl aus Haut- als auch aus Genitalwarzen des Menschen gezeigt werden (Almeida et al., 1969; Dunn & Ogilvie, 1968; Strauss et al., 1949). Aus der morphologisch einheitlichen Struktur der Viruspartikel wurde geschlossen, dass es sich möglicherweise um ein und dasselbe Virus handelt, welches beide Läsionen gleichermaßen verursacht. Erst durch die molekularbiologische Charakterisierung und Sequenzierung von Virusisolaten fand man heraus, dass PV eine große Diversität aufweisen. Über 130 Typen sind bis heute aus verschiedenen Warmblütern wie Vögeln und Säugetieren (einschließlich des Menschen) isoliert, charakterisiert und vollständig sequenziert worden (de Villiers et al., 2004; Gottschling et al., 2007b). Aufgrund der Assoziation von PV und verschiedenen humanen Krankheitsbildern stammen etwa 100 der bislang isolierten PV Genome vom Menschen (Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: Papillomavirus-assoziierte Erkrankungen des Menschen

Maligne und benigne Hauttumore	assoziierte HPV-Typen
plantare Warzen	1,2,4,63
gewöhnliche Warzen	1,2,4,7,26-29,57,60,65,75-78
flache Warzen	2,3,10,26-29,41,49
Metzgerwarzen	7
<i>Epidermodysplasia verruciformis</i> (EV)	5,8,9,12,14,15, 17,19,20-25,36-38,46,47,48,49
maligne Tumore von Nicht-EV-Patienten	1-6,8,10,11,14-16,18-20,23-25,27,29,26,38,41,47,48, unklassifizierte Typen
Anogenitale Tumore	
genitale Warzen (HPV geringen Risikos)	6,11,40,42,43,44,54,61,70,72,81,CP6108*
CIN, VAIN, VIN, PIN, PAIN	6,11,16,18,30,31,33-35,39,40,42-45,51,53,56-59,61, 62,64,66-74,79,82-86
Zervikales Karzinom (HPV hohen Risikos)	16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,68,73,82*
(mittleren Risikos)	26,53,66*

CIN, VAIN, VIN, PIN, PAIN: Intraepitheliale Neoplasie von Zervix, Vagina, Vulva, Penis, beziehungsweise Perianus adaptiert nach (Doerr & Adrian, 2002)
 *entnommen aus (Munoz et al., 2003)

1.3 Genomorganisation und Klassifikation der Papillomaviren

PV gehören zu den hüllenlosen DNA-Viren. Ihre infektiösen Viruspartikel sind ikosaedrisch und bauen sich aus 72 pentameren Kapsidproteinkomplexen auf. Das Genom der 55 nm großen Virionen besteht aus einer zirkulären, doppelsträngigen DNA und umfasst ungefähr 8.000 Basenpaare (Pfister et al., 1986). Die nur auf einem DNA-Strang kodierte, genetische Information wird in 3 Bereiche eingeteilt (siehe Abbildung 1.2):

- eine früh (engl. *early*, E) transkribierte Region, die mehrere offene Leserahmen (engl. *open reading frames*, ORF) einschließlich der großen Gene E1 und E2 für regulatorische Proteine der Transkription, Replikation und Transformation umfasst,
- eine spät (engl. *late*, L) transkribierte Region, welche 2 ORF für das große Hauptstrukturprotein L1 und das kleine Kapsidprotein L2 enthält und
- eine nicht-kodierende Region (engl. *non-coding region*, NCR), auch *long-control region* (engl., LCR) genannt, in der sich Regulationselemente der viralen Proteine befinden.

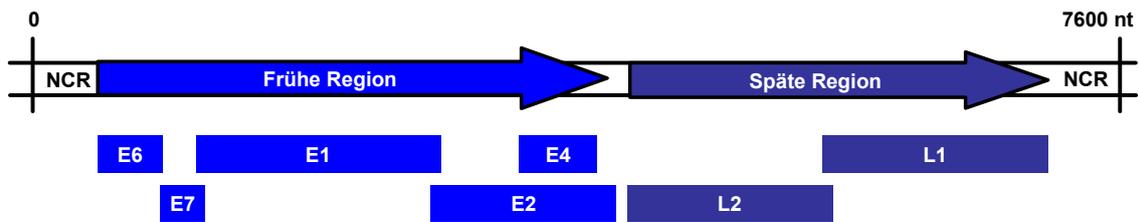


Abbildung 1.2: Organisation des HPV-8 Genoms. Das zirkuläre Genom besteht aus 7 offenen Leserahmen der früh beziehungsweise spät transkribierten Gene. Zwischen L1 und E6 liegen Regulationssequenzen im nicht-kodierenden Bereich (NCR).

Das L1-Protein ist phylogenetisch unter den 4 großen Genen am konserviertesten (Garcia-Vallve et al., 2005). Der Sequenzvergleich des L1 Gens dient als Grundlage zur Unterscheidung von Gruppen auf unterschiedlichem taxonomischen Niveau (Tabelle 1.2). In aktuellen phylogenetischen Analysen werden neben den L1 Sequenzdaten auch Informationen anderer Gene (z. B. E1, E2, L2) verwendet (Abbildung 1.3). Danach wird die Existenz der oben umrissenen Gruppierungen weitestgehend bestätigt (Gottschling et al., 2007b; Narechania et al., 2005; Rector et al., 2005).

Tabelle 1.2: Einteilung von Gattungen, Arten, Typen, Subtypen und Varianten von PV aufgrund der Sequenzidentität des L1-Gens, entnommen aus: (de Villiers et al., 2004)

Taxonomisches Niveau (Kategorie)	Sequenzähnlichkeit des L1 Gens
Gattung (Genus)	bis zu 60%
Art (Spezies)	60–70%
Typ	71–89%
Subtyp	90–98%
Variante	über 98%

Die Gruppierungen der taxonomischen Kategorie ‚Gattung‘ werden traditionell mit griechischen Buchstaben versehen (z. B. α -, δ - und λ -PV, die jeweils auf Primaten, Huftieren beziehungsweise Raubtieren vorkommen: (de Villiers et al., 2004). Die meisten HPV finden sich in 2 großen Gruppen, die allerdings nicht näher miteinander verwandt sind, nämlich α - und β -PV. Daneben gibt es noch kleinere Gruppierungen wie γ -, μ - und ν -PV, deren Diversität aber derzeit unzureichend erforscht ist.

Aufgrund ihrer Wirts- und Gewebespezifität vermutet man eine strikt wirtsgebundene Evolution von Papillomaviren (Bernard et al., 2006; Chan et al., 1995), wie man sie beispielsweise auch von Herpes-Viren kennt (McGeoch et al., 2000). Die große Vielfalt der

PV und ihre phylogenetische Analyse lässt vermuten, dass weitere evolutionäre Mechanismen wie adaptive Radiationen innerhalb eines Wirts und Infektionen über Artgrenzen hinweg bei der Diversifizierung von PV eine Rolle spielen (Gottschling et al., 2007a).

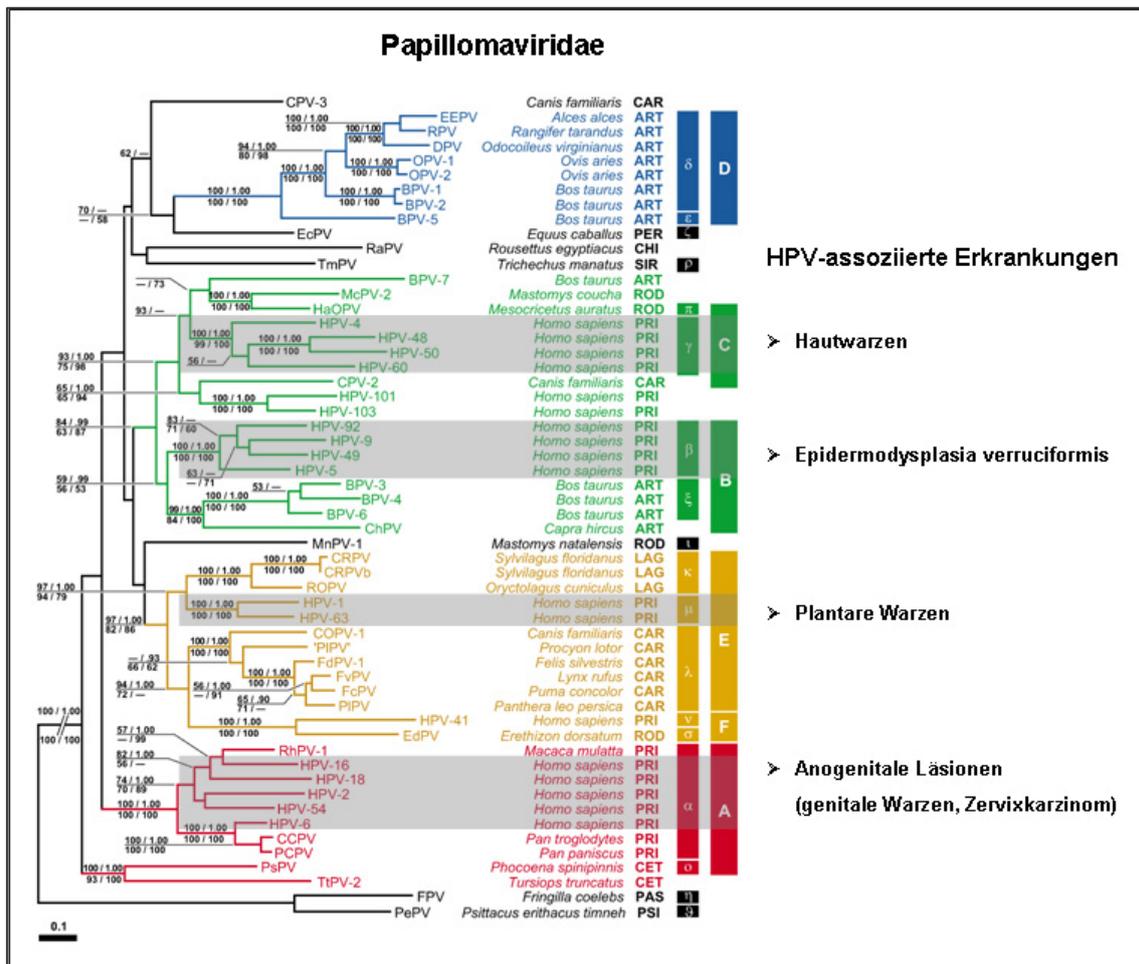


Abbildung 1.3: Stammbaum der Papillomaviridae (PV; gerechnet mit der Methode ‚Maximum Likelihood‘). Den Rechnungen liegen Aminosäure-Sequenzdaten der 3 großen Gene E1, E2 und L1-Gens von 56 repräsentativen PV-Typen zugrunde. Die Werte an den einzelnen Ästen stammen aus statistischen Erhebungen, die angeben wie gut die jeweilige Verzweigung gestützt ist. Taxonomische Gruppierungen wie α -, β - oder γ -PV sind in den Balken auf der rechten Seite gekennzeichnet. Humane PV (HPV) sind grau unterlegt (entnommen aus: (Gottschling et al., 2007b))

1.4 Die Infektion der Haut

Die Infektion durch PV erfolgt vorwiegend über Hautkontakt, sie kann sich aber auch über Oberflächen unbelebter Objekte vollziehen. Folgen sind beispielsweise plantare Fußwarzen durch Infektionen im Schwimmbad (Gentles & Evans, 1973). Bei der

Übertragung von mukosalen HPV-Typen ist Geschlechtsverkehr die Hauptinfektionsquelle. Aus diesem Grund zählen genitale Feigwarzen und Zervixkarzinome zu den sexuell übertragbaren Krankheiten (engl. *sexually transmitted diseases*, STD).

Die Entwicklung von Papillomaviren ist eng verbunden mit der Differenzierung von Epithelzellen (Doorbar, 2005; Stubenrauch & Laimins, 1999). Es umfasst den Prozess mit Beginn der Infektion der Basalzellen bis zur Freisetzung der Viren durch das Absterben der äußeren Hautzellen (Abbildung 1.4). Durch Verletzungen der Oberhaut dringen Viruspartikel in tiefere Zellschichten bis zu den Basalzellen vor und werden über die Bindung an Zelloberflächenrezeptoren in die Zellen eingeschleust. Über die Natur der beteiligten Rezeptoren existieren verschiedene Theorien, die zum einen auf eine Beteiligung von Heparinsulfaten (Giroglou et al., 2001; Joyce et al., 1999) oder aber auf eine Bindung über Integrinrezeptoren schließen lassen (Evander et al., 1997; Patterson et al., 2005).

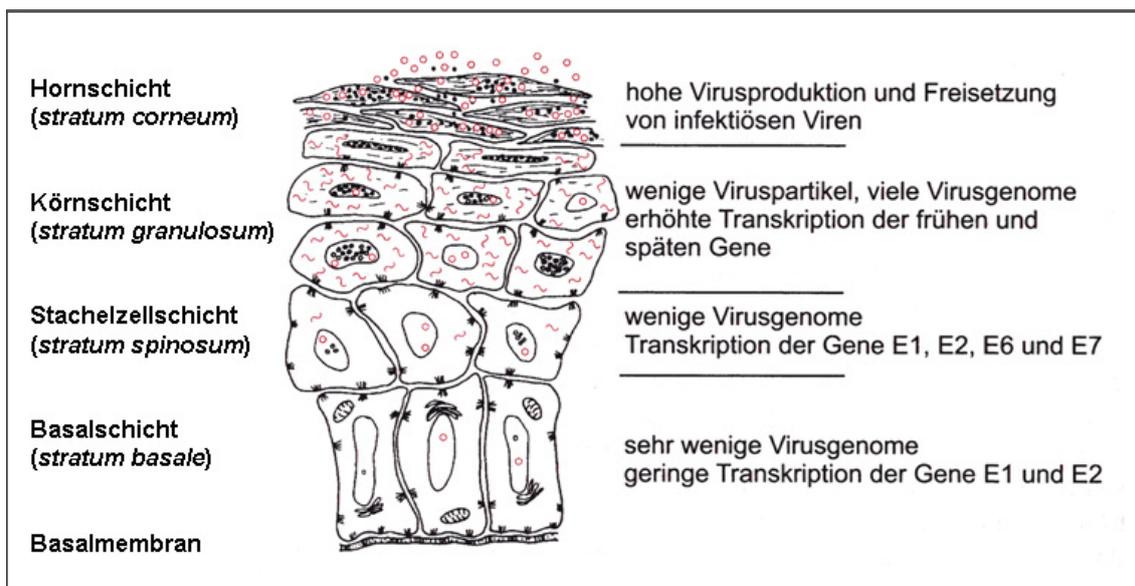


Abbildung 1.4: Verlauf einer produktiven Infektion von Papillomaviren im Hautepithel. Links sind die unterschiedlichen Epithelschichten (Schichten, lat. *strata*) bezeichnet und auf der rechten Seite die sich in den einzelnen Schichten vollziehenden Virus-spezifischen Veränderungen von Replikation und Transkription. Das Bild wurde entnommen aus: (Modrow et al., 2003).

Das Virus wird durch Endozytose aufgenommen und die DNA in den Kern transportiert. Die virale DNA verbleibt hier in geringer Kopienzahl bis zur weiteren Differenzierung der basalen Epithelzellen (lat. *stratum basale*) (Skiadopoulos & McBride, 1998). Durch die beginnende Differenzierung der Zellen erfolgt eine Umstrukturierung in der

Proteinausstattung der Zelle. Dadurch ändern sich auch die Bedingungen für das Virus, und die Produktion von Virusproteinen wird induziert. In den undifferenzierten Basalzellen findet anfänglich die Transkription der für die Virusreplikation notwendigen frühen Gene E1 und E2 zunächst nur in geringem Maße statt. In den darüber liegenden Zellen der Stachelzellschicht (lat. *stratum spinosum*) und Körnschicht (lat. *stratum granulosum*) erhöht sich die Transkription und Translation der viruseigenen Proteine, und das Virusgenom wird repliziert. Abschließend werden in den äußeren Hornzellen (lat. *stratum corneum*) der Haut oder Schleimhaut vollständige Viruspartikel aus Genom und Kapsidproteinen zusammengefügt und durch Abschuppung an der Oberfläche freigegeben (Bryan & Brown, 2001; Doorbar, 2005; Zhou et al., 1994).

Durch Untersuchungen von *Cottontailrabbit*-Papillomavirus (CRPV) in seinem natürlichen Wirt wurde gezeigt, dass das Virus auch in epidermalen Haarfollikelzellen nachweisbar ist (Schmitt et al., 1996). Die Ergebnisse verschiedener Untersuchungen zeigen, dass follikuläre Zellen den Viren als Reservoir dienen können (Boxman et al., 1997; Diaz-Cascajo et al., 2004). In einigen Studien wurden gezupfte Augenbrauen als klinische Probe für die HPV-Typisierung eingesetzt (Boxman et al., 2000; Struijk et al., 2003; Wolf et al., 2004). Eine systematische Untersuchung, ob derartige Proben den tatsächlichen HPV-Status kutaner Typen eines Menschen repräsentieren, ist bisher aber noch nicht durchgeführt worden.

1.5 Humane Papillomaviren und die Entstehung von Schleimhauttumoren

Die bislang am besten untersuchte Gattung der Papillomaviren, die α -PV (Abbildung 1.5), infizieren die Schleimhäute (Mukosa) des Anogenitaltraktes. Hier sind sie ursächlich an der Entstehung gutartiger und bösartiger Läsionen beteiligt (zur Hausen, 1996b; zur Hausen, 2002). In gutartigen Tumoren wie genitalen Feigwarzen (*Condylomata acuminata*) werden vor allem α -PV wie HPV-6 und HPV-11 gefunden, die als HPV-Typen geringen Risikos (engl. *low risk*; LR) bezüglich der Entwicklung maligner Tumore gelten (Munoz et al., 2003). Einige der durch spezifische HPV-Typen induzierten Läsionen zeigen aber ein erhöhtes Risiko, sich zu Karzinomen (z. B. der Zervix: Gebärmutterhalskrebs, *Carcinoma cervicis*) zu entwickeln. Diese onkogenen HPV-Typen zu denen HPV-16 und -18 gehören, bezeichnet man als Hoch-Risiko Typen (engl. *high risk*; HR). Nahezu 100% der Zervixkarzinome sind

mit HPV infiziert (Munoz et al., 2003; Munoz et al., 2006; Walboomers et al., 1999) und in etwa 70% können die HR-Typen HPV-16 oder -18 nachgewiesen werden. Auch in anderen Schleimhauttumoren (Vagina, Anus, Vulva, Penis, Oropharynx) sind in über 30% HPV-16 oder -18 zu finden (Bosch & Munoz, 2002; Kreimer et al., 2005; Munoz et al., 2006).

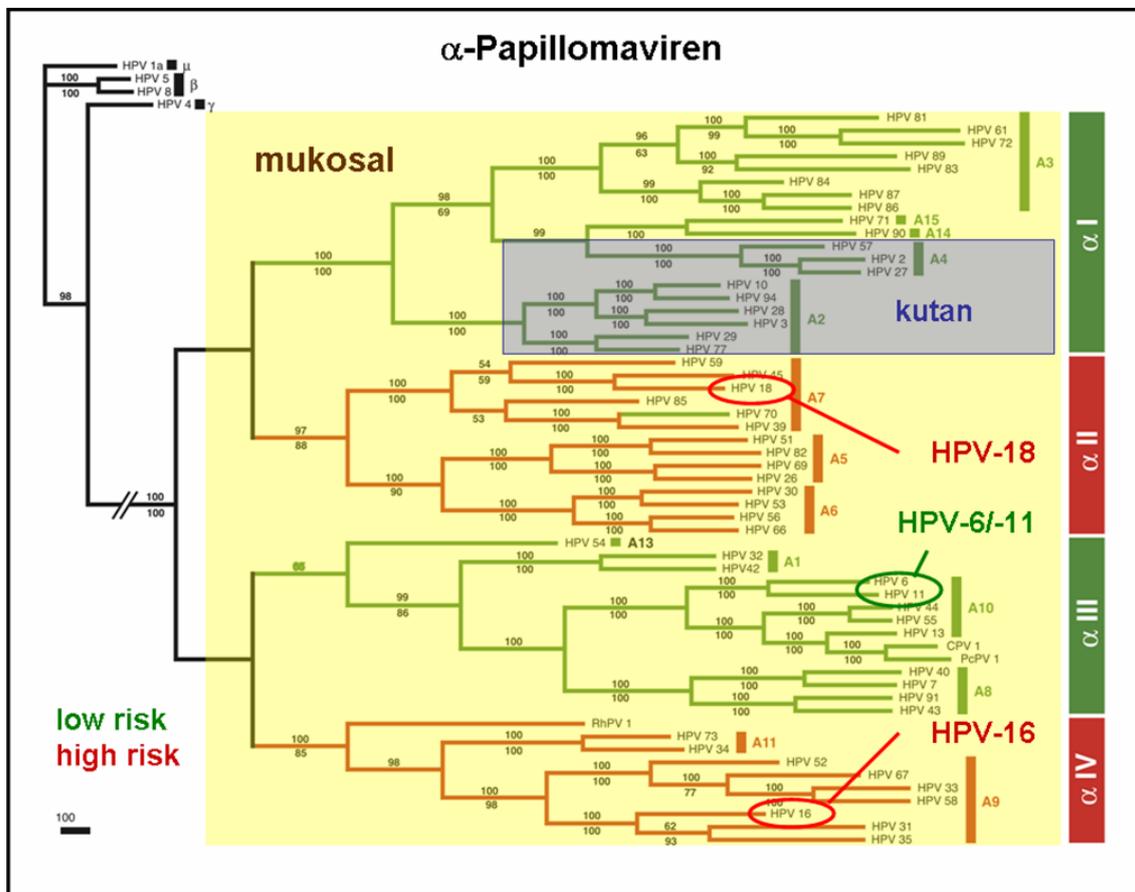


Abbildung 1.5: Stammbaum der α -PV (gerechnet mit dem Kriterium ‚Maximum Likelihood‘). Den Rechnungen liegen Nukleotid-Sequenzdaten alinierbarer Bereiche des gesamten Genoms von 57 PV-Typen zugrunde (β -, γ - und μ -PV dienen als Außengruppe). Die Werte an den einzelnen Ästen stammen aus statistischen Erhebungen, die angeben wie gut die jeweilige Verzweigung gestützt ist (Gottschling, unveröffentlichte Daten).

Aus evolutionsbiologischer Sicht verwundert es, dass zu den α -PV Verursacher mukosaler Krebserkrankungen zählen. Normalerweise ist es im Interesse der Pathogenen, den Wirt weitestgehend zu schonen, da sie sich beim Tod des Wirtes die Existenzgrundlage entziehen würden. In phylogenetischen Analysen konnte festgestellt werden, dass sich HR- und LR-Typen innerhalb der α -PV in jeweils 2 voneinander getrennte Gruppen einordnen lassen (Narechania et al., 2005). Das Gefahrenpotential einiger α -PV konnte dadurch leichter eingeschätzt werden (Munoz et al., 2003; Van Ranst et al., 1992). Obwohl auch zwischen der

Entwicklung von epithelialen Hauttumoren und der Präsenz spezifischer HPV-Typen ein Zusammenhang vermutet wird, kann für die andere große Gruppe der PV, die β -PV, eine solche Einteilung bisher nicht vollzogen werden (Gottschling et al., 2007a).

Innerhalb der monophyletischen Gruppe der mukosalen α -PV sind auch HPV-Typen, die Auslöser kutaner Hautwarzen sind (Abbildung 1.5). Diese Warzen-assoziierten Typen der viralen Spezies A2 und A4 bilden evolutionär 2 distinkte Entwicklungslinien, die wahrscheinlich unabhängig voneinander die Haut neu besiedelt haben.

Funktionell unterscheiden sich HR- und LR-Typen bezüglich ihrer Fähigkeit zur Immortalisierung von Zellen. HR-HPV wie HPV-16 und HPV-18 sind in der Lage, humane Zellen *in vitro* zu immortalisieren (Dürst et al., 1987; Kaur & McDougall, 1988; Pirisi et al., 1987), was für LR-Typen bislang nicht gezeigt werden konnte. Die wohl bekanntesten immortalen Zelllinien HeLa und SiHa sind aus Zervixkarzinomen etabliert worden (Friedl et al., 1970; Scherer et al., 1953). Ihre Unsterblichkeit wird unter anderem darauf zurückgeführt, dass HPV-18 beziehungsweise HPV-16 im zellulären Genom integriert vorliegen und eine stabile Expression der Onkogene E6 und E7 gewährleisten (Robinson et al., 2005). Die Integration von HR-HPV ist zu unterschiedlichen Anteilen in anogenitalen Karzinomen nachgewiesen worden (Hudelist et al., 2004; Wentzensen et al., 2004).

Die viruseigenen Onkogene E6 und E7 der HR-HPV-Typen spielen durch ihre Interaktion mit *p53* (E6) und *pRB* (E7) eine Schlüsselrolle während der Karzinogenese der infizierten Zellen (Dyson et al., 1989; Scheffner et al., 1991). Durch die Aktivität des zytosolischen Virusproteins E6 der α -PV wird der Tumorsuppressor *p53* dem Ubiquitin-abhängigen proteasomalen Abbau zugeführt (Huibregtse et al., 1991; Scheffner et al., 1990; Werness et al., 1990). Dieser Vorgang führt bei der infizierten Zelle zu einer erhöhten Apoptoseresistenz (Tommasino & Crawford, 1995; zur Hausen, 2002). Außerdem gibt es Untersuchungen zur Interaktion von E6 mit anderen zellulären Faktoren wie *Gps2* (Degenhardt & Silverstein, 2001) oder *Bak* (Thomas & Banks, 1999). Das nukleär lokalisierte E7-Protein von α -PV degradiert *pRb*, wodurch die Inhibition des Transkriptionsfaktors *E2F* aufgehoben wird. In der Folge aktiviert *E2F* verschiedene, an der Replikation beteiligte Gene, und die Zellproliferation wird stimuliert (Dyson et al., 1989; Massimi & Banks, 2000).

1.6 Die Entstehung epithelialer Hauttumore

Die Entstehung nicht-melanozytärer Hauttumore ist weniger gut erforscht als die von anogenitalen Tumoren. Eine Rolle von HPV bei der Genese von NMSC-Tumoren wurde erstmals für Patienten mit der seltenen, familiär vererbten Krankheit *Epidermodysplasia verruciformis* (EV; (Lewandowsky & Lutz, 1922) beschrieben. EV-Patienten leiden an ausgeprägten polymorphen Warzen, die in etwa 30% der Fälle zu SCC progredieren (Jablonska et al., 1972; Orth et al., 1978). Aus den kutanen Läsionen von EV-Patienten konnten neue HPV-Typen isoliert werden, die als kutane/EV HPV-Typen bezeichnet werden. Die überwiegende Mehrzahl der kutanen/EV HPV-Typen gehören zu den β -PV (Fuchs & Pfister, 1990). Insbesondere HPV-5 und HPV-8 werden in bis zu 90% der malignen Tumoren von EV-Patienten gefunden (Majewski & Jablonska, 1997; Orth, 1986).

Nach der Entwicklung neuer, besonders sensitiver Nachweismethoden wurden in epithelialen Hauttumoren von Patienten ohne EV ebenfalls eine große Vielfalt von HPV-Typen, vor allem der kutanen/EV HPV-Typen nachgewiesen (Berkhout et al., 1995; Brink et al., 2005; Harwood et al., 1999b). Inwieweit spezifische PV auch bei der Entstehung von nicht-melanozytären Krebstumoren des Menschen beteiligt sind, muss also als bislang nicht abschließend geklärt angesehen werden (Akgül et al., 2006; Nindl et al., 2007).

Aufgrund der Untersuchung von EV-Patienten vermutete man erstmals, dass auch der Immunstatus einen Einfluss auf die Entwicklung von epithelialen Tumoren wie kutanen Warzen und SCC haben könnte. EV-Patienten leiden an einem Immundefekt, durch den Killerzellen (Majewski et al., 1990) und zytotoxische T-Zellen (Cooper et al., 1990) nur noch eingeschränkt infizierte Zellen angreifen können. Patienten mit erworbenen Immundefekten wie einer HIV-Infektion oder einer systemischen Immunsuppression (z. B. Organtransplantatempfänger, engl. *organ transplant recipients*: OTR) haben ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von NMSC (Birkeland et al., 1995; Harwood et al., 2000; Meyer et al., 2003; Stockfleth et al., 2001). Im Vergleich zur Normalbevölkerung besitzen OTR ein 100-fach erhöhtes Risiko SCC und ein 10-fach erhöhtes Risiko BCC zu entwickeln (Euvrard et al., 2003; Pfister, 2003). Etwa 50% der OTR entwickeln 10 bis 20 Jahre nach Transplantation epithelialen Hautkrebs (Ramsay et al., 2002). Zusätzlich ist die Gefahr sowohl eines Tumorrezidivs als auch der Metastasierung im Vergleich zu immunkompetenten NMSC-Patienten erhöht (Adamson et al., 1998; Liddington et al., 1989; Martinez et al., 2003). Die Hauttumorgenese stellt damit das größte gesundheitliche Problem neben der Abstoßung des Organs dar (Stockfleth et al., 2001).

Etwa 90% der immunsupprimierten OTR sind mit kutanen HPV-Typen infiziert. In nierentransplantierten NMSC-Patienten waren erhöhte Prävalenzen, mehr multiple HPV-Infektionen und höhere Viruslasten verglichen mit immunkompetenten NMSC-Patienten nachgewiesen worden (Pfister et al., 2003; Stark et al., 1994). Die HPV-Prävalenzrate für kutane SCC war bei immunsupprimierten OTR 80% und bei der Normalbevölkerung 30–50% bestimmt worden (Harwood et al., 1999a).

Bei OTR ist die Immunsuppression wahrscheinlich ein Co-Faktor während der Hauttumorgenese. Die Art des Immunsuppressivum ist dabei ebenfalls von Bedeutung. Das Immunsuppressivum Cyclosporin A wurde gezeigt, dass es zum einen die DNA-Reparatur hemmen kann zum anderen steigt die Produktion von TGF- β (*tumor growth factor*), die zur Tumorprogression und Invasion führt (Herman et al., 2001; Hojo et al., 1999). Neuartige Immunsuppressiva, speziell mTOR Inhibitoren, weisen dagegen einen anti-karzinogenen Effekt auf. Die Wirkung von mTOR Inhibitoren beruht auf der Hemmung von angiogenetischen, proliferativen und metastasierenden Effekten (Bjornsti & Houghton, 2004; Geissler et al., 2004; Guba et al., 2002; Luan et al., 2002). Es wurde bereits in Tiermodellen gezeigt, dass der mTOR Inhibitor Rapamycin eine anti-tumorigene Wirkung bei der Verabreichung immunsuppressiver Dosen hat (Guba et al., 2005). Im Tierversuch mit herztransplantierten Mäusen wurde außerdem demonstriert, dass Rapamycin auch vor einer Organabstoßung schützen kann (Koehl et al., 2004).

Die Kombination aller Faktoren, UV-Licht, Infektion mit Papillomaviren und Immunsuppression scheinen die wichtigsten Risikofaktoren der Hauttumorgenese zu sein. In den ersten 15 Jahren nach Transplantation bilden sich bei 90% der OTR vor allem an Sonnenlicht-exponierten Arealen des Körpers planare Warzen, die sich anfangs morphologisch nicht von Warzen immunkompetenter Patienten unterscheiden (Birkeland et al., 1995; Glover et al., 1994). Bei immunsupprimierten Patienten treten diese Warzen nicht nur besonders gehäuft auf, sondern persistieren auch mehrere Jahre. Mit der Dauer der Immunsuppression und der Persistenz der Warzen gibt es klinische Hinweise, dass sich gutartige Warzen möglicherweise in epitheliale Hauttumore weiterentwickeln können (Blessing et al., 1989; Euvrard et al., 1993). Zurzeit ist jedoch unbekannt, welche HPV-Typen die Warzenbildung bei immunsupprimierten Patienten verursachen und ob es möglicherweise HR-Typen für spätere morphologische Veränderungen gibt.

Im Gegensatz zu den HR-Typen der α -PV konnte man für kutane/EV HPV nur vereinzelt eine Integration ins Wirtsgenom nachweisen (Favre et al., 1997; Yabe et al., 1989).

Auch die Funktionen der viralen Gene E6 und E7, die durch die Interaktion mit den zellulären Proteinen *p53* beziehungsweise *pRb* bei den HR-HPV der α -PV eine onkogene Wirkung haben, sind bei den kutanen/EV HPV-Typen noch weitgehend ungeklärt. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass in Anwesenheit kutaner HPV-Typen nach UV-Exposition eine *p53*-unabhängige Apoptose-Inhibition stattfindet. Diese Beobachtung wurde auf die Interaktion des E6-Proteins ausgewählter kutaner HPV-Typen (HPV-5, -10 und -77) mit dem proapoptischen Protein *Bak* und dessen Degradation zurückgeführt (Jackson & Storey, 2000). Bisher konnte nur mit dem E7 Protein von HPV-38 und HPV-47 analog zu den α -PV eine Bindung mit *pRb*, welche zur Degradation und Inaktivierung des Tumorsuppressorgens führt, eine Transaktivierung von *E2F*-abhängigen Genen gezeigt werden (Caldeira et al., 2003; Hiraiwa et al., 1996). Darüber hinaus gibt es Hinweise auf Interaktionen zwischen viralen Proteinen wie E6 und wirtszellulären Faktoren wie *TBP* (*TATA-box-binding protein*) und den assoziierten *TAFII*s (*TBP-associated factors*) (Enzenauer et al., 1998) oder dem *XRCC1* Protein der DNA-Reparatur (Iftner et al., 2002).

1.7 Tiermodelle zur Erforschung PV-assoziierter Erkrankungen

Für eine experimentelle Erforschung der Hauttumorgenese stehen sowohl Zellkultursysteme (HeLa, SiHa, organotypische Zellkultur) sowie Tiermodelle zur Verfügung. Aufgrund der Abhängigkeit des Virus von der zellulären Differenzierung und der Schwierigkeit der Generierung einer ausdifferenzierten Epithelschicht (Akgül et al., 2005) werden für die PV-Forschung Tiermodelle (Tabelle 1.3) herangezogen.

Die tumorigene Wirkung von PV ist schon in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts in Kaninchen und Pferden gezeigt worden. Ein aus einem Papillom eines Wildkaninchen (*Sylvilagus floridanus*) gewonnenes Agens wurde durch Injektion in die Haut eines Hauskaninchen (*Oryctolagus cuniculus*) übertragen und führte dort ebenfalls zur Entstehung von Papillomen (Shope & Hurst, 1933). Eine bekannte natürliche Infektion über Artgrenzen hinweg ist die Infektion von Pferden mit den bovinen PV-1 und -2. Beim Rind sind diese Viren (BPV-1 und -2) vor allem in gutartigen Hautwarzen zu finden (Übersichtsartikel: Campo, 2002). In Pferden gelten sie als Auslöser equiner Sarkoide (Chambers et al., 2003).

Unter Laborbedingungen ist vor allem die Arbeit mit transgenen Mäusen (*Mus musculus*) gut etabliert. Als Modell der kutanen Tumorgenese werden Mäuse untersucht, die zum einen mit der früh transkribierten Region des kutanen HPV-8 (Schaper et al., 2005) zum

anderen mit MnPV-1-E6 genetisch verändert worden sind (Helfrich et al., 2004). Der aus der Vielzitzenmaus *Mastomys coucha*¹ stammende MnPV-1 (Müller & Gissmann, 1978) dient darüber hinaus in seinem natürlichen Wirt als Modell für die kutane Tumorentstehung. Die Tiere eines Laborstamms (GRA Giessen), (Reinacher et al., 1978) sind latent mit dem Virus infiziert und entwickeln spontan kutane Papillome und Keratoakanthome.

Tabelle 1.3: Nicht-humane Papillomavirus-assoziierte Erkrankungen*

Art	assoziierte PV	Erkrankung
Kaninchen (<i>Sylvilagus floridanus</i>)	CRPV	kutane Papillome
Hund (<i>Canis familiaris</i>)	COPV	orale Papillome
Rind (<i>Bos taurus</i>)	BPV-1, -2	kutane Fibropapillome, Blasenkarzinom
	BPV-3	kutane Papillome
	BPV-4	intestinale Papillome und Karzinome
	BPV-5, -6	Papillomatosis von Zitzen und Euter
Pferd (<i>Equus caballus</i>), Esel (<i>Equus asinus</i>), Maultier	BPV-1, -2	Equines Sarkoid (Fibrosarkom)
	EcPV	kutane Papillome
Vielzitzenmaus (<i>Mastomys coucha</i>)	MnPV-1	kutane Papillome, Keratoakanthome

*nach (Campo, 2002) und (Modrow et al., 2003)
BPV, bovine PV ; COPV, canine oral PV; CRPV, cottontail rabbit PV; PV, Papillomavirus

¹ Es wurde experimentell gezeigt, dass der Laborstamm der Vielzitzenmaus (engl. *multimammate rat*) taxonomisch der Spezies *Mastomys coucha* (Smith, 1834) und nicht *Mastomys natalensis* (Smith, 1834) angehört. Der erste Papillomavirus heißt somit aus historischen Gründen MnPV-1 Kruppa, T. F., F. Iglauer, E. Ihnen, K. Miller & I. Kunstyr. 1990. Mastomys-Natalensis or Mastomys-Coucha - Correct Species Designation in Animal-Experiments. *Tropical Medicine and Parasitology* 41: 219-220..

1.8 Ursächlichkeit humanpathogener Viren bei der Entwicklung von Karzinomen

Das onkogene Potential von HPV ist in der Entstehung von Gebärmutterhalskrebs eingehend erforscht. Die WHO hat die Genotypen HPV-16, -18 (WHO, 1993), sowie -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59 und -66 offiziell als krebserregend klassifiziert (Cogliano et al., 2005). Ferner wurden die kutanen β -Typen HPV-5 und -8 als möglicherweise krebserregend eingestuft.

Die Ursächlichkeit eines Agens mit dem Entstehen einer Krankheit ist von Robert Koch (und Jacob Henle) vor etwa 100 Jahren in 3 Postulaten definiert worden (<http://www.vu-wien.ac.at/i123/allvir/Koch1.html>). Viren waren zu dieser Zeit noch unbekannt. Einer der Pioniere der Papillomavirusforschung, Harald zur Hausen, modifizierte die Postulate für den Nachweis der onkogenen Wirkung von DNA-Viren (zur Hausen, 2001). In der vorliegenden Arbeit zur Ermittlung der Ursächlichkeit von HPV in der Hauttumorgenese ergeben sich folgende Kriterien (PD Dr. Nindl, persönliche Mitteilung):

- (1) Das DNA-Virus muss in Tumorbiopsien und daraus hervorgegangenen Zell-Linien vorhanden sein und persistieren.
- (2) Die Aktivität des Virus muss in humanem Gewebe der Krankheit nachweisbar sein.
- (3) Das virale onkogene Potential muss sich in *in vitro* (Zellkultur) und *in vivo* (Tiermodell) Modellen in einem malignen Phänotyp darstellen.
- (4) Epidemiologisch muss die Anwesenheit des Virus einen Risikofaktor für die Krebsentstehung darstellen.

Für die Entstehung von Warzen (kutan und genital), sowie von Gebärmutterhalskrebs sind diese Punkte überprüft und bestätigt worden (siehe Abschnitt 1, Einleitung). Bei anderen HPV-assoziierten Erkrankungen wie kutane SCC und steht der endgültige Beweis noch aus.

1.9 Zielsetzung

Für die Klärung einer möglichen Ursächlichkeit humaner Papillomaviren und der Entwicklung kutaner SCC müssen verschiedene Kriterien erfüllt sein. Im Rahmen dieser Arbeit standen 2 Problematiken im Vordergrund, die sich auf das erste und vierte Postulat von zur Hausen beziehen (Abschnitt 1.8).

Das erste Postulat beinhaltet die Anwesenheit des Virus, das heißt den Nachweis des Agens in der Erkrankung bzw. zu einem bestimmten Zeitpunkt der Erkrankung. Ferner ist bekannt, dass persistierende Infektionen zu einem erhöhten Krebsrisikos führen. In der vorliegenden Arbeit wurden immunkompetente und immunsupprimierte Patienten untersucht. Normalgewebe von Patienten kann aufgrund ethischer Bedenken nicht immer entnommen werden, deshalb wurden für die Analyse der HPV-Prävalenz Haarfollikelproben verwendet. Es wird angenommen, dass Haarfollikelzellen ein Reservoir für kutane HPV-Typen darstellen. Im welchem Umfang war aber noch nicht abschließend geklärt.

Das vierte Postulat beschäftigt sich mit der Epidemiologie zwischen Krankheitsbild und Pathogen. Die Anwesenheit des Virus muss dabei einen Risikofaktor für die Krebsentstehung darstellen. Als Hauptrisikofaktoren für die Entwicklung von NMSC gelten UV-Licht, Hellhäutigkeit sowie ein eingeschränktes Immunsystem. Bei immunsupprimierten OTR wurden bisher sowohl eine höhere HPV-Prävalenz als auch ein erhöhtes NMSC-Risiko festgestellt. Es ergeben sich folgende Fragestellungen:

- Sind Haarfollikelzellen für die Bestimmung des HPV-Status eines Menschen geeignet?
- Finden Veränderungen in der HPV-Prävalenz, dem Typenspektrum und/oder der Viruslast während eines zeitlichen Verlaufes statt?
- Sind spezifische HPV-Typen bei NMSC-Erkrankungen mit einem erhöhten Risiko assoziiert?
- Welche HPV-Typen sind bei OTR zu finden? Unterscheiden sich immunkompetente und immunsupprimierten Patienten in ihrem HPV-Spektrum?
- Eignet sich das Tiermodell *M. coucha* zur Aufklärung molekularbiologischer Mechanismen der PV-induzierten Hauttumore?