

DIE ROLLE KUTANER
HUMANER PAPILLOMAVIREN
WÄHREND DER ENTWICKLUNG
EPITHELIALER HAUTTUMORE

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Anja Köhler
aus Berlin

April, 2007

1. Gutachter:

PD Dr. rer. nat. habil. Ingo Nindl, Charité Berlin, Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Hauttumorzentrum Charité (HTCC)

2. Gutachter:

Prof. Dr. rer. nat. Volker Erdmann, Freie Universität Berlin, Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie, Institut für Biochemie

Disputation am 27.09.2007

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Nicht-melanozytäre Hauttumore..... | 1 |
| 1.2 | Papillomavirus-assoziierte Krankheiten..... | 2 |
| 1.3 | Genomorganisation und Klassifikation der Papillomaviren | 3 |
| 1.4 | Die Infektion der Haut | 5 |
| 1.5 | Humane Papillomaviren und die Entstehung von Schleimhauttumoren..... | 7 |
| 1.6 | Die Entstehung epithelialer Hauttumore..... | 10 |
| 1.7 | Tiermodelle zur Erforschung PV-assoziiierter Erkrankungen | 12 |
| 1.8 | Ursächlichkeit humanpathogener Viren bei der Entwicklung von Karzinomen..... | 14 |
| 1.9 | Zielsetzung..... | 15 |
| 2 | Material und Methoden | 16 |
| 2.1 | Material | 16 |
| 2.1.1 | Patientenproben und anderes Untersuchungsmaterial | 16 |
| 2.1.2 | Aufbau der Studien..... | 16 |
| 2.1.3 | Verwendete Geräte | 20 |
| 2.1.4 | Verbrauchsmaterial..... | 20 |
| 2.1.5 | Reagenzien | 21 |
| 2.1.6 | Reagenzsysteme (<i>Kits</i>) | 21 |
| 2.1.7 | Puffer und Lösungen | 22 |
| 2.2 | Methoden | 23 |
| 2.2.1 | DNA-Isolierung..... | 23 |
| 2.2.2 | Virale Positivkontrollen..... | 24 |
| 2.2.3 | Grundlagen der Polymerase-Kettenreaktion..... | 27 |
| 2.2.4 | Konventionelle Polymerase-Kettenreaktion..... | 28 |
| 2.2.5 | Genotypisierung kutaner und mukosaler Papillomaviren mittels <i>Reverse Line Blot</i> | 30 |
| 2.2.6 | Quantitative Bestimmung der Viruslast | 37 |
| 2.2.7 | DNA <i>in situ</i> Hybridisierung | 45 |
| 2.2.8 | Hämatoxylin/Eosin-Färbung | 48 |
| 2.2.9 | Statistik..... | 49 |
| 3 | Ergebnisse | 50 |
| 3.1 | Etablierungen der Methoden..... | 50 |
| 3.1.1 | Sensitivität von BGC-PCR und <i>Reverse Line Blot</i> | 50 |
| 3.1.2 | Bestimmung der Viruslast mittels quantitativer PCR..... | 51 |
| 3.1.3 | DNA <i>in situ</i> Hybridisierung | 53 |
| 3.2 | HPV-Infektionen in wiederkehrenden, nicht-melanozytären Hauttumoren..... | 55 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 3.2.1 | Nachweis von Infektionen mit konsistenten HPV-Typen | 55 |
| 3.2.2 | Variantenanalysen | 58 |
| 3.2.3 | Viruslast..... | 60 |
| 3.3 | HPV-Prävalenz in Haarfollikeln verschiedener Areale des Körpers | 61 |
| 3.3.1 | Nachweis kutaner HPV-Typen in Haarfollikelzellen | 61 |
| 3.3.2 | Nachweis mukosaler HPV-Typen in Haarfollikelzellen | 61 |
| 3.3.3 | Nachweis mehrerer HPV-Typen in Haaren von einer Lokalisation | 63 |
| 3.4 | Verteilung kutaner/EV HPV-Typen in Haarfollikeln immunsupprimierter, organtransplantiertter Patienten..... | 64 |
| 3.4.1 | Prospektive Studie | 64 |
| 3.4.2 | Fall-Kontroll-Studie | 68 |
| 3.5 | HPV-Infektionen in Warzen von immunsupprimierten und immunkompetenten Patienten..... | 70 |
| 3.5.1 | Ergebnisse der HPV-Typisierung..... | 70 |
| 3.5.2 | Viruslast..... | 72 |
| 3.6 | Lokalisation und Virusmenge in Haut und Haarfollikeln von <i>Mastomys coucha</i> | 74 |
| 3.6.1 | <i>In situ</i> Hybridisierung..... | 74 |
| 3.6.2 | Die Viruslast in Normalhaut und Tumoren | 77 |
| 3.6.3 | Einfluss der Immunsuppression auf die Viruslast in Haarfollikelzellen | 78 |
| 4 | Diskussion | 80 |
| 4.1 | HPV-Nachweis und Genotypisierung mittels <i>Reverse Line Blot</i> | 80 |
| 4.2 | Epidemiologie kutaner/EV HPV-Typen | 81 |
| 4.3 | Persistierende Infektionen kutaner/EV HPV-Typen | 85 |
| 4.4 | Warzen als initiale Erkrankung zur Hautkarzinogenese | 87 |
| 4.5 | Viruslasten in Hauttumoren und Haarfollikelzellen..... | 90 |
| 4.6 | Tiermodell der Papillomavirus-induzierten Tumorentstehung | 92 |
| 4.7 | Schlussfolgerungen und Ausblick..... | 95 |
| 5 | Eigene Publikationen | 97 |
| 6 | Literaturverzeichnis..... | 98 |
| 7 | Zusammenfassung..... | 111 |
| 8 | Summary | 113 |
| 9 | Anhang | 115 |
| | Tabellenverzeichnis | 115 |
| | Abbildungsverzeichnis..... | 116 |
| | Abkürzungsverzeichnis..... | 117 |
| | Danksagung..... | 119 |

7 ZUSAMMENFASSUNG

Mehrere Faktoren führen zur Entstehung nicht-melanozytärer Hautkarzinome (engl. NMSC), wobei UV-Licht der Hauptrisikofaktor ist. Darüber hinaus spielt das Immunsystem eine zentrale Rolle wie Studien an immunsupprimierten, beispielsweise organtransplantierten Patienten (OTR) gezeigt haben. Bei diesen Menschen entstehen vor allem an Sonnenlicht-exponierten Arealen persistierende Warzen, die sich zu NMSC weiterentwickeln können. Mukosale Hoch-Risiko Typen humaner Papillomaviren (HPV) lösen anogenitale Karzinome aus (z. B. Gebärmutterhalskrebs), und auch kutane/EV HPV Typen scheinen die Entstehung epithelialer Hauttumore zu beeinflussen. Inwieweit sie als Auslöser dieser Krankheit gelten können, ist bislang unzureichend geklärt. Ziel dieser Arbeit ist die Rolle kutaner/EV HPV während der Hautkarzinogenese eingehender zu untersuchen und zu spezifizieren.

In dieser Arbeit wurden Lokalisation, Prävalenz, Persistenz und Viruslast kutaner/EV HPV-Typen mittels prospektiver und Fall-Kontroll Studien sowohl bei immunsupprimierten als auch bei immunkompetenten Patienten untersucht. Als Probenmaterial dienten verschiedene Tumorbiopsien (invasiv), aber Haarfollikelzellen der Augenbrauen bildeten den überwiegenden Anteil der Proben (nicht invasiv). Das Sammeln von Haarfollikeln war wesentlich leichter als das Entnehmen von Normalhautproben und ermöglichte die Dokumentation der vorherrschenden kutanen/EV HPV-Typen eines Menschen an verschiedenen Arealen des Körpers. Die Durchführung von Studien beim Menschen ist aus ethischen Gründen beschränkt, so dass Untersuchungen des onkogenen Potentials kutaner Papillomaviren am *in vivo* Tiermodell *Mastomys coucha* (immunkompetente und immunsupprimierte Tiere) durchgeführt wurden. Diese Tiere sind latent mit MnPV-1 infiziert und entwickeln spontan Hauttumore. Alle Untersuchungen wurden mittels hocheffizienter Methoden wie des *Reverse Line Blots*, quantitativer PCR und *in situ* Hybridisierung durchgeführt.

Persistierende Infektionen mit kutanen/EV HPV wurden a) unabhängig vom Immunstatus, b) bei NMSC-Patienten und gesunden Menschen und c) in Tumorgewebe als auch in Haarfollikeln nachgewiesen. Insbesondere die kutanen/EV HPV-Typen HPV-5, -15, -20 und -23 wurden häufig gefunden, und Primärtumore, Rezidive und Metastase waren meist mit demselben kutanen/EV HPV-Typen infiziert. In Warzen von OTR waren signifikant

häufiger Infektionen von kutanen/EV HPV-Typen als in Warzen immunkompetenter Patienten nachweisbar. In Warzen beider Kohorten waren die Viruslasten von Warzen-assoziierten HPV-Typen (HPV-3, -27, -57) um den Faktor 10^5 höher als von kutanen/EV HPV-Typen. Allerdings wurde eine Aktivierung der viralen Replikation kutaner/EV HPV mit Beginn der Immunsuppression beobachtet. Dieselbe Aktivierung wurde auch bei immunsupprimierten *M. coucha* gezeigt. Bei Tieren mit Tumoren wurden sowohl in Hauttumoren als auch in Normalhaut höhere Viruslasten als bei gesunden Tieren ermittelt. Ferner waren MnPV-1 Genome und/oder virale Transkripte in Normalhaut, Haarfollikelzellen, Hauttumoren und sogar in Nervenzellen des Gehirns nachweisbar.

Hoch-Risiko HPV-Typen für epitheliale Hauttumore konnten im Gegensatz zum Gebärmutterhalskrebs nicht identifiziert werden. Der Nachweis persistierender HPV-Infektionen von Primärtumoren, Rezidiven und Metastasen mit denselben Viren deutet jedoch auf eine ursächliche Beteiligung kutaner/EV HPV-Typen für die Entwicklung von NMSC. Die Aktivierung der viralen Replikation aufgrund Immunsupprimierung macht es wahrscheinlich, dass kutaner/EV HPV bei der Initiation der Onkogenese involviert ist. Vergleichbare Ergebnisse, die an *M. coucha* ermittelt wurden, deuten auf eine ursächliche Rolle von MnPV-1 bei der Hautkarzinogenese. Weiterführende Studien mögen die Bedeutung dieses *in vivo* Tiermodells für die Erweiterung des Wissens über epitheliale Hauttumore herausarbeiten.

8 SUMMARY

Multiple factors contribute to the development of non-melanoma skin cancer (NMSC), including UV light as the main risk factor. Another key player of skin carcinogenesis is the immune system. This correlation has been shown in studies with immunosuppressed patients such as organ transplant recipients (OTRs). They develop persistent warts in sun-exposed areas that may have the potential to progress into NMSC. Furthermore, cutaneous human papillomaviruses (cutaneous/EV HPVs) are considered to be involved in the development of epithelial skin tumours. However, the question remains unanswered, if the viruses have the potential to initiate NMSC, as it has been shown for genital high risk HPVs causing anogenital carcinomas such as cervical cancer. The main objective of this work is to specify the role of cutaneous/EV HPV during skin carcinogenesis.

Localisation, prevalence, persistence, and viral load of cutaneous/EV HPV types were determined in prospective as well as case control studies with both immunosuppressed and immunocompetent patients. Tumour biopsies were investigated (invasive), however hair follicles of plucked eyebrows were the main sample source (non-invasive). The collection of eyebrow hairs was easier to perform than normal skin tissue, and they represent the cutaneous/EV HPV infection status of an individual at different regions of the body. Because studies in humans are limited, the *in vivo* animal model, *Mastomys coucha*, was used in order to determine the oncogenic potential of cutaneous papillomaviruses investigating both immunocompetent and immunosuppressed subjects. These animals are latently infected with MnPV-1 and develop spontaneously skin tumours. Highly efficient methods including reverse line blot, quantitative PCR, and *in situ* hybridisation were utilized.

Persistent cutaneous/EV HPV infections were found in both hair follicle cells and biopsies, independently from immune status and history of skin cancer. In particular, the cutaneous/EV HPV types HPV-5, -15, -20, and -23 were most frequent. Infection with the same cutaneous/EV HPV types was present in primary tumour, recurrence, and metastasis. Warts of OTRs showed significantly more infections with cutaneous/EV HPV types than those of non-OTRs. The mean viral load of the warts-associated HPV types HPV-3, -27, and -57 was more than a 10^5 fold higher than of viruses from the cutaneous/EV group. The immune status of the individual under investigation did not influence the results. However,

the activation of viral replication started with the initiation of the immunosuppressant. The same was true for MnPV-1 present in immunosuppressed *M. coucha*. The viral load in both normal skin and tumours was higher in tumour-bearing animals than those without any skin disease. MnPV-1 genomes and / or viral transcripts were detected in normal skin, hair follicle cells, and even in neural cells of the brain.

It was not possible to identify and characterise high risk cutaneous/EV HPV types for NMSC as it was shown for cervical cancer. The persistence over different cancerous stages indicates the oncogenic potential of cutaneous/EV HPV types for cell transformation. Initiated by immunosuppression, the activation of virus replication suggests an important role of cutaneous/EV HPV in early stages of skin oncogenesis. The comparable results stated for *M. coucha* are probably indicative for the causal role of MnPV-1 during skin carcinogenesis. Further studies may highlight the importance of this *in vivo* animal model in accruing knowledge about epithelial skin cancer in humans.

9 ANHANG

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1.1: Papillomavirus-assoziierte Erkrankungen des Menschen | 3 |
| Tabelle 1.2: Einteilung von Gattungen, Arten, Typen, Subtypen und Varianten | 4 |
| Tabelle 1.3: Nicht-humane Papillomavirus-assoziierte Erkrankungen* | 13 |
| Tabelle 2.1: Kryo- und Paraffinpräparate (FFPE) der entnommenen Patientenproben von 3 NMSC-Patienten | 17 |
| Tabelle 2.2: Papillomavirus-Plasmide | 25 |
| Tabelle 2.3: Spezifische Oligonukleotide für konventionelle PCR und Sequenzierung..... | 29 |
| Tabelle 2.4: Oligonukleotide für die Q-PCR | 43 |
| Tabelle 3.1: Ergebnisse der kutanen/EV HPV-Typisierung, Analyse der HPV E6 Varianten und Bestimmung der Viruslast in Tumoren von NMSC-Patient #1, #2 und #3 | 57 |
| Tabelle 3.2 A und B: Nachweis von 24 kutanen/EV HPV- und 37 mukosalen HPV-Typen in Haaren verschiedener Hautareale von immunsupprimierten OTR (A) und IK Probanden (B) .. | 62 |
| Tabelle 3.3: Ergebnisse der HPV-Typisierung von Haarfollikelzellen kürzlich transplantiertes OTR (n=63);..... | 65 |
| Tabelle 3.4: HPV-Infektionen transplantiertes Patienten in den Gruppen mit kutanen Warzen (n=52), Hauttumoren (NMSC, N=49) und ohne kutane Warzen und Hauttumore (Kontrolle, n=53)..... | 68 |
| Tabelle 3.5: Nachweis von HPV-DNA der α -, β -, γ -, μ - und ν -Gattungen in Warzen von OTR und IK | 71 |
| Tabelle 3.6: Bestimmung der Viruslast in Hautwarzen von OTR und IK | 73 |
| Tabelle 3.7: Ergebnisse der Bestimmung der Viruslast in Haarfollikelzellen nach Immunsuppressivgabe..... | 78 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1.1: Die Risikofaktoren für die Entstehung von kutanen Plattenepithelkarzinomen (SCC)..... | 2 |
| Abbildung 1.2: Organisation des HPV-8 Genoms..... | 4 |
| Abbildung 1.3: Stammbaum der <i>Papillomaviridae</i> | 5 |
| Abbildung 1.4: Verlauf einer produktiven Infektion von Papillomaviren im Hautepithel..... | 6 |
| Abbildung 1.5: Stammbaum der α -PV..... | 8 |
| Abbildung 2.1: Prinzip des <i>Reverse Line Blot</i> | 32 |
| Abbildung 2.2: Durchführung des <i>Reverse Line Blot</i> | 33 |
| Abbildung 2.3: Quantitative PCR..... | 38 |
| Abbildung 2.4: Quantitative PCR von HPV-8 mit Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green..... | 39 |
| Abbildung 2.5: Prinzip der <i>in situ</i> Hybridisierung mittels Tyramid-Signal-Amplifikation..... | 46 |
| Abbildung 3.1: <i>Reverse Line Blot</i> und Polyakrylamidgel-Gelelektrophorese..... | 50 |
| Abbildung 3.2: Sequenzalignment von HPV-2a, -27, -57 und den Subtypen -27b und -57b..... | 52 |
| Abbildung 3.3 A–F: Referenzsystem für DNA- <i>in situ</i> Hybridisierung (ISH)..... | 54 |
| Abbildung 3.4: <i>Reverse Line Blot</i> mit BGC-PCR-Produkten..... | 56 |
| Abbildung 3.5: Darstellung der E6 Variantenanalyse von HPV-8, -14, -21 und -36 in 2 NMSC-Patienten..... | 58 |
| Abbildung 3.6: Ausschnitt aus dem Sequenzvergleich der HPV-21 Sequenzvariante 21var-1.. | 59 |
| Abbildung 3.7: Prävalenz kutaner/EV HPV-Typen in Haarfollikeln immunsupprimierter Patienten im ersten Monat nach Transplantation und nach 3, 6, 9, 12 und 18 Monaten..... | 64 |
| Abbildung 3.8: Veränderung der HPV-20 Viruslasten bei 6 Patienten innerhalb von 18 Monaten nach Organtransplantation..... | 67 |
| Abbildung 3.9: Verteilung der mukosalen, Warzen-assoziierten und kutanen/EV HPV-Typen in Warzen von organtransplantierten (OTR) und immunkompetenten (IK) Patienten..... | 70 |
| Abbildung 3.10: Verteilung von kutanen/EV HPV-Typen und Warzen-assoziierten HPV-Typen der A4-Spezies in Warzen von organtransplantierten (OTR) und immunkompetenten (IK) Patienten..... | 72 |
| Abbildung 3.11 A-F: DNA- <i>in situ</i> Hybridisierung (ISH) an Hautgewebe von <i>M. coucha</i> | 75 |
| Abbildung 3.12 A und B: MnPV-1-DNA im Gehirn (Thalamus) von <i>M. coucha</i> | 76 |
| Abbildung 3.13 MnPV-1-Viruslast in Normalhaut und Hauttumor von Tieren mit Tumoren (A) und in der Haut gesunder Tiere in Abhängigkeit vom Alter (B)..... | 77 |
| Abbildung 3.14 Die Entwicklung der Viruslast nach Immunsuppressivgabe..... | 79 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------|---|
| AEC | Amino-Ethyl-Carbazol |
| A | antisense |
| AK | Aktinischs Keratose |
| AS | Aminosäure |
| BCC | Basal Cell Carcinoma |
| BGC-PCR | Beta Gamma Cutaneous-Polymerase Chain Reaction |
| bp | Basepairs |
| BPV | Bovines Papillomavirus |
| COPV | Canine Oral Papillomavirus |
| CRPV | Cottontail Rabbit Papillomavirus |
| Da | Dalton – Einheit des Molekulargewichtes |
| DMF | Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Deoxyribonucleic Acid |
| dNTP | desoxy-Nukleotidtriphosphat |
| EcPV | Equus Caballus Papillomavirus |
| EDAC | 1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide |
| EDTA | Ethylendiamintetra-Acetat |
| EtBr | Ethidumbromid |
| EV | Epidermodysplasia Verruciformis |
| F | forward |
| FFPE | Formalin Fixed Paraffin Embedded |
| HR | High Risk |
| HPV | Humane/s Papillomavirus/en |
| IK | Immunkompetenter Proband/Patient |
| IS | Immunsuppression |
| kb | Kilobasenpaare |
| KBE | Kolonie bildende Einheiten |
| LB | Luria Bertani |
| LCR | Long Control Region |
| LR | Low Risk |
| MnPV | Mastomys natalensis Papillomavirus |

| | |
|--------|---|
| NCR | Non-Coding Region |
| NMSC | Non Melanoma Skin Cancer |
| ORF | Open Reading Frame |
| OTR | Organ Transplant Recipients |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| PBS | Phosphat Buffered Saline |
| Q-PCR | quantitative Polymerase Chain Reaction |
| R | reverse |
| RLB | Reverse Line Blot |
| PV | Papillomavirus (en) |
| TAE | Tris-Acetate-EDTA-Puffer |
| TBS | Tris Buffered Saline |
| S | sense |
| SCC | Squamous Cell Carcinoma |
| SDS | Sodiumdodecylsulfat |
| STD | Sexually Transmitted Diseases |
| SSSDNA | Sonificated Solmon Sperm DNA |
| U | Unit - Einheit der Enzymaktivität |
| UV | Ultraviolett |

Einheiten des Internationalen Einheitensystem (SI, Le Système international d'unités) wurden nach geltendem Gesetz verwendet.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Dr. Ingo Nindl danken, in dessen Arbeitsgruppe die vorliegende Arbeit angefertigt wurde. Seine wissenschaftliche Betreuung, sowie kritischen Beiträgen trugen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Marc Gottschling, für anregende fachliche Diskussionen, neue Blickwinkel, unermüdliches Korrekturlesen und viel Geduld.

Herrn Prof. Volker Erdmann danke ich für die Bereitschaft diese Arbeit zu begutachten.

Allen Mitarbeitern der Dermatologischen Klinik der Charité Berlin, hauptsächlich dem klinischen Personal des HTCC sei gedankt. Prof. Sterry und Prof. Stockfleth danke ich für die Möglichkeit meine Promotionsarbeit durchführen zu können, für die Bereitstellung von Material, Laborflächen und technischen Geräten.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei den Arbeitsgruppen von Prof. Frank Rösl und Dr. Michael Pawlita und ihren Mitarbeitern am DKFZ Heidelberg, im speziellen Julia Nafz und Kristina Michael für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe sei für das nette Arbeitsklima und die große Hilfsbereitschaft bei den täglichen Problemen der Laborarbeit gedankt, insbesondere Mandy Lehmann und meinen studentischen Mitstreitern Chantip Dang, Kathi Westphal und Anja Dahten.

Diese Promotionsarbeit ist meiner Patentante Marianne Weitze, meiner "Schwester im Geiste" Katrin Schult und vor allem meinen Mutter Erika Köhler gewidmet – für ihre uneingeschränkte Unterstützung, die vielen aufmunternden Worte und das stetige Interesse an meiner Arbeit.