

Astrid Ruhland  
Dr. sc. hum.

## **Einfluß von ultraviolettem Licht auf die Promotoraktivität unterschiedlicher humaner Papillomavirustypen**

Geboren am 10.01.1973 in Köln  
Reifeprüfung am 27.06.1992 in Wesseling  
Studiengang der Fachrichtung Biologie vom WS 1992/1993 bis WS 1997/1998  
Vordiplom am 24.03.1995 an der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg  
Diplom am 07.10.1997 an der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg

Promotionsfach: Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)  
Doktorvater: Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. H. zur Hausen

Papillomaviren (PV) gehören zur Familie der Papillomaviridae und infizieren Basalzellen des Hautepithels oder Basalzellen der Schleimhäute im Anogenitaltrakt sowie im Oropharyngealtrakt. Sie werden mit gutartigen, prämaligen oder malignen Läsionen der Haut oder des Anogenitaltraktes assoziiert. Während der Mechanismus, wie die genitalen HPV-Typen die maligne Entwicklung im Anogenitaltrakt auslösen, bisher gut untersucht ist, ist nichts bekannt über den Mechanismus, wie und ob die kutanen HPVs die Karzinogenese des Nicht-Melanom-Hautkrebs (NMSC) beeinflussen können. Dies sollte daher Gegenstand der vorliegenden Arbeit sein. Da in den einzelnen NMSC-Läsionen sehr unterschiedliche kutane HPV-Typen detektiert werden, wurden insgesamt 11 unterschiedliche kutane HPV-Typen untersucht, die jeweils mit unterschiedlichen Arten von Läsionen assoziiert sind.

Bisher ist bekannt, daß ultraviolette Bestrahlung der Haut an der Entwicklung zum NMSC beteiligt ist. UV-Licht besitzt sehr unterschiedliche Effekte auf die Hautzellen. Es können z.B. die in den NMSCs detektierten Mutationen im Tumorsuppressorgen *p53* entstehen. Außerdem werden durch UV-Licht in den Hautzellen pro-inflammatorische Zytokine und die Signaltransduktionskaskade der MAP-Kinasen aktiviert, die wiederum den Transkriptionsfaktor AP-1 induzieren können. Dieser Transkriptionsfaktor und *p53* könnten die Transkription der kutanen HPV-Typen nach UV-Bestrahlung aktivieren. In der vorliegenden Studie sollte daher untersucht werden, ob die Regulationsregionen (URR) der 11 unterschiedlichen kutanen HPV-Typen durch UV-Licht und die daraus resultierende Aktivierung von Zytokinen, MAP-Kinasen, AP-1 und *p53* tatsächlich beeinflusst werden können. Dazu wurden die URR-Regionen von HPV 1, 2, 3, 5, 7, 20, 23, 27, 38, 41 und 77 vor ein Reportergen (CAT) in den pBLCAT5-Vektor kloniert und in die Keratinozytenzelllinie HaCaT transfiziert. Dabei zeigte sich, daß die Promotorregionen der unterschiedlichen HPVs unterschiedlich auf UV-Licht und pro-inflammatorische Zytokine (IL-1, IL-6, IL-17, TNF- $\alpha$ , Interferone) reagieren. HPV 2, 3, 27, 38 und 77 werden durch UV-Licht und HPV 27 auch durch die Zytokine inhibiert, während HPV 1, 5, 7, 20 und 23 durch UV-Licht und HPV 20 auch durch die Zytokine aktiviert werden. Die Zytokine IL-1, IL-6, IL-17 und TNF- $\alpha$  aktivieren bzw. inhibieren erst 24h nach ihrer Zugabe die URRs von HPV 20 bzw. 27. Die Interferone- $\alpha$ , - $\beta$  oder - $\gamma$  dagegen aktivieren die URR von HPV 20 in den ersten drei Stunden nach ihrer Zugabe und inhibieren die URR von HPV 27 ebenso früh. Durch die Inhibierung des IL-1-Signaltransduktionswegs in den HaCaT-Zellen durch IL-1Ra (Rezeptor-Antagonist) konnte ein direkter Nachweis erbracht werden, daß dieser 36 bzw. 48h nach der UV-Bestrahlung am UV-Effekt beteiligt ist.

In der vorliegenden Studie konnte weiterhin gezeigt werden, daß die MAP-Kinasen JNK und ERK und der Transkriptionsfaktor AP-1 durch UV-Licht aktiviert werden. Durch diese

Aktivierung wird 15 min nach der UV-Bestrahlung die Regulationsregion von HPV 20 und 27 aktiviert, denn Inhibitoren dieser Faktoren heben die Aktivierung der URR von HPV 20 und 27 15 min nach UV-Bestrahlung auf.

Neben den Zytokinen, den MAP-Kinasen und AP-1 spielt auch das Tumorsuppressorprotein p53 bei der Inhibierung bzw. Aktivierung der URRs nach UV-Bestrahlung eine entscheidende Rolle. Untersuchungen mit Zelllinien, die einen unterschiedlichen p53-Status hatten, zeigten, daß in den Zelllinien mit Wildtyp-p53 (RKO) oder mutiertem p53 (HaCaT) der UV-Effekt gleich ist, während man den gegenteiligen Effekt in der Zelllinie erzielt, die kein p53 besitzt (H1299). Das Tumorsuppressorprotein hat außerdem zusammen mit den HPV-Promotoren einen Einfluß auf die JNK-Aktivierung, die wiederum Auswirkungen auf die Expression der AP-1-Komponenten hat, da c-Fos nur in der H1299-Zelllinie in meßbaren Mengen exprimiert wird.

Die Ergebnisse aus dieser Studie geben keinen Aufschluß darüber, warum manche HPV-Typen durch UV-Licht aktiviert und andere inhibiert werden. Sie zeigen vielmehr, daß UV-Licht nicht direkt auf die Regulationsregionen der kutanen HPV-Typen wirkt, sondern daß an dem Effekt unterschiedliche zelluläre Signaltransduktionswege (Zytokine, MAP-Kinasen) beteiligt sind. In weiteren Studien soll getestet werden, ob die Aktivierung bzw. Inhibierung der URRs von HPV 20 bzw. 27 durch die Interferone über den JAK/STAT-Signaltransduktionsweg stattfinden könnte, da in den URRs von beiden Typen potentielle STAT-Bindestellen durch Computeranalyse ermittelt wurden. Ferner soll untersucht werden, ob die Ausschüttung von freien Radikalen, die in den URR-transfizierten Zellen um 70% gegenüber den untransfizierten Zellen erhöht ist, einen Einfluß auf die Aktivierung der Zytokine oder der MAP-Kinasen durch UV-Bestrahlung in den URR-transfizierten Zellen besitzt.