

Isolierung und Charakterisierung neuer Papillomviren

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

Diplom-Biologe Eric Schulz

aus

Neubrandenburg

2011

angefertigt in der Arbeitsgruppe:
Tumorvirologie

unter der Leitung von:
Priv.-Doz. Dr. rer. nat. habil. Ingo Nindl

im
Haut Tumor Centrum Charité (HTCC)
Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
Charité – Universitätsmedizin Berlin

Bearbeitungszeitraum
15. Januar 2008 bis 15. Januar 2011

1. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Ingo Nindl
2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Disputation am 14.06.2011

**Meiner Familie und Katharina gewidmet,
die mich immer vorbehaltlos unterstützt haben.**

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung

Summary

1	Einleitung	1
1.1	Papillomvirusinfektionen bei Menschen und Tieren.....	1
1.2	Genomaufbau und Funktion der Papillomvirusproteine.....	2
1.3	Taxonomie und Evolution der Papillomviren.....	4
1.4	Die Diversität der Papillomviren.....	7
1.5	Nachweis neuer Papillomviren und Isolierung ihrer vollständigen Genome.....	9
1.6	Ziele.....	10
2	Einzelarbeiten	12
2.1	Titel der publizierten Einzelarbeiten.....	12
2.2	Eigenanteil an den publizierten Einzelarbeiten.....	13
3	Genomic characterisation of the first insectivoran Papillomavirus reveals an unusually long, second non-coding region and indicates a close relationship to <i>Betapapillomavirus</i>	16
3.1	Artikel.....	16
3.2	Zusatzmaterial.....	25
4	Isolation and genomic characterisation of the first Norway rat (<i>Rattus norvegicus</i>) Papillomavirus and its phylogenetic position within <i>Pipapillomavirus</i>, primarily infecting rodents	37
4.1	Artikel	37
4.2	Zusatzmaterial.....	43
5	Modular organizations of novel cetacean Papillomaviruses	63
5.1	Artikel	63
5.2	Zusatzmaterial.....	71
6	Diskussion	103
6.1	Besonderheiten im Genomaufbau und potenzielle Eigenschaften der neuen Papillomvirus-Typen.....	103

6.2	Klassifikation der neuen Papillomvirus-Typen	105
6.3	Verwandtschaftsbeziehungen der neuen Papillomvirus-Typen offenbaren Hinweise auf vielfältige Evolutionsmechanismen.....	107
6.4	Ausblick.....	110
7	Literaturverzeichnis	113
8	Anhang	122
8.1	Danksagung.....	122
8.2	Tabellarischer Lebenslauf.....	123
8.3	Stipendien.....	124
8.4	Veröffentlichungen.....	124
8.5	Tagungsbeiträge.....	124
8.6	Eidesstattliche Erklärung.....	125

Zusammenfassung

Papillomviren (PV) sind kleine, unbehüllte Viren mit einem zirkulären, doppelsträngigen DNA-Genom in der Größe von etwa 8 kb. Sie werden in PV-Typen und übergeordnete Taxa wie Arten und Gattungen eingeteilt. Ein PV-Typ wird durch die Initialen des Binomens seines Wirtes und ‚PV‘ bezeichnet und fortlaufend nummeriert. In der Haut und Schleimhaut von Säugetieren, Vögeln und Schildkröten rufen PV-Infektionen vorwiegend gutartige Läsionen, aber auch bösartige Tumoren hervor.

Die geringe Zahl bekannter PV nicht humaner Wirte (68 PV-Typen aus 37 von 5416 Säugetierarten) führte zu widersprüchlichen Annahmen über die Evolution dieser Viren. Ferner sind von klassischen Labortieren keine PV-Typen bekannt, weshalb aktuell kein Maus- oder Rattenmodell existiert. Das Ziel dieser Arbeit war es, neue PV-Typen zu isolieren, ihre potenziellen Eigenschaften bioinformatisch zu charakterisieren und ihre Verwandtschaftsverhältnisse darzustellen.

Von verschiedenen Tierarten wurden mithilfe PV-spezifischer PCR zahlreiche neue PV nachgewiesen. Davon konnten sieben vollständige PV-Genome isoliert, kloniert und sequenziert werden. Sie wurden den PV-Nomenklaturregeln entsprechend als EePV1 (Wirt: europäischer Igel), RnPV1 (Wirt: Wanderratte), PphPV1, PphPV2 und PphPV3 (Wirt: Schweinswal), DdPV1 (Wirt: gemeiner Delfin) und TtPV3-Variante (Wirt: atlantischer Weißseitendelfin) bezeichnet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Verwandtschaftsverhältnisse ermittelt: 1. EePV1 wurde als neue PV-Gattung Dyoeta-PV klassifiziert. Es bildete die Schwestergruppe zur Beta-PV-Gattung (Wirte: Primates). Sein Genom besitzt eine zweite nicht kodierende Region, die nur in den nicht näher verwandten Lambda-PV (Wirte: Carnivora) vorkommt und daher wahrscheinlich zweimal unabhängig voneinander entstanden ist. 2. RnPV1 (Wirt: Wanderratte) bildete eine monophyletische Gruppe mit bekannten Pi-PV (Wirte: Rodentia) und zeigte nahe Verwandtschaft zum karzinogenen McPV2 (Wirt: Vielzitzenmaus). 3. Die neuen Cetacea-PV gruppieren sich in zwei unterschiedlichen Linien. Während die meisten eine monophyletische Gruppe mit bekannten Cetacea-PV der Gattungen Omikron- und Upsilon-PV bildeten, war PphPV3 nicht näher mit den übrigen Cetacea-PV verwandt. Außer PphPV3 zeigten die Cetacea-PV in den Stammbäumen der frühen bzw. späten Gene widersprüchliche Positionen. Die TtPV3-Variante wurde aus einer anderen als der eigentlichen Wirtsart (großer Tümmler) isoliert.

Es konnte gezeigt werden, dass neben der Ko-Divergenz von Virus und Wirt auch adaptive Radiation, zwischenartliche Übertragung und Anpassung an einen neuen Wirt sowie Rekombination eine Rolle bei der Evolution der PV spielen. Ferner bildet die Isolierung von RnPV1 die Grundlage für die Etablierung eines Tiermodells zur Untersuchung PV-induzierter Erkrankungen anhand eines klassischen Labortieres.

Summary

Papillomaviruses (PV) are small, non-enveloped viruses with a circular double stranded DNA genome of approximately 8 kb in size. They are classified into PV types and higher taxonomic levels such as species and genera. PV types are named by the initials of the scientific species name of the host plus 'PV' and followed by a continuous numbering. PV infect the skin and mucosa of mammals, birds and turtles and cause benign but also malignant tumours.

The small number of non-human PV (68 PV types from 37 of 5416 mammalian species) has led to different assumptions about the evolution of these viruses. Moreover PV types from classical laboratory animals are not known, which is the reason why rat or mouse disease models do not exist for PV. Therefore it was the aim of this work to isolate new PV and to characterise their potential properties by bioinformatic approaches and to analyse their phylogenetic relationships.

Numerous new PV types from different animals were identified by PV specific PCR. Out of these, seven complete PV genomes were isolated and subsequently cloned and sequenced. According to PV nomenclature the new PV types were designated as EePV1 (host: European hedgehog), RnPV1 (Host: Norway rat), PphPV1, PphPV2, und PphPV3 (host: Harbour porpoise), DdPV1 (host: Common dolphin), and TtPV3-variant (host: Atlantic white sided dolphin).

In this thesis, the following relationships could be determined: 1. EePV1 was classified as the new genus Dyoeta-PV and constituted the sister group of the Beta-PV genus (hosts: primates). Its genome exhibits a second non coding region that is only present in distantly related Lambda-PV (hosts: carnivores) and therefore possibly arose twice independently. 2. RnPV1 constituted a monophyletic group with known Pi-PV (hosts: rodentia) showing a close relationship to the carcinogenic McPV2 (host: multimammate rat). 3. The new cetacean PV clustered in two different lineages. While the majority of them constituted a monophyletic group with the known cetacean Omikron- and Upsilon-PV, PphPV3 was only distantly related to the remaining cetacean PV. Except for PphPV3, all cetacean PV showed conflicting phylogenetic positions within trees calculated either from early or from late genes. TtPV3 variant was isolated from a species distinct from its original host (bottlenose dolphin).

It was shown that, beside co-divergence of viruses and hosts, other evolutionary mechanisms such as interspecies transmission and adaption to the new host, adaptive radiation and also recombination are involved in PV evolution. Furthermore the isolation of RnPV1 represents a promising basis for establishment of a new animal disease model to study PV induced diseases including cancer in a classical laboratory animal.

1 Einleitung

1.1 Papillomvirus-Infektionen bei Menschen und Tieren

Papillomviren (PV) infizieren mukosale oder kutane Epithelien verschiedener Tierarten, einschließlich des Menschen (Howley und Lowy, 2007). Sie verursachen sowohl gutartige als auch bösartige, proliferative Läsionen der Plattenepithelien der Haut oder der Schleimhaut (Sundberg et al., 1996). Dabei ist ihr Replikationszyklus an die Differenzierung ihrer Wirtszellen angepasst (Doorbar, 2005).

Infektionen des Anogenitalbereichs durch sogenannte genitale humane PV (HPV) der Gattung Alpha-PV sind eine der häufigsten sexuell übertragbaren Krankheiten des Menschen. Genitale HPV-Typen lösen Feigwarzen (*Condylomata accuminata*) des Anogenitalbereichs aus. Des Weiteren induzieren sie in der Gebärmutter Schleimhaut zervikale, intraepitheliale Neoplasien (engl.: cervical intraepithelial neoplasia, CIN), die zum invasiven Zervixkarzinom progredieren können (zur Hausen, 2002). Die HPV-Typen HPV-16 und -18 sind ursächlich für 70 % aller Zervixkarzinome und werden daher als HPV-Typen hohen Risikos (HR-HPV) klassifiziert (zur Hausen, 1996). Beim Menschen ist das Zervixkarzinom die weltweit zweithäufigste Krebsentität bei Frauen.

Bei Makaken sind ebenfalls genitale PV-Typen bekannt, die mit CIN-Läsionen und Zervixkarzinomen assoziiert sind (Ostrow, La Bresh und Faras, 1991; Wood et al., 2007; Chen et al., 2009; Tomaić et al., 2009). Sexuell übertragbare Infektionen sind auch bei Walen und Delfinen bekannt und werden als mögliche Ursache verminderter Fortpflanzungsraten dieser bedrohten Tiere diskutiert (Van Bresse et al., 1996, Rehtanz et al., 2006, Van Bresse et al., 2007; Rector et al., 2008; Rehtanz et al., 2010).

Kutane PV-Infektionen verlaufen oft asymptomatisch (Antonsson et al., 2000), können aber auch zu morphologischen Veränderungen der Haut führen. Diese gutartigen Hautveränderungen werden als kutane Warzen bezeichnet. Man unterscheidet gemeine Warzen der Hände und Füße (*Verrucae vulgares*), Plantarwarzen (*Verrucae plantares*) und plane Warzen (*Verrucae planae juveniles*). Sie werden beim Menschen vor allem durch sogenannte warzenassoziierte HPV-Typen induziert. Dazu gehören die Arten Alpha-2- und Alpha-4-PV sowie die Gattungen Mu- und Nu-PV. Die Beta- und Gamma-PV werden generell als kutane PV bezeichnet (de Villiers et al., 2004). Besonders immunsupprimierte, organtransplantierte Personen und Patienten mit der seltenen Erbkrankheit Epidermodyplasia verruciformis weisen ein erhöhtes Risiko für die Entstehung kutaner Warzen sowie Plattenepithelkarzinomen (engl.: squamous cell carcinoma; SCC) und ihrer Vorläuferläsionen, den aktinischen Keratosen (AK), auf (Harwood et al., 2000; Majewski und Jablonska, 2006, Orth, 2006; Akgül, Cooke und Storey, 2006). SCC ist eine Form des nicht melanozytären Hautkrebses (engl.: non melanoma skin cancer; NMSC). In der kaukasischen

Bevölkerung stellt NMSC die häufigste Krebsentität dar (Euvrard, Kanitakis und Claudy, 2003). Vermutlich sind kutane HPV-Typen in der Lage, als Kofaktor bei der Hautkrebsentstehung zu wirken (Nindl, Gottschling und Stockfleth, 2007).

Kutane PV-Typen verschiedener Säugetiere zeigen sehr ähnliche Eigenschaften wie kutane HPV (Antonsson und Hansson, 2002). Bei Nutztieren (besonders Rinder) verursachen PV-induzierte Tumoren beträchtliche wirtschaftliche Schäden (Borzacchiello und Roperto, 2008; Nasir und Campo, 2008; Diniz et al., 2009). Kutane PV sind mit Hautläsionen immundefizienter Hunde und Frettchen (Ordnung: Carnivora) assoziiert (Tobler et al., 2006; Rodriguez et al., 2010). An sonnenlichtexponierten Arealen mit wenig Behaarung entwickeln Katzen (Ordnung: Carnivora) und Schafe (Ordnung: Artiodactyla) ebenfalls PV-assoziierte, warzen-ähnliche Läsionen und kutane SCC (Munday et al., 2009; Alberti et al., 2010). In der Vielzitzenmaus *Mastomys coucha* (Smith, 1834) sowie in Hasen lösen natürlich auftretende PV-Infektionen kutane und anogenitale Warzen sowie invasive Karzinome aus. Diese Tiere und ihre spezifischen PV-Typen werden derzeit als Tiermodell verwendet, um die molekularen Mechanismen der PV-induzierten Tumorentstehung zu untersuchen (Amtmann, Volm und Wayss, 1984; Wettstein, Barbosa, und Nasser, 1987; Brandsma et al., 1991; Nafz et al., 2007; Nafz et al., 2008; Cladel et al., 2010).

1.2 Genomaufbau und Funktion der Papillomvirus-Proteine

PV sind kleine, unbehüllte Viren, deren sphärisches Kapsid etwa 55 nm groß ist. Es enthält ein zirkuläres, doppelsträngiges (ds) DNA-Genom mit einer Größe von etwa 8000 bp. Das PV-Genom hat einen konservierten Aufbau aus einer nicht kodierenden Region (engl.: non coding region; NCR) sowie einer kodierenden Region. Der kodierende Bereich enthält unterschiedlich viele, teilweise überlappende oder ineinander geschachtelte offene Leserahmen (engl.: open reading frame; ORF). Sämtliche PV-Gene sind in derselben Orientierung kodiert. Entsprechend ihrer zeitlich gestaffelten Expression während des Replikationszyklusses unterscheidet man früh (engl.: early; E) und spät (engl.: late; L) transkribierte Gene. Bei allen bekannten PV enthält der kodierende Bereich die vier großen Hauptgene E1, E2, L2 und L1. Abhängig vom jeweiligen PV-Typ kommt zusätzlich eine variierende Anzahl kleiner Gene E4, E5, E6, E7, und E8 vor, von denen E5, E7 und E8 fehlen können. Die NCR enthält den viralen Replikationsursprung (ori), Bindungsstellen (BS) für die Virusproteine E1 und E2 sowie einen oder mehrere Promotoren (Howley und Lowy, 2007) und jeweils verschiedene Transkriptionsfaktorbindungsstellen (TFBS) für wirtseigene Transkriptionsfaktoren (TF) (Garcia-Vallvé et al., 2006, Thierry, 2009). Aufgrund ihrer regulatorischen Funktion bei der viralen Replikation und Genexpression wird die NCR auch als stromaufwärts liegende regulatorische Region (engl.: upstream regulatory region, URR) bezeichnet. Zusätzlich zur URR kommt bei Lambda-PV eine zweite NCR vor, die den

kodierenden Bereich der frühen und späten Gene voneinander trennt (Terai und Burk, 2002; Rector et al., 2007; Lange et al., 2009b).

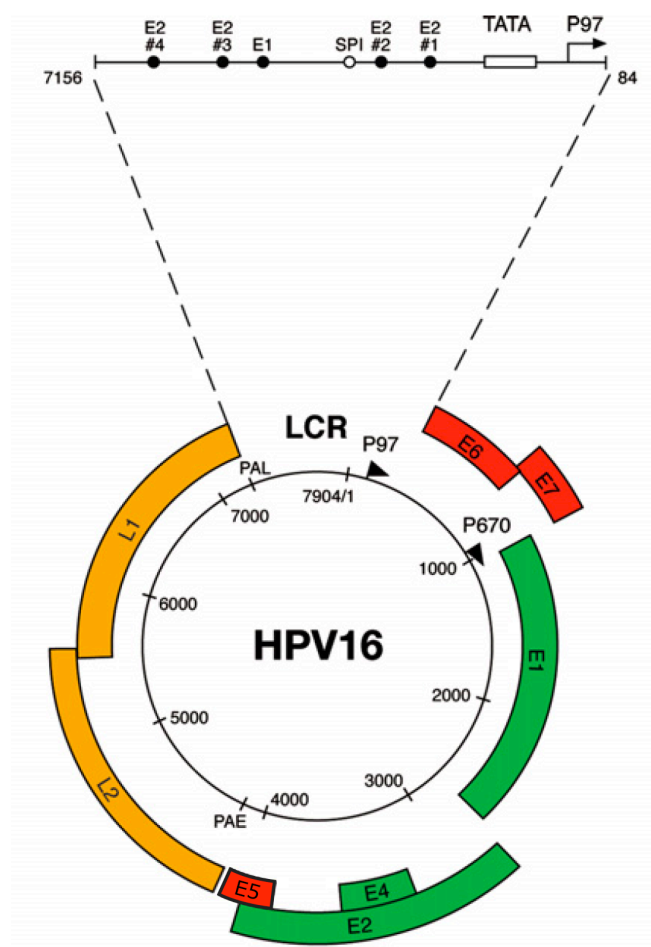


Abbildung 1: Darstellung des Genomaufbaus von HPV16 (verändert nach Doorbar, 2006).

Die E1- und E2-Proteine binden an konservierte Bindungsstellen der NCR. Das E1-Protein besitzt Helikasefunktion und reguliert zusammen mit E2 die virale Replikation (Chiang et al., 1992; Lu et al., 1993; Demeret, Yaniv und Thierry, 1994). E2 wurde sowohl als positiver als auch als negativer Regulator der viralen Genexpression beschrieben (McPhillips et al., 2006; Schweiger, You und Howley, 2006). Außerdem werden dem E2-Protein Funktionen bei der Aufteilung der PV-Genome auf die Tochterzellen sowie bei der Verpackung des Genoms in die Viruskapside zugeschrieben (Ilves, Kivi und Ustav, 1999; Zhao et al., 2000). Die L1- und L2-Proteine bilden das Viruskapsid. Sie präsentieren auf ihrer Oberfläche Epitope, die neutralisierende Antikörper induzieren können (Yaegashi et al., 1991; Breitbart et al., 1995). Die E6- und E7-Proteine interagieren direkt mit zahlreichen zellulären Proteinen und beeinflussen diese in ihrer Funktion (Lechner und Laimins, 1994). Das E6-Protein degradiert beispielsweise das Tumorsuppressorprotein p53. So verhindert es in den infizierten Zellen die Einleitung der Apoptose und vermindert die genomische Stabilität der Wirtszellen (Huibregtse, Scheffner und Howley, 1991). Das E7-Protein inhibiert Zellzykluskontroll-

proteine der pRb-Familie, degradiert pRb und fördert dadurch die Proliferation infizierter Zellen (Dyson et al., 1989; Boyer, Wazer und Band, 1996). Das E5-Protein verhindert ebenfalls die Apoptose (Kabsch und Alonso, 2002; Oh et al., 2010) und die Präsentation von Antigenen an der Zelloberfläche. Dadurch vermindert es die Erkennung PV-infizierter Zellen durch das Immunsystem (Marchetti et al., 2009). Das E4-Protein leitet die Amplifikation des viralen Genoms ein (Wilson et al., 2007). Es weicht Keratineinlagerungen der Wirtszellen auf und erleichtert die Freisetzung reifer Viruspartikel (Doorbar et al., 1991; Roberts et al., 1993; Bryan und Brown, 2000).

1.3 Taxonomie und Evolution der Papillomviren

Das L1-Gen ist der am stärksten konservierte Bereich des PV-Genoms. Per Definition der PV-Studiengruppe des Internationalen Komitees für die Taxonomie von Viren (ICTV) wird das L1-Gen zur Klassifizierung von PV-Typen verwendet. Phylogenetische Analysen anhand der L1-Nukleotidsequenz ermöglichten eine grundlegende Einteilung in PV-Gattung, PV-Art und PV-Typ und führten zur Festlegung von Ähnlichkeitsschwellenwerten für die Unterscheidung von PV-Gattung, PV-Art und PV-Typ (de Villier et al., 2004; Bernard et al., 2010). Darüber hinaus erfordert die Klassifizierung eines Virus die Interpretation phylogenetischer Stammbäume und die Einbeziehung der Genomorganisation sowie Biologie und Pathogenität der einzelnen PV-Typen (Bernard et al., 2010).

Vertreter einer PV-Gattung haben per Definition weniger als 60 % Sequenzähnlichkeit zu PV anderer PV-Gattungen. Gattungen werden mit griechischen Buchstaben bezeichnet (z. B. *Alphapapillomvirus*; Alpha-PV). Da mit zunehmender Zahl bekannter PV alle griechischen Buchstaben bereits vergeben waren, begann man das Alphabet ab Delta erneut von vorn und setzte die Vorsilbe „dyo“ (griechisch: doppelt/noch einmal) davor (z. B. Dyodelta-PV). PV-Typen mit 60-70 % Sequenzähnlichkeit zu anderen PV-Typen werden als PV-Arten zusammengefasst. PV-Arten werden bezeichnet, indem man nach der Gattungsbezeichnung eine arabische Zahl anfügt (z. B. Alpha-1-PV) (de Villiers et al., 2004; Bernard et al., 2010).

Um als neuer PV-Typ akzeptiert zu sein, muss das Genom vollständig sequenziert sein und in seinem L1-Gen weniger als 90 % Sequenzähnlichkeit zu anderen PV-Typen aufweisen. Entsprechend der Nomenklaturregeln des ICTV erfolgt die Benennung eines PV-Typen durch die initialen Buchstaben des wissenschaftlichen Binomens des Wirtes, gefolgt von ‚PV‘ für Papillomvirus und einer fortlaufenden Nummer (z. B. *Ovis aries* Papillomvirus 1; OaPV1). Sollte eine Buchstabenkombination bereits vergeben sein, wird auch der zweite Buchstabe des Epithetons in den Namen des PV-Typen aufgenommen. Ausnahmen bilden humane PV (HPV), canine PV (CPV) und bovine PV (BPV). In dieser Arbeit erfolgen die Benennungen der PV sowie die Zuordnungen zu PV-Typen, PV-Arten und PV-Gattungen entsprechend dieser Nomenklaturregeln (Bernard et al., 2010). PV-Typen werden anhand festgelegter

Ähnlichkeitsschwellenwerte der L1-Sequenzen weiter unterteilt. Ein PV-Subtyp ist durch 90–97 % Sequenzhomologie zu ihren PV-Prototypen definiert und bei mehr als 97 % Sequenzähnlichkeit zu einem PV-Prototypen werden sie als PV-Variante bezeichnet (de Villiers et al., 2004). Sie werden dadurch gekennzeichnet, dass man an den Namen des PV-Typs die Bezeichnung Variante bzw. Subtyp anhängt. Zur Unterscheidung mehrerer Varianten bzw. Subtypen eines PV-Typs wird eine Nummer, entsprechend der Reihenfolge ihrer Entdeckung, oder ein Buchstabencode verwendet.

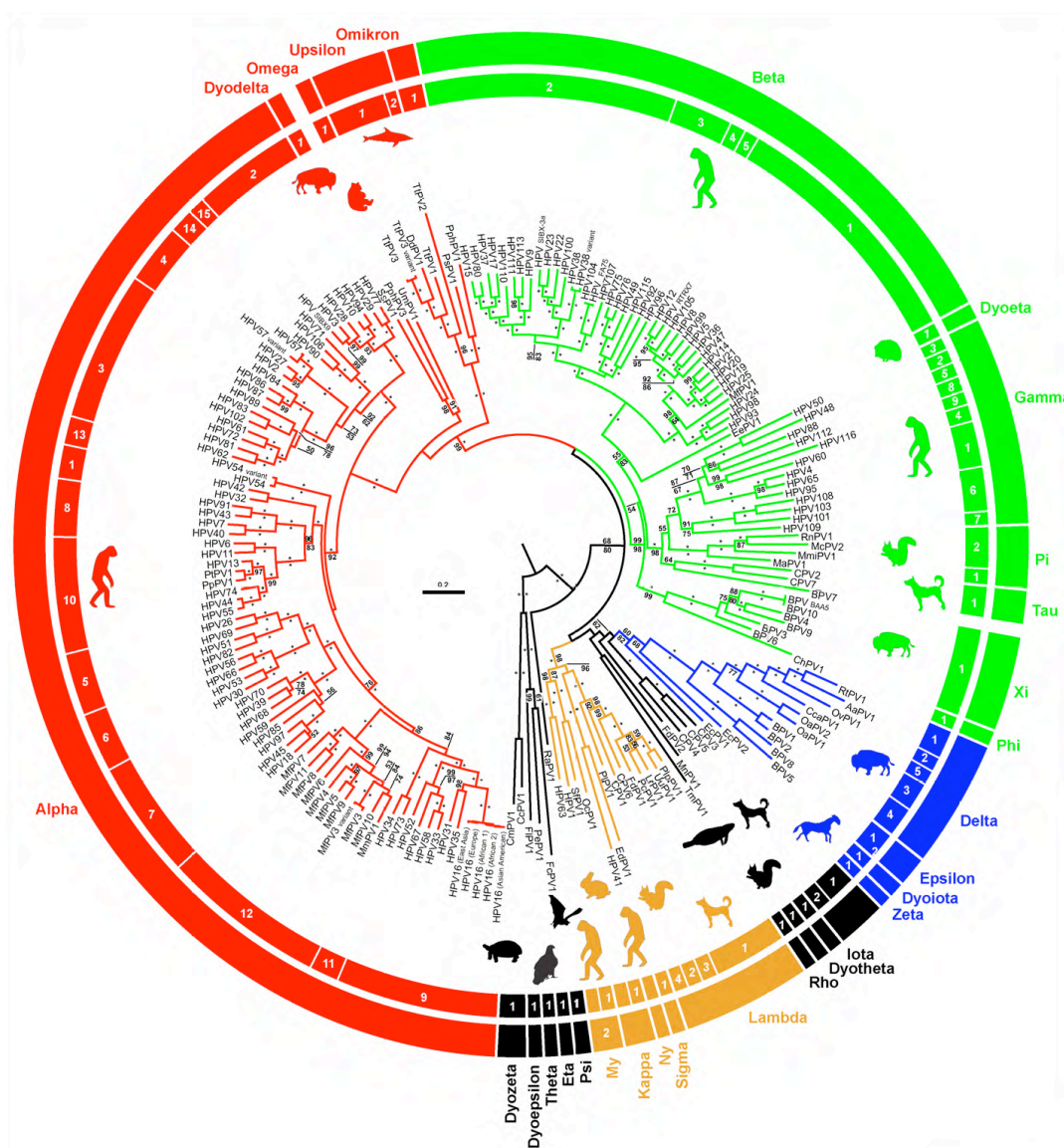


Abbildung 2: Maximum-Likelihood-Phylogramm der zusammengesetzten Aminosäuresequenzen der Gene E1/E2/L1 aller vollständig sequenzierter PV-Typen. Kronengruppen sind farblich markiert, rot: Alpha+Omikron-PV, blau: Delta+Epsilon-PV, grün: Beta+Xi-PV und ocker: Lambda+Sigma-PV. Die Zugehörigkeit der PV-Typen zu den jeweiligen PV-Gattungen ist durch farbliche Balken mit griechischen Buchstaben gekennzeichnet. Die Zugehörigkeit der PV-Typen zu PV-Arten ist durch farbliche Balken mit arabischen Ziffern gekennzeichnet (Abbildung: Bravo, Sanjosé und Gottschling, 2010).

Phylogenetische Analysen mit den zusammengeführten Aminosäuresequenzen der Gene E1/E2/L1 ergaben statistisch gut gestützte Phylogramme. Durch sie ließen sich basale

Verzweigungen genauer darstellen als anhand des L1-Gens. Dadurch konnten übergeordnete Kronengruppen oder Supertaxa identifiziert werden. Entsprechend ihrer phylogenetisch am weitesten voneinander entfernten Gattungen werden diese Gruppen im weiteren Verlauf dieser Arbeit als Alpha+Omikron-PV (Wirte: Primates, Cetacea, Carnivora, Artiodactyla), Delta+Epsilon-PV (Wirte: Artiodactyla, Perissodactyla), Beta+Xi-PV (Wirte: Primates, Carnivora, Artiodactyla, Rodentia, Eulipotyphla, Marsupialia) und Lambda+Sigma-PV (Wirte: Primates, Carnivora, Rodentia) bezeichnet. Die überwiegende Mehrzahl aller PV-Typen lassen sich einer dieser Kronengruppen zuordnen (Gottschling et al., 2007a; Bravo, Sanjosé und Gottschling, 2010) (Abbildung 2).

In der Vergangenheit, als nur wenige PV-Typen aus verschiedenen Wirtsarten bekannt waren, wurden PV generell als hochgradig wirtsspezifisch angesehen. Hinzu kam, dass die Verwandtschaftsbeziehungen der PV mit denen ihrer Wirte in Verbindung gebracht wurden. So wurde aus der nahen Verwandtschaft von PV-Typen, welche nah verwandte oder dieselben Wirtsarten infizieren, auf Ko-Divergenz von Virus und Wirt bzw. wirtsgebundene Evolution als alleinigen Mechanismus der PV-Diversifizierung geschlossen (Chan et al., 1992; Van Ranst et al., 1995; Halpern et al., 2000; Bernard, Calleja-Macias und Dunn, 2006). Demzufolge kam es bei der Aufspaltung einer Wirtsart in zwei neue Arten zur unabhängigen Veränderung der Viren auf den neu entstandenen Wirtsarten und somit zur Entstehung neuer PV-Typen. Beispielsweise wurde anhand identischer Stammbaumtopologien der Lambda-1- und Lambda-2-PV und ihrer Wirte, den Katzen (Familie: Felidae; Ordnung: Carnivora), auf wirtsgebundene Evolution dieser PV-Arten geschlossen (Rector et al., 2007). Um Ko-Divergenz plausibel zu rekonstruieren, sind allerdings gut aufgelöste und deckungsgleiche Stammbäume der Pathogene und ihrer Wirte notwendig (Jackson, 2005; Gottschling et al., 2007a). Jedoch trifft dies nur in den seltensten Fällen zu.

Phylogenetische Analysen anhand unterschiedlicher Kombinationen früher oder später Gene resultierten zudem in jeweils gut gestützten, aber inkongruenten Stammbaumtopologien. Dies ließ unterschiedliche Herkünfte früher und später PV-Gene vermuten (García-Valvé, Alonso und Bravo, 2005). Die Ergebnisse verschiedener bioinformatischer Analysen deuten darauf hin, dass Rekombinationsereignisse im Laufe der PV-Evolution vielfach vorgekommen sind (Narenchania et al., 2005; Varsani et al., 2006; Bravo und Alonso, 2007; Angulo und Carvajal-Rodríguez, 2007; Shah, Doorbar und Goldstein, 2010). Der eindrucksvollste Beweis dafür, dass die Rekombination eine Rolle bei der Entstehung neuer ds-DNA-Viren spielt, ist das *Bettongia*-Papillomatosis-Carcinomatosis-Virus (BPCV). Das zirkuläre ds-DNA-Genom dieses Virus ist chimärisch aus späten Genen der Papillomviren sowie einem Gen für das große und kleine T-Antigen der Polyomaviren zusammengesetzt (Woolford et al., 2007; Bennett et al., 2008).

Durch die Klonierung zahlreicher vollständiger Genome neuer PV-Typen wurde deutlich, dass sich beispielsweise die Katzen-PV in zwei nicht näher verwandten PV-Gattungen gruppieren, nämlich Lambda- und Dyotheta-PV (Lange et al., 2009b). Vertreter der CPV finden sich ebenfalls in den nicht näher miteinander verwandten Gattungen Lambda-PV, Tau-PV und Chi-PV (Yuan et al., 2007; Tobler et al., 2008, Lange et al., 2009a). Als Erklärung für diese Befunde wurde adaptive Radiation und anschließende Realisierung neuer ökologischer Nischen auf derselben Wirtsart vermutet (Gottschling et al., 2007a; Bravo, de Sanjosé und Gottschling, 2010).

Weiterhin wurde gezeigt, dass BPVs nicht nur Rinder-, sondern auch Nager- und Pferdearten infizieren können (Pfister, Fink und Thomas, 1981; Chambers et al., 2003; Bogaert et al., 2005; Kidney und Berrocal, 2008; Silvestre et al., 2009). Auch nah verwandte Makakenarten werden von einer Gruppe identischer PV-Typen infiziert (Chen et al., 2009). Bei Katzen fanden sich sowohl Hinweise auf zoonotische Übertragungen von HPV-9 als auch verschiedener neuer PV-Typen mit Sequenzähnlichkeit zu bekannten PV-Typen der Artiodactyla (Munday et al., 2007; Teifke et al., 2003). Die zwischenartliche Übertragung und nachfolgende Veränderung und Anpassung an einen neuen Wirt muss ebenfalls als Mechanismus der PV-Diversifizierung in Betracht gezogen werden und kann als Erklärung für widersprüchliche phylogenetische Stellungen von PV-Typen nah verwandter Tierarten dienen (Myers, Bernard und Delius, 1996; Rector et al. 2005a; Gottschling et al., 2007a; Shah, Doorbar und Goldstein, 2010).

Zusammengefasst ergeben diese Befunde ein komplexes Bild der PV-Evolution. Daher müssen Hypothesen über die Entstehung und Evolution einzelner Verwandtschaftskreise innerhalb der PV jeweils im Einzelfall geprüft werden.

1.4 Die Diversität der Papillomviren

Die Rekonstruktion der Entstehungsgeschichte einzelner PV-Taxa erfordert die Interpretation möglichst hoch aufgelöster und gut gestützter phylogenetischer Stammbäume unter Einbeziehung der Virus-Wirtsbeziehung sowie Genomaufbau und Pathogenität der einzelnen PV-Typen. Dieses Vorgehen wird bei PV durch eine derzeit unvollständige Stichprobe begrenzt. Sie ist auf das ungenügende Wissen über die PV-Diversität zurückzuführen, denn vermutlich werden alle Säugetiere und Vögel von spezifischen PV-Typen infiziert (Bernard et al., 1997). Dabei treten häufig multiple Infektionen eines Tieres mit verschiedenen PV-Typen auf (Sundberg et al., 1996; Antonsson und Hansson, 2002). Dies lässt vermuten, dass jede einzelne Säugetierart von ähnlich vielen verschiedenen PV-Typen infiziert werden wie der Mensch.

Die derzeit bekannte Diversität der PV umfasst 221 Datenbankeinträge (Stand: Dezember 2010; Bernard et al., 2010; Bennett et al., 2010; Alberti et al., 2010; Lange et al., 2010; Joh

et al., 2010). Dabei herrscht ein großes Ungleichgewicht zwischen der Anzahl bekannter HPV-Typen und nicht humaner PV-Typen. Den 149 bekannten HPV-Typen stehen nur 68 PV-Typen aus 37 Säugetierarten sowie drei PV-Typen aus drei Vogelarten und zwei PV-Typen aus zwei Schildkrötenarten gegenüber. Wenn man annimmt, dass alle 5.416 bekannten Säugetierarten (Wilson und Reeder, 2005) von nur halb so vielen, unterschiedlichen PV-Typen infiziert werden wie der Mensch, dann existieren in den rezenten Säugetieren voraussichtlich mehr als 395.000 bislang unbekannte PV-Typen. Damit beträgt der Anteil bekannter PV-Typen an der zu erwartenden PV-Diversität von Säugetieren nur 0,02 % (68/395.000).

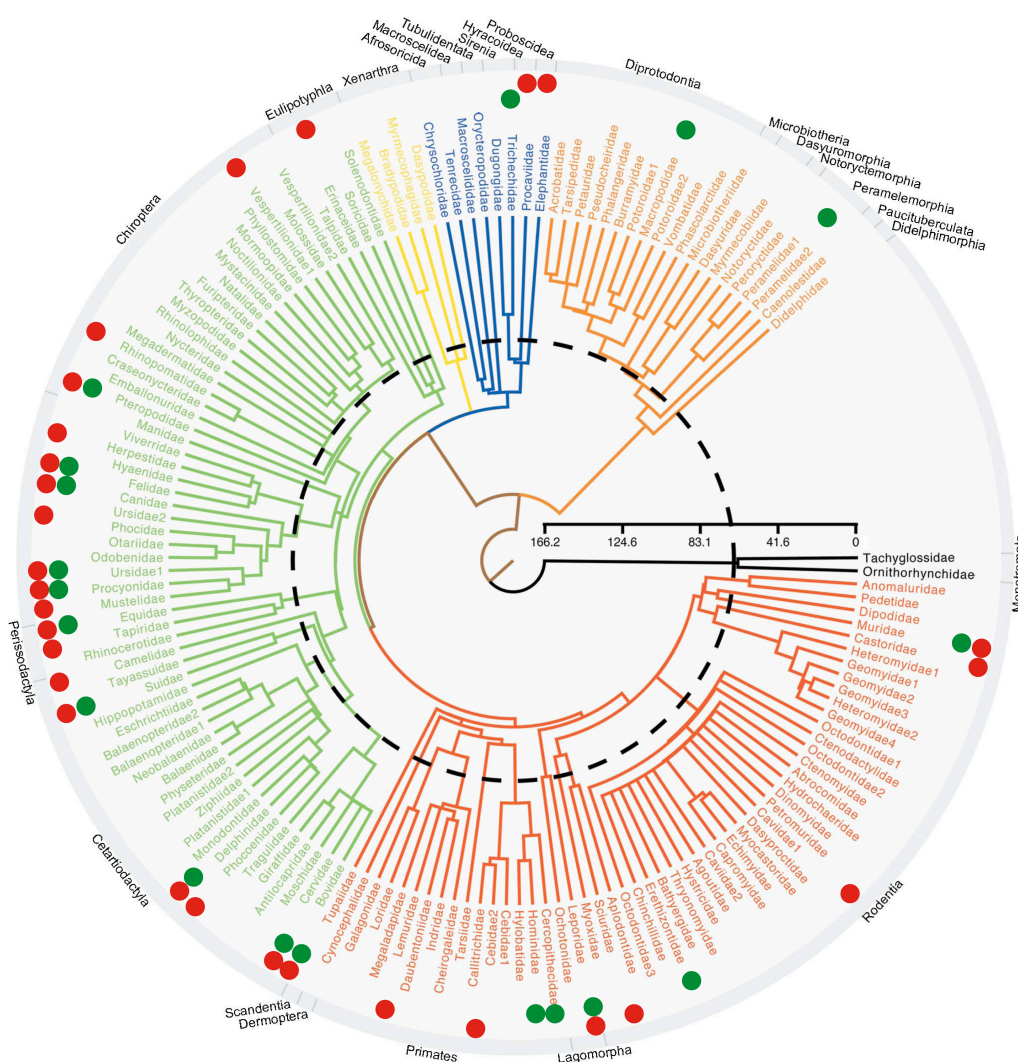


Abbildung 3: Stammbaum der Säugetiere (verändert nach Bininda-Emonds et al., 2007). Hauptlinien sind farblich gekennzeichnet: schwarz, Monotremata; orange, Marsupialia; blau, Afrotheria; gelb, Xenarthra; grün, Laurasiatheria; und rot, Euarchontoglires. Ordnungen sind am Rand angegeben. Nicht-monophyletische Familien sind mehrfach aufgeführt und nummeriert. Grüne Punkte kennzeichnen Säugetierfamilien, aus denen bereits vollständige PV-Genome bekannt sind. Die roten Punkte kennzeichnen Säugetierfamilien, von denen Gewebe- bzw. Haarproben im Laufe der Arbeit gesammelt und untersucht wurden.

In der Abbildung 3 ist dargestellt, von welchen Säugetierfamilien PV-Typen bekannt sind. Um Stammbaumberechnungen und die Rekonstruktion von Evolutionsmechanismen der PV-

Diversifizierung zu verbessern, ist die Einbeziehung einer größeren Stichprobe notwendig. Durch die Korrelation der Merkmale bekannter PV-Typen mit gut gestützten Phylogenien können somit auch Risikoabschätzungen für experimentell wenig untersuchte PV-Typen verbessert werden. Vermutlich lassen sich durch die Einbeziehung weiterer Taxa auch bekannte PV-Typen mit bisher unsicherer phylogenetischer Stellung genauer klassifizieren. Deshalb ist es erforderlich, weitere vollständige PV-Genome aus möglichst unterschiedlichen Tierarten zu isolieren und zu charakterisieren.

1.5 Nachweis neuer Papillomviren und Isolierung ihrer vollständigen Genome

PV-DNA kann nicht nur in klinischen Läsionen, sondern auch in gesunder Haut und in Haarfollikelzellen nachgewiesen werden, die das natürliche Reservoir der PV sind (Boxman et al., 2000; Antonsson und Hansson, 2002; Köhler et al., 2007). In gesunden Tieren wurden zahlreiche verschiedene PV nachgewiesen (Antonsson und Hansson, 2002). Mit diesem Wissen ist es möglich, gezielt nach neuen PV zu suchen und die vollständige Virus-DNA zu isolieren, zu klonieren und zu sequenzieren.

Die Gegenwart unbekannter PV-DNA in Haarfollikeln und Hautbiopsien lässt sich durch PCR mit degenerierten, PV-spezifischen Konsensusprimern und anschließender Sequenzierung der PCR-Produkte nachweisen. Das Primerpaar FAP59/64 wurde von der Konsensussequenz konservierter Sequenzmotive kutaner HPV-Typen abgeleitet. Es ermöglicht die Amplifikation eines ~450 bp großen Bereiches des L1-Gens. Aufgrund der Konserviertheit der FAP-Primerbindungsstellen lässt sich mit diesem Primerpaar sowohl bekannte als auch unbekannte PV-DNA amplifizieren (Forsslund et al., 1999; Antonsson et al., 2000; Antonsson und Hansson, 2002; Antonsson und McMillan, 2006). Ergänzend dazu ist es mit dem Primerpaar CP4/5 möglich, einen DNA-Bereich aus dem E1-Gen sowohl bekannter als auch unbekannter PV zu vervielfältigen (Iftner et al., 2003). Die Direktsequenzierung der erhaltenen Amplikons und ein anschließender Vergleich der DNA-Sequenzen mit den Einträgen in den öffentlichen Datenbanken erlaubt die Identifizierung neuer PV anhand ihrer Sequenzähnlichkeit zu bereits bekannten PV.

Die zentrale, technische Anwendung bei der Isolierung vollständiger, unbekannter PV-Genome ist die multiple Strangverdrängungsamplifikation (engl.: rolling circle amplification, RCA) (Fire und Xu, 1995; Liu et al., 1996; Rector, Tachezy und Van Ranst, 2004). Durch diese *in vitro* Methode konnten in den letzten Jahren zahlreiche neue PV-Genome aus Menschen und verschiedenen Tieren kloniert werden (Bernard et al., 2010). Analog zur Phagenreplikation im sogenannten „Rolling Circle Mechanismus“ kann mit dieser Methode unspezifisch zirkuläre DNA amplifiziert werden. Da PV ein zirkuläres ds-DNA-Genom

besitzen, das in der Zelle in vielen Fällen episomal vorliegt, lässt sich mit dieser Technik PV-DNA im Hintergrund der linearen Wirts-DNA vervielfältigen.

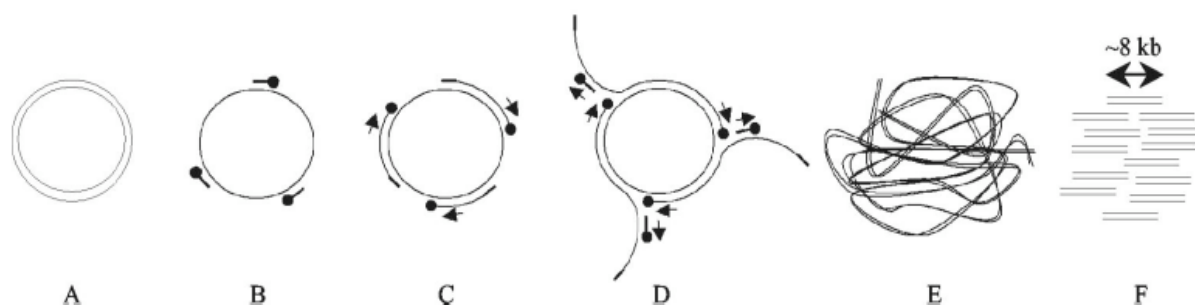


Abbildung 4: Schematische Darstellung der multiplen Strangverdrängungsamplifikation (RCA) (verändert nach Rector, Tachezy und Van Ranst, 2004).

Die Abbildung 4 veranschaulicht den Ablauf der RCA-Reaktion. Nach einem initialen Denaturierungsschritt (A) lagern sich unspezifische Oligonukleotidprimer an die zu amplifizierende DNA an (B). Die Phi-29-Polymerase verlängert die kurzen Primer und baut entsprechend der komplementären Basenpaarung Einzelnukleotide in den wachsenden DNA-Strang ein (C). Dabei verdrängt sie stromaufwärts liegende Stränge von der Matrize (D). Durch die andauernde, unidirektionale Amplifikation entstehen aneinanderhängende, einzelsträngige Kopien der zirkulären Ausgangs-DNA. So kann auch bei geringen Viruslasten genügend PV-DNA für nachfolgende Klonierungsreaktionen gewonnen werden. Die hochmolekularen Reaktionsprodukte (E) können durch Verdauung mit einem Restriktionsenzym, das idealerweise nur einmal im Virusgenom schneidet, in einzelne Kopien des PV-Genoms zerlegt werden (F). Diese stehen dann für eine nachfolgende Klonierung des vollständigen Virusgenoms zur Verfügung (Fire und Xu, 1995; Liu, et al., 1996; Rector, Tachezy und Van Ranst, 2004).

1.6 Ziele

Um plausible und überzeugende Rückschlüsse auf die Evolutionsmechanismen der PV ziehen zu können, ist es notwendig, statistisch gut gestützte phylogenetische Stammbäume zu erstellen. Dafür ist eine möglichst umfassende und repräsentative Taxonauswahl nötig. Die anzunehmende Diversität der PV ist derzeit aber nur ansatzweise erfasst. Daher ist es das Ziel dieser Arbeit, weitere vollständige PV-Genome aus unterschiedlichen Tierarten zu klonieren, zu sequenzieren und bioinformatisch zu charakterisieren. In der Abbildung 3 ist dargestellt, aus welchen Säugetierfamilien im Verlauf dieser Arbeit zu diesem Zweck Proben gesammelt und untersucht wurden.

Durch phylogenetische Analysen werden die Verwandtschaftsverhältnisse der neuen PV-Typen dargestellt. Durch Korrelation ihrer phylogenetischen Stellung mit ihren Virus-Wirtsbeziehungen und ihren potenziellen Eigenschaften sollen Rückschlüsse auf

unterschiedliche Evolutionsmechanismen der PV-Diversifizierung gezogen werden. Dazu gehören adaptive Radiation und Realisierung neuer ökologischer Nischen, zwischenartliche Übertragung und Anpassung an eine neue Wirtsart oder Rekombination. Des Weiteren galt es zu überprüfen, ob sich bekannte PV-Typen, die sich bislang keiner Kronengruppe zuordnen ließen, genauer als zuvor klassifizieren lassen, wenn weitere DNA-Sequenzen neuer PV in die Stammbaumrekonstruktion einbezogen werden.

Ferner sind zurzeit keine PV-Typen klassischer Labortiere bekannt. Daher lässt sich der Einfluss von Wirtsfaktoren auf Pathogenese von PV-Infektionen und PV-induzierter Tumorerkrankungen *in vivo* nur schwer in einem natürlichen Kontext studieren. Virale und wirtseigene Faktoren, die eine zoonotische PV-Übertragung ermöglichen, wurden bisher ebenfalls nicht experimentell untersucht. Deshalb sollten im Rahmen dieser Arbeit neue PV-Typen aus *Mus musculus* Linnaeus, 1758 oder *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769) kloniert und charakterisiert, werden.

2 Einzelarbeiten

2.1 Titel der publizierten Einzelarbeiten

Arbeit 1:

Eric Schulz, Marc Gottschling, Ignacio G. Bravo, Ullrich Wittstatt, Eggert Stockfleth und Ingo Nindl 2009. Genomic characterization of the first insectivoran Papillomavirus reveals an unusually long, second non-coding region and indicates a close relationship to *Betapapillomavirus*. J Gen Virol. 2009 Mar; 90 (Pt 3):626–633.

<http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.008011-0>

Arbeit 2:

Eric Schulz, Marc Gottschling, Gudrun Wibbelt, Eggert Stockfleth und Ingo Nindl 2010. Isolation and genomic characterization of the first Norway rat (*Rattus norvegicus*) Papillomavirus and its phylogenetic position within *Pipapillomavirus*, primarily infecting rodents. J Gen Virol. 2009 Nov; 90 (Pt 11):2609–2914.

<http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.012583-0>

Arbeit 3:

Marc Gottschling, Ignacio G. Bravo, Eric Schulz, Maria A. Bracho, Rob Deaville, Paul D. Jepson, Marie-Françoise Van Bresseem, Eggert Stockfleth und Ingo Nindl. Modular organizations of novel cetacean Papillomviruses Mol Phylogenet Evol. 2009 59 (1):34-42.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2010.12.013>

2.2 Eigenanteil an den publizierten Einzelarbeiten

Arbeit 1:

Genomic characterization of the first insectivoran Papillomavirus reveals an unusually long, second non-coding region and indicates a close relationship to *Betapapillomavirus*

I: Konzeption	Konzeption der Arbeit	20 %
	Entwicklung eines optimierten RCA-Protokolls zur effektiven Amplifikation zirkulärer PV-DNA im Hintergrund genomischer Wirts-DNA	100 %
	Entwicklung eines optimierten Protokolls des Restriktionsverdau zur Zerlegung der RCA-Produkte in lineare Einzelkopien des viralen Genoms	100 %
	Entwicklung der Klonierungsstrategie für das vollständige Virusgenom	100 %
II: Durchführung	Rolling Circle Amplification, Bestimmung geeigneter Restriktionsenzyme zur Zerlegung der RCA-Produkte in lineare Einzelkopien des viralen Genoms, Klonierung des vollständigen Virusgenoms	100 %
	Überprüfung der Sequenzierungsergebnisse und Nachsequenzierung potenzieller Sequenzierfehler (Stopkodons, Frame Shifts, Bereiche mit geringen Überlappungen der Einzelsequenzen) und anschließende Korrektur der Genomsequenzen	100 %
	Analyse der Genomorganisation, Datenbankannotierung der PV-Genomsequenzen	100 %
	Bioinformatische Charakterisierung der potenziellen Eigenschaften der Virusproteine, Untersuchung der nicht kodierenden Region auf das Vorkommen potenzieller cis-regulatorischer Sequenzelemente	100 %
III: Berichtsabfassung	Erstellung des Manuskripts und Diskussion der bioinformatischen Analysen	20 %

Arbeit 2:**Isolation and genomic characterization of the first Norway rat (*Rattus norvegicus*) Papillomavirus and its phylogenetic position within *Pipapillomavirus*, primarily infecting rodents**

I: Konzeption	Konzeption der Arbeit	50 %
	Entwicklung der Klonierungsstrategie für das vollständige Virusgenom	100 %
	Entwicklung PV-typenspezifischer PCRs zum PV-Nachweis in verschiedenen Körperregionen der infizierten Wanderratte	100 %
II: Durchführung	Probensammlung, Probenentnahme, Probenaufbereitung und Dokumentation	100 %
	Rolling Circle Amplification, Bestimmung geeigneter Restriktionsenzyme zur Zerlegung der RCA-Produkte in lineare Einzelkopien des viralen Genoms, Klonierung des vollständigen Virusgenoms	100 %
	Überprüfung der Sequenzierungsergebnisse und Nachsequenzierung potenzieller Sequenzierfehler (Stopkodons, Frame Shifts, Bereiche mit geringen Überlappungen der Einzelsequenzen) und anschließende Korrektur der Genomsequenzen	100 %
	Analyse der Genomorganisation, Datenbankannotierung der PV-Genomsequenzen	100 %
	Bioinformatische Charakterisierung der potenziellen Eigenschaften der Virusproteine, Untersuchung der nicht kodierenden Region auf das Vorkommen potenzieller cis-regulatorischer Sequenzelemente	100 %
III: Berichtsabfassung	Erstellung des Manuskripts und Diskussion der bioinformatischen Analysen	30 %

Arbeit 3:**Modular organizations of novel cetacean Papillomviruses**

I: Konzeption	Konzeption der Arbeit	30 %
	Entwicklung der Klonierungsstrategie für das vollständige Virusgenom	100 %
II: Durchführung	Probenaufbereitung	50 %
	Rolling Circle Amplification, Bestimmung geeigneter Restriktionsenzyme zur Zerlegung der RCA-Produkte in lineare Einzelkopien des viralen Genoms, Klonierung des vollständigen Virusgenoms	100 %
	Überprüfung der Sequenzierungsergebnisse und Nachsequenzierung potenzieller Sequenzierfehler (Stopkodons, Frame Shifts, Bereiche mit geringen Überlappungen der Einzelsequenzen) und anschließende Korrektur der Genomsequenzen	100 %
	Analyse der Genomorganisation, Datenbankannotierung der PV-Genomsequenzen	100 %
	bioinformatische Charakterisierung der potenziellen Eigenschaften der Virusproteine, Untersuchung der nicht kodierenden Region auf das Vorkommen potenzieller cis-regulatorischer Sequenzelemente	100 %
III: Berichtsabfassung	Erstellung des Manuskripts und Diskussion der bioinformatischen Analysen	20 %

6 Diskussion

6.1 Besonderheiten im Genomaufbau und potenzielle Eigenschaften der neuen Papillomvirus-Typen

Trotz ständig wachsendem Erkenntnisstand über die Diversität und den Wechselwirkungen zwischen Virus und Wirt ist die Evolution der PV derzeit unzureichend verstanden. Die Interpretation verschiedener Eigenschaften einzelner PV-Gruppen, ihrer Verwandtschaftsverhältnisse und der Beziehungen zu ihren Wirten führte zu unterschiedlichen Annahmen über die Evolution der Papillomviren. Ein Grund dafür ist die mangelnde Kenntnis von der PV-Diversität, die mit 68 bekannten PV-Typen aus 37 von 5.416 nicht-humanen Säugetierarten nur ansatzweise erfasst ist. Daher war es das Ziel dieser Arbeit, neue PV zu identifizieren, ihre vollständigen Genome zu klonieren und zu sequenzieren. Die neuen PV-Typen sollten anhand ihrer Genomorganisation und der Sequenzmerkmale ihrer Proteine charakterisiert werden, um potenzielle Eigenschaften abzuleiten. Durch die Darstellung und Interpretation ihrer Verwandtschaftsverhältnisse sollten Rückschlüsse auf mögliche Evolutionsmechanismen gezogen werden, die an der Entstehung der neuen PV-Typen beteiligt waren. Dabei galt es zu überprüfen, ob sich die Verwandtschaftsbeziehungen bekannter PV-Typen mit unsicherer phylogenetischer Stellung durch die Einbeziehung der neuen PV-Sequenzen in die Stammbaumberechnung genauer als zuvor darstellen lassen.

In der vorliegenden Arbeit werden die vollständigen genomischen DNA-Sequenzen folgender neuer PV-Typen präsentiert: EePV1 (Wirt: europäischer Igel, *Erinaceus europaeus* Linnaeus, 1758; Ordnung: Eulipotyphla) (Schulz et al., 2009a), RnPV1 (Wirt: Wanderratte, *Rattus norvegicus*; Ordnung: Rodentia) (Schulz et al., 2009b), PphPV1, PphPV2, und PphPV3 [Wirt: Schweinswal, *Phocoena phocoena* (Linnaeus, 1758); Ordnung: Cetacea], DdPV1 (Wirt: gemeiner Delfin, *Delphinus delphis* Linnaeus, 1758; Ordnung: Cetacea), und TtPV3-Variante [Wirt: atlantischer Weißseitendelfin, *Lagenorhynchus acutus* (Gray, 1828); Ordnung: Cetacea] (Gottschling et al., 2010).

Die neuen PV-Typen entsprechen in ihrem Genomaufbau der grundlegenden Genomorganisation der PV, bestehend aus URR sowie frühen und späten Genen, die in derselben Orientierung kodiert sind. Die neuen PV-Typen enthalten die vier großen Hauptgene E1, E2, L1 und L2 und besitzen daneben einen ORF für ein E6- sowie für ein E4-Gen. Die E4-ORF der neuen PV-Typen beginnen nicht mit einem normalen Startkodon (Schulz et al., 2009a; Schulz et al., 2009b; Gottschling et al., 2010). Vermutlich werden sie durch Zusammenspleißen der ersten Kodons des E1-ORF mit dem Beginn des E4-ORF exprimiert, wie beispielsweise bei den humanen Alpha-PV-Typen (Nasseri et al., 1987). Darüber hinaus enthalten die Genome von EePV1 und RnPV2 einen E7-ORF (Schulz et al., 2009a; Schulz et al., 2009b).

Das Genom von EePV1 verfügt über eine zweite NCR zwischen frühen und späten Genen (Schulz et al., 2009a). Das Vorkommen einer zweiten NCR im Genom von EePV1 ist ungewöhnlich, da eine solche Genomorganisation innerhalb der Familie *Papillomaviridae* sehr selten ist und nur bei den nicht näher verwandten Lambda-PV (Wirte: Carnivora) vorkommt (Terai und Burk, 2002; Tachezy et al., 2002a; Rector et al., 2005b; Rector et al., 2007; Lange et al., 2009b). Es zeigte sich jedoch keinerlei Sequenzhomologie zwischen der zweiten NCR der Lambda-PV und der von EePV1. Ferner wurde diese Funktion dieser Region bisher weder in PV der Katzen noch in den PV der Hunde experimentell untersucht. Das Vorliegen potenzieller TFBS und TATA-Boxen in der zweiten NCR von EePV1 deutet jedoch auf eine regulatorische Funktion dieses Genombereiches hin (Schulz et al., 2009a).

Die Genome der neuen Cetacea-PV zeichnen sich durch ein fehlendes E7-Gen aus (Gottschling et al., 2010). Lediglich im Genom des Theta-PV PePV1 [Wirt: Graupapagei, *Psittacus erithacus* (Linnaeus, 1758); Ordnung: Psittaciformes; Klasse: Aves] (Tachezy et al., 2002b) ist ebenfalls kein E7-Gen vorhanden. Da Aves-PV nicht näher mit den Cetacea-PV verwandt sind, kam es innerhalb der PV wahrscheinlich zweimal unabhängig zum Verlust des E7-Gens. An homologer Position des E7-ORF anderer PV befindet sich bei Cetacea-PV (Rehtanz et al., 2006; Van Bressemer et al., 2007; Rector et al., 2008) sowie den nah verwandten SsPV1 [Wirt: Hausschwein, *Sus scrofa* Linnaeus, 1758, Ordnung: Artiodactyla] (Stevens et al., 2008b) und UmPV1 [Wirt: Eisbär, *Ursus maritimus* (Phipps, 1774), Ordnung: Carnivora] (Stevens et al., 2008a) eine kurze NCR. Dieses Merkmal kann daher als Apomorphie für diese monphyletische Gruppe aus SsPV1, UmPV1 und Cetacea-PV gewertet werden (vgl. 6.2).

Neben dem fehlenden E7-Gen zeichnen sich die neuen und auch die bekannten Cetacea-PV durch besonders lange E6-Gene aus (Gottschling et al., 2010). Sie weisen an ihrem 3'-Ende zusätzliche Basenfolgen auf, die in anderen PV-Typen nicht vorkommen. Dadurch sind die entsprechenden E6-Proteine um bis zu 70 Aminosäuren (AS) länger als die E6-Proteine anderer PV (Rehtanz et al., 2006; Van Bressemer et al., 2007; Rector et al., 2008). In den C-terminalen AS-Bereichen von PphPV3-E6 und DdPV1-E6 sowie TtPV3-Variante-E6 ist ein PDZ-Bindungsmotiv (X-S/T-X-L/V) lokalisiert. Die PDZ-Bindungsmotive am C-Terminus der E6-Proteine genitaler HR-HPV sind mit der Fähigkeit zur Transformation der Wirtszellen assoziiert. Sie interagieren durch dieses Motiv mit zellulären Proteinen, die eine PDZ-Domäne enthalten und führen diese der Degradation im Proteasom zu (Thomas et al., 2008). Unter anderem wird hierdurch der Tumorsuppressor p53 inhibiert, was zur Apoptoseinhibierung und Verminderung der genomischen Stabilität der Wirtszellen führt (Huibregtse, Scheffner und Howley, 1991). In den neuen Cetacea-PV befinden sich die PDZ-Bindungsmotive innerhalb der zusätzlichen C-terminalen AS-Folgen. In den E6-Proteinen von DdPV1 und TtPV3-Variante liegen sie stromaufwärts des C-Terminus, wohingegen es im

E6-Protein von PphPV3 den absoluten C-Terminus bildet. Dies deutet darauf hin, dass PphPV3-E6 mit zellulären PDZ-Proteinen interagieren und möglicherweise Tumorsuppressorproteine und Zellpolaritätsproteine inhibieren kann (Thomas et al., 2008).

EePV1 besitzt in seinem E7-Protein ein PDZ-Bindungsmotiv, das drei AS vor dem C-Terminus liegt (Schulz et al., 2009a). Ein PDZ-Bindungsmotiv am absoluten C-Terminus des E7-Proteins von MmPV1 [Wirt: Rhesusaffe, *Macaca mulatta* (Zimmermann, 1780), Ordnung Primates] (Ostrov, La Bresh und Faras, 1991) ist für die Veränderung der Zellpolarität und Motilität verantwortlich (Tomaić et al., 2009). Obwohl das PDZ-Bindungsmotiv des E7-Proteins von EePV1 nicht den absoluten C-Terminus bildet, befindet es sich im Alignment der AS-Sequenzen an exakt derselben Position wie in MmPV1. Welchen Einfluss die zusätzlichen drei AS am C-Terminus von EePV1-E7 auf die Funktionalität der PDZ-Bindungsdomäne haben, kann anhand des Sequenzvergleiches nicht vorhergesagt werden. Das Vorkommen dieses Motivs in EePV1-E7 deutet jedoch auf ähnliche Eigenschaften wie die des E7-Proteins von MmPV1 hin.

Das Genom von RnPV1 weist keine besonderen Sequenzmerkmale auf, anhand derer sich konkrete Eigenschaften dieses PV-Typen ableiten lassen. Im Sequenzvergleich und den phylogenetischen Analysen zeigte sich aber eine große Ähnlichkeit mit McPV2. Dieser PV-Typ infiziert die Vielzitzenmaus *Mastomys coucha* und ist ursächlich für die Entstehung anogenitaler Tumoren (Nafz et al., 2008). Aufgrund hoher Sequenzübereinstimmungen und seiner Schwestergruppenbeziehung mit diesem karzinogenen PV-Typ können ähnliche Eigenschaften für RnPV1 angenommen werden (Schulz et al., 2009b). *Mastomys coucha* sowie das Baumwollschwanzkaninchen *Sylvilagus floridanus* (J. A. Allen, 1890) und ihre spezifischen PV-Typen sind, im Gegensatz zu transgenen Mäusen, die einzigen Tiermodelle mit deren Hilfe derzeit PV-induzierte Karzinogenese *in vivo* in einem natürlichen Kontext untersucht werden kann (Amtmann, Volm und Wayss, 1984; Wettstein, Barbosa, und Nasser, 1987; Brandsma et al., 1991; Nafz et al., 2007; Nafz et al., 2008; Cladel et al., 2010). Da es sich bei diesen Tieren jedoch nicht um klassische Labortiere handelt, könnte sich ein Rattenmodell als nützlich erweisen, um in Zukunft die molekularen Mechanismen PV-induzierter Karzinogenese zu studieren.

6.2 Klassifikation der neuen Papillomvirus-Typen

Durch die Klonierung der vollständigen Genome der neuen PV-Typen konnte ein Beitrag zur Erweiterung der bekannten PV-Diversität geleistet werden. Phylogenetische Analysen und die Ermittlung der Sequenzähnlichkeiten ihrer L1-Gene erlaubten die Klassifizierung der neuen PV-Typen entsprechend der ICTV-Vorgaben.

EePV1 (Wirt: Europäischer Igel, *Erinaceus europaeus*) repräsentiert den bisher einzigen PV-Typ aus einer Tierart der Eulipotyphla (früher „Insectivora“). Dieses Virus nimmt im

Stammbaum eine phylogenetische Stellung innerhalb des Beta-Xi-PV-Supertaxons ein und bildet die Schwestergruppe der Beta-PV (Wirte: Primates). Es weist in seinem L1-Gen 64 % Sequenzähnlichkeit mit McPV-2 [Wirt: afrikanische Vielzitzenmaus, *Mastomys coucha* Ordnung: Rodentia] auf (Schulz et al., 2009a). Dies liegt über dem Ähnlichkeitsschwellenwert zur Unterscheidung einzelner PV-Gattungen. Aufgrund seiner besonderen Genomorganisation mit einer zweiten NCR zwischen frühen und späten Genen und seiner Verwandtschaft mit Beta-PV wurde dieser PV-Typ jedoch als neue Gattung klassifiziert und als Dyoeta-PV bezeichnet (Bernard et al., 2010).

RnPV1 (Wirt: Wanderratte, *Rattus norvegicus*) nimmt eine phylogenetische Stellung innerhalb der Pi-PV ein und bildet eine monophyletische Gruppe mit bekannten PV-Typen, die ebenfalls Tiere der Rodentia infizieren. Darunter sind MmiPV1 [Wirt: Erntemaus, *Micromys minutus* (Pallas, 1771); Ordnung: Rodentia] (Van Doorslaer et al., 2007) und McPV2 (Wirt: Vielzitzenmaus, *Mastomys coucha*, Ordnung: Rodentia) (Nafz et al., 2008) und MaPV1 [Wirt: syrischer Goldhamster, *Mesocricetus auratus* (Waterhouse, 1839), Ordnung: Rodentia]. (Iwasaki et al., 1997). Im Stammbaum zeigt RnPV1 ein Schwestergruppenverhältnis zu McPV2 und weist in seinem L1-Gen 83–85 % Sequenzähnlichkeit mit McPV2 und MmiPV1 auf (Schulz et al., 2009b). Daher gehören RnPV1, MmiPV1 und McPV1 zur Pi-1-PV Art, während MaPV1 71–73 % Sequenzähnlichkeit zu den übrigen Pi-PV zeigt und als Pi-2-PV Art klassifiziert wurde (Bernard et al., 2010).

Die neuen PV-Typen PphPV1, PphPV2 und PphPV3 [Wirt: Schweinswal, *Phocoena phocoena*; Ordnung: Cetacea], DdPV1 [Wirt: gemeiner Delfin, *Delphinus delphis*; Ordnung: Cetacea] und TtPV3-Variante [Wirt: atlantischer Weißseitendelfin, *Lagenorhynchus acutus*; Ordnung: Cetacea] nehmen trotz ihres Vorkommens auf identischen bzw. nah verwandten Tierarten unterschiedliche phylogenetische Stellungen ein. Sie gruppieren sich in zwei unterschiedlichen Linien, wobei sie eine phylogenetische Stellung innerhalb des Alpha+Omikron-PV-Supertaxons einnehmen und mit Ausnahme von PphPV3 eine monophyletische Gruppe mit bekannten PV-Typen der Omikron+Upsilon-PV (Wirte: Cetacea) bilden. Die Omikron+Upsilon-PV bilden innerhalb des Alpha+Omikron-PV-Supertaxons die Schwestergruppe zu den Alpha+Dyodelta+Omega-PV.

PphPV1 bildet eine Schwestergruppe mit dem bekannten Omikron-PV, PsPV1 [Wirt: Burmeister Schweinswal, *Phocoena spinipinnis* (Burmeister, 1865); Ordnung: Cetacea]. (Van Bressemer et al., 2007) Die Sequenzähnlichkeiten ihrer L1-Gene zu den übrigen PV liegen unter 55 %. Ihre Sequenzähnlichkeit zueinander beträgt 72 %. Damit bilden sie gemeinsam die PV-Gattung der Omikron-PV und werden nicht weiter in PV-Arten unterteilt (Gottschling et al., 2010).

Die neuen PV PphPV2 und DdPV1 und die TtPV3-Variante sind nah mit den bekannten Upsilon-PV-Typen TtPV1, TtPV2 und TtPV3 [Wirt: großer Tümmler, *Tursiops truncatus*

(Montagu, 1821); Ordnung: Cetacea] (Rehtanz et al., 2006; Rector et al., 2008) verwandt und bilden aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeiten zwischen 59 % und 98 % zu diesen PV-Typen die gemeinsame PV-Gattung der Upsilon-PV. DdPV1, TtPV1, TtPV3 und die TtPV3-Variante haben Sequenzähnlichkeiten von 78–98 % und werden vom ICTV voraussichtlich als Upsilon-1-PV Art klassifiziert. TtPV2 weist maximal 68 % Sequenzähnlichkeit mit den übrigen Upsilon-PV auf und bildet die Upsilon-2-PV Art. PphPV2 hat maximal 61 % Sequenzähnlichkeit mit allen anderen Upsilon-PV und bildet somit voraussichtlich die Upsilon-3-PV Art.

PphPV3 hingegen ist nicht näher mit den Omikron+Upsilon-PV verwandt und bildet die Schwestergruppe zum Dyodelta-PV SsPV1 (Wirt: Hausschwein, *Sus scrofa*, Ordnung: Artiodactyla) (Stevens et al., 2008b). Diese Gruppe aus PphPV3 und SsPV1 bildete die Schwestergruppe zu den Alpha+Omega-PV (Wirte: Primates und Carnivora). PphPV3 weist 63 % Sequenzähnlichkeit zu SsPV1 auf (Gottschling et al., 2010). Dies liegt über dem Ähnlichkeitsschwellenwert für die Unterscheidung verschiedener PV-Gattungen. Voraussichtlich wird es aber aufgrund seines Genomaufbaus mit einem langen E6-Gen als eigenständige PV-Gattung klassifiziert werden. Die endgültige Entscheidung über die Benennung dieser Gattung wird jedoch vom ICTV getroffen und bleibt solange offen, bis die nächste Überarbeitung der PV-Nomenklatur durch die PV-Studiengruppe veröffentlicht wird. Durch die Klonierung der neuen PV-Typen erhöhte sich die Zahl bekannter PV-Typen aus nicht humanen Säugetieren von 68 auf 75. Die Zahl bekannter Wirtsarten innerhalb der Säugetiere erhöhte sich von 37 auf 42. Die Zahl der bekannten Wirtsordnungen innerhalb der Säugetiere erhöhte sich von elf auf zwölf. Dennoch konnten bislang unsichere phylogenetische Stellungen bekannter PV-Typen, die sich bisher keiner Kronengruppe zuordnen ließen, durch die Einbeziehung neuer PV-Sequenzen in die Stammbaumrekonstruktion nicht genauer klassifiziert werden. Die Klonierung weiterer vollständiger PV-Genome aus dem näheren Verwandtschaftskreis dieser PV-Typen ist notwendig, um deren Verwandtschaftsverhältnisse akkurat zu bestimmen.

6.3 Verwandtschaftsbeziehungen neuer Papillomvirus-Typen offenbaren vielfältige Evolutionsmechanismen

Die Ergebnisse der phylogenetischen Analysen zeigten, dass die neuen PV-Typen der Eulipotyphla, Rodentia und Cetacea jeweils unterschiedliche Stellungen innerhalb des PV-Stammbaumes einnehmen. Oberflächlich betrachtet entspricht dies den Verwandtschaftsverhältnissen der Wirte, die ebenfalls nicht näher miteinander verwandt sind. Doch trotz nah verwandter bzw. identischer Wirte (Cetacea-PV) zeigen einige neue PV-Typen (PphPV3) hingegen nur entfernte Verwandtschaft zueinander.

Die Stammbäume der jeweiligen Wirte sind nicht deckungsgleich mit dem PV-Stammbaum oder einzelnen Ästen darin. Dies ist jedoch notwendig, um wirtgebundene Evolution anhand von Stammbaumrekonstruktionen plausibel zu machen (Gottschling et al., 2007a). Die Stammbaumpositionen der neuen PV-Typen widersprechen daher der Annahme von Ko-Divergenz als alleinigem Evolutionsmechanismus der PV, weshalb alternative Evolutionsmechanismen in Betracht gezogen werden müssen. Aus den Verwandtschaftsbeziehungen der neuen PV-Typen, den Beziehungen zu ihren Wirten und den jeweiligen Sequenzmerkmalen ihrer Genome ergeben sich verschiedene Interpretationsmöglichkeiten für die Entstehung ihrer jeweiligen PV-Gattungen.

Die Ko-Divergenz von Virus und Wirt als alleiniger Evolutionsmechanismus muss für PV bereits in ihrer Grundannahme verworfen werden, da das Dogma ihrer strikten Wirtsspezifität durch eine zunehmende Anzahl an Gegenbeispielen widerlegt ist. So wurde in dieser Arbeit das vollständige Genom einer Variante von TtPV3 [Wirt: großer Tümmler, *Tursiops truncatus*, Ordnung: Cetacea] aus einem atlantischen Weißseitendelfin [*Lagenorhynchus acutus* (Gray, 1828); Ordnung: Cetacea] kloniert. Das Vorkommen von PV-Varianten auf unterschiedlichen Wirtsarten deutet auf ein nicht zu vernachlässigendes zoonotisches Potenzial der PV hin (Gottschling et al., 2010).

Bereits zuvor wurden identische Makaken-PV in verschiedenen Makakenarten (Ordnung: Primates) nachgewiesen und als Hinweis auf zwischenartliche Übertragung gewertet (Chen et al., 2009). BPV1 und BPV2 [Wirt: *Bos taurus* Linnaeus, 1758; Ordnung: Artiodactyla] sind in der Lage verschiedene Rinderarten (Ordnung: Artiodactyla) sowie Pferde und Tapire (Ordnung: Perissodactyla) zu infizieren und sogenannte Sarkoide zu induzieren (Chambers et al., 2003; Bogaert et al., 2005; Kidney und Berrocal, 2008; Silvestre et al., 2009). Diese Hinweise belegen, dass Wirtsspezifität kein allumfassendes Merkmal der PV ist. Hingegen werden Artgrenzen in einzelnen Fällen durchaus überschritten. Die Veränderung und Anpassung des Virus an das Habitat auf einem neuen Wirt kann somit zur Entstehung neuer PV-Typen führen (Gottschling et al., 2007a; Gottschling et al., 2007b). Daher muss die Möglichkeit zwischenartlicher Übertragung und nachfolgender unabhängiger Veränderung auf den verschiedenen Wirten bei der Interpretation der Verwandtschaftsverhältnisse der PV berücksichtigt werden.

Die Schwestergruppenbeziehung zwischen EePV1 (Wirtsordnung: Eulipothyphla; Laurasiatheria) und Beta-PV (Wirtsordnung: Primates; Afrotheria) widerspricht der Annahme von Ko-Divergenz, da ihre Wirte nicht näher verwandt sind (siehe Abbildung 4). Daher könnte eine zwischenartliche Übertragung und Anpassung an einen neuen Wirt an der Entstehung dieser PV-Gattung beteiligt gewesen sein. EePV1 besitzt eine zweite NCR zwischen frühen und späten Genen, die nur bei Lambda-PV (Wirtsordnung: Carnivora) vorkommt. Es besteht jedoch keine nähere Verwandtschaft zwischen EePV1 und Lambda-PV, und die Sequenzen

ihrer zweiten NCR zeigen im Alignment keinerlei Sequenzübereinstimmung. Daher ist eine Homologie dieser Region von EePV1 und Lambda-PV unwahrscheinlich (Schulz et al., 2009a). Bei den Lambda-PV zeigen sich nur innerhalb der Vertreter der Lambda-1-PV-Art Übereinstimmungen zwischen den Sequenzen der zweiten NCR. Die zweite NCR der Lambda-2-, Lambda-3- und Lambda-4-PV-Art zeigen hingegen keine Übereinstimmungen zueinander oder zur korrespondierenden Region der Lambda-1-PV oder EePV1. Hinzu kommt, dass andere PV-Typen der Carnivora wie FdPV2 (Wirt: Hauskatze, *Felis catus* Linnaeus, 1758, Ordnung: Carnivora) (Lange et al., 2009b) oder CPV2, -4, -5 und -7 (Wirt: Haushund, *Canis lupus familiaris* Linnaeus, 1758, Ordnung: Carnivora) (Tobler et al., 2006; Yuan et al., 2007; Tobler et al., 2008; Lange et al., 2009a), die ebenfalls nicht näher mit Lambda-PV verwandt sind, keine zweite NCR aufweisen. Eine mehrfach unabhängige konvergente Entstehung dieses Merkmals kann daher als Erklärung für diesen Befund gesehen werden (Schulz et al., 2009a).

RnPV1 (Wirt: Wanderratte, *Rattus norvegicus*) bildet eine monophyletische Gruppe mit den bekannten PV-Typen der Pi-PV, die ebenfalls Nager infizieren (Schulz et al., 2009b). Die nahe Verwandtschaft ihrer Wirte spricht auf den ersten Blick für Ko-Divergenz. Die Systematik der Rodentia ist derzeit umstritten. Dies erschwert die Beweisführung anhand von Vergleichen der Stammbaumtopologien der Viren und ihrer Wirte. Daher muss Ko-Divergenz innerhalb der Pi-PV mit Vorsicht bewertet werden. RnPV1 bildet im Stammbaum der zusammengesetzten Gene E1/E2/L1 die Schwestergruppe zu McPV2 [Wirt: *Mastomys coucha*; Ordnung: Rodentia]. Unter der Annahme von Ko-Divergenz müsste RnPV1 aber näher mit MmiPV1 [Wirt: Erntemaus, *Micromys minutus* (Pallas, 1771); Ordnung: Rodentia] verwandt sein als mit McPV2, denn *M. minutus* und *R. norvegicus* sind näher miteinander verwandt als *R. norvegicus* und *M. coucha* (Rowe et al., 2008).

Hinzu kommt, dass die Rodentia-PV, neben den Pi-PV, zwei weitere nur entfernt verwandte Gattungen Iota-PV und Sigma-PV bilden. Dies steht im Gegensatz zur Monophylie ihrer Wirte. Daher müssen für die Entstehung der einzelnen Rodentia-PV-Gattungen alternative Erklärungen herangezogen werden. PV-DNA wurde in den verschiedenen Rodentia an sehr unterschiedlichen Körperregionen wie Mundhöhle, Haut und Genitalbereich und – im Fall der *Mastomys*-PV – auch in inneren Organen nachgewiesen (O'Banion, Reichmann und Sundberg, 1988; Iwasaki et al., 1997; Rector et al., 2005a; Nafz et al., 2007; Nafz et al., 2008; Schulz et al., 2009b). Diese PV-Typen haben anscheinend die Fähigkeit, unterschiedliche Habitate zu besiedeln. Daher spielt möglicherweise adaptive Radiation und Realisierung neuer ökologischer Nischen in unterschiedlichen Habitaten auf demselben Wirt eine Rolle bei der Diversifizierung der Rodentia-PV (Jackson, 2005; Gottschling et al., 2007a, Bravo, de Sanjosé und Gottschling, 2010).

Mit Ausnahme von PphPV3 nehmen alle PV-Typen der Cetacea jeweils unterschiedliche Stellungen innerhalb der Stammbäume der frühen und späten Gene ein. Während PphPV3 in beiden Stammbäumen die Schwestergruppe zu SsPV1 bildet, die wiederum die Schwestergruppe der Alpha+Omega-PV darstellt, nehmen alle anderen Cetacea-PV nur im Stammbaum der frühen Gene Positionen als Schwestergruppe der übrigen Vertreter des Alpha+Omikron-PV-Supertaxons ein. Hingegen bilden sie im Stammbaum der späten Gene eine monophyletische Gruppe mit den Xi-PV (Wirte: Artiodactyla). Beide phylogenetischen Stellungen sind aus evolutionärer Sicht plausibel zu erklären. Die phylogenetischen Stellungen der frühen Gene von Upsilon+Omikron-PV korrelieren mit dem gemeinsamen genitalen bzw. mukosalen Tropismus der Vertreter des Alpha+Omikron-PV-Supertaxons. Jedoch korrelieren die phylogenetischen Stellungen ihrer späten Gene mit der gemeinsamen Abstammung der Wirte von Upsilon+Omikron+Xi-PV (Wirte: Cetartiodactyla) (Gottschling et al., 2010).

Widersprüchliche Topologien gut gestützter Stammbäume früher bzw. später PV-Gene wurden als Hinweis für zurückliegende Rekombinationsereignisse gewertet (Narenchania et al., 2005; García-Valvé, Alonso und Bravo, 2005; Varsani et al., 2006; Angulo und Carvajal-Rodríguez, 2007; Shah, Doorbar und Goldstein, 2010). Die Ergebnisse der BootScan-Analyse sprechen ebenfalls dafür, dass die unterschiedlichen Stellungen der Cetacea-PV ein weit zurückliegendes Rekombinationsereignis widerspiegeln. Dabei könnten Bereiche der späten Gene eines nahen Verwandten der Alpha+Omega+Dyodelta-PV gegen den korrespondierenden Bereich eines nahen Verwandten der Xi-PV ausgetauscht worden sein. Mit Ausnahme von PphPV3 sind die Genome aller Cetacea-PV damit chimärisch aus Bestandteilen der frühen Gene der Alpha-PV und der späten Gene der Xi-PV zusammengesetzt. Möglicherweise stellt PphPV3 einen Verwandten eines noch unbekanntem Donors dar, dessen frühe Gene in die Genome eines nahen Verwandten der Xi-PV integriert wurden (Gottschling et al., 2010). Den wahren Donor wird man vermutlich nie finden, weil er vermutlich schon ausgestorben ist oder sich im Laufe der Zeit stark verändert hat.

6.4 Ausblick

Die Rodentia-PV infizieren nah verwandte Wirte, zeigen im Stammbaum aber polyphyletische Positionen. Der neue Eulipotyphla-PV EePV1 zeigt nahe Verwandtschaft zu PV-Typen, welche entfernt verwandte Wirte (Primates) infizieren. Hinzu kommt, dass die Cetacea-PV in separaten Analysen früher und später Gene widersprüchliche Verwandtschaftsverhältnisse aufweisen. Daraus ergibt sich ein sehr komplexes Bild der PV-Evolution. Die heute bekannte Diversität der PV ist sicherlich durch das Wirken verschiedener Evolutionsmechanismen einschließlich Ko-Divergenz, zwischenartlicher Übertragung und

unabhängiger Veränderung auf verschiedenen Wirten, adaptiver Radiation und der Realisierung neuer ökologischer Nischen auf demselben Wirt sowie durch Rekombinationsereignisse entstanden.

Als Folge dieser Erkenntnis sollten die Verwandtschaftsverhältnisse jeder einzelnen PV-Gattung separat betrachtet werden. Dabei sollten die phylogenetischen Stellungen im Zusammenhang mit den jeweiligen Eigenschaften der Viren, ihren Genomorganisationen und den Beziehungen zu ihren Wirten interpretiert werden.

Weiterhin gilt es, die bestehenden Lücken im Wissen um die PV-Diversität zu füllen, um die komplexen evolutionären Zusammenhänge innerhalb der PV im Detail zu verstehen. Dazu ist es notwendig, weitere neue PV-Typen zu klonieren und ihre genomischen Sequenzen in die Stammbaumrekonstruktion zu integrieren. Eine bessere Kenntnis der PV-Evolution kann helfen, die Verknüpfung zwischen Genotyp und dem karzinogenen Phänotyp bestimmter PV-Typen zu verstehen. Dies wäre von großer Wichtigkeit für die medizinische Diagnostik. Man weiß beispielsweise, dass das Potenzial für maligne Transformation bei nah verwandten HPV-Typen am ähnlichsten ist (Muñoz et al., 2003). Das Wissen um die PV-Evolution kann also helfen, anhand der Verwandtschaftsverhältnisse Risikoabschätzungen für potenzielle karzinogene Eigenschaften bestimmter PV-Taxa vorzunehmen (Schiffmann et al., 2005; Bravo und Alonso, 2007; Burk, Chen und van Doorslaer, 2009; Diallo et al., 2009; Esmaeili, Mohabatkar und Mohsenzadeh, 2010). Die genitalen HR-HPV-Typen (Alpha PV, Alpha-9 und Alpha-11, HPV18 und HPV16) können den Niedrigrisiko-HPV-Typen (Beta-, Gamma-, Mu- und Nu-PV) aufgrund ihrer phylogenetischen Verwandtschaft gegenübergestellt werden. Dieses Wissen ist entscheidend bei der Auswahl bestimmter PV-Typen für künftige Experimente. Dies ist besonders für solche PV-Typen interessant, die gerade erst isoliert wurden und daher noch nicht experimentell charakterisiert werden konnten.

Ebenso kann eine verbesserte Klassifizierung helfen, eine adäquate Auswahl von PV-Typen und ihren Wirten für die Etablierung künftiger Tiermodelle zu treffen (Borzacchiello et al., 2009). Die Klonierung von PV-Typen klassischer Labortiere kann dazu beitragen, neue Tiermodelle zu etablieren und damit PV-induzierte Erkrankungen *in vivo* zu untersuchen (Schulz et al., 2009b). Beispielsweise kann die Interaktion der Viren mit dem komplexen Zellsystem der Haut und dem Immunsystem untersucht werden, was für die Impfstoffentwicklung von entscheidender Bedeutung ist. Tiermodelle anhand der Wanderratte oder der Hausmaus hätten den Vorteil, dass die Genome dieser Tiere bereits vollständig bekannt sind (Mouse Genome Sequencing Consortium, 2002; Rat Genome Sequencing Project Consortium, 2004) und zahlreiche genetisch veränderte Varianten dieser Tiere sowie Antikörper gegen eine Vielzahl ihrer Proteine verfügbar sind. Die Identifizierung von Genen bzw. von Proteinen des Wirtes, die die Pathogenese von PV-Infektionen beeinflussen, kann zur Entwicklung neuer Präventionsstrategien und Therapeutika beitragen.

Des Weiteren ließen sich mit Ratten- oder Mausmodellen auch molekulare Mechanismen entschlüsseln, die zoonotische PV-Übertragungen erlauben bzw. verhindern. Dies kann wiederum dazu beitragen, die wirtschaftlichen Schäden durch zwischenartliche PV-Infektionen in Nutztieren, wie Pferden und Rindern, zu verringern. Darüber hinaus ließen sich mögliche Gefahren für den Menschen abschätzen, die von zoonotischen Übertragungen nicht humaner PV ausgehen.

7. Literaturverzeichnis

- Alberti, A., Pirino, S., Pintore, F., Addis, M. F., Chessa, B., Cacciotto, C., Cubeddu, T., Anfossi, A., Benenati, G., Coradduzza, E., Lecis, R., Antuofermo, E., Carcangiu, L. und Pittau, M. 2010. *Ovis aries* Papillomavirus 3: a prototype of a novel genus in the family Papillomaviridae associated with ovine squamous cell carcinoma. *Virology*. 407, 352–359.
- Akgül, B., Cooke, J. C. und Storey, A. 2006. HPV-associated skin disease. *J Pathol*. 208, 165–175.
- Amtmann, E., Volm, M. und Wayss, K. 1984. Tumour induction in the rodent *Mastomys natalensis* by activation of endogenous papilloma virus genomes. *Nature*. 308, 291–292.
- Angulo, M., und Carvajal-Rodríguez, A. 2007. Evidence of recombination within human Alpha-Papillomavirus. *Viol J*. 4:33.
- Antonsson, A., Forslund, O., Ekberg, H., Sterner, G. und Hansson, B. G. 2000. The ubiquity and impressive genomic diversity of human skin Papillomaviruses suggest a commensalic nature of these viruses. *J Virol*. 74, 1636–1641.
- Antonsson, A. und Hansson, B. G. 2002. Healthy skin of many animal species harbors Papillomaviruses which are closely related to their human counterparts. *J Virol*. 76, 12537–12542.
- Antonsson, A., McMillan, N. A. 2006. Papillomavirus in healthy skin of Australian animals. *J Gen Virol*. 87, 3195–3200.
- Bennett, M. D., Woolford, L., Stevens, H., Van Ranst, M., Oldfield, T., Slaven, M., O'Hara, A. J., Warren, K. S. und Nicholls, P. K. 2008. Genomic characterization of a novel virus found in papillomatous lesions from a southern brown bandicoot (*Isodon obesulus*) in Western Australia. *Virology*. 376, 173–182.
- Bennett, M. D., Reiss, A., Stevens, H., Heylen, E., Van Ranst, M., Wayne, A., Slaven, M., Mills, J. N., Warren, K. S., O'Hara, A. J., und Nicholls, P. K. 2010. The first complete Papillomavirus genome characterized from a marsupial host: a novel isolate from *Bettongia penicillata*. *J Virol*. 84, 5448–5453.
- Bernard, H. U, Chan, S. Y., Myers, G., Sverdrup, F., Baker, C., McBride, A., Munger, K. und Meissner, J. 1997. Animal Papillomaviruses. In *Human Papillomaviruses 1997: A compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences*. Los Alamos: Theoretical Biology and Biophysics, Los Alamos National Laboratory
- Bernard, H. U, Calleja-Macias, I. E. und Dunn, S. T. 2006. Genome variation of human Papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. *Int J Cancer*. 118, 1071–1076.
- Bernard, H. U., Burk, R. D., Chen, Z., van Doorslaer, K., zur Hausen, H. und de Villiers, E. M. 2010. Classification of Papillomaviruses (PVs) based on 189 PV-types und proposal of taxonomic amendments. *Virology*. 401, 70–79.
- Bininda-Emonds, O. R., Cardillo, M., Jones, K. E., MacPhee, R. D., Beck, R. M., Grenyer, R., Price, S. A., Vos, R. A., Gittleman, J. L. und Purvis, A. 2007. The delayed rise of present-day mammals. *Nature*. 446, 507–512.

- Bogaert, L., Martens, A., De Baere, C. und Gasthuys, F. 2005. Detection of bovine Papillomavirus DNA on the normal skin and in the habitual surroundings of horses with and without equine sarcoids. *Res Vet Sci.* 79, 253–258.
- Borzacchiello, G. und Roperto, F. 2008. Bovine Papillomaviruses, papillomas and cancer in cattle. *Vet Res.* 39:45.
- Borzacchiello, G., Roperto, F., Nasir, L. und Campo, M. S. 2009. Human Papillomavirus Research: Do We Still Need Animal Models? *Int J Cancer.* 125, 739–740.
- Boxman, I. L., Russell, A., Mulder, L. H., Bouwes Bavinck, J. N., ter Schegget, J. und Green, A. und The Nambour Skin Cancer Prevention Study Group. 2000. Case-control study in a subtropical Australian population to assess the relation between non-melanoma skin cancer and epidermodysplasia verruciformis human Papillomavirus DNA in plucked eyebrow hairs. *Int J Cancer.* 86, 118–121.
- Boyer, S. N., Wazer, D. E. und Band, V. 1996. E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res.* 56, 4620–4624.
- Brandsma, J. L., Yang, Z. H., Barthold, S. W. und Johnson, E. A. 1991. Use of a rapid, efficient inoculation method to induce papillomas by cottontail rabbit Papillomavirus DNA shows that the E7 gene is required. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88, 4816–4820.
- Bravo, I. G. und Alonso, A. 2007. Phylogeny and evolution of Papillomaviruses based on the E1 and E2 proteins. *Virus Genes.* 34, 249–262.
- Bravo, I. G., de Sanjosé, S. und Gottschling, M. 2010. The clinical importance of understanding the evolution of Papillomaviruses. *Trends Microbiol.* 18, 432–438.
- Breitburd, F., Kirnbauer, R., Hubbert, N. L., Nonnenmacher, B., Trin-Dinh-Desmarquet, C., Orth, G., Schiller, J. T. und Lowy, D. R. 1995. Immunization with viruslike particles from cottontail rabbit Papillomavirus (CRPV) can protect against experimental CRPV infection. *J Virol.* 69, 3959–3963.
- Bryan, J. T. und Brown, D. R. 2000. Association of the human Papillomavirus type 11 E1^{E4} protein with cornified cell envelopes derived from infected genital epithelium. *Virology.* 277, 262–269.
- Burk, R. D., Chen, Z. und Van Doorslaer, K. 2009. Human Papillomaviruses: Genetic Basis of Carcinogenicity. *Public Health Genomics.* 12, 281–290
- Chambers, G., Ellsmore, V. A., O'Brien, P. M., Reid, S. W. J., Love, S., Campo, M. S. und Nasir, L. 2003. Association of bovine Papillomavirus with the equine sarcoid. *J Gen Virol.* 84, 1055–1062.
- Chan, S. Y., Ho, L., Ong, C. K., Chow, V., Drescher, B., Dürst, M., ter Meulen, J., Villa, L., Luande, J., Mgaya, H. N. und Bernard, H. U. 1992. Molecular variants of human Papillomavirus type 16 from four continents suggest ancient pandemic spread of the virus and its coevolution with humankind. *J Virol.* 66, 2057–2066.
- Chiang, C. M., Ustav, M., Stenlund, A., Ho, T. F., Broker, T. R. und Chow, L. T. 1992. Viral E1 and E2 proteins support replication of homologous and heterologous papillomaviral origins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89; 5799–5803.

- Chen, Z., van Doorslaer, K., Desalle, R., Wood, C. E., Kaplan, J. R., Wagner, J. D. und Burk, R. D. 2009. Genomic diversity and interspecies host infection of alpha12 *Macaca fascicularis* Papillomaviruses (MfPVs). *Virology* 393, 304–310.
- Cladel, N. M., Hu, J., Balogh, K. K. und Christensen, N. D. 2010. Differences in methodology, but not differences in viral strain, account for variable experimental outcomes in laboratories utilizing the cottontail rabbit Papillomavirus model. *J Virol Methods*. 165, 36–41.
- de Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H. U. und zur Hausen, H. 2004. Classification of Papillomaviruses. *Virology*. 324, 17–27.
- Demeret, C., Yaniv, M. und Thierry, F. 1994. The E2 transcriptional repressor can compensate for Sp1 activation of the human Papillomavirus type 18 early promoter. *J Virol*. 68, 7075–7082.
- Diallo, A. B., Badescu, D., Blanchette, M. und Makarenkov, V. 2009. A whole genome study and identification of specific carcinogenic regions of the human papilloma viruses. *J Comput Biol*. 16, 1461–1473.
- Diniz, N., Melo, T. C., Santos, J. F., Mori, E., Brandão, P. E., Richtzenhain, L. J., Freitas, A. C., Beçak, W., Carvalho, R. F. und Stocco, R. C. 2009. Simultaneous presence of bovine Papillomavirus in blood and in short-term lymphocyte cultures from dairy cattle in Pernambuco, Brazil. *Genet Mol Res*. 8, 1474–1480.
- Doorbar, J., Ely, S., Sterling, J., McLean, C. und Crawford, L. 1991. Specific interaction between HPV-16 E1^{E4} and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature*. 352, 824–827.
- Doorbar, J. 2005. The Papillomavirus life cycle. *J Clin Virol*. 32, 7–15.
- Doorbar J. 2006. Molecular biology of human Papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci*. 110, 525–541.
- Dyson, N., Howley, P. M., Münger, K. und Harlow, E. 1989. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*. 243, 934–937.
- Esmaili, M., Mohabatkar, H. und Mohsenzadeh, S. 2010. Using the concept of Chou's pseudo amino acid composition for risk type prediction of human Papillomaviruses. *J Theor Biol*. 263, 203–209.
- Euvrard, S., Kanitakis, J. und Claudy, A. 2003. Skin cancers after organ transplantation. *N Engl J Med*. 348, 1681–1691.
- Fire, A. und Xu, S. Q. 1995. Rolling replication of short DNA circles. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92, 4641–4645.
- Forslund, O., Antonsson, A., Nordin, P., Stenquist, B. und Hansson, B. G. 1999. A broad range of human Papillomavirus types detected with a general PCR method suitable for analysis of cutaneous tumours and normal skin. *J Gen Virol*. 80, 2437–2443.
- García-Vallvé, S., Alonso, A. und Bravo I. G. 2005. Papillomaviruses: different genes have different histories. *Trends Microbiol*. 11, 514–521.
- García-Vallvé, S., Iglesias-Rozas, J. R., Alonso, A. und Bravo, I. G. 2006. Different Papillomaviruses have different repertoires of transcription factor binding sites: convergence and divergence in the upstream regulatory region. *BMC Evol Biol*. 6, 20–33.

- Gottschling, M., Stamatakis, A., Nindl, I., Stockfleth, E., Alonso, A. und Bravo, I. G. 2007a. Multiple evolutionary mechanisms drive Papillomavirus diversification. *Mol Biol Evol.* 24, 1242–1258.
- Gottschling, M., Köhler, A., Stockfleth, E. und Nindl, I. 2007b. Phylogenetic analysis of Beta-Papillomaviruses as inferred from nucleotide and amino acid sequence data. *Mol Phylogenet Evol.* 42, 213–222.
- Gottschling, M., Bravo, I. G., Schulz, E., Bracho, M. A., Deaville, R., Jepson P. D., Van Bresse M. F., Stockfleth, E. und Nindl, I. 2010. Modular organizations of novel cetacean papillomviruses. *Mol Phylogenet Evol.* 59, 34-42.
- Halpern, A. L. 2000. Comparison of Papillomavirus and immunodeficiency virus evolutionary patterns in the context of a Papillomavirus vaccine. *J Clin Virol.* 19, 43–56.
- Harwood, C. A., Suretheran, T., McGregor, J. M., Spink, P. J., Leigh, I. M., Breuer, J. und Proby, C. M. 2000. Human Papillomavirus infection and non-melanoma skin cancer in immunosuppressed and immunocompetent individuals. *J Med Virol.* 61, 289–297.
- Howley, P. M. und Lowy, D. R. 2007. Papillomaviruses. In *Fields Virology*, 5. Edition. Knipe, D. M. & Howley, P. M. Philadelphia, PA: Lippincott, Williams, Wilkins (Editoren) 2299–2354.
- Huibregtse, J. M., Scheffner, M. und Howley, P. M. 1991. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human Papillomavirus types 16 or 18. *EMBO J.* 10, 4129–4135.
- Iftner, A., Klug, S. J., Garbe, C., Blum, A., Stancu, A., Wilczynski, S. P. und Iftner, T. 2003. The prevalence of human Papillomavirus genotypes in nonmelanoma skin cancers of nonimmunosuppressed individuals identifies high-risk genital types as possible risk factors. *Cancer Res.* 63, 7515–7519.
- Ilves, I., Kivi, S. und Ustav, M. 1999. Long-term episomal maintenance of bovine Papillomavirus type 1 plasmids is determined by attachment to host chromosomes, which is mediated by the viral E2 protein and its binding sites. *J Virol.* 73, 4404–4412.
- Iwasaki, T., Maeda, H., Kameyama, M., Moriyama, M., Kanai, S. und Kurata, T. 1997. Presence of a novel hamster oral Papillomavirus in dysplastic lesions of hamster lingual mucosa induced by application of dimethylbenzanthracene and excisional wounding: molecular cloning and complete nucleotide sequence. *J Gen Virol.* 78, 1087–1093.
- Jackson, A. 2005. The effect of paralogous lineages on the application of reconciliation analysis by cophylogeny mapping. *Syst Biol.* 54, 127–145.
- Joh, J., Jenson, A. B., King, W. W., Proctor, M. L., Ingle, A., Sundberg, J. P. und Ghim, S. J. 2010. Genomic analysis of the first laboratory mouse Papillomavirus (MusPV). *J Gen Virol.* (in Druck).
- Kabsch, K. und Alonso, A. 2002. The human Papillomavirus type 16 (HPV-16) E5 protein sensitizes human keratinocytes to apoptosis induced by osmotic stress. *Oncogene.* 21, 947–953.
- Kidney, B. A. und Berrocal, A. 2008. Sarcoids in two captive tapirs (*Tapirus bairdii*): clinical, pathological and molecular study. *Vet Dermatol.* 19, 380–384.

- Köhler, A., Forschner, T., Meyer, T., Ulrich, C., Gottschling, M., Stockfleth, E. und Nindl, I. 2007. Multifocal distribution of cutaneous human Papillomavirus types in hairs from different skin areas. *Br J Dermatol.* 156, 1078–1080.
- Lange, C. E., Tobler, K., Ackermann, M., Panakova, L., Thoday, K. L. und Favrot, C. 2009a. Three novel canine Papillomaviruses support taxonomic clade formation. *J Gen Virol.* 90, 2615–2621.
- Lange, C. E., Tobler, K., Markau, T., Alhaidari, Z., Bornand, V., Stockli, R., Trussel, M., Ackermann, M. und Favrot, C. 2009b. Sequence and classification of FdPV2, a Papillomavirus isolated from feline Bowenoid in situ carcinomas. *Vet Microbiol.* 137, 60–65.
- Lange, C. E., Tobler, K., Ackermann, M. und Favrot, C. 2010. Identification of two novel equine Papillomavirus sequences suggests three genera in one cluster. *Vet Microbiol.* (in Druck).
- Lechner, M. S. und Laimins, L. A. 1994. Inhibition of p53 DNA binding by human Papillomavirus E6 proteins. *J Virol.* 68, 4262–4273.
- Liu, D., Daubendiek, S. L., Zillman, M. A., Ryan, K. und Kool, E. T. 1996. Rolling circle DNA synthesis: small circular oligonucleotides as efficient templates for DNA polymerases. *J Am Chem Soc.* 118, 1587–1594.
- Lu, J. Z., Sun, Y. N., Rose, R. C., Bonnez, W. und McCance, D. J. 1993. Two E2 binding sites (E2BS) alone or one E2BS plus an A/T-rich region are minimal requirements for the replication of the human Papillomavirus type 11 origin. *J Virol.* 67, 7131–7139.
- Majewski, S. und Jablonska, S. 2006. Current views on the role of human Papillomaviruses in cutaneous oncogenesis. *Int J Dermatol.* 45, 192–196.
- Marchetti, B., Gault, E. A., Cortese, M. S., Yuan, Z., Ellis, S. A., Nasir, L. und Campo, M. S. 2009. Bovine Papillomavirus type 1 oncoprotein E5 inhibits equine MHC class I and interacts with equine MHC I heavy chain. *J Gen Virol.* 90, 2865–2870.
- McPhillips, M. G., Oliveira, J. G., Spindler, J. E., Mitra, R. und McBride, A. A. 2006. Brd4 is required for E2-mediated transcriptional activation but not genome partitioning of all Papillomaviruses. *J Virol.* 80, 9530–43.
- Mouse Genome Sequencing Consortium. 2002. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature.* 420, 520–562.
- Munday, J. S., Hanlon, E. M., Howe, L., Squires, R. A. und French, A. F. 2007. Feline cutaneous viral papilloma associated with human Papillomavirus type 9. *Vet Pathol.* 44, 924–927.
- Munday, J. S., Howe, L., French, A., Squires, R. A. und Sugiarto, H., 2009. Detection of papillomaviral DNA sequences in a feline oral squamous cell carcinoma. *Res Vet Sci.* 86, 359–361.
- Muñoz, N., Bosch, F. X., de Sanjosé, S., Herrero, R., Castellsagué, X., Shah, K. V., Snijders, P. J. und Meijer, C. J. 2003. Epidemiologic classification of human Papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 348, 518–527.
- Myers, G., Bernard, H. U. und Delius, H. 1994. Human Papillomaviruses 1994. A compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences, Los Alamos, NM, Los Alamos National Laboratory.

- Nafz, J., Köhler, A., Ohnesorge, M., Nindl, I., Stockfleth, E. und Rösl, F. 2007. Persistence of *Mastomys natalensis* Papillomavirus in multiple organs identifies novel targets for infection. *J Gen Virol.* 88, 2670–2678.
- Nafz, J., Schäfer, K., Chen, S. F., Bravo, I. G., Ibberson, M., Nindl, I., Stockfleth, E. und Rösl, F. 2008. A novel rodent Papillomavirus isolated from anogenital lesions in its natural host. *Virology.* 374, 186–197.
- Narechania, A., Chen, Z., DeSalle, R. und Burk, R. D. 2005. Phylogenetic incongruence among Onkogenic genital alpha human Papillomaviruses. *J Virol.* 79, 15503–15510.
- Nasir, L. und Campo, M. S. 2008. Bovine Papillomaviruses: their role in the aetiology of cutaneous tumours of bovids and equids. *Vet Dermatol.* 19, 243–54.
- Nasseri, M., Hirochika, R., Broker, T. R. und Chow, L. T. 1987. A human papilloma virus type 11 transcript encoding an E1-E4 protein. *Virology.* 159, 433–439.
- Nindl, I., Gottschling, M. und Stockfleth, E. 2007. Human Papillomaviruses and non-melanoma skin cancer: basic virology and clinical manifestations. *Dis Markers.* 23, 247–259.
- O'Banion, M. K., Reichmann, M. E. und Sundberg, J. P. 1988. Cloning and characterization of a Papillomavirus associated with papillomas and carcinomas in the european harvest mouse (*Micromys minutus*). *J Virol.* 62, 226–233.
- Oh, J. M., Kim, S. H., Cho, E. A., Song, Y. S., Kim, W. H. und Juhn, Y. S. 2010. Human Papillomavirus type 16 E5 protein inhibits hydrogen-peroxide-induced apoptosis by stimulating ubiquitin-proteasome-mediated degradation of Bax in human cervical cancer cells. *Carcinogenesis.* 31, 402–410.
- Orth, G. 2006. Genetics of epidermodysplasia verruciformis: Insights into host defense against Papillomaviruses. *Semin Immunol.* 18, 362–374.
- Ostrow, R. S., La Bresh, K. V. und Faras, A. J. 1991. Characterization of the complete RhPV1 genomic sequence und an integration locus from a metastatic tumor. *Virology.* 181, 424–429.
- Pfister, H., Fink, B. und Thomas, C. 1981. Extrachromosomal Bovine Papillomavirus type 1 DNA in hamster fibromas and fibrosarcomas. *Virology.* 115, 414–418.
- Rat Genome Sequencing Project Consortium. 2004. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature.* 428, 493–521.
- Rector, A., Tachezy, R., und Van Ranst, M. 2004. A Sequence-independent strategy for detection and cloning of circular DNA virus genomes by using multiply primed rolling-circle amplification *J Virol.* 78, 4993–4998
- Rector, A., Tachezy, R., Van Doorslaer, K., MacNamara, T., Burk, R. D., Sundberg, J. P. und Van Ranst, M. 2005a. Isolation and cloning of a Papillomavirus from a North American porcupine by using multiply primed rolling-circle amplification: the *Erethizon dorsatum* Papillomavirus type 1. *Virology.* 331, 449–456.
- Rector, A., Van, Doorslaer, K., Bertelsen, M., Barker, I. K., Olberg, R. A., Lemey, P., Sundberg, J. P. und Van Ranst, M. 2005b. Isolation and cloning of the raccoon (*Procyon lotor*) Papillomavirus type 1 by using degenerate Papillomavirus-specific primers. *J Gen Virol.* 86, 2029–2033.

- Rector, A., Lemey, P., Tachezy, R., Mostmans, S., Ghim, S. J., Van Doorslaer, K., Roelke, M., Bush, M., Montali, R. J., Joslin, J., Burk, R. D., Jenson, A. B., Sundberg, J. P., Shapiro, B. und Van Ranst, M. 2007. Ancient Papillomavirus-host co-speciation in Felidae. *Genome Biol.* 8(4), R57.
- Rector, A., Stevens, H., Lacave, G., Lemey, P., Mostmans, S., Salbany, A., Vos, M., Van Doorslaer, K., Ghim, S. J., Rehtanz, M., Bossart, G. D., Jenson, A. B. und Van Ranst, M. 2008. Genomic characterization of novel dolphin Papillomaviruses provides indications for recombination within the Papillomaviridae. *Virology* 378, 151–161.
- Rehtanz, M., Ghim, S. J., Rector, A., Van Ranst, M., Fair, P. A., Bossart, G. D. und Jenson, A. B. 2006. Isolation and characterization of the first American bottlenose dolphin Papillomavirus: *Tursiops truncatus* Papillomavirus type 2. *J Gen Virol.* 87, 3559–3565.
- Rehtanz, M., Ghim, S. J., McFee, W., Doescher, B., Lacave, G., Fair, P. A., Reif, J. S., Bossart, G. D. und Jenson, A. B. 2010. Papillomavirus antibody prevalence in freeranging and captive bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *J Wildlife Dis.* 46, 136–145.
- Roberts, S., Ashmole, I., Johnson, G. D., Kreider, J. W. und Gallimore, P. H. 1993. Cutaneous and mucosal human Papillomavirus E4 proteins form intermediate filament-like structures in epithelial cells. *Virology.* 197, 176–187.
- Rodriguez, A., Gates, L., Payne, H. R., Kiupel, M. und Mansell, J. 2010. Multicentric squamous cell carcinoma in situ associated with Papillomavirus in a ferret. *Vet Pathol.* 47, 964–968.
- Rowe, K. C, Reno M. L., Richmond, D. M., Adkins, R. M. und Steppan S. J. 2008. Pliocene colonization and adaptive radiations in Australia and New Guinea (Sahul): Multilocus systematics of the old endemic rodents (Muroidea: Murinae). *Mol Phyl Evol.* 47, 84–101.
- Schiffman, M., Herrero, R., Desalle, R., Hildesheim, A., Wacholder, S., Rodriguez, A. C., Bratti, M. C., Sherman, M. E., Morales, J., Guillen, D., Alfaro, M., Hutchinson, M., Wright, T. C., Solomon, D., Chen, Z., Schussler, J., Castle, P. E. und Burk, R. D. 2005. The carcinogenicity of human Papillomavirus types reflects viral evolution. *Virology.* 337, 76–84.
- Schulz, E., Gottschling, M., Bravo, I. G., Wittstatt, U., Stockfleth E. und Nindl, I. 2009a. Genomic characterization of the first insectivoran Papillomavirus reveals an unusually long, second non-coding region and indicates a close relationship to *BetaPapillomavirus*. *J Gen Virol.* 90, 626–633.
- Schulz, E., Gottschling, M., Wibbelt, G., Stockfleth E. und Nindl, I. 2009b. Isolation and genomic characterization of the first Norway rat (*Rattus norvegicus*) Papillomavirus and its phylogenetic position within *PiPapillomavirus*, primarily infecting rodents. *J Gen Virol.* 90, 2609–2914.
- Schweiger, M. R., You, J. und Howley, P. M. 2006. Bromodomain protein 4 mediates the Papillomavirus E2 transcriptional activation function. *J Virol.* 80, 4276–4285.
- Shah, S. D., Doorbar, J. und Goldstein, R. A. 2010. Analysis of host-parasite incongruence in Papillomavirus evolution using importance sampling. *Mol Biol Evol.* 27, 1301–1314.
- Silvestre, O., Borzacchiello, G., Nava, D., Iovane, G., Russo, V., Vecchio, D., D’ausilio, F., Gault, E. A., Campo, M. S. und Paciello, O. 2009. Bovine Papillomavirus type 1 DNA and E5 oncoprotein expression in water buffalo fibropapillomas. *Vet Pathol.* 46, 636–641.

- Stevens, H., Rector, A., Bertelsen, M. F., Leifsson, P. S. und Van Ranst, M. 2008a. Novel Papillomavirus isolated from the oral mucosa of a polar bear does not cluster with other Papillomaviruses of carnivores. *Vet Microbiol.* 129, 108–116.
- Stevens, H., Rector, A., Van der Kroght, K. und Van Ranst, M. 2008b. Isolation and cloning of two variant Papillomaviruses from domestic pigs: *Sus scrofa* Papillomaviruses type 1 variants a and b. *J Gen Virol.* 89, 2475–2481.
- Sundberg, J. P., Van Ranst, M., Burk, R. D., Jenson, A. B., von Krogh, G., und Gross, G. 1996. The nonhuman (animal) Papillomaviruses: host range, epitope conservation, and molecular diversity. In *Human Papillomavirus infections in dermatology and venereology*, Boca Raton, FL: CRC Press pp 44–68.
- Tachezy, R., Duson, G., Rector, A., Jenson, A. B., Sundberg, J. P. und Van Ranst, M. 2002a. Cloning and genomic characterization of *Felis domesticus* Papillomavirus type 1. *Virology* 301, 313–321.
- Tachezy, R., Rector, A., Havelkova, M., Wollants, E., Fiten, P., Opdenakker, G., Jenson, B., Sundberg, J. und Van Ranst, M. 2002b. Avian Papillomaviruses: the parrot *Psittacus erithacus* Papillomavirus (PePV) genome has a unique organization of the early protein region and is phylogenetically related to the chaffinch Papillomavirus. *BMC Microbiol.* 2, 19–27.
- Teifke, J. P., Kidney, B. A., Löhr, C. V. and Yager, J. A. 2003. Detection of Papillomavirus-DNA in mesenchymal tumour cells and not in the hyperplastic epithelium of feline sarcoids. *Vet Dermatol.* 14, 47–56.
- Terai, M. und Burk, R. D. 2002. *Felis domesticus* Papillomavirus, isolated from a skin lesion, is related to canine oral Papillomavirus and contains a 1.3 kb non-coding region between the E2 and L2 open reading frames. *J Gen Virol.* 83, 2303–2307.
- Thomas, M., Narayan, N., Pim, D., Tomaić, V., Massimi, P., Nagasaka, K., Kranjec, C., Gammoh, N. und Banks, L. 2008. Human Papillomaviruses, cervical cancer and cell polarity. *Oncogene.* 27, 7018–7030.
- Thierry, F. 2009. Transcriptional regulation of the Papillomavirus oncogenes by cellular and viral transcription factors in cervical carcinoma. *Virology.* 384, 375–379
- Tobler, K., Favrot, C., Nespeca, G. und Ackermann, M. 2006. Detection of the prototype of a potential novel genus in the family *Papillomaviridae* in association with canine epidermodysplasia verruciformis. *J Gen Virol.* 87, 3551–3557.
- Tobler, K., Lange, C., Carlotti, D. N., Ackermann, M. und Favrot, C. 2008. Detection of a novel Papillomavirus in pigmented plaques of four pugs. *Vet. Dermatol.* 19, 21–25.
- Tomaić, V., Gardiol, D., Massimi, P., Ozbun, M., Myers, M. und Banks, L. 2009. Human and primate tumour viruses use PDZ binding as an evolutionarily conserved mechanism of targeting cell polarity regulators. *Oncogene.* 28, 1–8.
- Van Bresse, M.- F., Van Waerebeek, K., Piérard, G. E. und Desaintes, C. 1996. Genital and lingual warts in small cetaceans from coastal Peru. *Dis Aquat Org.* 26, 1–10.
- Van Bresse, M.- F., Cassonnet, P., Rector, A., Desaintes, C., Van Waerebeek, K., Alfaro-Shigueto, J., Van Ranst, M. und Orth, G. 2007. Genital warts in Burmeister's porpoises: characterization of *Phocoena spinipinnis* Papillomavirus type 1 (PsPV-1) and evidence for a second, distantly related PsPV. *J Gen Virol.* 88, 1928–1933.

- Van Doorslaer, K., Rector, A., Jenson, A. B., Sundberg, J. P., Van Ranst, M. und Ghim, S. J. 2007. Complete genomic characterization of a murine Papillomavirus isolated from papillomatous lesions of a European harvest mouse (*Micromys minutus*). J Gen Virol. 88, 1484–1488.
- Van Ranst, M., Kaplan, J. B., Sundberg, J. P., Burk, R. D., Gibbs, A., Calisher, C. H. und García-Arena, I. F. 1995. Molecular evolution of the human Papillomaviruses. In: Gibbs, A. J., Calisher, C. H., García-Arena, I. F. (Editoren). Molecular basis of virus evolution. Cambridge: Cambridge University Press. 455–476.
- Varsani, A., van der Walt, E., Heath, L., Rybicki, E. P., Williamson, A. L. und Martin, D. P. 2006. Evidence of ancient Papillomavirus recombination. J Gen Virol. 87, 2527–2531.
- Wettstein, F. O., Barbosa, M. S. und Nasser, M. 1987. Identification of the major cottontail rabbit Papillomavirus late RNA cap site and mapping and quantitation of an E2 and minor E6 coding mRNA in papillomas and carcinomas. Virology. 159, 321–328.
- Wilson, D. E. und Reeder, D. A. M. (Editoren). 2005. Mammal species of the world. A taxonomic and geographic reference (3. Edition), Johns Hopkins University Press. 2, 142 pp.
- Wilson, R., Ryan, G. B., Knight, G. L., Laimins, L. A., und Roberts, S. 2007. The full-length E1^{E4} protein of human Papillomavirus type 18 modulates differentiation-dependent viral DNA amplification and late gene expression. Virology. 362, 453–460.
- Wood, C. E., Chen, Z., Cline, J. M., Miller, B. E. und Burk R. D. 2007. Characterization and experimental transmission of an oncogenic Papillomavirus in female macaques. J Virol. 81, 6339–6345.
- Woolford, L., Rector, A., Van Ranst, M., Ducki, A., Bennett, M. D., Nicholls, P. K., Warren, K. S., Swan, R. A., Wilcox, G. E. und O'Hara, A. J. 2007. A novel virus detected in papillomas and carcinomas of the endangered western barred bandicoot (*Perameles bougainville*) exhibits genomic features of both the Papillomaviridae and Polyomaviridae. J Virol. 81, 13280–13290.
- Yaegashi, N., Jenison, S. A., Valentine, J. M., Dunn, M., Taichman, L. B., Baker, D. A. und Galloway, D. A. 1991 Characterization of murine polyclonal antisera and monoclonal antibodies generated against intact and denatured human Papillomavirus type 1 virions. J Virol. 65, 1578–1583
- Yuan, H., Ghim, S., Newsome, J., Apolinario, T., Olcese, V., Martin, M., Delius, H., Felsburg, P., Jenson, B. und Schlegel, R. 2007. An epidermotropic canine Papillomavirus with malignant potential contains an E5 gene and establishes a unique genus. Virology. 359, 28–36.
- Zhao, K. N., Hengst, K., Liu, W. J., Liu, Y. H., Liu, X. S., McMillan, N. A. und Frazer, I. H. 2000. BPV1 E2 protein enhances packaging of full-length plasmid DNA in BPV1 pseudovirions. Virology. 272, 382–393.
- zur Hausen, H. 1996. Papillomavirus infections- a major cause of human cancers. Biochim Biophys Acta. 1288, 55–78.
- zur Hausen, H. 2002. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. Nat Rev Cancer. 2, 342–35

8 Anhang

8.1 Danksagung

Mein Dank gilt allen Personen, die am Zustandekommen dieser Arbeit beteiligt waren:

PD Dr. Ingo Nindl danke ich für seine wissenschaftliche Betreuung, für das in mich gesetzte Vertrauen und die Bereitschaft, mich an diesem interessanten Thema arbeiten zu lassen, sowie für die Freiheiten, die mir im Labor zur Verfügung standen.

Prof. Dr. Rupert Mutzel danke ich für die Begutachtung meiner Arbeit.

PD Dr. Marc Gottschling danke ich für die Initialisierung dieses spannenden Projekts, für die anregenden Diskussionen über die PV-Evolution sowie das kritische Lesen und die wertvollen Hinweise zum Manuskript.

Dr. Anja Köhler danke ich für die schonungslosen Ansprachen, ihre wertvollen Anleitungen im Labor und besonders für das kritische Lesen des Manuskriptes.

PD Dr. Ansgar Lukowski danke ich für den unkomplizierten Zugang zum automatischen Kapillarsequenzierer und für die Anleitung an diesem Gerät.

MTA Mandy D. Lehman danke ich für die hervorragende Organisation unseres Labors, ihren erfrischenden Humor und das angenehme Arbeitsklima.

Ich danke Dr. Dania Richter, Dr. Paul Jepson, Dr. Rob Deaville, Rainer Ulrich, Dr. Gudrun Wibbelt, Philipp Olias, Dr. Kai Schäfer, Dr. Ignazio Bravo, Dr. Frank Siebenhaar und Dr. Chantip Dang-Heine und Dr. Ursula Siebert für die Bereitstellung der Tierproben.

Ich danke Prof. Dr. Stockfleth, der den fließenden Übergang vom Charité-Stipendium zum ESCF-Stipendium überhaupt ermöglichte.

Ein besonderer Dank geht an meine Familie und Katharina, die mich stets in meinem Handeln bestärkt und uneingeschränkt unterstützt haben.

8.2 Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten wurden aus Gründen des Datenschutzes entfernt

Ausbildung:

seit 02/2008	Dissertation an der Freien Universität Berlin im Fach Biologie Thema: „Isolierung und Charakterisierung neuer Papillomviren“ in der Forschungsgruppe ‚Tumorvirologie‘ (AG Nindl) (HTTC, Klinik für Dermatologie, Charité, Berlin)
03/2007–11/2007	Diplomarbeit Thema: Isolierung und Charakterisierung neuer Papillomviren in der Forschungsgruppe ‚Tumorvirologie‘ (AG Nindl) (HTTC, Klinik für Dermatologie, Charité, Berlin)
09/2005–11/2005	Außeruniversitäres Forschungspraktikum, Antibody Engineering, in der Antiangiogenese-Forschung (Schering AG, Berlin)
06/2004–08/2004	Außeruniversitäres Forschungspraktikum, Isolierung unbekannter HTLV, im ZBS1 (Robert Koch Institut, Berlin)
10/2001–11/2007	Studium der Biologie an der Freien Universität Berlin
10/2000–06/2001	Grundwehrdienst als Sanitätssoldat im 1. Stabsfernmelde- batallion 801 in Neubrandenburg
08/1992–06/2000	Juliot-Curie-Gymnasium, Neubrandenburg, Abitur 2000

8.3 Stipendien

02/2008–01/2009	Charité-Promotionsstipendium
02/2009–01/2010	Charité-Promotionsstipendium
02/2010–01/2011	Promotionsstipendium der European Skin Cancer Foundation

8.4 Veröffentlichungen

Schulz, E., Gottschling, M., Bravo, I. G., Wittstatt, U., Stockfleth, E. und Nindl, I. 2009a. Genomic characterization of the first insectivoran Papillomavirus reveals an unusually long, second non-coding region and indicates a close relationship to BetaPapillomavirus. *J Gen Virol.* 90, 626–633.

Schulz, E., Gottschling, M., Wibbelt, G., Stockfleth, E., und Nindl, I. 2009b. Isolation and genomic characterization of the first Norway rat (*Rattus norvegicus*) Papillomavirus and its phylogenetic position within PiPapillomavirus, primarily infecting rodents. *J Gen Virol.* 90, 2609–2614.

Gottschling, M., Bravo, I. G., Schulz, E., Bracho, M. A., Deaville, R., Jepson, P. D., Van Bresse M. F., Stockfleth, E. und Nindl, I. 2010. Modular organization of novel cetacean papillomviruses. *Mol Phylogenet Evol.* 59, 34-42

Köhler, A., Gottschling, M., Manning, K., Lehmann, M. D., Schulz, E., Krüger-Corcoran, D., Stockfleth, E. und Nindl, I. 2011. Genomic characterization of ten novel cutaneous human Papillomaviruses from persistent warts of immunosuppressed patients. *J Gen Virol.* 92, 1585-1894.

Schulz, E., Gottschling, M., Ulrich, R. G., Richter, D., Stockfleth E. und Nindl, I. 2011. Different phylogenetic positions of novel rodent Papillomaviruses suggest adaptive radiation as a mechanism of rodent PV diversification. (in Vorbereitung).

8.5 Tagungsbeiträge

Gottschling, M., Schulz, E., Bravo, I. G., Stamatakis, A., Wittstatt, U., Deaville, R., Stockfleth, E. und Nindl, I. 2007. Phylogenomics of Papillomaviruses and identification of novel types. 24th IPV Conference and Clinical Workshop, Peking (China). (Poster)

Schulz, E., Gottschling, M. und Nindl, I. 2008. Five novel cetacean Papillomavirus types and the different phylogenetic positions of *OmikronPapillomaviruses*. 5th International HPV and Skin Cancer Conference, Heidelberg (Deutschland) (Poster)

Gottschling, M., Schulz, E., Deaville, R., Stockfleth, E. und Nindl, I. 2008. Two novel cetacean Papillomavirus types and the different phylogenetic positions of OmikronPapillomavirus. 18th Annual Meeting of the Society of Virology (GfV), Heidelberg (Germany). (Vortrag)

Gottschling, M., Schulz, E., Bravo I. G., Deaville, R. und Nindl, I. 2009. Phylogenetic characterization of isolated novel chimeric cetacean Papillomaviruses. The 25th International Papillomavirus Conference, Malmö (Schweden). (Poster)

Gottschling, M., Schulz, E., Bravo, I. G., Deaville, R., Jepson P. D., Van Bresse M. F., Stockfleth, E. und Nindl, I. 2010. Novel cetacean Papillomaviruses exhibit both chimeric and non-recombinant genome organizations. The 26th International Papillomavirus Conference, Montreal (Kanada). (Poster)

8.6 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die hier vorgelegte Arbeit selbst verfasst und mich nur aus den angegebenen Quellen und Hilfen bedient habe. Die Dissertation wurde weder bereits als Prüfungsarbeit verwendet noch einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt. Ein Prüfungsverfahren ist an keiner anderen Stelle beantragt.

Berlin, Februar 2011

(Eric Schulz)