

4 DISKUSSION

4.1 HPV-Nachweis und Genotypisierung mittels *Reverse Line Blot*

Für den Nachweis eines breiten Spektrums an HPV-Typen wurden in den letzten Jahren verschiedene PCR-basierte Methoden beschrieben (Berkhout et al., 1995; Boxman et al., 1997; Forslund et al., 1999; Shamanin et al., 1994; Tieben et al., 1993). Die Genotypisierung erfolgte dabei vielfach mittels einer Klonierung mit anschließender Sequenzierung oder einer direkten Sequenzierung der PCR-Produkte. Für große epidemiologische Studien ist eine aufwendige Genotypisierung mittels Sequenzabgleich allerdings wenig praktikabel.

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete System aus BGC-PCR und RLB ermöglicht die gleichzeitige Genotypisierung von bis zu 39 Proben mit 41 typenspezifischen Sonden der β - und γ -HPV (Brink et al., 2005). Ein vergleichbares System zum RLB wurde von de Koning und Mitarbeitern (de Koning et al., 2006) mit der PM-PCR RHA-Methode entwickelt. Während mit der BGC-PCR (Brink et al., 2005) ein 70 bp Produkt aus dem L1-Bereich von β - und γ -PV amplifiziert wird, erfolgt die Genotypisierung der alternativen Methode (de Koning et al., 2006) mit einem 117 bp-Fragment aus dem E1-Bereiches der β -PV. Der Nachweis der Fragmente wird äquivalent mit einem *Blot-Assay* durchgeführt. Die Genotypisierung ist aufgrund der geringen Amplikongröße (< 400 bp) beider Methoden sowohl mit Formalin-fixiertem als auch mit Kryogewebe durchführbar.

Es zeigte sich eine hohe Zuverlässigkeit sowie eine hervorragende Übereinstimmung der HPV-Typisierung zwischen der neuen Nachweismethode BGC-PCR/RLB und einer E6-typenspezifischen konventionellen PCR.

Die untere Nachweisgrenze von BGC-PCR und RLB war abhängig vom HPV-Typ und lag bei 10 bis 100 Kopien von HPV-5, -8, -9, -14, -15, -17, -19 und -20. Das entspricht der von Brink und Kollegen (Brink et al., 2005) beschriebenen Sensitivität mit Verdünnungsreihen von 11 HPV-Typen (HPV-5, -8, -9, -12, -14, -15, -17, -19, -20, -21 und -24). Mit der PM-PCR RHA-Methode (de Koning et al., 2006) wird ebenfalls eine Nachweisgrenze von 10 bis 100 Kopien (HPV-5, -8, -9, -15, -17, -19, -23, -24, -36, -38, -47, -49, -93 und -96) erreicht.

Ein großer Vorteil gegenüber Nachweissystemen mit einer anschließenden Sequenzierung der PCR-Produkte ist der simultane Nachweis mehrerer HPV-Typen im RLB innerhalb eines Schrittes. Bei Doppelbestimmungen waren starke Signale immer reproduzierbar, schwache Signale nicht. Im Fall von Mehrfachinfektionen konnte jedoch nicht

direkt von der Signalstärke auf die Viruslast geschlossen werden. Bei mehreren HPV-Typen in einem Ansatz findet vermutlich eine Konkurrenzreaktion statt, indem unterschiedliche Sequenzen um die vorhandenen Startoligonukleotide konkurrieren. Aufgrund der Bindungseigenschaften werden wahrscheinlich einige Sequenzen besser amplifiziert als andere, was in einer größeren Anzahl der Amplifikate und Signalstärke resultiert. Die Methoden gelten deshalb als semiquantitativ.

Bei Sequenzabweichungen innerhalb des Starter- oder Sondenbereiches etwa bei HPV-Varianten können Probleme beim Nachweis, wie bei allen PCR-basierten und hybridisierungsabhängigen Methoden, nicht ausgeschlossen werden. Vor allem bei HPV-negativen Proben sollten daher Methoden zur Identifikation neuer Typen eingesetzt werden, wie beispielsweise die RCA-, *Rolling Circle Amplification*' (Rector et al., 2004). Da die BGC-PCR einen hoch konservierten Bereich des Genoms abdeckt, werden auch bisher unbekannte Typen amplifiziert, die durch die Ergänzung spezifischer Typisierungssonden leicht in das System integriert werden können (Nindl et al., 2007).

Das BGC-PCR/RLB-System ist eine sensitive und effiziente Nachweismethode für kutane HPV-Typen und eignet sich für große epidemiologische Studien.

4.2 Epidemiologie kutaner/EV HPV-Typen

Infektionen mit kutanen HPV (kutane/EV und Warzen-assoziierte Typen) sind weit verbreitet, und daher ist auch ein großer Anteil der Bevölkerung latent infiziert (~ 50 %) (Boxman et al., 1997; Harwood et al., 1999a; Köhler et al., 2007). Die HPV-Prävalenz und Viruslast in Normalhaut ist dabei geringer als in NMSC Proben (Berkhout et al., 2000; Dang et al., 2006; Iftner et al., 2003; Pfister, 2003).

Ungeachtet dessen, was in den letzten Jahren an neuen Erkenntnissen zusammengetragen wurde, ist es immer noch unklar, ob und welche HPV-Typen in die Hauttumorgenese involviert sind (Akgül et al., 2006; Nindl et al., 2007; Pfister, 2003). Es werden eine Vielzahl von HPV-Typen insbesondere der Gattungen β und γ (kutane/EV) in NMSC, Haarfollikeln und Normalhaut gefunden (Brink et al., 2005; de Koning et al., 2006; Forslund et al., 1999; Harwood et al., 1999b). Auf ein onkogenes Potential von HPV-5 und -8 wird aufgrund ihrer Assoziation mit malignen Hauttumoren bei EV-Patienten geschlossen (Orth, 2006). HPV-38 und HPV-77 wurden aus prä-malignen und malignen Hautläsionen erstmals isoliert und in funktionellen Analysen zeigten sie transformierende Eigenschaften

(Caldeira et al., 2003; Purdie et al., 1999). In epidemiologischen Studien konnte aber kein ursächlicher Zusammenhang zwischen spezifischen HPV-Typen und der Entstehung von NMSC hergestellt werden (Alotaibi et al., 2006; Harwood et al., 2004).

Seit der kutane *Cottontailrabbit*-PV (CRPV) erstmals in Haarfollikelzellen von Kaninchen nachgewiesen wurde (Schmitt et al., 1996), wird angenommen, dass Haarfollikelzellen ein Reservoir für kutane HPV-Typen in der Haut darstellen. Boxman und Kollegen (Boxman et al., 1997) dokumentierten beim Menschen die Anwesenheit von kutanen/EV HPV-Typen in Haarfollikelzellen. Sie verwendeten Haare von Augenbraue, Arm- und/oder Beinhaarfollikel von 26 OTR und 22 IK-Probanden zur HPV-Typisierung. Da aber keine systematische HPV-Typisierung von Körperhaaren stattfand, ließ sich keine allgemeine Aussage über den repräsentativen HPV-Status in Haarfollikeln machen. Im Rahmen meiner Arbeit wurden Körperhaare von jeweils 9 Probanden (OTR und IK) gesammelt und auf die Anwesenheit von kutanen/EV HPV-Typen untersucht. Von jedem Probanden wurde 5–6 Lokalisationen über den gesamten Körper (Augenbraue, Kopf, Arm, Rumpf, Bein und Scham) einbezogen. Die HPV-Prävalenz über alle Proben (51 vs. 54) betrug dabei 96% (OTR) beziehungsweise 50% (IK), vergleichbar mit den von Boxman gefundenen 92% (OTR) beziehungsweise 45% (IK) (Boxman et al., 1997). Zusätzlich wurde durch eine große Übereinstimmung von 66% der kutanen/EV HPV-Typen in Haarfollikeln über alle untersuchten Körperareale festgestellt. Damit wurde erstmals gezeigt, dass Haarfollikelzellen der Augenbrauen den individuellen Status kutaner/EV HPV-Typen am gesamten Körper dokumentieren (Köhler et al., 2007).

Es liegen nur wenige Daten vor, bei denen sowohl Haarfollikelzellen als auch Gewebeproben von einem Individuum auf kutane/EV-HPV-Typen untersucht wurden. Boxman und Kollegen (Berkhout et al., 2000) untersuchten sowohl Tumorbiopsien als auch Haarfollikelzellen von 20 Individuen (IK). Dabei stimmten 12 von 20 Paaren im HPV-Status überein (HPV-positiv oder HPV-negativ) und in 4 von 5 Paaren HPV-positiver Haarfollikelzellen der Augenbrauen und NMSC-Gewebe wurden identische kutane/EV HPV-Typen nachgewiesen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine ähnliche Übereinstimmung im HPV-Muster ermittelt werden wie in Haarfollikeln unterschiedlicher Körperareale (66%). Zum einen wurden von einem Patienten neben einem SCC und 2 AK ebenfalls Haarfollikeln von 3 Körperarealen entnommen. In allen 6 Proben (5 Proben vom Kopf, d.h. SCC, AK, Haare von Kopf und Augenbraue, sowie eine Haarprobe vom Rumpf) war dieselbe HPV-8-Variante zu finden. Zum anderen wurden Haarfollikelzellen, ebenso wie benigne und maligne

Tumore von 36 OTR, exemplarisch in verschiedenen Studien meiner Arbeit untersucht (Daten nicht gezeigt). Bei 8 Patienten (22%) wurde weder in Haarfollikelzellen noch in der Gewebeprobe kutane/EV HPV-DNA nachgewiesen. In 20 Patienten (56%) wurden kutane/EV HPV-Typen übereinstimmend in Tumor und Haarfollikelzellen gefunden.

Mit Hilfe der HPV-Typisierung von Haarfollikelzellen wurde untersucht, ob eine HPV-Infektion mit einem NMSC-Risiko assoziiert ist (Struijk et al., 2003; Termorshuizen et al., 2004). In einer niederländische Studie wurden Haarfollikelzellen der Augenbraue von immunkompetenten NMSC-Patienten (n=156) und Kontrollprobanden (n=320) auf die Anwesenheit von 6 kutanen/EV HPV-Typen (HPV-5, -8, -15, -20, -24 und -38) untersucht (Termorshuizen et al., 2004). Die Autoren ermittelten signifikant häufiger HPV-5, -8, -15, -20 und -24 bei NMSC-Patienten ($p < 0,05$) und eine nicht signifikant erhöhte Prävalenz von HPV-38. Von Struijk und Kollegen (Struijk et al., 2003) wurde berichtet, dass bei immunkompetenten NMSC-Patienten (n=155) ein signifikanter Unterschied zwischen dem HPV-Muster in Haarfollikelzellen im Vergleich zu Kontrollprobanden (n=371) gefunden wurde. Die Anwesenheit von HPV-DNA (HPV-2, -5, -8, -15, -16, -20, -24 und -38) korrelierte sowohl mit einem höheren Alter als auch mit dem männlichen Geschlecht. Nach einem Abgleich mit Alter und Geschlecht fanden die Autoren eine Assoziation zwischen der Anwesenheit von HPV-DNA in Augenbrauen und der Entwicklung von NMSC, ohne die Hervorhebung von einem bestimmten HPV-Typ.

In Studien mit einem breiteren Nachweisspektrum an HPV-Typen, wurden in Haarfollikelzellen von 31 OTR ohne Berücksichtigung von Mehrfachinfektionen am häufigsten HPV-15 (23%), -20 (19%), -23 (35%) (Brink et al., 2005) beziehungsweise von 45 OTR am häufigsten HPV-5 (37%), -8 (33%), -23 (55%), -24 (47%), -38 (32%) gefunden (de Koning et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit wurden mit der BGC-PCR HPV-5, -15, -20 und -23 als Einzel- oder Mehrfachinfektion am häufigsten (30%) in Haarfollikelproben von 154 OTR nachgewiesen. Ferner wurde bei OTR mit oder ohne NMSC kein signifikanter Unterschied der kutanen/EV HPV-Typen in den Haarfollikelzelle beobachtet.

Bei der Untersuchung von NMSC-Patienten (IK) vs. tumorfreien Patienten (IK) wurde in früheren Studien ein Unterschied in der Prävalenz kutaner/EV HPV-Typen gefunden (Struijk et al., 2003; Termorshuizen et al., 2004). Wir analysierten kutaner/EV HPV-Typen in Haarfollikelzellen bei OTR mit und ohne Hauttumore und fanden keinen signifikanten Unterschied bei Prävalenz oder Verteilung. Möglicherweise führen Immunsuppressiva zur Aktivierung bestimmter HPV-Typen, während andere hinsichtlich ihrer Replikation nicht

beeinflusst werden. Einen ähnlichen Effekt sieht man auch bei EV-Patienten, bei denen eine große Anzahl verschiedener HPV-Typen in der Haut nachgewiesen werden, jedoch HPV-5 und -8 am häufigsten in malignen Tumoren gefunden werden (Majewski & Jablonska, 1997).

Das Auftreten von NMSC ist alters- und geschlechtsabhängig (Katalinic et al., 2003; Moloney et al., 2006). Ebenso wie in vorhergehenden Studien waren bei den von uns untersuchten 154 OTR signifikant mehr Männer und mehr Patienten höheren Alters unter den NMSC-Patienten (n=49) zu finden. Außerdem wurde eine direkte Korrelation zwischen Dauer der Immunsuppression und dem Auftreten von NMSC festgestellt. Die Zeit nach Transplantation war bei den NMSC-Patienten signifikant erhöht. Dieses Ergebnis bestätigt bereits die veröffentlichten Daten, die besagen, dass die Anzahl von NMSC-Erkrankungen von 29% auf 82% mit Dauer der Immunsuppression ≥ 20 Jahre ansteigt (Moloney et al., 2006; Ramsay et al., 2002). Die Bestätigung dieser anerkannten Fakten sichert die korrekte Durchführung der Studie und damit auch unsere weiteren Schlussfolgerungen.

Mukosale HPV-Typen wurden in anogenitalen Haarfollikeln nur bei Patienten mit aktuellen oder abgeheilten genitalen Läsionen nachgewiesen (Adachi et al., 2004; Boxman et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit wurden 105 Haarfollikelproben vom gesamten Körper von je 9 OTR und 9 IK untersucht. Mukosale HPV-Typen wurden nur in 6 Proben (Bein, Rumpf, Augenbraue) von 5 OTR gefunden, jedoch bei keinem IK. Bei der Analyse kutaner Warzen von 33 OTR und 29 IK waren nur zu 17% und 15% mukosale HPV-Typen nachweisbar. Mukosale HPV-Typen scheinen im Gegensatz zu kutanen/EV HPV-Typen kein Reservoir in Zellen und Haarfollikelzellen der Haut zu haben. Dieses Resultat steht auch im Einklang mit der Hypothese, dass bestimmte HPV-Typen auch spezifische Zielzellen haben und charakteristische Läsionen auslösen (Egawa, 2003).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass an verschiedenen Arealen des Körpers die gleichen HPV-Typen unabhängig von der UV-Exposition zu finden sind (Köhler et al., 2007). Ferner besitzt jeder Proband ein individuelles Muster an HPV-Typen, die mit einer großen Übereinstimmung (67%) auf dem gesamten Körper vertreten waren. Das Sammeln von Haarfollikeln ist wesentlich leichter als das Entnehmen von Gewebeproben und ermöglicht die Dokumentation der vorherrschenden kutanen/EV HPV-Typen eines Menschen, die als Grundlage für eine Risikoabschätzung für die Hauttumorgenese dienen kann. Aber es konnten keine Hoch-Risiko Typen für die Tumorenstehung bestimmt werden. Es muss also als weiterhin ungeklärt angesehen werden, ob bestimmte HPV-Typen in die kutane Onkogenese

involviert sind. Denkbar wäre, dass unter bisher unbekanntem Umständen fast jeder kutane/EV HPV-Typ eine karzinogene Veränderung verursachen kann.

Für die Bestimmung einer vorliegenden Infektion mit kutanen HPV-Typen eignen sich Haarfollikel der Augenbraue. Im Gegensatz zu anogenitalen Krebserkrankungen konnten keine Hoch-Risiko HPV-Typen bei NMSC identifiziert werden.

4.3 Persistierende Infektionen kutaner/EV HPV-Typen

Für eine direkte Assoziation von kutanen HPV-Typen und der Hautkarzinogenese müssen die Viren persistieren, das heißt über einen längeren Zeitraum in den Zellen vorhanden sein. Die Expression viraler Gene ist eng verbunden mit der Zelldifferenzierung. In einigen Fällen, wie bei der Infektion mit dem Hoch-Risiko Typ HPV-16, kann es zu einer abortiven Infektion kommen, bei welcher der produktive virale Zyklus abgebrochen wird und keine viralen Partikel entstehen. Diese abortiven Infektionen können die Krebsentwicklung begünstigen (Doorbar, 2005).

Ostrow und Kollegen (Ostrow et al., 1982) analysierten erstmals HPV-DNA in Warzen, einem primären SCC und Metastasen eines EV-Patienten mittels Restriktion-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP). Sie fanden sowohl im SCC als auch in der Metastase eine HPV-5 Deletionsmutante, der 20% des viralen Genoms fehlten. In meiner Arbeit wurden Primärtumore, Rezidive und Metastasen sowie AK HPV-typisiert (Abschnitt 3.2). Es waren persistierende Infektionen mit einzelnen und mehreren HPV-Typen (HPV-8, -14, -21, -36) sowohl im Primärtumor als auch in Tumorrezidiven und Metastasen über einen Zeitraum von bis zu 53 Monaten nachweisbar. Interessanterweise wurde dieselbe Deletionsmutante von HPV-21 in einem Primärtumor, einer AK und in einer kutanen sowie in Lymphknotenmetastasen nachgewiesen. Durch den Nachweis identischer HPV-Varianten, sogar im Lymphknoten ist eine Neuinfektion unwahrscheinlich. Außerdem bestätigt das Auftreten von Virus-positiven Metastasen die Anwesenheit des Virus in transformierten, malignen Zellen des Primärtumors.

Es wurden bisher in Variantenanalysen der mukosalen Typen HPV-16 und -18 weder Deletionen noch Insertionen nachgewiesen (Nindl, 2002). *In vitro* Analysen von natürlich vorkommenden HPV-16 Varianten zeigten jedoch unterschiedliche biologische und biochemische Eigenschaften, die möglicherweise zu einem Unterschied in der Pathogenität führen (Stoppler et al., 1996). Eine veränderte Proteinsequenz kann sowohl zu abgewandelten

Bindungseigenschaften innerhalb des Proteins führen, als auch die Interaktion mit anderen Zellstrukturen beeinflussen. Die von uns identifizierten Varianten bekannter HPV-Typen (HPV-8Var-1, HPV-21Var-1, HPV-36Var-1, HPV-36Var-2) zeigen an insgesamt 10 Nukleotidpositionen im E6-Gen Einzelnukleotidaustausche und im HPV-21Var-1 eine 30 Nukleotide umfassende Deletion. In 6 Fällen stellen die Austausche nur eine stille Mutation dar, die übrigen 4 führen zu einer veränderten Aminosäure. Alle Varianten wurden aus Primärtumor und Rezidiven beziehungsweise Metastasen isoliert. Ob die kutanen HPV-E6 gefundenen Varianten einen direkten Einfluss auf die Hauttumorgenese haben können, lässt sich nur durch eine funktionelle Analyse klären. Von Interesse ist vor allem die Untersuchung der Fähigkeit zur Degradation des pro-apoptotischen Proteins *Bak* wie bei HPV-5, -10 und -77 gezeigt (Jackson & Storey, 2000).

Berkhout und Kollegen (Berkhout et al., 2000) untersuchten in einer retrospektiven Studie mehrere benigne und maligne Hauttumore von 23 OTR, von denen nur bei 2 Patienten in keiner Probe HPV-DNA nachgewiesen wurde. Mit einer Nachbeobachtungszeit von 3 bis 70 Monaten wurden in 17 von 21 (81%) Patienten persistierende HPV-Infektionen mit ein bis 2 HPV-Typen in Biopsien gefunden. Bei einer schwedischen prospektiven Studie mit 42 IK und 31 OTR wurden im Abstand von 5 bis 7 Jahren Hautabstriche von der Stirn HPV-typisiert (Hazard et al., 2007). In IK wurden zu Beginn der Studie 69% HPV-positive Proben gefunden bei der zweiten Probe waren es nach 5 bis 7 Jahren 71%, mit einem Anteil von 48% persistierender Infektionen. In OTR waren am Anfang 71% HPV-positiv, nach 5 bis 7 Jahren waren es 90%. Persistierende Infektionen wurden in 33% der OTR gefunden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 63 OTR innerhalb des ersten Monats nach Transplantation prospektiv untersucht und anhand von Haarfollikeln der Augenbraue der HPV-Status über eine Zeit von bis zu 18 Monaten bestimmt. Dabei wurde ein geringer Anstieg der HPV-Positivität ermittelt. Zu Beginn waren 73% HPV-positiv, nach einem Jahr waren es 86%, eine Persistenz von HPV-Typen zeigte sich in 71% der OTR. Die HPV-Prävalenz unserer und der schwedischen Studien lag in einem vergleichbaren Bereich, die Anzahl persistierender Infektionen nicht. Eine Ursache hierfür könnte in der Art der Proben liegen. Abstrichproben von der Hautoberfläche sind möglicherweise anfälliger für Kontaminationen und besitzen eine geringere Viruslast, wodurch das nachgewiesene HPV-Spektrum variabler wird. Auch die Zeit zwischen den Probenentnahmen (5–7 Jahre vs. 1 Jahr) wirkt sich negativ auf die Vergleichbarkeit beider Studien aus. Zusätzlich könnte die spezifische Definition persistierender HPV-Infektionen durch die Autoren eine Rolle spielen. Dagegen wurde

sowohl in unserer Studie in Haarfollikelzellen als auch in Gewebeproben einer anderen Studie (Berkhout et al., 2000) eine vergleichbare Anzahl persistierender HPV-Infektionen nachgewiesen.

Persistierende HPV-Infektionen sind mit einem erhöhten Zervixkarzinomrisiko assoziiert (IARC, 1995) Persistierenden Infektionen mit kutanen HPV-Typen in epithelialen Hauttumoren verschiedenen Schweregrads deutet auf eine mögliche Rolle dieser Viren in der Hauttumorgenese.

4.4 Warzen als initiale Erkrankung zur Hautkarzinogenese

Die notwendige Immunsuppression nach einer Transplantation führt bei bis zu 90% der Patienten zur Entwicklung von Warzen innerhalb von 10 Jahren nach Transplantation (Meyer et al., 2003; Rüdinger et al., 1986). OTR entwickeln Warzen, die länger persistieren als gewöhnliche Warzen und eine veränderte Morphologie aufweisen (atypische Warzen, engl.: *warty like lesions*) als bei IK (Harwood et al., 1999a). Mit zunehmender Dauer der Immunsuppression und Persistenz der Warzen gibt es klinische Hinweise, dass zunächst gutartige Warzen möglicherweise in epitheliale Hauttumore progredieren können (Blessing et al., 1989; Euvrard et al., 1993). Allgemein ist für OTR das Risiko erhöht, benigne und maligne epitheliale Hauttumore zu entwickeln, und es wird vermutet, dass HPV-Infektionen dabei ursächlich beteiligt sind (Bavinck et al., 2001; Stockfleth et al., 2004).

In vielen Fällen kann aus der Morphologie kutaner Warzen auf das Vorhandensein spezifischer HPV-Typen geschlossen werden (Egawa, 1994; Jablonska et al., 1985). Beispielsweise ist HPV-1 der Auslöser für Warzen mit einem granulären Muster an Einschlusskörpern im Zytoplasma, während Läsionen mit filamentösen Einschlusskörpern von HPV-63 ausgelöst werden. In gewöhnlichen Warzen, die überwiegend an Händen und Füßen auftreten, werden vor allem die α -Typen HPV-2, -27 und -57 (Spezies A4) gefunden (Jablonska et al., 1997; Rübben et al., 1997). In 2 Studien wurden gewöhnliche Hautwarzen von IK mittels PCR, Restriktionsanalysen und/oder Hybridisierungsmethoden untersucht (Rübben et al., 1997; Rübben et al., 1993). In 131 kutanen Warzen von 111 IK wurden am häufigsten HPV-2 (59%) und HPV-57 (26%) nachgewiesen (Rübben et al., 1993). In einer weiteren Studie wurden bei 202 von 219 Warzen (95%) HPV-2, -27 und -57 beobachtet (Rübben et al., 1997). In meiner Arbeit wurden 94 Warzen von 33 OTR und 29 IK auf alle bekannten HPV-Typen mit verschiedenen PCR-basierten Methoden untersucht. Warzen-

assoziierte HPV-Typen wurden in 63% der 41 Warzen von IK nachgewiesen, HPV-57 (32%) und HPV-27 (27%) waren am häufigsten vertreten. Zusätzlich waren 15% der Proben von IK positiv für mukosale HPV-Typen und in 49% wurden kutane/EV HPV-Typen gefunden. Mehr als 20% zeigten Infektionen mit mehreren HPV-Typen.

Der HPV-Nachweis in kutanen Warzen von OTR wurde ebenfalls zum größten Teil mit Hybridisierungsmethoden (*Southern Blot* und *in situ*) durchgeführt, die nicht das gesamte Spektrum der HPV-Typen erfassen (Gassenmaier et al., 1986; Obalek et al., 1992; Rüdlinger et al., 1986; Van der Leest et al., 1987). In Warzen von OTR und IK wurde ein vergleichbares Spektrum an HPV-Typen nachgewiesen, wobei auch bei OTR die Warzen-assoziierten HPV-Typen der A4-Spezies am häufigsten zu finden waren. In bis zu 40% der Warzen von IK konnten jedoch keine spezifischen HPV-Typen bestimmt werden, was vermutlich auf die Anwesenheit anderer HPV-Typen zurückzuführen ist. Mittels typenspezifischer PCR-Methoden für kutane/EV HPV-Typen (HPV-5, -8), Warzen-assoziierte Typen (HPV-1, -2) und mukosale Typen (HPV-6, -11, -16, -18) gelang es Stark und Kollegen (Stark et al., 1994) in 79% (11/18) kutaner Warzen von OTR HPV-DNA nachzuweisen. In der ersten Studie mit dem Nachweis eines breiten Spektrum an HPV-Typen wurde in allen 15 untersuchten Warzen von OTR HPV-DNA gefunden (de Villiers et al., 1997). Die Warzen-assoziierten Typen HPV-1, -27 und -57 waren am häufigsten und in 10/15 (67%) der Warzen zu finden, während der kutane/EV Typ HPV-23 nur in 2 Warzen (13%) vorhanden war. In einer weiteren Studie wurden unter Verwendung einer *nested*-PCR-Methode in allen 23 kutanen Warzen von OTR HPV-DNA nachgewiesen (Harwood et al., 1999b). Warzen-assoziierte Typen, kutane/EV HPV-Typen und mukosale Typen wurden in 87%, 74% und 26% der Warzen gefunden. Die unterschiedlichen Häufigkeiten von kutanen/EV HPV-Typen in beiden Studien könnten mit den verschiedenen Sensitivitäten und Spezifitäten der verwendeten PCR-Methoden begründet werden.

In der vorliegenden Arbeit wiesen wir bei 53 kutanen Warzen von OTR Warzen-assoziierte Typen in 45%, kutane/EV HPV-Typen in 79% und mukosale Typen in 17% der Proben nach. Wir beobachteten eine vergleichbare Prävalenz von kutanen EV/HPV-Typen, wie sie von Harwood und Mitarbeitern berichtet wurde (Harwood et al., 1999b). Im Vergleich zu Warzen von IK waren bei OTR die Prävalenz (49% vs. 79%) und Anzahl an Mehrfachinfektionen (17% vs. 62%) von kutanen/EV HPV-Typen signifikant erhöht. Die allgemeine HPV-Prävalenz (91% in OTR, 93% in IK) der von uns analysierten Proben war vergleichbar mit vorhergehenden Studien. Jedoch der Anteil Warzen-assoziierten HPV-Typen

in Warzen von IK (63%) und OTR (45%) war geringer als in früheren Studien, in denen andere Nachweismethoden verwendet wurden. Die Genotypisierung mittels Restriktionsanalysen ist weitgehend unspezifisch und auch mit Hybridisierungsmethoden sind sich nah verwandte Typen nur schwer spezifizierbar. Dagegen lassen spezifische PCR-Methoden nur wenig Spielraum für den Nachweis abweichender Sequenzen. Dies könnte ein Grund sein, warum beim Nachweis kutaner/EV HPV-Typen mit unterschiedlichen Methoden verschiedene Häufigkeiten gefunden wurden.

In unserer Studie führten wir erstmals einen Vergleich zwischen kutanen Warzen von OTR und IK durch. Das gesamte bekannte HPV-Spektrum (etwa 100 verschiedenen Typen) wurde analysiert und die Viruslast ausgewählter HPV-Typen wurde bestimmt. Vielfach wurden sowohl Warzen-assoziierte Typen als auch kutane/EV HPV-Typen gemeinsam in kutanen Warzen nachgewiesen. Es ist unklar, ob mehr als ein HPV-Typ in einer einzelnen Zelle vorliegt oder verschiedene Zellen mit unterschiedlichen HPV-Typen infiziert sind. Da ein direkter Zusammenhang zwischen Ursächlichkeit des Virus und der Virusreplikation in kutanen Warzen besteht, sollte der auslösende HPV-Typ der Läsion in einer deutlich höheren Viruslast vorliegen. Sowohl von Warzen-assoziierten als auch kutanen/EV HPV-Typen wurde die Viruslast bestimmt. In beiden Kollektiven, OTR und IK zeigten die Warzen-assoziierten Typen HPV-3, -27 oder -57 hohe Virusmengen. Sie lagen um bis zu 10^5 -fach höher als gleichzeitig vorhandene kutane/EV HPV-Typen. Die hohe Viruslast spricht eher für eine aktive Beteiligung Warzen-assoziiierter als kutaner/EV HPV-Typen an der Entstehung gewöhnlicher Warzen, unabhängig vom Immunstatus. Die Aktivierung der Virusreplikation nach systemischer Immunsuppression ist möglicherweise mit einer erhöhten Persistenz von HPV in kutanen Warzen assoziiert.

Der Anteil an negativen Proben lässt vermuten, dass zumindest ein Teil der Warzen, in denen kein spezifischer HPV-Typ nachgewiesen werden konnte, unbekannte Virustypen vorhanden sind. Da Warzen ein gesundheitliches Problem für OTR darstellen, ist es wichtig zu wissen, welche HPV-Typen ursächlich sind. Das würde den Weg für eine Therapie, möglicherweise eine prophylaktische Vakzinierung bereiten. Für die gezielte Suche nach neuen HPV-Typen sollte beispielsweise die RCA (Rector et al., 2004) bei Proben angewandt werden, in denen kein spezifischer HPV-Typ gefunden wurde.

Die hohe Viruslast Warzen-assoziiierter HPV-Typen unabhängig vom Immunstatus lässt eine aktive Beteiligung dieser Typen an der Genese der Warzen

vermuten. Kutane EV/HPV-Typen haben eine hohe Prävalenzrate und geringe Viruslast bei OTR und scheinen Warzen nicht zu induzieren.

4.5 Viruslasten in Hauttumoren und Haarfollikelzellen

Aktuell liegen nur wenige Daten über die Viruslast kutaner/EV HPV-Typen in NMSC-Tumoren vor. Bei EV-Patienten wurden vor allem in kutanen SCC eine hohe Viruslast von 100 bis 300 Kopien pro Zelle gemessen. Durch *in situ* Hybridisierung zeigte sich aber, dass die hohen Virusmengen auf nur wenige positive Zellen im Tumor zurückzuführen waren (Pfister, 2003). Obwohl bei OTR von höheren Virusmengen in NMSC ausgegangen wird als bei Tumoren von IK, wurde hier nur eine HPV-Kopie pro 20 bis 5.000 Zellen im Tumor gefunden.

Weissenborn und Kollegen (Weissenborn et al., 2005) ermittelten die Viruslast von HPV-5, -8, -15, -20, -24 und -36 in 51 Hauttumoren (13 SCC, 13 BCC, 25 AK) und 8 Metastasen von IK. Sie fanden die höchsten HPV-Viruslasten in AK, die im Vergleich zu SCC wesentlich höher waren. In 12% der AK wurden Viruslasten von einer Kopie in weniger als 5 Zellen beobachtet, während die höchste Viruslast in SCC (15%) bei einer Kopie pro 5–50 Zellen gefunden wurde. Bei über der Hälfte der untersuchten SCC (54%) lag die Viruslast unterhalb der Nachweisgrenze, bei AK-Proben waren es nur 20%. Die geringsten HPV-Viruslasten wurden in Metastasen gemessen, dabei lagen 87% unterhalb der Nachweisgrenze. Forslund und Kollegen (Forslund et al., 2003) untersuchten die Viruslast von HPV-92 in 6 Hautbiopsien (2 SCC, 2 BCC, 2 AK) von IK. Sie fanden in beiden AK eine höhere Viruslast von HPV-92 (1 Kopie pro 30 bzw. 66 Zelle) als in SCC (1 Kopie pro 436 bzw. 1143 Zellen). Die höchsten Virusmengen waren in BCC messbar (94 Kopien pro Zelle bzw. 1 Kopie pro Zelle).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden in 12 Hauttumoren (Primärtumore, Rezidiven, und Metastasen und AK) die Viruslast von 4 persistierenden Typen (HPV-8, -14, -21, -36) eines IK und eines OTR bestimmt. Die höchste Viruslast wurde mit einer HPV-21 Kopie pro 3 Zellen in einer AK des OTR gemessen (Nindl et al., 2006). Das gleichzeitig entnommene SCC zeigte eine HPV-21 Kopie pro 7 Zellen. In späteren Rezidiven und Metastasen waren nur noch geringere Viruslasten von HPV-21 nachweisbar. Auch im primären SCC des IK-Patienten waren mit einer HPV-14 Kopie pro 38 Zellen mehr Kopien als in der kutanen

Metastase (1 HPV-14 Kopie pro 375 Zellen) nachweisbar. Bei den Viruslasten von HPV-8, und -36 zeigte sich keine Korrelation.

AK sind Vorstufen zum SCC (Nindl et al., 2007). Die höhere Viruslast in AK im Vergleich zum späteren SCC oder nachfolgenden Rezidiven und Metastasen, spricht dafür, dass das Virus vor allen in der initialen Phase der Karzinogenese eine Rolle spielt.

In einer weiteren Studie unserer Gruppe wurde die aktive Transkription von HPV-8 E6/E7 in Normalhaut, AK und SCC von 6 OTR untersucht (Dang et al., 2006). Es wurden Transkripte von E6/E7 in 3 AK und einem SCC, aber nicht in Warzen oder Normalhaut nachgewiesen. *In vitro* Studien zeigten, dass das E6 Protein die Apoptose infolge von UV-Schädigung hemmt und ferner das Reparatursystem UV-induzierter Thymin-Dimere (Giampieri & Storey, 2004; Jackson & Storey, 2000). Purdie und Kollegen (Purdie et al., 1999) beschrieben die Fähigkeit von HPV-77 E6, Keratinozyten in die S1-Phase zu drängen. Die anti-apoptotische Wirkung sowie eine Verzögerung der DNA-Reparatur und die Zunahme der Proliferation könnten zu einer Manifestierung UV-geschädigter Zellen und letztendlich auch zur Anhäufung karzinogener Mutationen führen. Durch einen solchen Einfluss auf die frühe Tumorgenese das Virus bei späteren Stadien der Karzinogenese nicht mehr beteiligt sein und ist möglicherweise aus diesem Grund nur noch vereinzelt nachweisbar.

Eine Aktivierung des Virus mit der Folge von Replikation und Expression viraler Gene wird als wichtiges Kriterium angesehen, dass HPV eine Rolle während der Hautkarzinogenese spielen kann (zur Hausen, 1996a). Eine Aktivierung muss in einem sehr frühen Stadium der Hauttumorgenese erfolgen. Für die Messung der Viruslast über einen längeren Zeitraum bietet sich wiederum die Bestimmung in Haarfollikelzellen an. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 63 OTR kurz nach der Transplantation und nachfolgend bis zu 18 Monaten untersucht. Dabei wurden persistierende HPV-Infektionen mit kutanen/EV HPV-Typen nachgewiesen. Exemplarisch erfolgte eine Bestimmung der Viruslast in 6 von 10 HPV-20 positiven Patienten. In 80% Patienten war innerhalb von 12 Monate ein Anstieg zu beobachten, die im Verlauf wieder abnahmen. Der Anstieg der Viruslast nach Immunsuppression scheint eine Aktivierung von HPV zu bestätigen. Das gleiche Phänomen wurde im Tiermodell (*M. coucha*) beobachtet. Die Viruslast von MnPV-1 stieg nach Immunsuppression an und ging im Verlauf von 20 Wochen wieder leicht zurück. Die Immunsuppression ist bei Menschen und Tieren ein entscheidender Faktor.

Die Aktivierung der Virusreplikation nach systemischer Immunsuppression und der Nachweis höherer Viruslasten in AK vs. SCC deutet auf eine Rolle kutaner/EV HPV-Typen in der initialen Phase der Hauttumorgenese hin.

4.6 Tiermodell der Papillomavirus-induzierten Tumorentstehung

Der Krankheitsverlauf in *Mastomys coucha* dient als Modell zur Papillomavirus-induzierten Hautkarzinogenese. Die Labortiere sind latent mit MnPV-1 infiziert und entwickeln spontan benigne Tumore wie Papillome und Keratoakanthome (Müller & Gissmann, 1978; Reinacher et al., 1978).

Die Applikation Tumor-induzierender Agenzien führt darüber hinaus zur Entwicklung von SCC (Amtmann et al., 1984). Das onkogene Potential von MnPV-1 zeigte sich auch bei transgenen Mäusen, bei denen MnPV-1 E6 unter Kontrolle des Cytokeratin 14 Promotor in der Basalzellschicht der Haut exprimiert wurde (Helfrich et al., 2004). Nahezu 100% der MnPV-1 E6 transgenen Mäuse entwickelten unter der Applikation Tumor-induzierender Agenzien maligne epitheliale Hauttumore, bei den Kontrollmäusen ohne MnPV-1 E6 traten sie nur zu 10 % auf.

Reinacher und Kollegen (Reinacher et al., 1978) untersuchten spontan aufgetretene Keratoakanthome und SCC bei *Mastomys* (GRA Giessen) mittels Elektronenmikroskopie. Sie beobachteten virale Partikel von MnPV-1 in den obersten, differenzierten Zellschichten des Gewebes (*stratum granulosum*, *stratum corneum*), aber nicht in der Basalzellschicht oder der darüber liegenden Schicht (*stratum spinosum*). Mit der wesentlich sensitiveren *in situ* Hybridisierung (ISH) konnte ich sowohl in Normalhaut als auch in Hauttumoren von *M. coucha* (GRA Giessen) MnPV-1 DNA nachweisen. Bei Normalhaut waren in den differenzierten Zellschichten (*stratum spinosum*, *stratum granulosum*) positive Zellkerne sichtbar, während basale Zellen keine Färbung zeigten. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass in basalen Zellen wesentlich geringere Mengen an MnPV-1 Genomen, unterhalb der Nachweisgrenze der ISH, vorliegen. In Hauttumoren ist die Zellschichtung des normalen Gewebes aufgehoben. Stattdessen zeigte sich eine Faltung des Gewebes, in dem sich MnPV-1-negative Zellen mit positiven Zellen abwechselten, ähnlich wie in einer humanen HPV-induzierten Warze.

Die diffuse Färbung über den gesamten Kern positiver Zellen in der ISH weist auf einen episomalen und nicht integrierten Status viraler DNA hin. Diese Hypothese konnten wir mit

Southern Blot-Analysen bestätigen (Nafz et al., 2007). In fast allen inneren Organen (Herz, Niere, Lunge, Leber, Magen, Milz, Darm, Gehirn) wurden mittels *Southern Blot*-Analysen Virus-DNA nachgewiesen (Nafz et al., 2007). Das wirft die Frage auf, wie strikt die Gewebespezifität von Papillomaviren wirklich ist. Ein interessanter Befund ist der Nachweis von Virus-DNA mittels *in situ* Hybridisierung in neuronalen Zellen im Gehirn von *M. coucha*. In einer kürzlich publizierten Studie wurde gezeigt, dass HPV-16 E6 Sequenzen in peripheren Nervenzellen bei Patienten mit oralen Tumoren und Gebärmutterhalskrebs vorkommen (Fule et al., 2006). Die Ausbreitung von MnPV-1 in anderen Organen erfolgt möglicherweise über das Blut oder das lymphatische System, wie es schon bei Frauen mit fortgeschrittenen Gebärmutterhalskrebs beschrieben wurde (Ho et al., 2005; Kay et al., 2005). Auch in vorherigen Untersuchungen wurden mittels *Southern Blot* in weiteren Geweben außer Haut (Muskel, Leber, Darm, obere Atmungsorgane) MnPV-1 gefunden, die ebenfalls getesteten Lymphozyten waren allerdings MnPV-1 negativ (Amtmann et al., 1984).

Wie beim Menschen wurde auch in *M. coucha* das Alter als wichtiger Faktor in der Hauttumorgenese identifiziert. Amtmann und Kollegen (Amtmann et al., 1984) beschrieben die Entwicklung von Tumoren nicht vor dem 12. Lebensmonat, und eine Tumorrates von 80% bis zum 16. Monat. Die Bestimmung der durchschnittlichen Viruslast (densitometrische Analyse im *Southern Blot*) ergab in histologisch normaler Haut einen Anstieg von 0,1 auf 3.000 Kopien pro Zelle bei Tieren im Alter zwischen 4 und 20 Monaten. In unseren Analysen zeigte sich ebenfalls ein geringer Anstieg der Viruslast im Alter zwischen 1,5–14 Monaten von 0,1–14 MnPV-1 Genomen pro 1.000 Zellen. Keines der Tiere hatte zum Zeitpunkt der Analyse Tumore entwickelt. Tiere ohne Tumore waren im Durchschnitt jünger (1,5–10 Monate) als Tiere mit Tumore (10–20 Monaten). Beim Vergleich der Viruslast in Normalhaut von Tieren mit und ohne Tumore ergab sich eine um den Faktor 1.000 erhöhte Virusmenge von MnPV-1. Die unterschiedlichen Virusmengen unserer im Vergleich zu früheren Untersuchungen sind zurückzuführen auf die verwendeten Methoden. Aber beide Studien stimmen überein, dass das Alter einen Einfluss auf die Hauttumorgenese hat. Zusätzlich konnten wir feststellen, dass auch in histologisch normaler Haut bei Tieren mit Tumoren eine höhere Viruslast als bei Tieren ohne Tumore messbar ist. Im Tumor selber ist im Durchschnitt eine 2–100-fach höhere Viruslast als in der Normalhaut des gleichen Tieres zu finden. MnPV-1 ist wahrscheinlich grundsätzlich an der Tumorformation beteiligt, die initial mit einer Aktivierung der Virusreplikation eingeleitet wird.

Die Entwicklung von NMSC beim Menschen steigt sowohl mit dem Alter als auch mit der Dauer einer Immunsuppression. OTR besitzen ein um das 100-fache erhöhtes Risiko von SCC. Durchschnittlich entwickeln sich NMSC 10 bis 20 Jahre nach Transplantation (Amtmann et al., 1984; Ramsay et al., 2002). Neuartige Immunsuppressiva, speziell mTOR Inhibitoren, zeigen im Gegensatz zu anderen Immunsuppressiva eine anti-karzinogenen Wirkung (Guba et al., 2004; Koehl et al., 2004). 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).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde bei 15 Tieren zwischen dem 5. und 10. Lebensmonat die Viruslast mittels Haarfollikelanalyse alle 5 Wochen ermittelt. Jeweils 5 Tiere erhielten die Immunsuppressiva Rapamycin oder Cyclosporin A im Futter verabreicht, 5 Tiere gehörten zu Kontrollgruppe. Im Durchschnitt waren bei beiden immunsupprimierten Gruppen höhere Virusmengen zu messen als in der Kontrollgruppe, was auf eine Aktivierung der Virusreplikation hinweist. Über 20 Wochen zeigte sich aber keine direkte Korrelation zwischen Alter und Viruslast und es wurde auch keine Tumorentstehung bei einem der Tiere beobachtet. Im Alter von 9. Monaten entwickeln etwa 30-40% der Tiere die ersten Tumore (persönliche Mitteilung J. Nafz). Die 10 Monate alten Tiere waren zu jung für eine abschließende Aussage über das tumorigene Potential der verabreichten Immunsuppressiva. Eine spätere Auswertung wäre für die Einschätzung des tumorigenen Potentials von Rapamycin beziehungsweise Cyclosporin A wichtig. Sollte sich die Hypothese bestätigen lassen, dass mit Rapamycin eine geringere Tumorentwicklung als mit Cyclosporin A stattfindet, ist es unwahrscheinlich, dass es auf eine geringe Viruslast zurückzuführen ist. Im Vergleich zeigten immunsupprimierte Tiere, unabhängig von der Art des Immunsuppressivum, äquivalente Viruslasten.

Des Weiteren konnten wir in unsere Untersuchungen MnPV-1 Transkripte mittels RT-PCR in Hauttumoren sowie in Normalhaut nachweisen, jedoch nicht im viruspositiven Gehirn (Daten hier nicht gezeigt, (Nafz et al., 2007). Amtmann und Mitarbeiter (Amtmann et al., 1984) fanden mittels *Northern Blot*-Analysen ebenfalls in allen getesteten Tumoren MnPV-1 RNA, dagegen nicht in Normalhaut. Der *Northern Blot* erreicht aber nicht die Sensitivität der von uns angewendeten RT-PCR und ist möglicherweise der Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse. Der Nachweis viraler Transkripte zeigt, dass es sich um virulente Infektionen handelt, die wahrscheinlich in die Hauttumorgenese involviert sind.

Die bisherigen Ergebnisse unterstreichen die Eignung des Modellsystems *M. coucha* in der Papillomavirus-induzierten Entstehung epithelialer Hauttumore. In Normalhaut und Tumorgewebe ist MnPV-1 nachweisbar und die erhöhten Virusmengen im Tumor lassen auf eine Aktivierung des Virus während der Tumorgenese schließen. Ebenso wie bei immunsupprimierten OTR war ein geringer Anstieg der Viruslast bei *M. coucha* nach systemischer Immunsuppression und höheren Alters zu beobachten.

4.7 Schlussfolgerungen und Ausblick

Es wurde gezeigt, dass Haarfollikel der Augenbraue für die Analyse des HPV-Status eines Menschen geeignet sind, da sie das Muster kutaner/EV HPV-Typen kutaner Läsionen am gesamten Körper repräsentieren. Haarfollikel sind wesentlich leichter zu entnehmen als Gewebeproben und ermöglichen die Dokumentation der vorherrschenden kutaner/EV HPV-Infektionen eines Menschen. Sowohl in Haarfollikeln als auch in Tumorgewebe wurden persistierende Infektionen gefunden. Durch die andauernde Anwesenheit des Virus wird die Voraussetzung für eine onkogene Zelltransformation geschaffen. Durch den Beweis der Persistenz erfüllen kutane Papillomaviren das erste Kochsche Postulat für die Ursächlichkeit eines Agens mit dem Entstehen einer Krankheit.

Für die Erfüllung des vierten Postulates nach zur Hausen (abgewandelt von den 3 Kochschen Postulaten) muss die Infektion mit kutanen/EV HPV-Typen einen Risikofaktor in der Hauttumorgenese darstellen. Eine Schädigung der Haut durch UV-Licht ist der Hauptrisikofaktor für die Tumorentwicklung, eine Immunsuppression und der Hauttyp sind weitere bekannte Risikofaktoren. Die Immunsuppression scheint zusammen mit einer HPV-Infektion das Hautkrebsrisiko zu erhöhen. Es wurde eine Aktivierung der Virusreplikation nach Immunsuppression sowohl beim Menschen als auch beim Tiermodell *M. coucha* gefunden. Wenn HPV eine Rolle während der Hautkarzinogenese spielt, ist eine Aktivierung des Virus mit der Folge von Replikation und Expression viraler Gene notwendig. Der Mechanismus dieser Aktivierung ist noch ungeklärt. Funktionelle Analysen mit *in vitro* (organotypische Zellkultur) und *in vivo* Systemen (Tiermodell) könnten helfen die Signalwege zu identifizieren.

Es konnten keine Hoch-Risiko Typen für die Tumorenstehung identifiziert werden. Die Untersuchung kutaner Warzen, die klinisch bei OTR vermutlich auch zu SCC progredieren

können, lässt den Schluss zu, dass vor allem in der Entwicklung kutaner Hauttumore bei immunsupprimierten Patienten bisher noch unbekannte HPV-Typen eine Rolle spielen können.

Für detaillierte Untersuchungen des Einflusses der Immunsuppression sowie der Infektion mit kutanen PV bietet sich das Tiermodell *Mastomys coucha* an. MnPV-1 wurde bisher als einziger PV aus Hauttumoren von *M. coucha* isoliert, wodurch ein einfacheres Bild als beim Menschen entsteht. Auch beim Tiermodell wurde wie beim Menschen eine Aktivierung des Virus durch eine Immunsuppression beobachtet und die Viruslast erhöht sich mit zunehmendem Alter und ist in Hauttumoren höher als in Normalhaut.