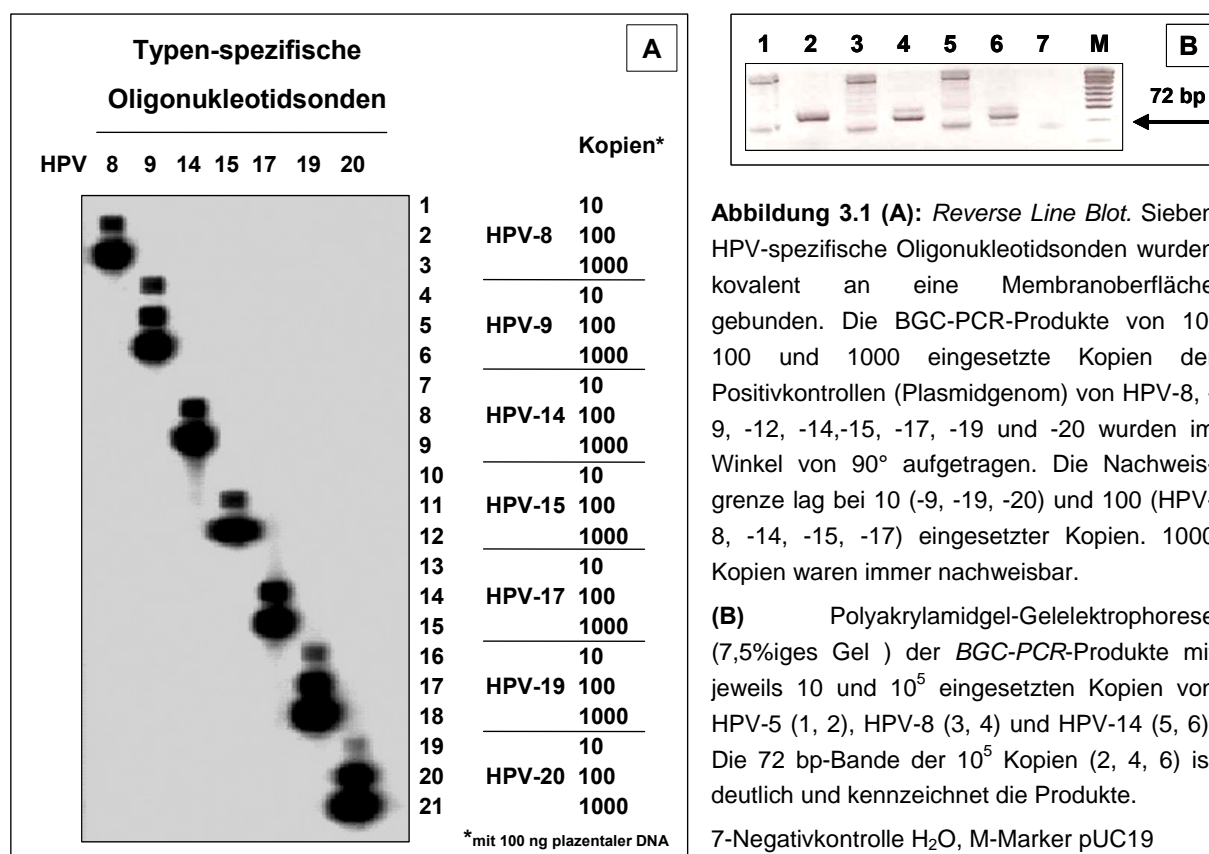


3 ERGEBNISSE

3.1 Etablierungen der Methoden

3.1.1 Sensitivität von BGC-PCR und *Reverse Line Blot*

Für die Etablierung der BGC-PCR wurden verschiedene Thermozykler ausgetestet. Die erforderlichen Zeitverzögerungen (Rampen) konnten aber nur beim PE9600 von Perkin Elmer erreicht werden. Die Qualität der BGC-PCR wurde anhand der Sensitivität bestimmt. Einige der zur Verfügung stehenden HPV-Plasmidgenome wurden in 10-fachen Verdünnungsreihen in der BGC-PCR eingesetzt und mit dem RLB nachgewiesen. In der Abbildung 3.1 A ist der Sensitivitätsnachweis von 7 HPV-Typen dargestellt. Es wurden 10, 100 und 1000 Kopien von HPV-8, -9, -14, -15, -17, -19, -20 mit 100 ng genomischer DNA aus Plazenta in der BGC-PCR eingesetzt. Die Nachweisgrenze lag zwischen 10 (-9, -19, -20) und 100 (HPV-8, -14, -15, -17) eingesetzter Kopien, das entspricht einer DNA-Menge von 0,2–2 fg. 1000 Kopien waren immer nachweisbar.



Einige BGC-PCR-Produkte wurden in einem Polyakrylamidgel (7,5%) aufgetrennt, in einem Ethidiumbromidbad (1x TAE + 10 µl EtBr) nachgefärbt und mittels Anregung durch

UV-Licht dokumentiert (Abbildung 3.1 B). Die 72 bp-Bande der BGC-PCR ist sichtbar bei 10^5 eingesetzten Kopien (2, 4, 6) von HPV-5, -8 und -14, während bei 10 eingesetzten Kopien nur unspezifische Nebenbanden erkennbar sind.

3.1.2 Bestimmung der Viruslast mittels quantitativer PCR

Die Viruslast von PV-positiven DNA-Isolaten wurde mittels Q-PCR quantifiziert. Für die Ermittlung der Zelläquivalente erfolgte die Etablierung einer PCR eines zellulären Gens, bei humanem Gewebe war es eine β -Globin- und bei Proben von *M. coucha* eine β -Aktin-spezifische PCR. Durch die Generierung von Standardreihen bekannter DNA-Mengen (0,1–100 ng) wurden die entsprechenden CP-Werte ermittelt und die DNA-Konzentration unbekannter Proben interpoliert. Als Grundlage diente die Größe des humanen Genoms in einer diploiden Körperzelle (NCBIGenomeProject no. taxid=9606) mit $6 \cdot 10^9$ Basenpaaren. Bei einem Basengewicht von etwa 650 Da pro Basenpaar entsprechen $6 \cdot 10^9$ bp einer DNA-Menge von 6,6 pg pro Zelle. Da präzise Angaben für *M. coucha* nicht verfügbar sind, wurde der Wert aus den ebenfalls bekannten Genomgrößen von Maus (*Mus musculus*, 5,6 pg, NCBIGenome Project no. taxid=10090) und Ratte abgeleitet (*Rattus norvegicus*, 5,8 pg, NCBIGenome Project no. taxid=10116) und auf 5,7 pg DNA pro Körperzelle festgelegt.

Für die Ermittlung der Virusmenge wurde aus dem eingefügten, klonierten HPV-Genom (~8.000 bp) und dem verwendeten Vektor (pBR322, ~4.300 bp) die Plasmidgröße (~12.300 bp) berechnet. Mit einem Molekulargewicht von 650 g/mol für 1 bp ergab sich eine Masse von etwa 14 ag (10^{-18} g) für eine Kopie eines HPV-Plasmids. Aufgrund von auftretenden Verlusten durch unspezifische Adhäsion wurde für alle Plasmide in Bakterienvektoren mit einer Masse von 20 ag pro Kopie gerechnet. Nach der Quantifizierung (siehe 2.2.2.6) der Plasmidlösungen konnten dann die erforderlichen Verdünnungen hergestellt werden. Die Verdünnungen der Plasmid-Positivkontrollen wurden in einer 1 ng/ μ l DNA-Lösung des zu bestimmenden Gewebes (DNA aus humaner Plazenta oder MnPV-1-negative *M. coucha* DNA) angesetzt.

Für HPV-27 und HPV-57 wurden Hybridisierungssonden zur Quantifizierung verwendet. Aufgrund der großen Sequenzhomologie war dadurch eine bessere Abgrenzung beider Typen gewährleistet. Die Oligonukleotide erfassten beide HPV-Typen zusammen, erst durch die Hybridisierungssonden konnten beide Typen getrennt voneinander innerhalb eines Ansatzes gemessen werden (Abbildung 3.2). Die Auswertung erfolgte analog zur Q-PCR mit

SYBR Green. Die Virusmenge der Probe wurde mittels einer Standardkurve berechnet und die Viruslast zusammen mit der zellulären DNA-Menge der Probe ermittelt.

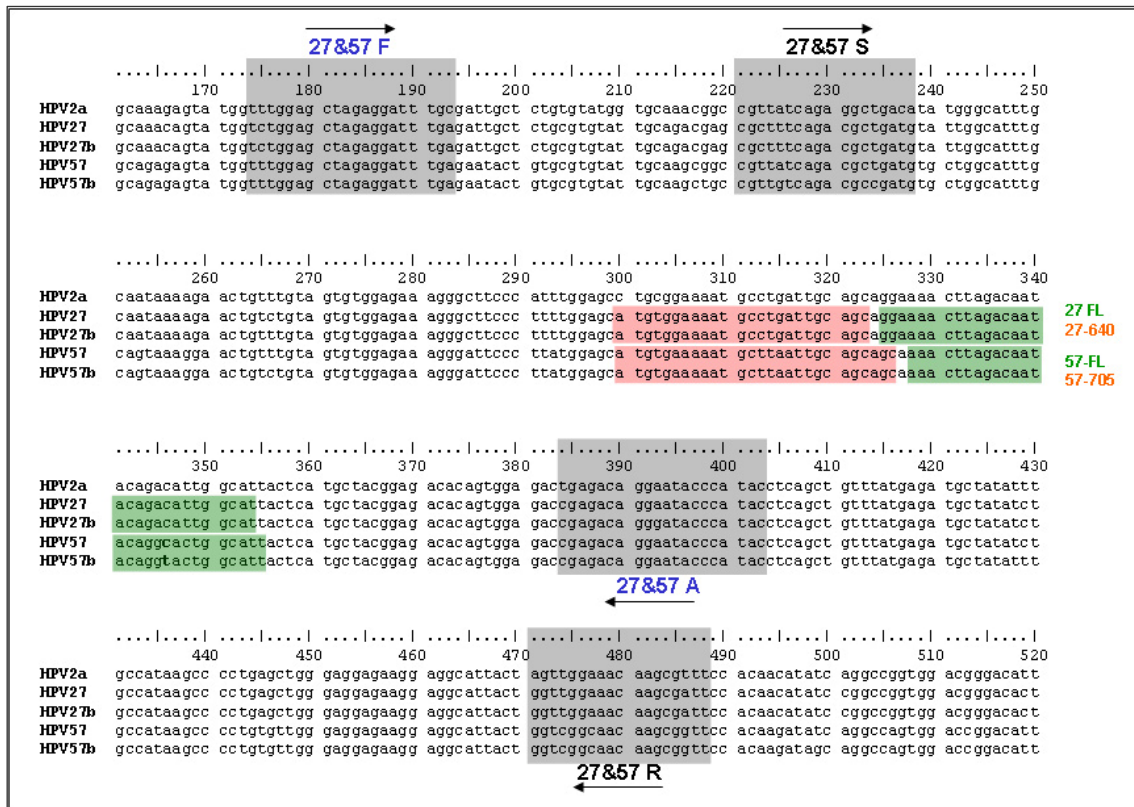


Abbildung 3.2: Sequenzalignment von HPV-2a, -27, -57 und den Subtypen -27b und -57b. Es ist der Bereich des ORF der Gene E6/E7 der Position 160–520 nt angegeben. Die blau unterlegten Bereiche zeigen die Positionen der 2 Vorwärts- und 2 Rückwärtsoligonukleotide (27&57F/S bzw. A/R) an, welche für die PCR-Optimierung getestet wurden. Die LC-Versuche wurden mit der Oligonukleotidkombination 27&57 F und A durchgeführt. Die grün und orange markierten Bereiche kennzeichnen die Sequenzen der verwendeten spezifischen Hybridisierungssonden 27-FL und 27-640 beziehungsweise 57-FL und 57-705.

3.1.3 DNA *in situ* Hybridisierung

Für die Etablierung der TSA-ISH wurden in Paraffin eingebettete Schnitte HPV-typisierter Genitalwarzen (HPV-6 und -11 positiv), einer EV-Läsion (HPV-8 positiv) und eines SCC (HPV-5 positiv) verwendet. Für die Sondenherstellung wurden die jeweiligen HPV-Plasmidgenome eingesetzt. Bei HPV-6 und -11 positiven Präparaten diente HPV-5 im gleichen Plasmidvektor (pBR322) als Negativkontrolle. Bei HPV-5 und -8 positiven Präparaten wurde als Negativkontrolle HPV-20 verwendet.

Die ISH von humanem Gewebe diente als Referenzsystem für die ISH von *M. coucha*-Gewebe. Die Optimierung der ISH wurde an Gewebe von Normalhaut, Hauttumoren und Gehirngewebe von *M. coucha* durchgeführt, welche im *Southern Blot*⁸ MnPV-1 positiv waren. Für alle Gewebe wurde die Proteinase K-Behandlung für die Zugänglichkeit der DNA optimiert. Dafür wurden verschiedene Inkubationszeiten (10–20 min) mit 2 Enzymkonzentrationen ausgetestet (4 µg/ml oder 8 µg/ml). Der optimale Proteinaseverdau wurde bei humane mit 4 µg/ml für 12 min ermittelt. Bei Gewebe von *M. coucha* war für eine optimale Vorbehandlung 8 µg/ml Proteinase notwendig. Die Inkubationszeiten betragen für Haut 12 min und für Gehirngewebe 14 min.

In der Beurteilung aller ISH-Experimente diente die ISH genitaler Feigwarzen als Referenzsystem (Abbildung 3.3 A und B). Typischerweise verteilten sich Zellen durch die Teilung einer basalen Zelle konisch in darüberliegende Schichten. Bei der HPV-Infektion war dieses konische Muster in den subbasalen bis zu den verhornten Schichten erkennbar. Diffuse Zellkernfärbungen ließen einen episomalen Status der Virus-DNA vermuten, während punktuelle Signale bei sehr geringen episomalen Viruslasten beobachtet wurden. Eine schwache Färbung positiver Zellen deutete ebenfalls auf geringe DNA-Mengen. In der Negativkontrolle waren keine spezifischen Zellkernfärbungen zu beobachten (Bild nicht gezeigt).

Im HPV-5 positiven SCC eines NMSC-Patienten (IK) (Abbildung 3.3 C) und in der HPV-8 positiven Läsion eines EV-Patienten sind positive Zellen ausschließlich oberhalb der basalen Schichten erkennbar (Abbildung 3.3 F). Im HPV-5 positiven SCC die Zellkerne eines Haarfollikels HPV-5 positiv, umgebende Zellen der Dermis waren HPV-5 negativ. In den

⁸ Der *Southern Blot* wurde von J.Nafz (AG Rösl) im DKFZ Heidelberg durchgeführt.

jeweiligen Negativkontrollen waren keine positiven Zellkerne vorhanden (Bilder zu EV-Läsion und Haarfollikel nicht gezeigt).

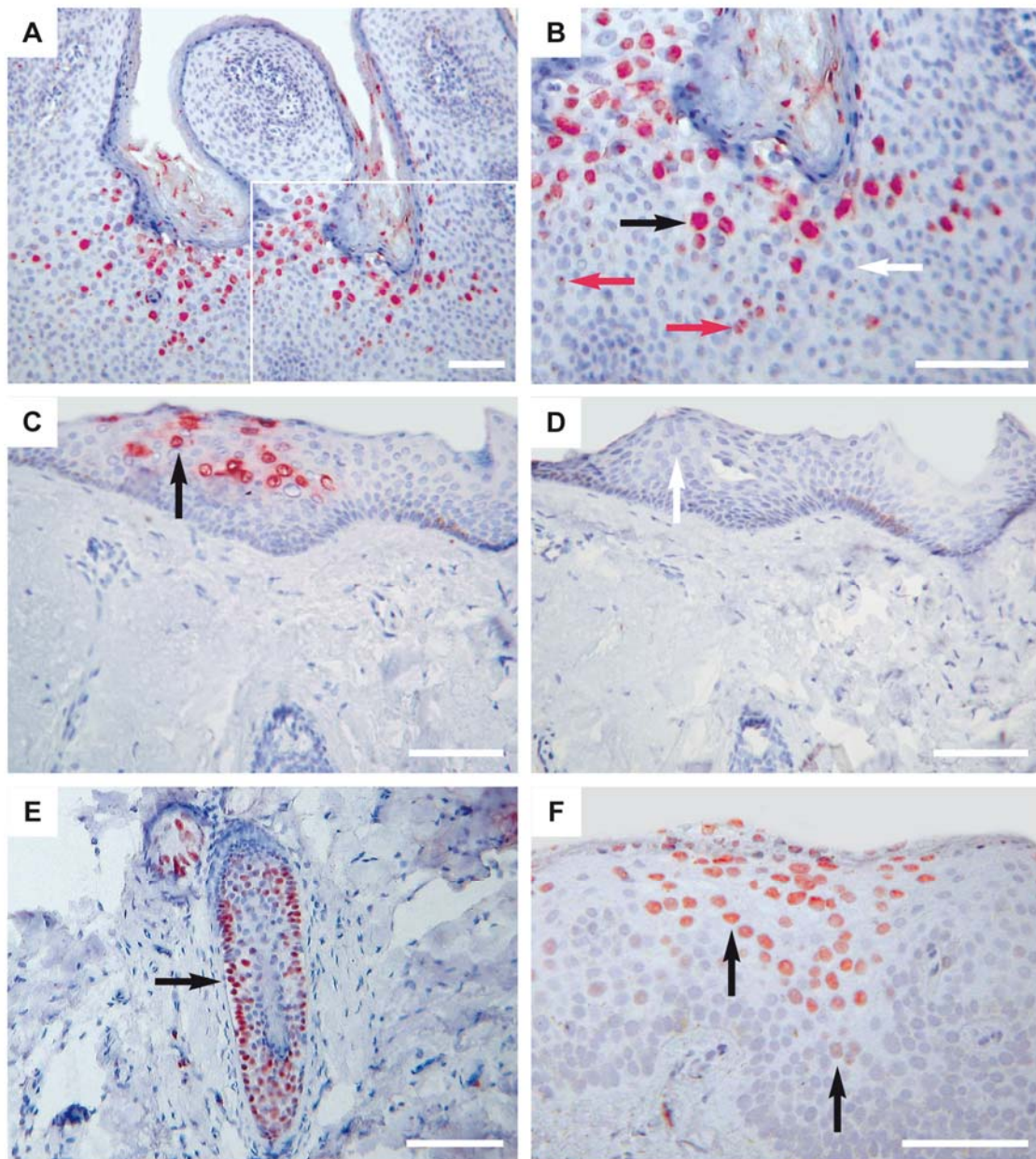


Abbildung 3.3 A–F: Referenzsystem für DNA *in situ* Hybridisierung (ISH) Rotfärbung indizierte HPV-positive Zellkerne: (A) und (B) HPV-6/-11 positive Genitalwarze (*C. acuminata*), (B) Ausschnitt von (A) HPV-positive Zellen zeigten sowohl diffuse (schwarzer Pfeil) als auch lokal begrenzte Signale (roter Pfeil), HPV-negative Zellkerne in blau (weißer Pfeil); (C)–(E) HPV-5 positives SCC eines IK NMSC-Patienten (C) HPV-5 positive Zellkerne (schwarzer Pfeil); (D) Negativkontrolle (ISH mit HPV-20) zu (C) ohne rote Zellkernfärbung (weißer Pfeil); (E) rot gefärbte HPV-5 positive Kerne von Haarfollikelzellen in der Dermis (schwarzer Pfeil); umgebende Zellen der Dermis waren HPV-5 negativ (F) HPV-8 positive Zellkerne einer EV-Läsion mit stark und schwach gefärbten Zellkernen (schwarze Pfeile). In den Negativkontrollen zu A, E und F war keine Rotfärbung der Zellkerne zu beobachten (nicht gezeigt). Maßstab: 100 μ m.

3.2 HPV-Infektionen in wiederkehrenden, nicht-melanozytären Hauttumoren

3.2.1 Nachweis von Infektionen mit konsistenten HPV-Typen

In 2 von 3 Patienten (#1 und #2) waren alle Proben HPV-positiv (Tabelle 3.1). Es wurden konsistente Einzel- oder Mehrfachinfektionen nachgewiesen, sowohl im Primärtumor als auch in Rezidiven und in Metastasen. Patient #3 war in 7 von 9 Proben frei von HPV-DNA.

Bei Patient #1 war HPV-14 sowohl im primären SCC als auch in einer Metastase im Lymphknoten 8 Monate nach Entfernung des Primärtumors nachweisbar.

In den Proben des immunsupprimierten OTR #2 wurden über einen Zeitraum von 54 Monaten (4,5 Jahre) insgesamt 10 HPV-Typen bestimmt. HPV-9 und -24 waren jeweils nur zu einem Zeitpunkt und nur in einer Probe zu finden. HPV-50 war in 2 Proben und HPV-17 in 4 Proben zum identischen Zeitpunkt vorhanden. Über einen längeren Zeitraum nachweisbar waren HPV-4 und -20 (8–37 Monate), HPV-8 und -15, (0–54 Monate), HPV-21 (0–37 Monate) und HPV-36 (0–53 Monate). Dabei wurden HPV-8, -15 und -17 sowohl in Hautläsionen von Hals beziehungsweise Wange nachgewiesen, als auch in Haarfollikeln von Kopf- und Rumpf.

Der kutane Primärtumor von Patient #3 war zum Zeitpunkt der Entnahme negativ für HPV-DNA. In einer Lymphknoten Metastase, die 16 Monate später entnommen wurde, konnten HPV-4 und HPV-14 nachgewiesen werden. Der zum gleichen Zeitpunkt entnommene, Tumor-freie Lymphknoten zeigte keine HPV-DNA. Erst nach 24 Monaten wurde HPV-4 in einem SCC-Rezidiv gefunden.

In Tabelle 3.1 sind die Ergebnisse der HPV-Analysen zusammengefasst und in Abbildung 3.4 ist exemplarisch ein kutaner RLB einiger Proben dargestellt.

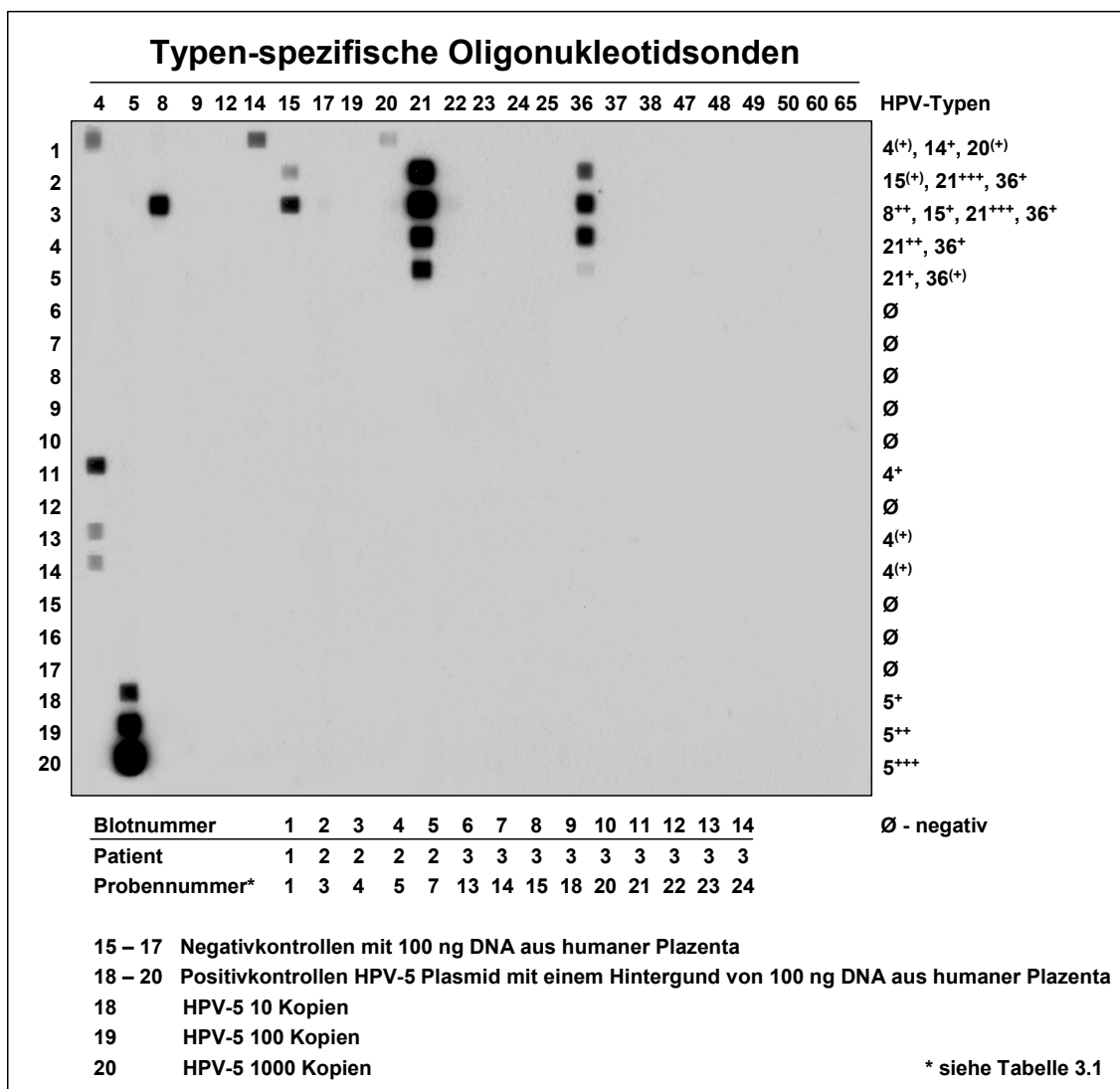


Abbildung 3.4: Reverse Line Blot mit BGC-PCR-Produkten. Typenspezifische Oligonukleotid-Sonden von 24 HPV-Typen wurden kovalent auf einer Membranoberfläche in parallelen Linien gebunden (horizontale Achse). Die BGC-PCR-Produkte der Patientenproben und Kontrollen wurden im Winkel von 90° dazu aufgetragen (vertikale Achse). Die Probennummern der Patienten (1–14) sind den Biopsienummer in Tabelle 3.1 zugeordnet. In jedem Experiment wurden 3 Negativkontrollen und 3 Positivkontrollen mitgeführt.

Im Fall von Patient #1 bestätigte eine HPV-14-spezifische PCR die HPV-14-positiven Proben des RLB. Bei Patient #2 wurden ebenfalls die Ergebnisse des RLB mittels typenspezifischen E6-PCR für HPV-8, -21 und -36 bestätigt. In 17 von 18 durchgeführten PCR-Reaktionen stimmten die Ergebnisse der L1- und E6-PCR überein. Nur in Biopsie-Nummer 9 konnte kein E6-PCR-Produkt für HPV-21 nachgewiesen werden, obwohl der RLB nach BGC-PCR ein positives Signal für HPV-21 zeigte (Tabelle 3.1).

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

Pat. Nr.	Biopsie Nr.	Entnahme - Zeit nach Primärtumor (Monate)	HPV Typ ^a	HPV E6 Variante ^b	Viruslast			
					HPV Typ	Virale Kopien/ µl (±SD)	Zellanzahl/ µl (±SD)	Anzahl der Zellen pro 1 Kopie
1	1	0	4 ⁽⁺⁾ ,14 ⁺ ,20 ⁽⁺⁾	HPV-14PT	14	3,0 (±1,2)	115 (±3)	38
	2	8	14⁺	HPV-14PT	14	1,4 (±0,1)	525 (±20)	375
2	3	0	15 ⁺ , 21⁺⁺⁺ , 36⁺	21Var-1 36Var-1	21 36	14 (±1,5) 0,56 (±0,04)	94 (±4)	7 168
	4	0	8 ⁺ ,15 ⁺ , 21⁺⁺⁺ , 36⁺	21Var-1 36Var-1	21 36	4,7 (±0,4) 0,18 (±0,01)	16 (±1)	3 91
	5	4	21⁺⁺⁺ , 36⁺	21Var-1 36Var-1	21 36	7,8 (±0,04) 0,20 (±0,01)	147 (±8)	19 735
	6	8	4 ⁺⁺⁺ ,20 ⁺ , 21⁺⁺	21Var-1	21	0,6 (±0,1)	52 (±2)	87
	7	9	21⁺ , 36⁽⁺⁾	21Var-1 36Var-1	21 36	0,35 (±0,01) n.m.	84 (±5)	240 n.b.
	8	11	4 ⁺⁺ ,20 ⁺ , 21⁺ , 36⁽⁺⁾	21Var-1 36Var-2	21 36	n.b.	n.b.	n.b.
	9	37	4 ⁽⁺⁾ 15 ⁺ ,20 ⁺⁺ , 21⁽⁺⁾	n.m.	21	0,36 (±0,01)	83 (±6)	231
	10	53	8⁺⁺ ,17 ⁽⁺⁾	8Var-1	8	21 (1)	786 (±105)	37
	11	53	8⁺⁺ ,15 ⁽⁺⁾ ,24 ⁺ , 36⁺	8Var-1 36Var-1	8 36	241 (±5) n.m.	19311 (±396)	80 n.b.
	12	54	8⁺	8Var-1	8	10 (±3)	2096 (±84)	210
	H1	53	8⁺⁺⁺ ,17 ⁺ , 50 ⁺⁺⁺	8Var-1	8	208 (±10)	166 (±16)	1
	H2	53	8⁺⁺⁺ , 9 ⁺ , 15 ⁺ ,17 ⁺	8Var-1	8	30 (±2)	65 (±1)	2
H3	53	8⁺⁺⁺ ,15 ⁺ ,17 ⁺ ,50 ⁺	8Var-1	8	4 (±0,02)	48 (±1)	12	
3	13	0	negativ					
	14	1	negativ					
	15	10	negativ					
	16	16	4 ⁺⁺ ,14 ⁺	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
	17	16	negativ					
	18	19	negativ					
	19	20	negativ					
	20	20	negativ					
21	24	4 ⁺	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	

Von den fettgedruckten HPV-Typen (n= 21) wurden eine E6 Variantenanalyse und eine Bestimmung der Viruslast durchgeführt. Signalstärken (siehe Abbildung 3.4): +++, stark, ++ mittel, + schwach, (+) sehr schwach

^a, HPV Nachweis von 24 kutanen Typen (HPV-4, -5, -8, -9, -12, -14, -15, -17, -19, -20, -21, -22, -23, -24, -25, -36, -37, -38, -47, -48, -49, -50, -60, und -65) wurde durchgeführt mittels BGC-PCR gefolgt vom RLB.

^b, HPV-14PT, Prototyp; 21Var-1, 226C (Del 244–273, AA16–25); 36Var-1, 311T; 36Var-2, 261C (L21S), 311T; 8Var-1, 220A (Y9N), 272A (A26E), 276A, 289C, 302T (S36L), 309T, 348A. E6 Sequenzen wurden mit der Prototyp Sequenz von HPV-8 (NCBI accession number: M12737), HPV-14 (NCBI accession number: X74467), HPV-21 (NCBI accession number: U31779), and HPV 36 (NCBI accession number: U31785) verglichen.

HPV, humane Papillomaviren; n.b., nicht bestimmt; n.m., nicht messbar; Pat, Patient; Nr., Nummer

3.2.2 Variantenanalysen

Bei den sequenzierten PCR-Produkten von HPV-8, -21 und -36 des Patienten #2 zeigten sich Varianten der bekannten Prototypen, während bei Patient #1 nur die HPV-14 E6 Sequenzen des beschriebenen Prototyps (HPV-14PT) nachweisbar waren (Abbildung 3.5). In Tabelle 3.1 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

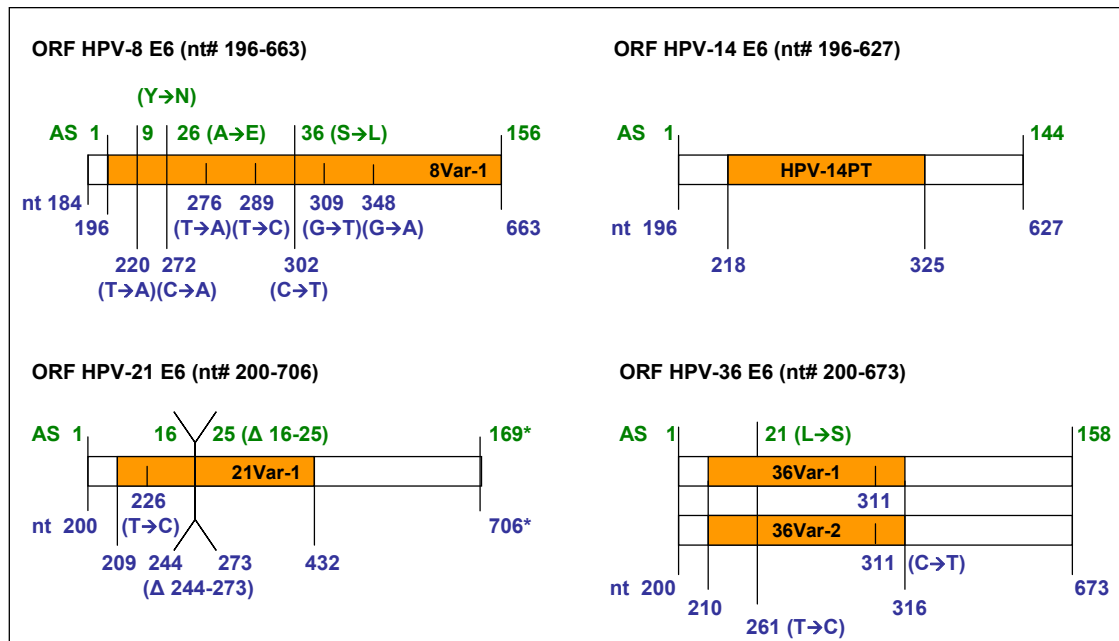


Abbildung 3.5: Darstellung der E6 Variantenanalyse von HPV-8, -14, -21 und -36 in 2 NMSC-Patienten. Der E6 ORF mit Aminosäurepositionen (AS, grün) und Nukleotidpositionen (nt, blau) sind eingezeichnet. Veränderte Nukleotide und Aminosäuren sind in Klammern angegeben.

* 21Var-1 besitzt 676 statt 706 Nukleotide und 139 statt 169 Aminosäuren.

ORF, offener Leserahmen; nt#, Nukleotidposition (A, Adenin; C, Cytosin; G, Guanin; T, Thymin); AS, Aminosäure (A, Alanin; E, Glutaminsäure, L, Leucin; N, Asparagin; S, Serin; Y, Tyrosin)

Bei Patient #2 wurden in 2 AK und einem SCC, 53 und 54 Monate nach Primärtumorentnahme, identische Sequenzveränderungen im HPV-8 E6-Gen (E6 #196–663) nachgewiesen (8Var-1). Diese E6-Variante wurde darüber hinaus in HPV-8-positiven Haarfollikel (Augenbraue, Kopf, Brust) gefunden, die nach 53 Monaten entnommen wurden (Abbildung 3.5). Bei allen Mutationen handelte es sich um den Austausch einzelner Nukleotide. In Position 9 (nt# 220) der E6 Aminosäuresequenz wurde Tyrosin durch Asparagin ersetzt, an Position 26 (nt# 272) Alanin durch Glutaminsäure und an Position 36 (nt# 302) Serin durch Leucin ausgetauscht. Außerdem wurden 4 weitere, stille Mutationen

ohne Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz an Position nt# 276, nt# 289, nt# 309 und nt# 348 ermittelt. Die 7 veränderten Basen umfassen je zweimal einen Austausch T → A (#220, #276) und je einmal C → A (#272), T → C (#289), C → T (#302), G → T (#309) und G → A (#348).

Der untersuchte Bereich von HPV-21 umfasste die Nukleotide 209–432 des E6 ORF (E6 #200–706). In allen 6 untersuchten Hautbiopsien (0–11 Monate) konnte eine stille Mutation an Position 226 (T→C) als auch eine 30 nt umfassende Deletion ohne Leserahmenverschiebung nachgewiesen werden (Abbildung 3.6). Bei den fehlenden Nukleotiden handelte es sich um einen Verlust von 10 Aminosäuren (#16–25) im E6-Gen (Abbildung 3.6).

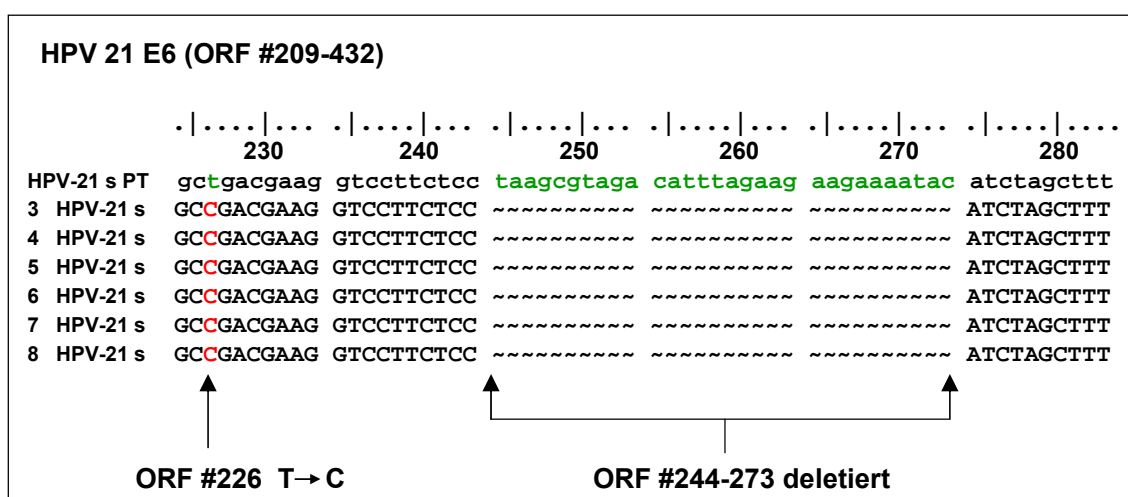


Abbildung 3.6: Ausschnitt aus dem Sequenzvergleich der HPV-21 Sequenzvariante 21var-1 von Biopsie-Nr. 3-8 mit dem Prototypen der Datenbank (NCBI Accession number: U31779). In allen Proben wurde innerhalb des analysierten Bereiches (ORF#209–432) ein Einzelnukleotidaustausch an Position 226 (T→C), sowie eine 30 bp umfassende Deletion der Nukleotide 244–273 nachgewiesen.

HPV, humane Papillomaviren; s, vorwärts; PT, Prototyp; ORF, offener Leserahmen

Die in 6 Hautbiopsien gefundenen Sequenzabweichungen vom HPV-36 Prototyp lagen zwischen den Positionen #210–316 des E6 ORF (200–673 nt). Es wurde in 5 Proben zum Zeitpunkt der Primärtumorentnahme sowie 4, 8, 9 und 53 Monate danach eine HPV-36-Variante identifiziert. Der Nukleotidaustausch von C → T (nt# 311) führte nicht zum Aminosäureaustausch. Eine zusätzliche Punktmutation wurde in einer kutanen Metastase nach 11 Monaten gefunden. Hier führte der Basenaustausch von T → C (nt# 261) zu einer Aminosäureänderung von Leucin zu Serin an Position 21. Diese Variante wurde in der Tumorprobe 53 Monate nach Primärtumorentnahme nicht gefunden.

3.2.3 Viruslast

Es wurden in allen getesteten Gewebeproben nur sehr geringe Viruslasten gefunden (1 HPV-Kopie pro 3 bis 735 Zellen). HPV-8 Viruslasten von bis zu 1 HPV-Kopie pro Zelle wurden dagegen in Haarfollikelzellen nachgewiesen (Tabelle 3.1).

In den HPV-14 positiven Proben des immunkompetenten Patienten #1 zeigte sich innerhalb des Zeitraumes von 8 Monaten eine Verringerung der Virusmenge von 1 HPV-14 Kopie pro 38 Zellen im Primärtumor (Biopsie-Nr. 1) zu 1 HPV-14 Genom pro 375 Zellen im Tumorrezidiv (Biopsie-Nr. 2).

Die Viruslasten von HPV-8 in den AK-Proben des immunsupprimierten OTR (#2) lagen bei 1 Kopie pro 37 (Biopsie-Nr. 10, 53 Monate) bis 210 Zellen (Biopsie-Nr. 12, 54 Monate). Im SCC betrug die Viruslast 1 Kopie pro 80 Zellen (Biopsie-Nr. 11, 53 Monate). In den Haarfollikelzellen der Augenbraue wurde eine HPV-8 Viruslast von einer Kopie pro Zelle, bei Kopfhaaren (H2) mit einer Kopie pro 2 Zellen und bei vom Rumpf entnommenen Haarfollikel (H3) von einer Kopie auf 12 Zellen gemessen.

Die Viruslast von HPV-21 und -36 bei Patient #2 konnte insgesamt über einen Zeitraum von 37 und 53 Monaten bestimmt werden. Bei HPV-21 nahm die Viruslast stetig ab. In primären SCC (Biopsie-Nr. 4) war 1 Kopie pro 7 Zellen vorhanden, in der AK (Biopsie-Nr. 4) zum gleichen Zeitpunkt wurde 1 Kopie auf 3 Zellen gemessen. Nach 4 Monaten war 1 Kopie pro 19 Zellen, nach 8 Monaten pro 87 Zellen und nach 37 Monaten pro 231 Zellen in Rezidiven und Metastasen nachweisbar.

Bei HPV-36 zeigte sich eine große Schwankungsbreite von einem Genom pro 91–735 Zellen. Nach 9 Monaten war HPV-36 nicht mehr messbar.

3.3 HPV-Prävalenz in Haarfollikeln verschiedener Areale des Körpers

3.3.1 Nachweis kutaner HPV-Typen in Haarfollikelzellen

In den Haarfollikelzellen wurde eine Vielzahl kutaner HPV-Typen gefunden. In OTR wurden in doppelt so vielen Proben HPV-DNA gefunden wie in IK, jedoch in beiden Gruppen wurde kein dominanter HPV-Typ nachgewiesen (Tabelle 3.2).

In OTR (A) war die HPV-Nachweisrate mit 49 HPV-positiven von 51 untersuchten Proben (96%) doppelt so hoch im Vergleich zu IK (B), bei denen 27 von 54 Haarproben (50%) HPV positiv waren. Bei einem Kontrollprobanden wurde in keiner der Haarproben HPV-DNA gefunden. In 3 von 9 IK war ein HPV-Typ in einer einzelnen Haarprobe nachweisbar. Bei einem weiteren Probanden wurde in 2 von 6 Proben ein einzelner HPV-Typ (HPV-15 oder -23) identifiziert. Fünf von 9 Probanden der IK (56%) wurden demnach als HPV-negativ definiert.

Keiner der identifizierten kutanen Typen war weder bei OTR noch bei IK signifikant häufiger vertreten als andere. In den Proben der OTR wurden 16 von 24 analysierten kutanen HPV-Typen (HPV-5, -8, -9, -12, -14, -15, -17, -20, -21, -23, -24, -25, -36, -37, -38, -50) ermittelt, während bei IK 14 von 24 Typen (HPV-5, -8, -12, -14, -15, -17, -19, -20, -21, -23, -24, -37, -38, -50) vorkamen. Bei OTR war HPV-23 am häufigsten vertreten (14%), gefolgt von HPV-8 (11%) und HPV-15 (9%). HPV-15 war dagegen der am häufigsten nachgewiesene HPV-Typ in IK Probanden (10%), gefolgt von HPV-19 (7%) und HPV-14 (6%). Die HPV-Typen HPV-9, -25, und -36 wurden ausschließlich in OTR, aber nicht in der Kontrollgruppe nachgewiesen. Darüber hinaus wurde HPV-19 in 7% der Kontrollgruppe, aber in keiner Probe der immunsupprimierten Patienten gefunden. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tabelle 3.2 zu finden.

3.3.2 Nachweis mukosaler HPV-Typen in Haarfollikelzellen

Sechs mukosale HPV-Typen (HPV-16, -33, -40, -51, -52, -70) wurden in 6 von 51 Haarproben (12%) von 9 OTR identifiziert, aber in keiner Haarproben der IK. Von 3 Patienten wurde in Haarfollikeln der Augenbraue je ein einzelner mukosaler HPV-Typ gefunden (HPV-16, -40 oder -51). Ebenso konnte in 2 Beinhaarproben (HPV-33 oder -52) und in einer Probe vom Rumpf (HPV-70) je ein mukosaler HPV-Typ gefunden.

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)

A	HPV-Typen ^a in Haaren						HPV-Typen		
	Pat. Nr.	Sonnenlicht-exponiert			Nicht Sonnenlicht-exponiert			in mind. 4 Arealen	in allen Arealen
Kopf		Augenbraue	Arm	Rumpf	Bein	Scham			
OTR	1	23,36,37	23,36,37,(40)	n.b.	23,36,37,50	23,36,37,50	23,36,37	23,36,37	23,36,37
	2	9,14,17	14,17	8,9,14,17	8,9,14,17	8,9,17	8,9,14,17	8,9,14,17	17
	3	9,15,24	15,20,21,23,24	9,15,20,21,23,24,36	15,20,21,24	15,20,21,24,25	9,15,20,21,24,25	15,20,21,24	15,24
	4	8,9,15,17	8,17,50,(51)	8,15,50	8,15,17,24,50	–	8	8	–
	5	5	5	n.b.	5	(52)	5	5	–
	6	14,23	8,14,15,23	n.b.	23	8,15, (33)	23	23	–
	7	–	9,12,14,20,23,25, (16)	20,25	23,25, (70)	12,20,25,38	20,25	20,25	–
	8	37	37	15,37	37	23,37	23,37	37	37
	9	8,15,23	8,9,20,23	8,15,23	8,20,23,38	8,9,14,20,23	8,14,23,38	8,23	8,23
Durchschnittliche Anzahl an HPV-Typen: Proben insgesamt: 3,0 (73/24) HPV-positive Proben: 3,2 (73/23)			Durchschnittliche Anzahl an HPV-Typen: Proben insgesamt: 2,9 (78/27) HPV-positive Proben: 3,0 (78/26)			HPV-Positivität insgesamt: Pat.: 9/9 (100%) Proben: 49/51 (96%)			
B	HPV-Typen ^a in Haaren						HPV-Typen		
	Pat.-Nr.	Sonnenlicht-exponiert			Nicht Sonnenlicht-exponiert			in mind. 4 Arealen	in allen Arealen
Kopf		Augenbraue	Arm	Rumpf	Bein	Scham			
IK	1	14,15,37,50	14,15,37	14,15,37,50	14	14,15,21,50	14	14,15	14
	2	5,19,20,21,37	5,19,20,37	5,37	19	–	19	19	–
	3	–	–	–	–	–	15	–	–
	4	12,15,19,23	8,12,14,15,19,23	8,12,14,15,17,19,23	8,12,14,15,23	8,12,14,15,17,19,23	8,12,14,15,17,19,23	8,12,14,15,19,23	12,15,23
	5	–	–	15	15	–	–	–	–
	6	–	–	–	–	–	–	–	–
	7	23	–	–	–	–	–	–	–
	8	–	–	–	–	15	–	–	–
	9	5,15,19,20,24,38	5,12,15,20,23	15	12,15,19,20,23,38	–	5	15	–
Durchschnittliche Anzahl an HPV-Typen: Proben gesamt: 2,0 (53/27) HPV-positive Proben: 3,8 (53/14)			Durchschnittliche Anzahl an HPV-Typen: Proben Gesamt: 1,4 (37/27) ^b HPV-positive Proben: 2,8 (37/13) ^b			HPV-Positivität insgesamt: Pat.: 4/9 (44%) Proben: 27/54 (50%)			

HPV, humane Papillomaviren; Pat., Patient; Nr., Nummer; OTR, organtransplantiertes Proband; IK, immunkompetentes Proband; n.b., nicht bestimmt, –, negativ, MW, Mittelwert; w, weiblich

^a, 24 kutane HPV-Typen (β & γ): HPV-4, -5, -8, -9, -12, -14, -15, -17, -19, -20, -21, -22, -23, -24, -25, -36, -37, -38, -47, -48, -49, -50, -60, -65 und 37 mukosale HPV-Typen (α): HPV-6, -11, -16, -18, -26, -31, -33, -34, -35, -39, -40, -42, -43, -44, -45, -51, -52, -53, -54, -55, -56, -57, -58, -59, -61, -66, -68, -70, -71, -72, -73, -81, -82IS, -82IMM, -83, -84, -CP61

^b kein signifikanter Unterschied zwischen Sonnenlicht-exponierten und Nicht-Sonnenlicht-exponierten Arealen (Statistische Analyse erfolgte mittels U-test von Wilcoxon, Mann, und Whitney). Mukosale HPV-Typen sind in Klammern angegeben.

3.3.3 Nachweis mehrerer HPV-Typen in Haaren von einer Lokalisation

Mehrere HPV-Typen wurden in der Mehrzahl der Proben beider Gruppen nachgewiesen. Die durchschnittliche Anzahl der HPV-Typen pro Probe war in OTR nicht signifikant erhöht verglichen mit den IK (Tabelle 3.2).

In Haarfollikeln wurde mehrere HPV-Typen in 8 von 9 OTR (89%) nachgewiesen und in 38 von 49 HPV-positiven Proben (78%). Nur in 4 von 9 der Kontrollgruppenprobanden (44%) mit 16 von 27 HPV-positiven Proben (59%) waren dagegen mehrere HPV-Typen zu finden. Das Muster spezifischer HPV-Typen auf einem Individuum war unabhängig von der untersuchten Körperregion: Zwischen 1–6 übereinstimmende HPV-Typen konnten in den Proben eines Individuums von mindestens 4 Lokalisationen nachgewiesen werden.

Die durchschnittliche Anzahl nachgewiesener HPV-Typen war sowohl bei OTR (alle Proben: 3,0 vs. 2,9; HPV-positiv: 3,2 vs. 3,0) als auch bei IK (alle Proben: 2,0 vs. 1,4; HPV-positiv: 3,8 vs. 2,8) an Sonnenlicht-exponierten Hautarealen prinzipiell höher als an bedeckten Arealen, die Unterschiede waren aber nicht signifikant.

3.4 Verteilung kutaner/EV HPV-Typen in Haarfollikeln immunsupprimierter, organtransplantierter Patienten

3.4.1 Prospektive Studie

In der folgenden Studie wurden Patienten eingeschlossen, deren Nierentransplantation vor weniger als einem Monat stattfand. Die Patienten wurden in einer prospektiven Studie über einen Zeitraum von 18 Monaten beobachtet. Die aus Haarfollikelzellen isolierte DNA wurde mittels BGC-PCR und RLB HPV-typisiert. Dabei wurden bei durchschnittlich 80% der Patienten HPV-DNA nachgewiesen (Abbildung 3.7).

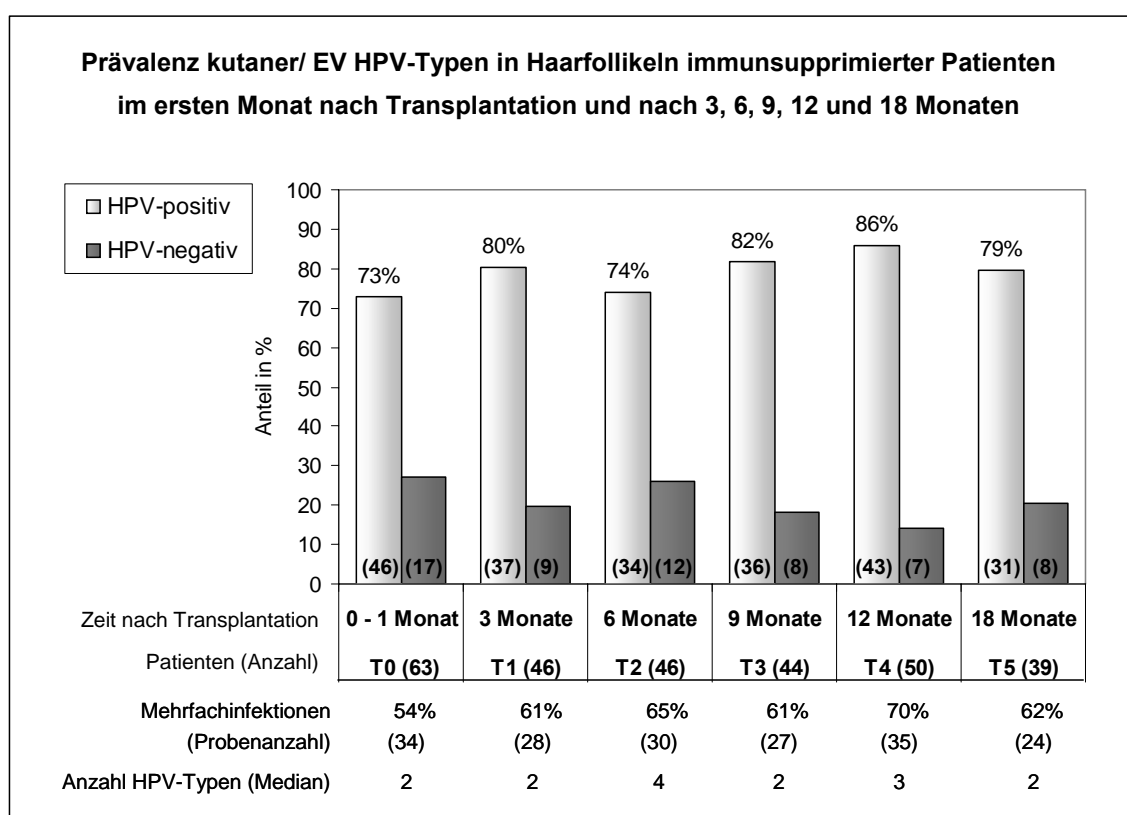


Abbildung 3.7: Prävalenz kutaner/EV HPV-Typen in Haarfollikeln immunsupprimierter Patienten im ersten Monat nach Transplantation und nach 3, 6, 9, 12 und 18 Monaten.

Anzahl der Mehrfachinfektionen mit kutanen/EV HPV-Typen und Anzahl der HPV-Typen in den Haarfollikeln der Augenbrauen; T0–T5, Zeitpunkt 0–5

Von anfänglich 63 Patienten (T0) kamen in der Nachbeobachtungszeit (T1–T5) zwischen 39–50 Patienten zur Wiedervorstellung. HPV-DNA wurde dabei in minimal 73% (T0) bis maximal 86% (T4) der Proben gefunden. Eine Infektion mit mehreren HPV-Typen lag in 54% der Patienten zum Zeitpunkt T0 vor. Diese Rate erhöhte sich auf 70% innerhalb

von 12 Monaten, nach 18 Monaten lag sie bei 62%. Die Anzahl der nachgewiesenen HPV-Typen lag dabei zwischen 0–8 Typen (Median. 2–4). In 45 von 63 Patienten (71%) wurden persistierende HPV-Infektionen über den gesamten Zeitraum mit 1-7 HPV-Typen (Median: 2) nachgewiesen. Als persistierend wurden HPV-Typen definiert, die in mindestens 60% der untersuchten Proben eines Patienten nachweisbar waren. Die Ergebnisse der HPV-Typisierung sind in der Tabelle 3.3 A und B zusammengefasst. Innerhalb eines Monats nach Transplantation (T0) waren in 17 von 63 aufgenommenen Patienten (27%) keine HPV-DNA nachweisbar. Nach weiteren 18 Monaten wurden in 12 von 17 HPV-negativen Patienten HPV-DNA gefunden. Insgesamt wurde bei 5 von 63 Patienten (8%) in keiner Probe HPV-DNA nachgewiesen (Tabelle 3.3 A).

Tabelle 3.3: Ergebnisse der HPV-Typisierung von Haarfollikelzellen kürzlich transplantiertes OTR (n=63); (A) HPV-negativ (21/63) zum Zeitpunkt T0 (n=17) und Patienten mit nicht persistierenden^a HPV-Infektionen (n=4).

A	ZT	0–1 Monat	3 Monate	6 Monate	9 Monate	12 Monate	18 Monate	persistierender HPV-Typ(en) ^a
Nr.	T0	T1	T2	T3	T4	T5		
1	–	–	–	–	–	–	–	
2	–	n.b.	–	n.b.	–	n.b.	–	
3	–	–	–	–	–	–	–	
4	–	n.b.	–	–	–	–	–	
5	–	–	–	–	n.b.	n.b.	–	
6	–	–	14,23	23	14,23	23	–	23
7	–	5,17	n.b.	5,17	5,17,23	5,17	–	5,17
8	–	n.b.	8,9,17,20	8,17	8,14,17	n.b.	–	8,17
9	–	9	9,14	–	n.b.	14	–	
10	–	n.b.	–	23	23	–	–	
11	–	–	9	9	–	12,24	–	
12	–	n.b.	n.b.	9	n.b.	n.b.	–	
13	–	15	n.b.	–	–	–	–	
14	–	n.b.	–	n.b.	14	n.b.	–	
15	–	–	–	n.b.	n.b.	20	–	
16	–	20	–	n.b.	–	n.b.	–	
17	–	n.b.	–	–	14,20,23	–	–	
18	38	n.b.	–	23	5,38	–	–	
19	9	–	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	–	
20	24	n.b.	n.b.	–	5,15,17	n.b.	–	
21	37	–	–	n.b.	n.b.	n.b.	–	

^a, Definition persistierende HPV-Infektion: Nachweis von mindestens einem HPV-Typ in 60% der untersuchten Proben eines Patienten, bei nicht persistierenden HPV-Infektionen war dies nicht der Fall

–, negativ; n.b., nicht bestimmt; Nr., Nummer; ZT, Zeit nach Transplantation

Tabelle 3.3: (B) Ergebnisse der HPV-Typisierung, Patienten mit persistierenden^a HPV-Infektionen (42/63)

B	ZT	0-1 Monat	3 Monate	6 Monate	9 Monate	12 Monate	18 Monate	persistierender HPV-Typ(en) ^a
Nr.		T0	T1	T2	T3	T4	T5	
22		15	5	n.b.	5,15,20	n.b.	n.b.	5,15
23		12,15	15	12	n.b.	12	–	12
24		38	5,9,14,21,38	n.b.	5,21	5,21,38	5,38	5,38
25		14	8,14,23	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	14
26		15	n.b.	15,38	15,20	5,15	5,15	15
27		20	20	20	20	20	20	20
28		23	15,23	n.b.	23	23	23	23
29		23	23,38	14,23,38	n.b.	14,23,38	14,23	23
30		24	24	24	n.b.	n.b.	n.b.	24
31		23,24	–	n.b.	23,24,47	23	23	23
32		23,37	23,37	23,37	n.b.	37	23,37	23,37
33		15,23	15,17,23,24	15,17,23	n.b.	15,23,37	17,23	23
34		12,15	n.b.	12,17	12,17,20	12,17	12,17	12,17
35		15,20	n.b.	12,15,20,37	n.b.	12,20,37	12,15,20,37	15,20
36		8,12	8,12	n.b.	12	8,12	8,12,17	8,12
37		5,17	5,17	n.b.	n.b.	5,17	n.b.	5,17
38		9,24	9,24	9,24	9,24	9,24	9,24	9,24
39		20,23	20	15,20,23,38	20	20	20	20
40		23,37	37,38	n.b.	17,20,23,37	17,20,37,38	n.b.	37
41		20,23	17,20	14,15,20,23	15,17,20,23	20,23	n.b.	20
42		12,38,47	12,38,49	n.b.	12,38,47	12	12,38	12,38
43		15,23,37	15,23,37	12,37	n.b.	12	15,37	12,37
44		9,19,23	n.b.	9,19,23	9,15,23,24	23	19,23	19,23
45		37,48,65	37,48,65	8,14,37,48,65	37,65	8,37,48,65	n.b.	37,48,65
46		4,5,8,23	23	23	n.b.	n.b.	n.b.	23
47		14,21,24,36	21	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	21
48		20,22,23,37	15,37	n.b.	23,37	23,37	n.b.	23,37
49		8,14,15,20	n.b.	8,14,15,20	15,20	15,23,38	n.b.	15,20
50		15,20,23,37	15,20,23,37	15,20,23,37	15,20,23,37	15,20,23,37	15,20,23,37	15,20,23,37
51		8,14,15,17,23	8,14,23	8,14,20,23	n.b.	n.b.	8,23	8,14,23
52		14,17,21,23,36	n.b.	17,21,36	15,17,21,23,36	17,21,36	n.b.	17,21,36
53		5,12,14,15,23	n.b.	5,12,17,37	5,12,14,17,20,23	5,12,17,20,21	5,12,17	5,12,17
54		5,12,15,17,23	n.b.	12,15,17,23	12,23	12,17,23	12,17,23	12,17,23
55		9,15,21,37,49	9,15,20,37,49	9,20,37,49	9,14,15,20,23,37,49	9,20,23,37,49	n.b.	9,15,20,37,49
56		9,12,20,24,25	9,12,20,24,25	9,12,15,23,24	9,12,15,20,23,24,25	9,12,15,23,24,25	9,12,15,23,24,25	9,12,15,23,24,25
57		12,15,17,23,24,36	15,23	15,17,24	15,24	9,12,15,17,24	9,12,24	15,24
58		8,15,17,20,23,24	8,20,23,24	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	8,20,23,34
59		5,9,15,23,37,38	5,9,23,37,38	5,9,23,37,38	5,9,23,37,38	5,9,23,37	5,9,23,37,38	5,9,23,37,38
60		8,15,19,20,23,47	8,15,17,20,50	8,9,15,19,20,23,47	8,9,15,17,20,23,47	8,9,17,20,47	n.b.	8,9,15,17,20,23,47
61		14,15,19,20,23,24	14,15,17,20,23,37,38,65	15,20,23,65	12,15,20	15,20,23,65	12,14,15,20,23,65	15,20,23,65
62		14,15,19,20,23,36,38	14,19,23,36,38	14,23,36,38	20,23,36,38	14,23	23,38	14,23,38
63		12,14,19,20,23,24,37	12,14,20,23,24,37	14,20,23,24,37	12,14,15,20,23,24,37	12,14,20,23,24,37	12,14,20,23,24,37	12,14,20,23,24,37

^a, siehe Tabelle 3.3 (A); –, negativ; n.b., nicht bestimmt; Nr., Nummer

Persistierende Infektionen wurden insgesamt mit 19 von 24 getesteten HPV-Typen gefunden (HPV-5, -8, -12, -14, -15, -17, -19, -20, -21, -23, -24, -25, -36, -37, -38, -47, -48, -49, -65). HPV-4, -22 und -60 wurde in keiner Probe gefunden. Die häufigsten persistierenden HPV-Typen waren HPV-23 mit 13%, HPV-15 und -20 mit jeweils 8% und HPV-37 mit 6%. Die restlichen kutanen/EV HPV-Typen waren mit 1% bis 5% vertreten.

Exemplarisch wurde die Viruslast von HPV-20 in 6 Patienten über einen Zeitraum von 12 beziehungsweise 18 Monaten bestimmt (Abbildung 3.8). Dabei war bei 5 Patienten ein Anstieg innerhalb von 6–9 Monaten nach Transplantation zu beobachten. Bei einem Patienten reduzierte sich die Anzahl der HPV-20 Genome von durchschnittlichen 42,2 Kopien in 100 Zellen (T0) pro 1 Kopie (Monat 12).

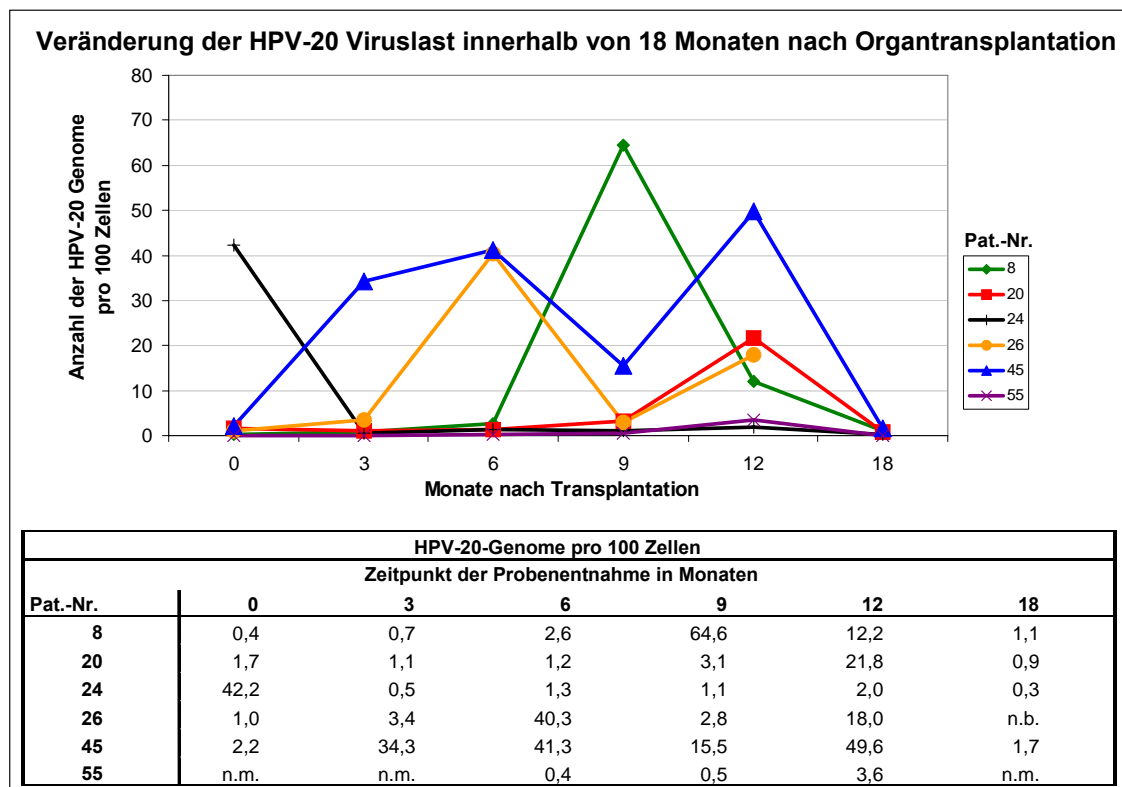


Abbildung 3.8: Veränderung der HPV-20 Viruslasten bei 6 Patienten innerhalb von 18 Monaten nach Organtransplantation.

n.b., nicht bestimmt, n.m. nicht messbar, Nr., Nummer; Pat., Patient

3.4.2 Fall-Kontroll-Studie

In der Fall-Kontroll-Studie wurden 154 Patienten eingeschlossen, deren Nierentransplantation vor mehr als 2 Jahren stattfand. Die Patienten wurden 3 Gruppen zugeordnet. Patienten ohne epitheliale Hauttumore (ohne kutane Warzen und ohne NMSC) gehörten zur Kontrollgruppe. Patienten, die ausschließlich kutane Warzen hatten, bildeten die erste Fall-Gruppe. Patienten mit benignen und malignen epithelialen Hauttumoren (kutane Warzen und NMSC) wurden zur zweiten Fall-Gruppe gezählt. Von allen Probanden wurde die aus Haarfollikelzellen isolierte DNA mittels BGC-PCR und RLB HPV-typisiert.

Tabelle 3.4 A: HPV-Infektionen transplantierten Patienten in den Gruppen mit kutanen Warzen (n=52), Hauttumoren (NMSC, N=49) und ohne kutane Warzen und Hauttumore (Kontrolle, n=53)

Gruppe	Patienten	Alter in Jahren ^a : Min–Max (Median)	Männer ^b	Kutane/ EV HPV- positiv ^b	Mehrfach- Infektionen ^b	Anzahl kutaner/ EV HPV- Typen	Häufigste HPV-Typen (%) [nicht nachgewiesene HPV-Typen]	Anzahl HPV-Typen pro Probe ^a : Min–Max (Median)	Zeit nach TX in Jahren ^a : Min–Max (Median)
Kontrolle	53	21–70 (48)	30 (57%)	43 (81%)	28/53 (53%)	19/24	HPV-23 (11%) HPV-20 (9%) HPV-12 (9%) HPV-15 (7%) [-22,-25,-48,-49,-60]	0–10 (2)	2–22 (7)
Warzen	52	16–70 (46)	34 (65%)	39 (75%)	30/52 (58%)	18/24	HPV-15 (8%) HPV-5,-23 (7%) [-22,-47,-48,-49,-60,-65]	0–7 (3)	2–29 (12)
p-Wert		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.			n.s.	n.s.
NMSC	49	22–74 (62)	38 (78%)	41 (84%)	35/49 (71%)	19/24	HPV-15 (12%) HPV-23 (8%) HPV-5,-20 (8%) [-22,-47,-48,-60,-65]	0–7 (3)	2–28 (12)
p-Wert		< 0,001	< 0,05	n.s.	n.s.			n.s.	< 0,05

p-Wert bestimmt: ^a, U-Test nach Wilkoxon, Mann und Whitney; ^b, chi²-Test

Max, Maximum; Min, Minimum; n.s., nicht signifikant; TX, Transplantation

In den 3 Gruppen der transplantierten Patienten (ohne epitheliale Hauttumore, mit benignen kutanen Warzen, mit NMSC) lag die HPV-Positivität der getesteten kutanen/EV HPV-Typen bei 75–84% (Tabelle 3.4 A). In der Gruppe der NMSC-Patienten war eine signifikant höhere Altersgruppe (Median: 62 vs. 48 Jahre) und mehr Männer als in der Kontrollgruppe (78% vs. 57% Männer) vertreten. Die Zeit nach Transplantation war bei den NMSC-Patienten ebenfalls signifikant erhöht verglichen mit den Kontrollpatienten (Median: 12 vs. 7 Jahre). Ein vorherrschender HPV-Typ wurde in keiner der 3 Gruppen gefunden. Im gesamten Kollektiv waren HPV-5, -15, -20 und -23 am häufigsten vertreten, die zusammen

einen Anteil von etwa 30% aller nachgewiesenen kutanen/EV HPV-Typen ausmachten (Kontrollpatienten: 31%, Patienten mit Warzen: 28%, NMSC-Patienten: 36%). Alle nicht explizit aufgeführten kutanen/EV HPV-Typen erreichten eine Häufigkeit von 1-6% in den einzelnen Gruppen (Tabelle 3.4).

Für die Auswertung innerhalb der Gruppen wurde die Zeit nach Transplantation betrachtet (≥ 2 bis 10 Jahre und > 10 Jahre). Die Aufteilung nach Alter stand nicht zur Verfügung, da sich die Altersgruppen zu sehr unterschieden. Es ließ sich bis auf eine Ausnahme keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit der Transplantationsdauer feststellen. Nur bei Patienten mit Warzen war eine signifikante Erhöhung der Anzahl an nachgewiesenen kutanen/EV HPV-Typen (Median 1 vs. 4) nach über 10 Jahren zu finden.

Tabelle 3.4 B: HPV-Typisierung von transplantierten Patienten in den Gruppen mit kutanen Warzen (n=52), Hauttumoren (NMSC, N=49) und ohne kutane Warzen und Hauttumore (Kontrolle, n=53)

Zeit nach TX	Gruppe	Patienten	Alter in Jahren ^a : Min–Max (Median)	Männer ^b	Kutane/ EV HPV- positiv ^b	Mehrfach- Infektionen ^b	Anzahl kutaner/ EV HPV- Typen	Häufigste HPV-Typen (%) [nicht nachgewiesene HPV-Typen]	Anzahl HPV-Typen pro Probe ^b : Min–Max (Median)
> 2–10 Jahre	Kontrolle	32	36–70 (51)	16 (50%)	25 (78%)	18/32 (56%)	19/24	HPV-23 (10%) HPV-20 (9%) HPV-12 (8%) [-22,-25,-48,-49,-60]	0–10 (3)
								HPV-12,-15, -20,-23 (10%) HPV-17 (6%) [-22,-25,-48,-49,-60]	0–9 (1)
	p-Wert		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.			n.s.
> 2–10 Jahre	Warzen	25	16–70 (42)	17 (68%)	17 (68%)	11/25 (44%)	16/24	HPV-36 (9%) HPV-20,-15,-12 (7%) [-21,-22,-25,-47, -48,-49,-60,-65]	0–4 (1)
								HPV-5 (11%) HPV-15 (9%) HPV-8,-23 (8%) [-22,-47,-48, -49,-60,-65]	0–7 (4)
	p-Wert		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.			p < 0,01
> 2–10 Jahre	NMSC	20	22-73 (64)	15 (75%)	17 (85%)	14/20 (70%)	16/24	HPV-12,-15 (10%) HPV-17,-23,-38 (8%) [-8,-22,-47,-48, -49,-50,-60,-65]	0–6 (2)
								13% HPV-15 HPV-5,-20-23 (8%) HPV-8 (7%) [-22,-47,-48,-60,-65]	0–7 (4)
	p-Wert		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.			n.s.

p-Wert bestimmt: ^a, U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney; ^b, chi²-Test

Max, Maximum; Min, Minimum; n.s., nicht signifikant; TX, Transplantation

3.5 HPV-Infektionen in Warzen von immunsupprimierten und immunkompetenten Patienten

3.5.1 Ergebnisse der HPV-Typisierung

Die kutane Warzen von 33 immunsupprimierten OTR (n=53) und 29 immunkompetenten, nicht-transplantierten Patienten (IK, n=41) wurden auf die Anwesenheit mukosaler α -HPV, Warzen-assoziiertes α -HPV und kutaner/EV HPV-Typen (β und γ -HPV) untersucht. HPV-DNA aller Typen wurde in 91% und 93% der Proben von OTR beziehungsweise IK nachgewiesen (Tabelle 3.5). In OTR wurden in 79% der Warzen kutane/EV HPV-Typen gefunden, die damit signifikant häufiger in dieser Kohorte zu finden waren als bei IK, bei denen 49% der Warzen kutane/EV HPV-Typen zeigten. Warzen-assoziierte HPV-Typen der A2-, A4-, μ - und ν -Gattung hatten mit 63% in IK die höchste Prävalenzrate (Abbildung 3.9). In OTR waren sie nur in 45% der Warzen vorhanden.

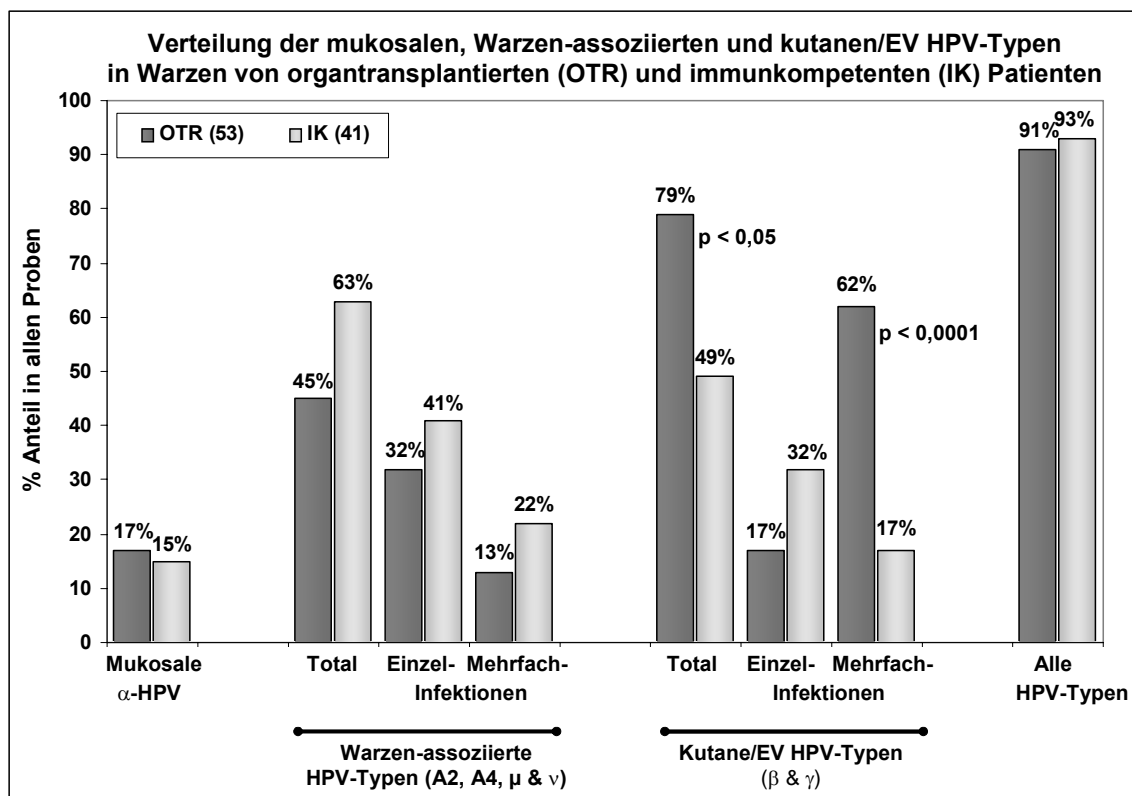


Abbildung 3.9: Verteilung der mukosalen, Warzen-assoziierten und kutanen/EV HPV-Typen in Warzen von organtransplantierten (OTR) und immunkompetenten (IK) Patienten.

Die Patientenzahl beider Kohorten ist in Klammern angegeben. Der p-Wert wurde mit dem χ^2 -Test berechnet.

Bei OTR wurden alle 24 der untersuchten kutanen/EV HPV-Typen nachgewiesen, in IK waren es 14 von 24 Typen (HPV-4, -8, -9, -14, -15, -17, -20, -21, -22, -23, -24, -25, -37, -38). Die Anzahl der multiplen Infektionen mit kutanen/EV HPV-Typen war signifikant höher bei OTR als bei IK (62% vs. 17%, $p < 0,0001$).

Tabelle 3.5: Nachweis von HPV-DNA der α -, β -, γ -, μ - und ν -Gattungen in Warzen von OTR und IK

OTR	Warzen-assoziierte HPV-Typen				Kutane/ EV HPV- Typen ⁴	Mukosale α -HPV-Typen ⁵	HPV- Infektionen Insgesamt
	A2 ¹	A4 ²	μ & ν ³	Alle			
53 Biopsien							
33 Patienten	13/53	9/53	7/53	24/53	42/53	9/53	48/53
30x Niere	25%	17%	13%	45%	79%	17%	91%
1x Lunge							
1x Herz							
1x Herz und Lunge	5x HPV-3 9%	8x HPV-27 15%	3x HPV-41 6%		17x HPV-20 32%	4x HPV-89 8%	
23 Männer	2x HPV-10 4%	1x HPV-57 2%	1x HPV-63 2%		15x HPV-23 28%	3x HPV-61 6%	
10 Frauen							
Alter:	2x HPV-28 4%		3x multiple HPV-Typen		12x HPV-8 23%	1x HPV-16 2%	
19–70 Jahre	1x HPV-29 2%				11x HPV-5 21%	1x HPV-32 2%	
Median:							
53 Jahre							
					... weitere ^b		

IK	Warzen-assoziierte HPV-Typen				Kutane/ EV HPV- Typen	Mukosale HPV-Typen	HPV- Infektionen Insgesamt
	A2	A4	μ & ν	Alle			
41 Biopsien							
29 Patienten	9/41	21/41	2/41	26/41	20/41	6/41	38/41
	22%	51%	5%	63%	49%	15%	93%
20 Männer							
9 Frauen	6x HPV-3 15%	13x HPV-57 ^a 32%	1x HPV-1 2%		7x HPV-17 17%	3x HPV-HF8 7%	
Alter:	2x HPV-10 5%	11x HPV-27 ^a 27%	1x HPV-41 2%		5x HPV-20 12%	3x HPV-IA18 7%	
10–73 Jahre							
Median:	1x multiple HPV- Typen				3x HPV-8 7,3%		
42 Jahre							
					... weitere ^c		

OTR, organtransplantiert; HPV, humane Papillomaviren; EV, Epidermodysplasia verruciformis

¹, CN3-PCR (HPV-3, -10, -28, -29, -77); ², MY09/10-PCR (HPV-2, -27, -57); ³, CN1-PCR (HPV-1, -41, -63); ⁴, BGC-PCR (HPV-4, -5, -8, -9, -12, -14, -15, -17, -19, -20, -21, -22, -23, -24, -25, -36, -37, -38, -47, -48, -49, -50, -60, -65); ⁵, MY09/10-PCR (alle weiteren α -HPV-Typen exklusiv der bereits erwähnten A2- und A4-Spezies)

^a 3x Doppelinfectionen mit HPV-27 und HPV-57; ^b 9x HPV-12; 8x HPV-17; 7x HPV-15; 5x HPV-4; 4x HPV-19 und -37; 3x HPV-14, -21, -22, -24, -25, -36 und -65; 2x HPV-3 und -5; 1x HPV-47, -48, -49 und -60; ^c 2x HPV-4, -9, -14, -15, -37 und -38; 1x HPV-21, -22, -23, -24 und -25

HPV-20, -23, -8 und -5 waren mit 32%, 28%, 23% und 21% am häufigsten unter Immunsuppression zu finden, die anderen kutanen/EV HPV-Typen hatten einen Anteil von 2–

17% (Abbildung 3.10). Ohne Immunsuppression waren HPV-17 (17%), HPV-20 (12%) und HPV-8 (7%) am häufigsten vertreten. Von den Warzen-assoziierten Typen waren in beiden Gruppen die A4-Typen mit 17–51% am häufigsten nachweisbar. Die kutanen/EV HPV-Typen und/oder die HPV-Typen der A4-Gruppe waren in 85% der Proben von OTR und in 83% der Proben der IK zu finden.

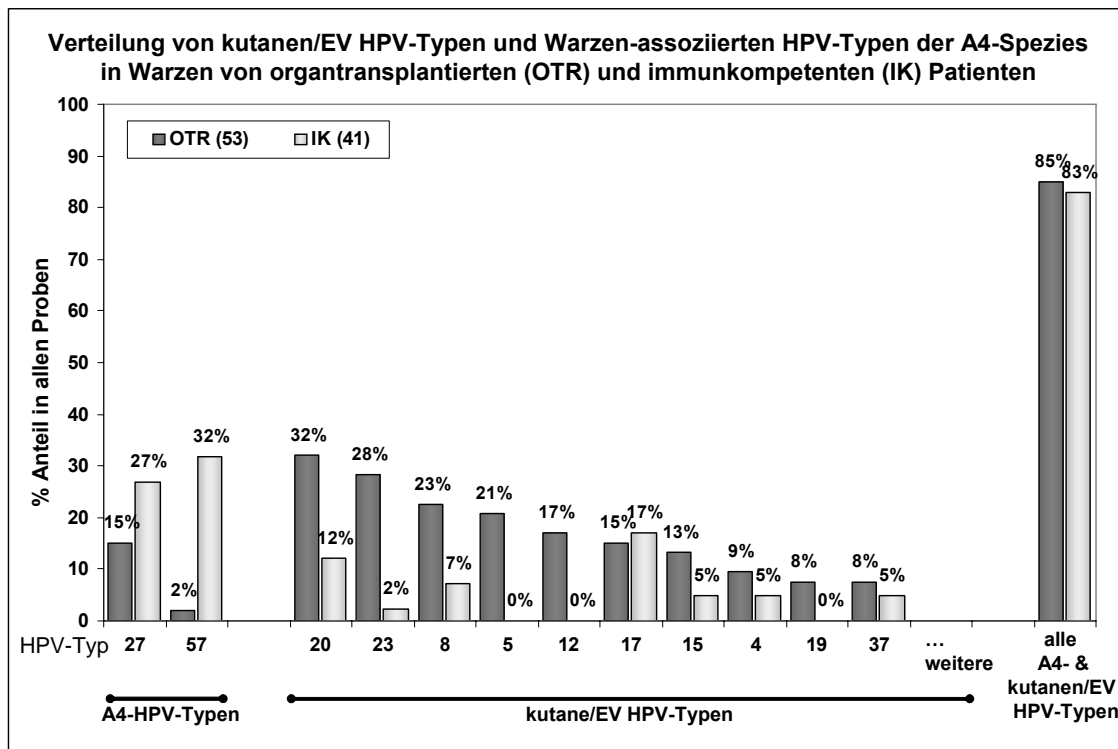


Abbildung 3.10: Verteilung von kutanen/EV HPV-Typen und Warzen-assoziierten HPV-Typen der A4-Spezies in Warzen von organtransplantierten (OTR) und immunkompetenten (IK) Patienten.

Die Patientenzahl beider Kohorten ist in Klammern angegeben.

3.5.2 Viruslast

Die Viruslast der Warzen-assoziierten Typen HPV-27 und HPV-57 war in beiden Gruppen um das 10^5 -fache erhöht verglichen mit den kutanen/EV HPV-Typen HPV-8, HPV-14 und HPV-20 (Tabelle 3.6). Die kutanen/EV HPV-Typen waren in Warzen von IK oder OTR nur in jeder zweiten bis tausendsten Zelle vertreten. Der Warzen-assoziierte HPV-3 war sowohl in sehr geringen als auch in sehr hohen Viruslasten bei IK zu finden. In 7 von 15 Warzen bei OTR betrug die Viruslast von HPV-27 über 5.000 Kopien pro Zelle. In den weiteren 8 HPV-27 negativen Warzen lagen die Viruslasten der kutanen/EV HPV-Typen bei 0,0001–0,143 Kopien pro Zelle. Von 3 der 8 Warzen wurde die Viruslast anderer Warzen-assoziierten Typen nicht bestimmt.

In 20 von 22 Warzen bei IK wurde eine Viruslast (HPV-3, -27 oder -57) von über 50 Kopien pro Zelle nachgewiesen. In den übrigen 2 von 22 Warzen waren keine Warzen-assoziierten Typen nachweisbar. Die getesteten kutanen/EV HPV-Typen waren entweder nicht messbar oder hatten eine Viruslast von unter einer Kopie pro 100 Zellen.

Tabelle 3.6: Bestimmung der Viruslast in Hautwarzen von OTR und IK

	Anzahl		Einzelinfektion	Mehrfachinfektion	Virale Kopien pro Zelle/ Anzahl der untersuchten Proben					
	Patienten	Biopsie			A2	A4		Kutane/EV HPV (β & γ)		
					HPV-3	HPV-27	HPV-57	HPV-8	HPV-14	HPV-20
OTR	10	15	1/15 7%	14/15 93%	0,052/1	5.849– 156.839/7	n.b.	n.m.	n.m.	0,0001– 0,143/9
IK	18	22	7/22 32%	15/22 68%	0,002– 39.268/5	298– 348.086/10	21.668– 301.544/9	0,0001/1	0,57/1	0,005/1

OTR, organtransplantiert Patient; HPV, humane Papillomaviren; EV, Epidermodysplasia verruciformis; n.b., nicht bestimmt; n.m. nicht messbar; SD, Standardabweichung; IK, immunkompetenter Patient

3.6 Lokalisation und Virusmenge in Haut und Haarfollikeln von *Mastomys coucha*

3.6.1 *In situ* Hybridisierung

3.6.1.1 Lokalisation von MnPV-1 in Normalhaut und Tumorgewebe

Sowohl in gesunder Haut als auch in Hauttumoren wurde MnPV-1 DNA in Zellkernen nachgewiesen. Die Färbung war diffus, es waren überwiegend stark gefärbte Zellkerne und wenige schwach gefärbte Kerne zu sehen (Abbildung 3.11).

In der gesunden Epidermis von Tieren mit Tumoren wurde in den Zellkernen MnPV-1 DNA nachgewiesen (Abbildung 3.11 A). Diese Zellkerne waren nicht vereinzelt gefärbt, sondern die parabasalen Zellschichten waren durchgehend MnPV-1 positiv. Die diffuse Färbung erstreckte sich über den gesamten Kern. Differenzierte Zellschichten wie das *stratum spinosum* und das *stratum granulosum* zeigten starke DNA-Signale. Im Gegensatz dazu waren die basalen Zellen der Normalhaut sowie die Zellen der Dermis ungefärbt (Abbildung 3.11 A). Die Negativkontrolle mit HPV-5 (in pBR322) als Sonde wies keine gefärbten Zellen auf (Abbildung 3.11 B).

Ein großer Teil des Zysten-ähnlicher Hauttumor (Abbildung 3.11 C–D) wurde bestand aus einer ausgeprägten, nekrotischen Kapsel mit einer ungleichmäßigen Verteilung der gefärbter Zellen am Rand. Das stark proliferierte Gewebe ließ keine Zuordnung der Zellschichten zu. Morphologisch handelte es sich bei den Zellen um epidermale, differenzierte Keratinozyten. MnPV-1-positive Zellen und negative Zellen sind im gesamten Bildausschnitt zu finden (Abbildung 3.11 C–D). Auch innerhalb der nekrotischen Kapsel sind einzelne rote MnPV-1 Signale erkennbar. Die Negativkontrolle mit HPV-5 (in pBR322) als Sonde wies keine gefärbten Zellen auf (Bilder nicht gezeigt).

In einem Papillom (Abbildung 3.11 E–F) zeigte das Gewebe einen Verlust der normalen Zellschichtung. Aufgrund der Zellmorphologie war das Gewebe vorwiegend epidermalen Ursprungs und enthielt sowohl MnPV-1-positive als auch -negative Zellen. Bei der weitgehend ungefärbten Struktur im Inneren des Gewebes ohne sichtbare Zellen handelte es sich dem Aussehen nach um einen hyperkeratotischen Stachel.

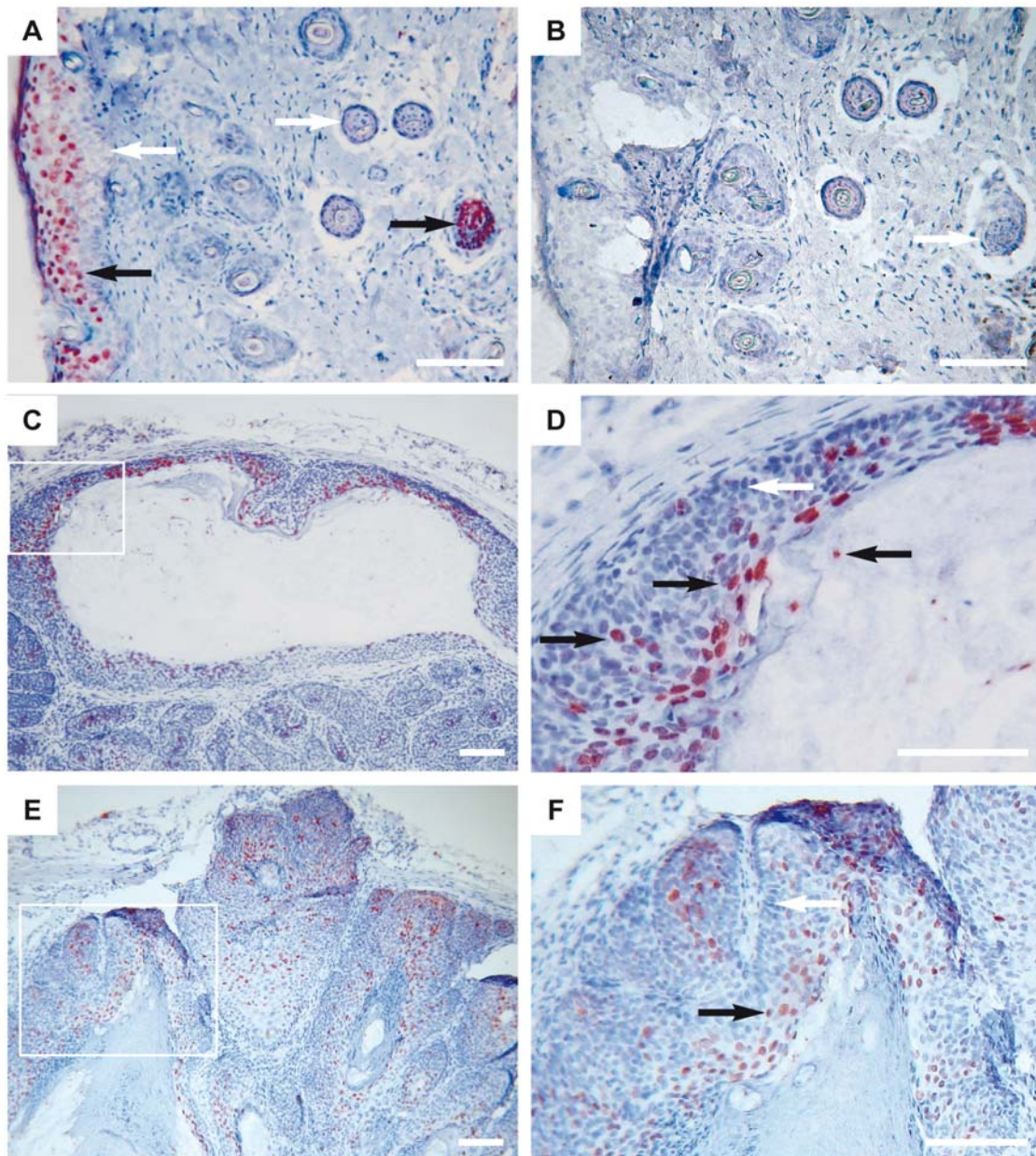


Abbildung 3.11 A-F: DNA-*in situ* Hybridisierung (ISH) (A) und (B) MnPV-1-positive Normalhaut eines Tieres mit Tumoren (*M. coucha*); (A) MnPV-1-Sonde – Färbung (rot) epidermaler Zellen und im Querschnitt der dermalen Papille eines Haarfollikels (schwarze Pfeile), basale Zellen und andere Haarfollikelzellen sind MnPV-1-negativ (weiße Pfeile); (B) Negativkontrolle zu (E) mit HPV-5, keine rote Färbung der in (E) positiven Zellen (weiße Pfeile); (C)–(F) MnPV-1-positive Tumore von *M. coucha*; (C) und (D) Zysten-ähnlicher Hauttumor mit nekrotischer Kapsel, (D) Ausschnitt von (C), MnPV-1-positive Zellkerne (rot) am Rand der Kapsel und auch in der Kapsel (schwarze Pfeile), negative Zellen an der abgewandten Seite (weißer Pfeil); (E) und (F) Papillom mit stark hyperkeratotischer Verhornung, (E) Ausschnitt von (F), MnPV-1-positive Zellkerne am Rand der Verhornung (schwarzer Pfeil), abgewandte Zellen sind MnPV-1 negativ. In den Negativkontrollen zu C und E waren keine positiven Signale nachweisbar (nicht gezeigt). Maßstab: 100 µm.

3.6.1.2 Nachweis von MnPV-1 in Haarfollikelzellen

In der Dermis sind im Querschnitt Haarfollikel als runde Strukturen erkennbar (Abbildung 3.11 A–B). Einer dieser Haarfollikel in der dermale Papille ist im unteren Bereich des Haarfollikels angeschnitten und MnPV-1 positiv (Abbildung 3.11 A). Die weiteren Haarfollikel in der Dermis zeigten histologisch Ausschnitte aus der weiter außen gelegenen interfollikulären Epidermis des Haarfollikels und waren MnPV-1-negativ (Abbildung 3.11 A). In der Negativkontrolle wurden keine Zellen angefärbt (Abbildung 3.11 B).

3.6.1.3 Papillomavirus-positive Zellen in Gehirnschnitten von *Mastomys coucha*

Innerhalb des Thalamus waren neurale Zellen positiv für MnPV-1 (Abbildung 3.12). Die neuronalen Zellen des Thalamus verlaufen in Faserbündeln. In der Hämatoxylin/ Eosin-Färbung (Abbildung 3.12 B) waren diese Bündel als dunkelrot gefärbte Strukturen inmitten der hellroten Gliazellen erkennbar. Zellkerne sind blau gefärbt. Innerhalb des Thalamus wurde nur in Zellkernen von Faserbündeln MnPV-1-DNA nachgewiesen, die Gliazellen des umgebenden Gewebes waren jedoch negativ für MnPV-1 (Abbildung 3.12 A).

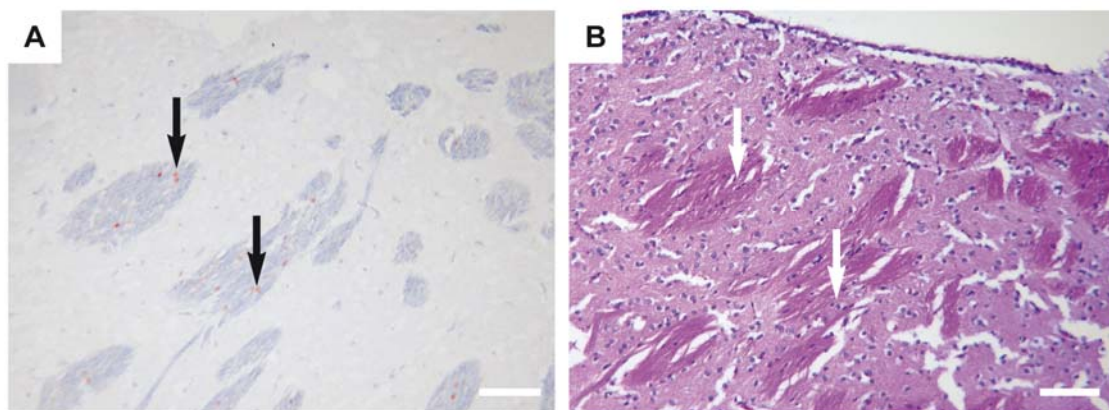


Abbildung 3.12 A und B: MnPV-1-DNA im Gehirn (Thalamus) von *M. coucha*; (A) DNA-ISH mit MnPV-1-Sonde, Rotfärbung indiziert positive Zellkerne (A) innerhalb von Nervenfaserbündeln (schwarze Pfeile), die Zellkerne umgebender Gliazellen sind ungefärbt, (B) Hämatoxylin/Eosin-Färbung. Die weißen Pfeile weisen auf die blau gefärbten Zellkerne. Der Maßstab rechts unten zeigt jeweils 100 µm.

3.6.2 Die Viruslast in Normalhaut und Tumoren

Viruspräsenz und Viruslast wurde in Normalhaut und Tumorproben von 6 Tieren mit Hauttumoren und in der Haut von 5 gesunden Tieren untersucht. Bei Tieren mit und ohne Tumorentwicklung unterschied sich die Virusmenge in der Normalhaut um mindestens den Faktor 1000. Mit zunehmendem Alter war auch ein Anstieg der Virusmenge zu beobachten. In Tumoren wurden im Vergleich zur Normalhaut des gleichen Tieres mehr MnPV-1 DNA nachgewiesen.

In Abbildung 3.13 sind die Ergebnisse der Bestimmung der Viruslast in Normalhaut und Tumoren graphisch dargestellt.

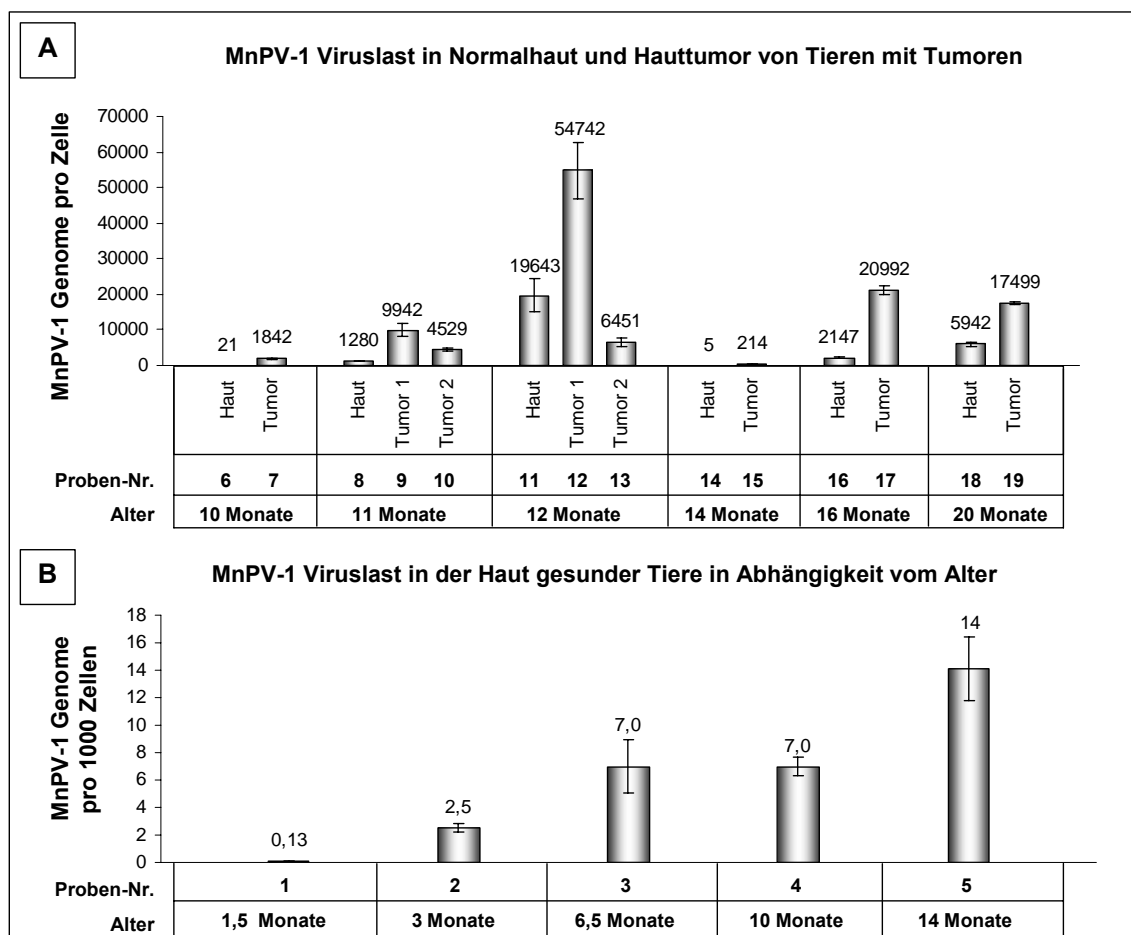


Abbildung 3.13 MnPV-1-Viruslast in Normalhaut und Hauttumor von Tieren mit Tumoren (A) und in der Haut gesunder Tiere in Abhängigkeit vom Alter (B).

Jeder Balken stellt die gemessene mittlere Virusmenge eines Tieres dar. Die Fehlerbalken beziehen sich auf die Standardabweichung der Messwerte. In (A) ist die MnPV-1 Viruslast pro Zelle angegeben. Bestimmt wurden jeweils Normalhaut und Hauttumor(e) von 6 Tieren im Alter von 10-20 Monaten. In (B) ist die mittlere Anzahl von MnPV-1 Kopien auf 1000 Zellen in 5 verschiedenen gesunden Tieren im Alter von 1,5–14 Monaten dargestellt.

Tiere ohne Tumore hatten eine mittlere Viruslast von 0,13–14 MnPV-1 Genome pro 1000 Zellen. Bei Tieren mit Tumoren lag die mittlere MnPV-1-Viruslast bei 21–5942 Genomen pro Zelle (Abbildung 3.13 A und B). In 6 Hauttumoren (Tumor 1) von 6 Tieren wurde eine höhere Virusmenge als in Normalhaut des gleichen Tieres gemessen. In 2 weiteren Tumoren (Tumor 2) war in den Tumoren weniger MnPV-1 DNA nachweisbar.

3.6.3 Einfluss der Immunsuppression auf die Viruslast in Haarfollikelzellen

Alle Einzelwerte der Virusbestimmungen und die Standardabweichungen sind in Tabelle 3.7 und Abbildung 3.14 zusammengefasst. In allen Gruppen zeigten die Virusmengen der einzelnen Tiere große Unterschiede, doch die Viruslast blieb innerhalb eines Tieres weitgehend stabil. Tiere, die in Woche 5 eine MnPV-1-Viruslast von unter 100 Kopien pro Zelle aufwiesen, zeigten innerhalb der nächsten 20 Wochen keinen Anstieg der Virusmenge auf über 2500 Genomen pro Zelle.

Tabelle 3.7: Ergebnisse der Bestimmung der Viruslast in Haarfollikelzellen nach Immunsuppressivgabe

		MnPV-1 Genome pro Zelle (Kremsdorf et al.)				
	Tiernummer	Geschlecht	Woche 5	Woche 10	Woche 15	Woche 20
Rapamycin	1	m	430 (± 14)	11997 (± 1042)	5527 (± 331)	10904 (± 827)
	2	m	843 (± 74)	6366 (± 544)	5372 (± 603)	18048 (± 2139)
	3	m	9 ($\pm 1,2$)	216 (± 11)	159 ($\pm 7,6$)	474 (± 50)
	4	w	54 ($\pm 8,8$)	2357 (± 179)	1299 (± 85)	286 (± 21)
	5	w	40 ($\pm 1,0$)	789 (± 24)	262 (± 41)	364 (± 20)
		Mittelwert	275	4345	2524	6015
		Median	54	2357	1299	474
Cyclosporin A	6	m	140 (± 15)	1096 (± 48)	455 (± 17)	3127 (± 137)
	7	m	355 (± 20)	21865 (± 1080)	3323 (± 65)	26634 (± 3582)
	8	m	25 ($\pm 1,8$)	1146 (± 56)	183 (± 20)	410 (± 44)
	9	w	97 ($\pm 5,4$)	418 (± 56)	147 (± 15)	208 (± 18)
	10	w	57 ($\pm 5,1$)	315 (± 11)	103 (± 10)	126 (± 17)
		Mittelwert	135	4968	842	6101
		Median	97	1096	183	410
Kontrolle	11	m	0,33 ($\pm 0,04$)	29 ($\pm 3,2$)	11 ($\pm 1,1$)	1,37 ($\pm 0,13$)
	12	m	0,39 ($\pm 0,04$)	592 (± 60)	13 ($\pm 0,12$)	0,94 ($\pm 0,06$)
	13	m	436 (± 43)	5691 (± 524)	33687 (± 214)	2704 (± 273)
	14	w	151 (± 10)	353 (± 25)	280 (± 19)	124 (± 14)
	15	w	22 ($\pm 2,9$)	639 (± 35)	270 (± 18)	139 ($\pm 7,7$)
		Mittelwert	122	1461	6852	594
		Median	22	592	270	124

m, männlich; SD, Standardabweichung; w, weiblich

Zwischen Tieren, die mit Rapamycin oder Cyclosporin A immunsupprimiert wurden, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der ermittelten Virusmengen (Abbildung 3.14). Ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) war aber in Woche 20 zwischen mit Rapamycin behandelten Tieren und der Kontrollgruppe feststellbar (Plotnummer 4 vs. 12). Die Kontrollgruppe wies eine wesentlich geringere Viruslast auf.

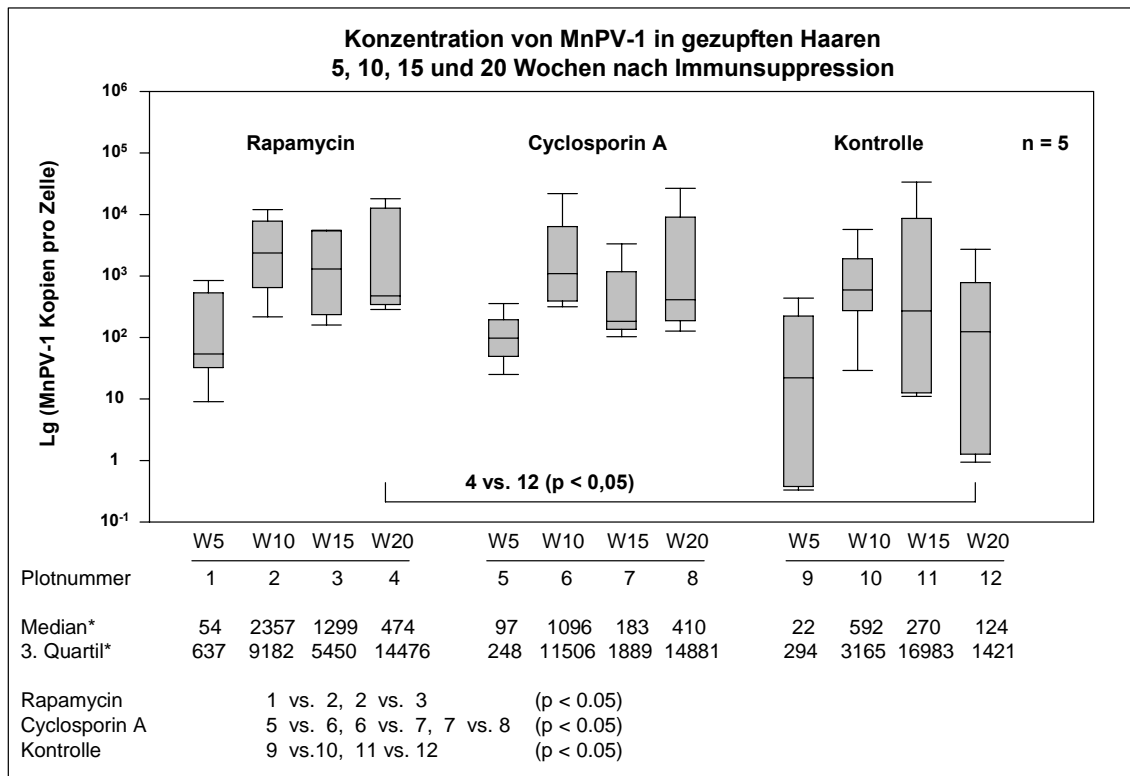


Abbildung 3.14 Die Entwicklung der Viruslast nach Immunsuppressivgabe, gemessen in gezupften Haarfollikelzellen nach 5, 10, 15 und 20 Wochen. In jeder der 3 Gruppen (Rapamycin, Cyclosporin A und Kontrolle) befanden sich 5 Tiere. Aus den 5 Einzelwerten jeder Gruppe wurde zu jedem Zeitpunkt Median und 3.Quartil berechnet. Boxplot-Diagramm erstellt durch SigmaPlot 2000, p-Wert berechnet mit U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney; *MnPV-1-Kopien pro Zelle,

MnPV-1, *Mastomys natalensis* Papillomavirus 1; p, p-Wert ; W, Woche

Innerhalb aller 3 Gruppen (Rapamycin, Cyclosporin, Kontrolle) wurden signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) in der Entwicklung der Virusmenge pro Zelle gefunden (Abbildung 3.14). Von Woche 5 zu Woche 10 erhöhte sich die Virusmenge in allen 3 Gruppen, von Woche 10 zu Woche 15 verringerte sich die Virusmenge wieder bei den immunsupprimierten Tieren, während sie in der Kontrolle wieder anstieg.