

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>4</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>5</b>
<b>1.1 Papillomviren (PV)</b>	<b>5</b>
1.1.1 Klassifizierung und Genomaufbau	5
1.1.2 Replikation der Papillomviren	6
1.1.3 Virusproteine der Papillomviren	6
1.1.4 Humane Papillomviren (HPV)	8
1.1.4.1 Kutane HPV-Typen und ihre Rolle in der Entstehung von Hautkrebs	8
1.1.4.2 Mukosotrope/anogenitale HPV-Typen und ihre Rolle in der Krebsentstehung	9
1.1.5 Tierpathogene Papillomviren	10
1.1.5.1 Shope's Kaninchenvirus (Cotton tail rabbit Papillomvirus, CRPV)	10
1.1.5.2 Bovines Papillomvirus (BPV)	10
1.1.5.3 <i>Mastomys natalensis</i> Papillomvirus (MnPV)	11
<b>1.2 Das Mehrstufenmodell der Karzinogenese</b>	<b>12</b>
<b>1.3 Das Onkoprotein E6</b>	<b>14</b>
<b>1.4 Das Onkoprotein E7</b>	<b>16</b>
<b>1.5 Transgene Tiermodelle für Gene der Papillomviren</b>	<b>17</b>
<b>1.6 Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>19</b>
<b>2 Ergebnisse</b>	<b>20</b>
<b>Teil I:</b>	<b>20</b>
<b>2.1 Das <i>Mastomys natalensis</i> Papillomvirus E6-Protein (MnPV-E6) und seine Rolle in der Tumorentstehung der Haut transgener Mäuse</b>	<b>20</b>
2.1.1 Erhaltung und Weiterzucht der MnPV-E6-transgenen Mauslinien	21
2.1.1.1 Darstellung der Transgen-Expression in der Haut adulter Mäuse	23
2.1.1.2 Transgen-Expression in primären Keratinozyten der MnPV-E6-transgenen Linien	24
2.1.1.3 Nachweis der MnPV-E6 mRNA mit Hilfe primärer Keratinozyten	27
2.1.2 Auf der Suche nach dem Phänotyp!	28
2.1.2.1 Histologische Analysen der MnPV-E6-transgenen Linien	29
2.1.3 Das Mehrstufenmodell der Karzinogenese	31
2.1.3.1 Planung der Mehrstufenkarzinogenese	31
2.1.3.1.1 Fallzahlüberlegungen:	32
2.1.3.1.2 Vorbereitungen zum Erhalt der Tierzahlen	33
2.1.3.2 Klassifizierung der Hauttumoren	34
2.1.3.3 Auswertung der Mehrstufenkarzinogenese	37
2.1.4 Lokalisation der Transgen-Expression in Keratoakanthomen	43
2.1.5 Charakterisierung der Epithelien durch molekulare Marker	44
2.1.6 Untersuchung der Hauttumoren auf Mutationen im H-ras-Gen	46
2.1.7 Einfluß des kutanen MnPV-E6-Proteins auf die Stabilität des Tumorsuppressorproteins p53	47
<b>Teil II:</b>	<b>49</b>
<b>2.2 Etablierung und Untersuchung von induzierbaren <i>Mastomys natalensis</i> Papillomvirus-E7-transgenen Mauslinien (MnPV-E7)</b>	<b>49</b>
2.2.1 Erhalt und Weiterzucht der MnPV-E7-transgenen Mäuse	50
2.2.2 Überprüfung der durch Cre-bedingten Rekombination in MnPV-E7-transgenen Mauslinien	51
2.2.3 Etablierung und Weiterzucht der Cre-Rekombinase-transgenen Mauslinien	52
2.2.4 Analyse der Cre-Rekombinase-Expression in der Haut transgener Mäuse	54
2.2.5 Analyse der Lokalisation der Cre-Rekombinaseaktivität in Cre-Rekombinase –transgenen Mäusen	55
2.2.6 Erstellung E7/Cre-transgener Mauslinien	57

2.2.7	Nachweis der MnPV-E7- mRNA aus der Haut E7/Cre-transgener Mäuse	57
2.2.8	Histologische Analyse von E7/Cre-transgenen Mäusen	59
<b>3</b>	<b>Diskussion</b>	<b>60</b>
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>68</b>
<b>5</b>	<b>Material</b>	<b>69</b>
<b>5.1</b>	<b>Chemikalien und Reagenzien</b>	<b>69</b>
5.1.1	Reagenzien und Medien der Zellkultur	71
5.1.2	Reagenzien und Medien der Bakterienkultur	72
<b>5.2</b>	<b>Puffer und Lösungen</b>	<b>72</b>
<b>5.3</b>	<b>Gelkomponenten</b>	<b>74</b>
<b>5.4</b>	<b>Enzyme</b>	<b>75</b>
<b>5.5</b>	<b>Größenstandarts</b>	<b>75</b>
<b>5.6</b>	<b>Oligonukleotide</b>	<b>75</b>
<b>5.7</b>	<b>Antikörper</b>	<b>76</b>
5.7.1	Primärantikörper	76
5.7.2	Sekundärantikörper	76
<b>5.8</b>	<b>Verwendete Plasmide</b>	<b>77</b>
<b>5.9</b>	<b>Konstrukte und transgene Mauslinien</b>	<b>77</b>
5.9.1	Konstrukt zur Erstellung MnPV-E6-transgener Mäuse	77
5.9.2	Konstrukt zur Erstellung induzierbarer MnPV-E7-transgener Mäuse	79
5.9.3	Konstrukt zur Erstellung Cre-Rekombinase-transgener Mäuse	80
5.9.4	Enhanced green fluorescence protein (eGFP)-Reporter-Maus zur Detektion der Cre-Rekombinase-Aktivität	81
<b>6</b>	<b>Methoden</b>	<b>82</b>
<b>6.1</b>	<b>Zellkulturtechniken</b>	<b>82</b>
6.1.1	Inkulturnahme eukaryontischer Zellen	82
6.1.2	Kultivierung eukaryontischer Zellen	82
6.1.3	Kryokonservierung eukaryontischer Zellen	82
<b>6.2</b>	<b>Herstellung primärer Keratinozyten</b>	<b>83</b>
<b>6.3</b>	<b>Zellkultur aus Tumormaterial</b>	<b>83</b>
<b>6.4</b>	<b>Reduzierung des Calciumgehaltes aus fötalem Kälberserum (FCS)</b>	<b>84</b>
<b>6.5</b>	<b>Collagen/Fibronectinbeschichtung von Kulturbehältnissen</b>	<b>84</b>
<b>6.6</b>	<b>Liposomen-vermittelte Transfektion eukaryontischer Zellen</b>	<b>85</b>
<b>6.7</b>	<b>Detektion der <math>\beta</math>-Galaktosidaseaktivität</b>	<b>85</b>
<b>6.8</b>	<b>Histologische Diagnoseverfahren</b>	<b>85</b>
6.8.1	Herstellung von Paraffinschnitten	85
6.8.2	Herstellung von Kryostatschnitten	86
6.8.3	Hämalaun/Eosin-Färbung	86
6.8.4	Nachweis der $\beta$ -Galaktosidase	87
<b>6.9</b>	<b>Immunohistochemie (IHC)</b>	<b>87</b>
6.9.1	Immunohistochemische Reaktion nach der ABC-Methode	87
6.9.2	Indirekte Immunfluoreszenz	89
<b>6.10</b>	<b>Methoden zur Analyse von Nukleinsäuren</b>	<b>90</b>
6.10.1	Transformation von <i>Escherichia coli</i> ( <i>E.coli</i> ) DH5 $\alpha$ -kompetenten Zellen	90

6.10.2	Minipräparation von Plasmid-DNA	90
6.10.3	Isolierung von Plasmid-DNA mit Hilfe des Qiagen Maxi-prep-Kits	91
6.10.4	Restriktionsspaltung von DNA	91
6.10.5	Vermessung von Nukleinsäuren	92
6.10.6	DNA-Elektrophorese in Agarose-Horizontalgelen	92
6.10.7	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	93
6.10.8	DNA-Isolierung aus Gewebebiopsien	93
6.10.9	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	93
<b>6.11</b>	<b>Isolierung von RNA</b>	<b>95</b>
6.11.1	RNA-Isolierung aus Mausepidermis	95
6.11.2	RNA-Isolierung aus primären Kerationozyten der Maus	96
6.11.2.1	DNase-Verdau von RNA	96
6.11.2.2	Reverse Transkription von RNA (RT-Reaktion)	97
<b>6.12</b>	<b>Analyse von Proteinen</b>	<b>97</b>
6.12.1	Proteinbestimmung nach Bradford	97
6.12.2	Diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	98
6.12.2.1	Präparation des SDS-Polyacrylamid-Gels	99
6.12.2.2	Vorbereitung der Proteinproben	99
6.12.3	Western-blot und Immunnachweis mittels Enhanced chemoluminescence (ECL)	100
<b>6.13</b>	<b>Mehrstufenkarzinogenese mit <i>Mastomys natalensis</i> Papillomvirus-E6-transgenen Mäusen (MnPV-E6)</b>	<b>101</b>
<b>6.14</b>	<b>Überprüfung der Rekombination der induzierbaren MnPV-E7-transgenen Mauslinie in Zellkultur</b>	<b>103</b>
<b>6.15</b>	<b>Test zur Überprüfung der Cre-Rekombinaseaktivität mit Hilfe einer eGFP-Reporter-Maus</b>	<b>103</b>
<b>6.16</b>	<b>Tamoxifenbehandlung der E7/Cre- transgenen Mäuse</b>	<b>104</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung</b>	<b>105</b>
<b>8</b>	<b>Literatur</b>	<b>107</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
β-gal	β-Galaktosidase
Bp	Basenpaare
BPV	Bovines Papillomvirus
CR1, CR2, CR3	Conserved regions 1, 2, 3
CRPV	Cotton tail rabbit Papillomvirus
DAPI	4.6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethyl-pyrocarbonat
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMBA	Dimethylbenz(a)anthracen
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxiribonukleinsäure
E.coli	Escherichia coli
E6AP	E6-assoziiertes Protein
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylen-diamin-tetraacetat
EMCV	Encephalomyocarditis Virus
EV	Epidermodysplasia verruciformis
HPV	Humanes Papillomvirus
IRES	Internal ribosome entry site
K-14	humaner Cytokeratin-14-Promotor
kb	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilo-Dalton
LB	Lauria-Bertani
M	Mol
mA	Mili-Ampere
min	Minute
MnPV	Mastomys natalensis Papillomvirus
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	messenger-RNA
OD	optische Dichte
ORF	Offenes Leseraster
PBS	Phosphate Bufferd Saline
PCR	Polymerase Chain Reaktion
Rb	Retinoblastom
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse-Transkriptase
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamis-Gelelektrophorese
sek	Sekunde
Tab.	Tabelle
TPA	12-0-Tetradecanoylphorbol-13-acetat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween-20	Polyoxyethylen-(20)-sorbitan monolaurat
Upm	Umdrehungen pro Minute
Vol	Volumen
z.B.	zum Beispiel

---

# 1 Einleitung

## 1.1 Papillomviren (PV)

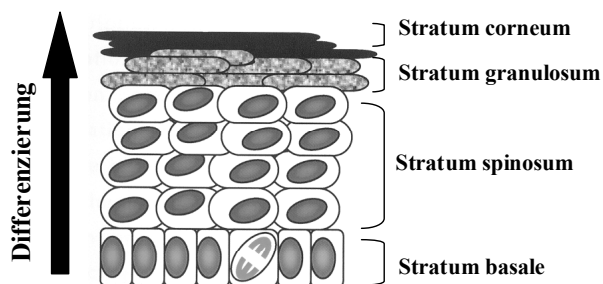
### 1.1.1 Klassifizierung und Genomaufbau

Die Papillomviren repräsentieren eine sehr heterogene Virusgruppe. Sie infizieren viele Säugetier-, Vogel- und Amphibienspezies (O'Banion, 1987), sind aber strikt wirts- und gewebsspezifisch (Rowson und Mahy, 1967). Die human- und tierpathogenen Papillomviren bildeten früher zusammen mit den Polyomaviren die Familie der Papovaviren. Der Name Papovaviren leitet sich ab aus *Papillomviren*, *Polyomaviren* und *vakuolisierenden Viren*. Inzwischen bilden die Papillomviren eine eigene Virusfamilie, die Papillomaviridae (Van Regenmortel, 2001). Die HPV-Typisierung erfolgt anhand des Genoms. Die Genomorganisation ist bei allen Papillomviren ähnlich. Direkte Sequenzvergleiche der Leseraster von L1- und E6-Genen sowie der URR (upstream regulatory region) definieren einen neuen Papillomvirus-Typ, wenn die Sequenzen weniger als 90 % Homologie zu bekannten Typen aufweisen. Beträgt die Homologie zwischen 90-98 % handelt es sich um einen Subtyp, bei einer Homologie von über 98 % wird das Virus als Variante eines bekannten Subtyps bezeichnet (Tyring, 2000).

Die Papillomviren besitzen ein ikosaedrisches Kapsid von 55 nm Durchmesser, welches aus 72 Kapsomeren besteht, die aus den viralen Strukturproteinen L1 (ca. 80 % des Gesamtproteins der Partikel) und L2 aufgebaut werden. Das Kapsid besitzt keine umgebende Membran (Klug und Finch, 1965). Im Innern des Kapsids liegt das doppelsträngige, zirkulär geschlossene DNA-Genom der Papillomviren von ca. 8 kb, mit zellulären Histonen assoziiert, als Superhelix vor (Favre et al., 1977; Pfister et al., 1978; Rösl et al., 1983). Zwischen den codierenden Bereichen liegt die als URR bzw. LCR (long control region) bezeichnete Region von ca. 1 kb Länge, in der sich die regulatorischen Elemente für die Transkription und die Replikation befinden (Waldeck et al., 1984; Swith et al., 1987; Romanczuk et al., 1990; Del Vecchio et al., 1992).

### 1.1.2 Replikation der Papillomviren

Der produktive Infektionszyklus der Papillomviren ist eng an den Differenzierungsstatus des epithelialen Gewebes gebunden (siehe Abb.1.1). Eine Infektion erfolgt, indem das Virus über Verletzungen des Stratum corneum in die Epidermis eindringt und die undifferenzierten Zellen des Stratum basale infiziert. Dort etabliert sich das Virusgenom extrachromosomal im Nukleus mit ca. 50-100 Kopien pro Zelle (Dürst et al., 1985) und die frühen viralen Gene E1 bis E7 werden transkribiert. Bei der Teilung der Basalzellen im Stratum basale wird die virale DNA auf die beiden Tochterzellen verteilt. Eine der beiden Tochterzellen wird normalerweise keine weitere Mitose durchlaufen und vom Stratum basale in das Stratum spinosum wandern, da dort die Differenzierung der Keratinozyten beginnt. Die zweite Tochterzelle verbleibt im Stratum basale. Somit können aus den unteren undifferenzierten Hautschichten immer wieder Zellen nachgeliefert werden, die das virale Genom im Multikopiestatus erhalten. Auf diese Art kann eine persistierende Form der Papillomvirusinfektion etabliert werden. Mit erfolgter Ausdifferenzierung der Zelle im Stratum spinosum beginnt im Stratum granulosum die verstärkte Replikation des Virusgenoms, die Synthese der viralen Kapsidproteine L1 und L2 sowie die Zusammenlagerung des Viruskapsids (Stubenrauch et al., 1999). Die Virionen werden von sich ablösenden Zellen des Stratum corneum freigesetzt (Stoler et al., 1989; Schneider und Koutsky, 1992).



**Abb. 1.1 Differenzierungsstadien des Epithels**

Dargestellt ist ein Querschnitt der Epidermis. Der Differenzierungsgrad nimmt entlang des Pfeils zu.

### 1.1.3 Virusproteine der Papillomviren

Das zirkuläre Genom wird in eine frühe und eine späte codierende Region eingeteilt. Die frühe Region enthält mehrere offene Leseraster (ORF) und codiert die frühen Proteine E1 bis E7, der späte Genombereich codiert die beiden Strukturproteine L1 und L2.

---

Nach der Infektion werden zunächst die Proteine E1 und E2 exprimiert, die hauptsächlich beim produktiven Infektionszyklus benötigt werden (Dürst et al., 1985).

**E1** ist ein Phosphoprotein von 70-80 kDa, das für die Initiation der Replikation erforderlich ist und eine Helikase- als auch ATPase-Aktivität besitzt (DelVecchio et al., 1992; Chiang et al., 1992). E1 bindet zunächst schwach an die Region des viralen Replikationsursprungs und wird durch die Interaktion mit E2 unterstützt (Mohr et al., 1990; Frattini et al., 1994). E2 wird anschließend wieder freigesetzt und E1 initiiert mit Hilfe der zelleigenen DNA-Polymerase  $\alpha$ -Primase die Replikation des Virusgenoms (Park et al., 1994; Masterson et al., 1998).

**E2** besteht aus 3 funktionellen Domänen und reguliert die virale Transkription. Die N-terminale Domäne fungiert als Transkriptionsaktivator (Bouvard et al., 1994), die C-terminalen 90 Aminosäuren beinhalten die Dimerisierungsdomäne sowie die DNA-Bindungsdomäne. Die dazwischen liegende Region bindet an palindromische Promotor-Sequenzen in der URR und reprimiert dadurch die Transkription der E6- und E7-Gene (Cripe et al., 1987; Bernard et al., 1989; Romanczuk et al., 1992). Im produktiven Viruszyklus wird so wahrscheinlich von der Expression der frühen Gene auf die der späten Gene umgeschaltet. In HPV-assoziierten Karzinomen ist das HPV-Genom meist in das Wirtsgenom integriert, die Öffnung des zirkulären Genoms erfolgt bevorzugt im E1/E2-Bereich, der dabei unterbrochen wird. Folglich wird die Expression von E6 und E7 nicht mehr reprimiert (Dürst et al., 1985; Cullen et al., 1991), beide Gene werden so konstitutiv exprimiert (Schwarz et al., 1985) und greifen über mehrere Wechselwirkungen in den Zellzyklus ein.

**E5** gilt bei bovinen Papillomviren als das virale Protein mit dem höchsten onkogenen Potential (Burkhardt et al., 1987). Das E5-Protein von BV1 ist in der Lage, Zellen in Kultur zu transformieren (Martin et al., 1989). Es kommt als hydrophobes Transmembranprotein vor allem im Golgi-Apparat der Zelle vor (Cohen et al., 1993).

Die Rolle des E5-Proteins bei humanen Papillomvirus-Typen (HPV) ist bisher unklar, obwohl es auch hier in den zellulären Stoffwechsel eingreift und z.B. aufgrund diverser Interaktionen die Aktivierung membran-assoziiierter Proteinkinasen beeinflusst (Crusius et al., 1997).

**E4** gehört trotz gegenteiliger Bezeichnung zu den späten Proteinen und kann im produktiven Infektionszyklus, gemeinsam mit L1, in großen Mengen nachgewiesen werden (Doorbar et al., 1986; Crum et al., 1990). Es akkumuliert im Cytoplasma und

erleichtert wahrscheinlich die Freisetzung von Viruspartikeln durch Interaktionen mit dem Cytokeratinskelett (Roberts et al., 1993).

Auf die Funktion der **E6-** und **E7-Gene** wird in Kapitel 1.1.7 und 1.1.8 genauer eingegangen. Es ist weitaus mehr über die Rolle der E6- und E7- Genprodukte von ‚high-risk‘-HPV-Typen bei der Transformation bekannt als über ihre eigentliche Funktion im produktiven Infektionszyklus.

Die späten Gene der Papillomviren kodieren für die Strukturproteine L1 und L2, wobei **L1** das Hauptstrukturprotein darstellt. Das Viruskapsid wird aus 72 Pentameren von L1, den Kapsomeren aufgebaut.

**L2** ist für den Aufbau des Kapsids nicht erforderlich, besitzt aber wichtige Aufgaben bezüglich der Bindung und Verpackung des Virusgenoms (Zhou et al., 1994; Zhao et al., 1998).

#### **1.1.4 Humane Papillomviren (HPV)**

Von humanen Papillomviren sind bereits 85 Typen vollständig sequenziert und mehr als 120 mögliche neue Typen charakterisiert (de Villiers, 1994; zur Hausen, 2000; Dell und Gaston, 2001). Alle bisher identifizierten humanen Papillomviren sind strikt epitheliotrop, d.h. sie infizieren ausschließlich teilungsfähige Basalzellen der Haut und Schleimhäute. Daher unterscheidet man zwischen kutanen und mukosotropen HPV-Typen.

##### **1.1.4.1 Kutane HPV-Typen und ihre Rolle an der Entstehung von Hautkrebs**

Die kutanen HPV-Typen wie z.B. HPV1, HPV2, HPV4 und HPV7 verursachen häufig gutartige Proliferationen und führen zur Warzenbildung (Favre et al., 1975; Jablonska et al., 1987; Inaba et al., 1993). Epidermodysplasia verruciformis (EV) ist eine seltene Erkrankung der Haut die mit multipler Warzenbildung verbunden ist (Orth et al., 1978). EV tritt bei genetisch bedingter Prädisposition auf (autosomal rezessive Vererbung auf Chromosom 17). An sonnenexponierten Stellen der Haut kommt es häufig zu einer Entartung der Warzen. In diesen Warzen sind circa 30 verschiedene kutane HPV-Typen nachweisbar, wobei HPV5, HPV8 und HPV14 die Hauptvertreter darstellen (Orth et al., 1986; Pfister, 1992; Jablonska und Majewski, 1994). Es wird daher vermutet, daß UV-Einwirkung in Kombination mit einer erfolgten HPV-Infektion eine Entartung der



---

Warzen und selten auch eine maligne Progression in Hauttumoren bewirken kann (Jackson and Storey, 2000). Ein möglicher Ansatzpunkt ist hierbei, daß mit Hilfe der UV-Strahlung eine Stimulation mancher HPV-Promotoren ausgelöst wird, die wiederum eine erhöhte Expression der Onkogene E6 und E7 auslösen (Purdie et al., 1999). Die kutanen HPV-Typen unterscheiden sich von den mukosotropen/anogenitalen HPV-Typen anhand der unterschiedlichen Aktivität ihrer Gene bzw. des fehlenden E5-Gens (Haller et al., 1995). Zudem wird vermutet, daß den unterschiedlichen Genen eine unterschiedliche Rolle bei der Transformation zukommt. Eine Beziehung zwischen Papillomviren und Hautkrebs wurde bisher jedoch nur bei EV-Patienten nachgewiesen, da hier in nahezu allen Karzinomen HPV-DNA nachweisbar war (Jablonska und Majewski, 1994). Bisher war es jedoch nicht möglich, die genaue Rolle der kutanen Papillomviren bezüglich Tumorinitiation und Tumorprogression in der Haut aufzuklären.

#### **1.1.4.2 Mukosotrope/anogenitale HPV-Typen und ihre Rolle in der Krebsentstehung**

Die HPV-Typen der Mukosa infizieren Schleimhäute des Anogenitalbereichs und anderer Organe wie z.B. Mundhöhle (de Villiers et al., 1985; Lönig et al., 1985), Ösophagus (Syriänen, 1982) oder Larynx (Kahn et al., 1986; Scheuerlen et al., 1986). Circa 44 HPV-Typen wurden bisher im Zusammenhang mit zervikalen Läsionen nachgewiesen (Walboomers et al., 1999). Die mukosotropen/anogenitalen HPV-Typen, die durch sexuelle Übertragung den Anogenitalbereich infizieren, werden in ‚high-risk‘ und ‚low-risk‘ HPV-Typen eingeteilt. Die Einteilung basiert auf dem transformierenden Potential der Onkogene E6 und E7 (zur Hausen, 1984). Zu den ‚high-risk‘ HPV-Typen gehören unter anderem HPV16 und HPV18, die zusammen mit HPV31 und HPV33 in ca. 90 % der Zervixkarzinombiopsien und als Auslöser der HSIL (high grade squamous intraepithelial lesions) nachgewiesen wurden (Dürst et al., 1983; Boshart et al., 1984; zur Hausen, 1996; Dell und Gaston, 2001). Infektionen mit einem ‚high-risk‘ HPV-Typ resultieren dabei nicht zwangsläufig in der Entwicklung eines malignen Tumors, es handelt sich vielmehr um ein seltenes Ereignis, das von zusätzlichen onkogenen Faktoren abhängig ist. Die meisten zervikalen Dysplasien bilden sich wieder spontan zurück (Nasiell et al., 1986).

---

Die zu den genitalen ‚low-risk‘ Typen gehörenden HPV-Typen HPV6 und HPV11 sind in benignen Hyperproliferationen (de Villiers et al., 1981; Gissmann et al., 1982) und nur selten in malignen Tumoren nachweisbar. Sie werden in über 90 % aller Condylome (Condyloma acuminata; Feigwarzen) und in sog. LSILs (low grade squamous intraepithelial lesions) nachgewiesen.

### **1.1.5 Tierpathogene Papillomviren**

Papillomviren kommen auch bei verschiedenen Säugetierarten und anderen Vertebraten vor. So können Affen, Rinder, Schafe, Hirsche, Kaninchen, Hunde aber auch Vögel und Reptilien von ihnen infiziert werden. Beispielhaft sind folgend einige tierpathogene Papillomviren dargestellt.

#### **1.1.5.1 Shope's Kaninchenvirus (Cotton tail rabbit Papillomvirus, CRPV)**

1933 wurde das CRPV als erstes Papillomvirus in Papillomen der Haut bei Kaninchen nachgewiesen (Shope, 1933). Diese Papillome besaßen die Fähigkeit, mit einer hohen Frequenz in Karzinome zu progressieren (Wettstein et al., 1987). Eine Großzahl von fundamentalen Studien bezüglich viraler Krebsentstehung und neoplastischer Progression wurden daher am CRPV-System erarbeitet. Das CRPV besitzt drei transformierende Proteine, eine lange und eine kurze Form des E6-Proteins als auch ein E7-Protein (Meyers et al., 1992).

#### **1.1.5.2 Bovines Papillomvirus (BPV)**

Zur Zeit sind fünf unterschiedliche BPV-Typen bekannt. Die Typen BPV1, BPV2, BPV5 und BPV6 verursachen hauptsächlich benigne Tumoren. Ausschließlich das BPV4 vermag im Pansen der infizierten Tiere eine maligne Progression auszulösen (Conolly et al., 1998). Das virale Protein E5 gilt bei den bovinen Papillomviren als das Protein mit dem höchsten onkogenen Potential (Burkhardt et al., 1989). Es ist in der Lage, Zellen in Kultur zu transformieren (Martin et al., 1989).

### 1.1.5.3 *Mastomys natalensis* Papillomvirus (MnPV)

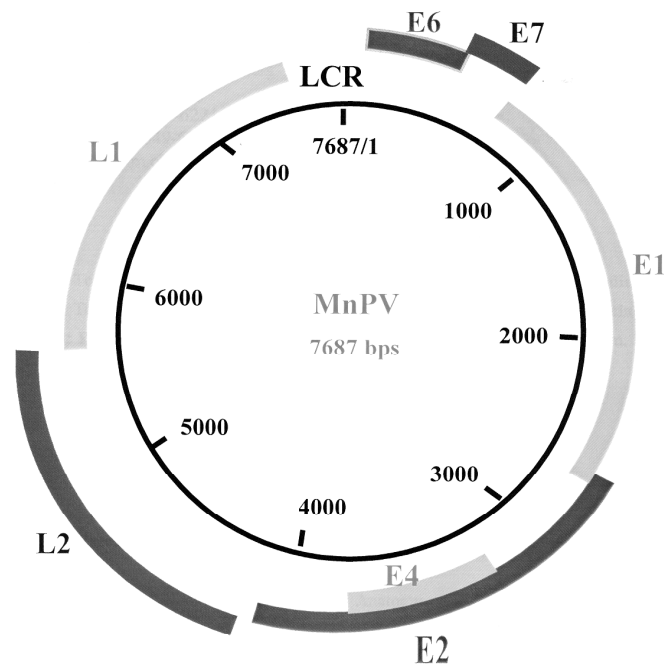
Der Nager *Mastomys natalensis* wurde von Smith (1834) erstmalig beschrieben. Er ist eine Mausspezies, die sich in Afrika im Süden der Sahara angesiedelt hat (Davis und Oettle, 1958). 1966 wurden Kolonien von *Mastomys natalensis* zur Seuchen-Forschung in Giessen etabliert. Die in Heidelberg befindlichen *Mastomys*-Zuchten wurden von der Zucht aus Giessen abgeleitet. Auffällig war das spontane Auftreten von epithelialen Hauttumoren. Die Hauttumoren wurden erstmals von Burtscher et al. (1973) beschrieben und nachfolgend als Papillom bzw. Keratoakanthom diagnostiziert (Thiel und Rudolph, 1976). Spontan auftretende maligne Tumoren wurden in der in Heidelberg etablierten Kolonie nicht nachgewiesen (Amtmann et al., 1987). Reinacher et al. (1978) konnten erstmals eine große Anzahl von Viruspartikeln in den Nuklei von keratinisierten Zellen des Stratum granulosum und Stratum corneum bei *Mastomys natalensis* nachweisen. Die Tumorigenität des MnPV wurde an Hand der hohen Frequenz entwickelter Tumoren, ausgelöst durch Infektionen gereinigter Virionen in junge *Mastomys*, deutlich. Hierbei entwickelten nahezu 40 % der infizierten Tiere benigne Hauttumoren (Müller und Gissmann, 1978). Mit ansteigendem Alter der Tiere nimmt die Anzahl der Viruskopien in den Zellen der Haut stark zu, so daß im Alter von ca. einem Jahr eine virusbedingte Tumorenstehung eintritt. Durch Behandlung mit einem Tumorpromotor (TPA) konnte die Anzahl der Viruskopien pro Zelle so stark erhöht werden, daß nach einer Behandlung von 44 Wochen 66 % der eingesetzten Tiere Geschwülste entwickelten. Die Geschwülste entsprachen histologisch den spontan entstehenden Keratoakanthomen (Amtmann et al., 1984). Bei Einsatz der Tiere in eine Mehrstufenkarzinogenese traten im Gegensatz zu den Verhältnissen bei der Maus (*Mus musculus*) anstelle von Papillomen hauptsächlich Keratoakanthome auf. Bei Behandlung mit dem Tumorigenitätsinitiator DMBA bzw. mit DMBA und dem Tumorpromotor TPA konnten schließlich Plattenepithelzellkarzinome induziert werden (Wayss et al., 1981).



**Abb. 1.2 *Mastomys natalensis* mit Keratoakanthomen**

Der Nager *Mastomys natalensis* ist der natürliche Wirt des MnPV. Es entstehen spontan benigne Tumoren, die als Keratoakanthome bezeichnet werden.

Das MnPV-Genom (Abb.1.3) ist in seiner Organisation auf andere Papillomviren übertragbar, allerdings variiert die Länge der einzelnen Leseraster sowie die Position wichtiger Promotoren. Nur einer der beiden DNA-Stränge ist codierend, so daß die Transkription in einer Richtung erfolgt (Chen et al., 1982; Danos et al., 1986). Das MnPV besitzt ein zirkuläres, doppelsträngiges Genom von 7687 Bp mit einem G/C-Gehalt von ca. 50 %. Es verfügt, in Übereinstimmung zu anderen Papillomviren, über offene Leseraster für die Gene E6, E7, E1 E2/E4, L2, L1 und eine long control region (LCR). Wie viele andere kutane Papillomviren, besitzt es ebenfalls kein E5-Gen.



**Abb. 1.3 Das MnPV-Genom**

E1-E7 = offenes Leseraster der ‚frühen‘ Gene; L1, L2 = offenes Leseraster der ‚späten‘ Gene. Die Nukleotide wurden von 1-7687 durchnummeriert (Chen, 2000).

## 1.2 Das Mehrstufenmodell der Karzinogenese

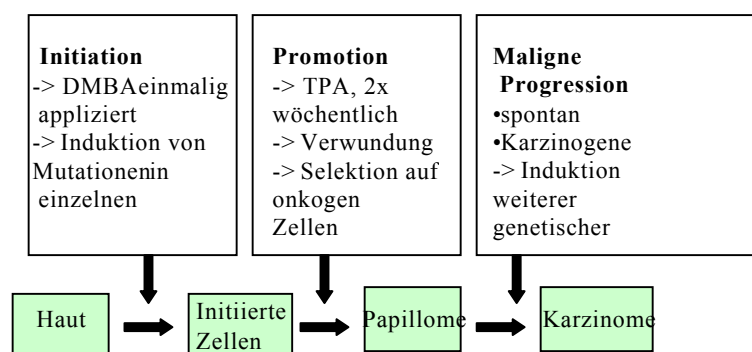
Die Mehrstufenkarzinogenese unterteilt die Entstehung von Karzinomen in die Schritte Initiation, Promotion und Progression (Berenblum, 1941).

Als Initiation wird die Induktion genetischer Veränderungen in einzelnen Zellen bezeichnet. Ein einzelnes Mutationsereignis kann für die Initiation ausreichend sein. In der Epidermis basiert dies häufig auf einer Mutation im H-ras-Gen. Dort kommt es zu einer Adenin zu Thymin Transversion in Position 2 des Codons 61 und das codierte Protein bleibt anschließend permanent aktiv (Leder et al., 1990). Tatsächlich führt die

transgene Expression des mutierten H-ras-Gens in der Haut zur Initiation (Song et al., 1999). Experimentell wird die Initiation durch eine Behandlung mit einem genotoxischen Karzinogen, hier 7,12-Dimethylbenz[a]-anthracen (DMBA), erreicht (Hecker et al., 1987).

Die Tumorpromotion kann als eine Selektion auf diese onkogen mutierten Zellen verstanden werden, da diese auf proliferationsfördernde Signale stärker, auf differenzierungs- und apoptosefördernde Signale hingegen schwächer ansprechen als das umgebene Gewebe. Dabei entstehen sogenannte Papillome, die sich häufig nach Absetzen des Tumorpromotors spontan wieder zurück entwickeln. Im Maushautmodell erfolgt die Tumorpromotion durch die kontinuierliche Applikation nicht-genotoxischer, aber entzündlicher, die Keratinozytenproliferation fördernde Substanzen, z.B. 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-azetat (TPA), einem Bestandteil des tropischen Wolfsmilchgewächses *Croton tiglium* (Goerttler et al., 1980). Tumorpromotoren lösen in der Haut eine zur Wundantwort analoge Reaktion aus, die von Entzündungsprozessen begleitet wird (Gems et al., 1984). Promotoren von der Art des TPA scheinen über eine Aktivierung von Proteinkinase C zu wirken.

Nach der Initiation und Promotion erfolgt spontan oder durch Karzinogene bedingt eine maligne Progression der entstandenen Hautwucherungen, was einen Verlust der Gewebedifferenzierung zur Folge hat. Die Effizienz dieses Umwandlungsschrittes läßt auf die karzinogene Wirkung des eingesetzten Transgens schließen.



**Abb. 1.4 Das Maushautmodell der Mehrstufenkarzinogenese**

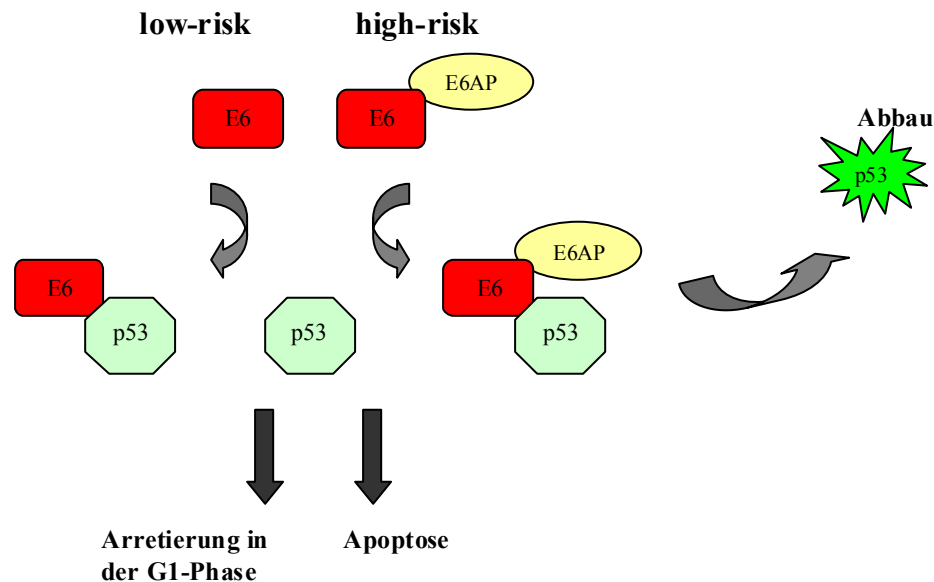
Nach der einmaligen Initiation mit dem Tumoriator DMBA erfolgt die Tumorpromotion mit TPA zweimal wöchentlich für 20 Wochen. Die Tiere werden über einen Zeitraum von 40 Wochen beobachtet.

### 1.3 Das Onkoprotein E6

Um Zusammenhänge zwischen HPV-Pathogenität und Tumorigenität im Wirtsorganismus zu verstehen, benötigt man das Verständnis von Interaktionsvorgängen viraler Onkoproteine mit Komponenten der Wirts-Zellen. Aufgrund vieler Studien konnte gezeigt werden, daß das E6-Protein der humanen Papillomviren transformierende Eigenschaften besitzt und zusammen mit dem E7-Protein das Hauptonkoprotein der Papillomviren darstellt (zur Hausen, 1986, 1999; Montovani et al., 2001). Sie können die Regulation des Zellzyklus beeinflussen und zu chromosomalen Instabilitäten führen (Filatov et al., 1998; Zwerschke und Jansen-Dürr 2000). Die HPV-E6-Proteine sind kleine Polypeptide von ca. 150 Aminosäuren. Sie beinhalten fünf hochkonservierte CXXC-Motive, welche zur Bildung der zwei Zinkfinger benötigt werden (Cole und Danos, 1987; Ullman et al., 1996). Die Bildung der Zinkfinger-Struktur ist für die Proteinaktivität entscheidend (Kanda et al., 1991; Sherman und Schlegel, 1996).

Das HPV16-E6-Gen wird vom frühen Promotor reguliert. Das HPV16-E6-Protein besitzt die Fähigkeit, primäre humane Epithelzellen (Band et al., 1991; Wazer et al., 1995) und im Zusammenspiel mit dem H-ras-Gen, primäre Nagerzellen zu immortalisieren (Storey et al., 1993). Besonders bedeutend ist die Interaktion des HPV16- und HPV18-E6-Proteins auf die Bindung (Werness et al., 1990) und Degradierung des Tumorsupressorproteins p53 (Scheffner et al., 1990). Viele Streßsignale wie die Zerstörung der DNA durch UV- oder  $\gamma$ -Strahlung, bzw. radioaktiver Substanzen oder Chemotherapeutika können die p53-Konzentration in der Zelle erhöhen. Das p53-Protein besitzt die Eigenschaft, den Zellzyklus in der G1/S- bzw. der G2/M- Phase reversibel zu arretieren, um Reparaturmechanismen in der Zelle zu aktivieren oder gegebenenfalls Apoptose zu initiieren (Avantaggiati et al., 1997). Das Protein p53 interagiert mit bestimmten Promotoren, beziehungsweise den dort gebundenen Transkriptionsfaktoren und transaktiviert sie. Das E6-Protein der ‚high-risk‘ HPV-Typen aktiviert den p53-Abbau indem es mit dem E6AP (E6 assoziiertes Protein), einer Ubiquitin-Protein-Ligase, einen Komplex eingeht (Scheffner et al., 1990; Maki, 1996; Be et al., 2001). Dieser Komplex interagiert mit p53, bewirkt dessen Ubiquitinierung und induziert seinen Abbau. Die Ubiquitinierung des gebundenen Substrates wird hierbei durch die C-terminale Domäne des E6AP bestimmt (Nieber et al., 1998). Das E6-Protein von ‚low-risk‘ HPV-Typen besitzt nicht die Fähigkeit mit E6AP einen Komplex einzugehen

(Mantovani und Banks, 2001). Es bindet direkt an p53, jedoch mit geringerer Aktivität als das E6-Protein der ‚high-risk‘ HPV-Typen (Lechner et al., 1992).



**Abb. 1.5 Darstellung des E6-E6AP-vermittelten Abbaus von p53**

Das E6-Protein der ‚high-risk‘ HPV-Typen bildet mit E6AP einen Komplex. Dieser Komplex reagiert mit dem p53-Protein und führt zu dessen Abbau. Das E6-Protein der ‚low-risk‘ HPV-Typen kann nicht an E6AP binden. Es reagiert aber direkt mit p53 und verhindert so ein Arretierung des Zellzyklus, bzw. die Induktion von Apoptose.

Das E6-Protein der kutanen HPV-Typen (z.B. HPV1, HPV5, HPV8, HPV47 und CRPV) zeigt ein transformierendes Potential in Nagerfibroblasten, aber keine immortalisierende Aktivität in humanen Keratinozyten (Iftner et al., 1988; Kiyono et al., 1992; Schmitt et al., 1994). Für das E6-Protein der kutanen HPV-Typen wurde bisher keine Assoziation mit E6AP bzw. p53 nachgewiesen (Elbel et al., 1997). Das gilt auch für die E6-Proteine des Shope’s Kaninchenvirus (CRPV) und des bovinen Papillomvirus1 (Werness et al., 1990). Hierdurch wird verdeutlicht, daß das E6-Protein der kutanen Papillomviren andere Mechanismen der Zelltransformation ausnutzt.

## 1.4 Das Onkoprotein E7

Das kleine phosphorylierte E7-Protein von 98 Aminosäuren ist für das transformierende Potential einiger HPV (Zwerschke et al., 1999) mit verantwortlich. Es besitzt, wie das E6-Protein, keine enzymatischen Aktivitäten, kann jedoch bestimmte zelluläre und virale Promotoren transaktivieren, die den E2-Promotoren des Adenovirus gleichen. Hierfür verantwortlich sind wahrscheinlich die im carboxyterminalen Bereich des E7-Proteins befindlichen Zinkfinger motive C-X-X-C, deren Aminosäurefolge mit dem E1A Protein der Adenoviren identisch ist (Jewers et al., 1992). Das E7-Protein besteht aus drei konservierten Regionen CR1, CR2 und CR3. Alle drei Regionen sind für die biologische Aktivität des Proteins bedeutend. Die Funktion der CR1-Region ist noch nicht deutlich geklärt. Sie ist in den Abbau des Retinoblastom-Tumorsupressorproteins Rb involviert, und Mutationen in diesem Bereich haben eine Reduktion der transformierenden Aktivität zur Folge (Banks et al., 1990). Die Bindestelle für Rb (LXCXE) liegt in der CR2-Region (Dyson et al., 1989). Die CR3-Domäne enthält die zwei Zinkfinger motive (Braspenning et al., 1998), bietet die Bindungsstellen für wichtige zelluläre Proteine wie p27, p21 und AP-1 und besitzt die Fähigkeit eine Deregulation des Zellzyklus zu induzieren.

Das E7-Protein kann mit vielen zellulären Faktoren interagieren. Eine der wichtigsten Funktionen ist die Interaktion von E7 mit dem Tumorsupressorprotein Rb (Dyson et al., 1989; Chellappan et al., 1992), p107 und p130 (Davies et al., 1993; Smith-McCune et al., 1999). Die Bindung des HPV-E7-Proteins mit Rb, p107 und p130 bewirkt einen Verlust des E2F im E2F-Rb-Komplex, was die Aktivierung der Transkription verschiedener E2F-assoziiierter Gene (B-myb, cyclin A) zur Folge hat (Phelps et al., 1991; Chellappan et al., 1992; Lam et al., 1994; Schulze et al., 1998). HPV16- und HPV18-E7-Onkoproteine besitzen die Fähigkeit Nagerzellen zu transformieren (Phelps et al., 1988; Watanabe et al., 1988; Tanaka et al., 1989), wobei HPV16-E7 mit dem aktivierten H-ras-Onkogen kooperiert (Matalashewski et al., 1987; Chesters et al., 1990). Das E7-Protein der ‚low-rik‘ HPV-Typen 6 und 11 besitzt eine reduzierte Bindungsaffinität zu Rb (Store et al., 1988). Bei einigen kutanen PV, wie HPV1, bindet das E7-Protein mit identischer Effizienz wie bei HPV16-E7 an Rb, bewirkt jedoch keinen Abbau des Proteins (Alunni-Fabbroni et al., 2000).



## 1.5 Transgene Tiermodelle für Gene der Papillomviren

Unter Verwendung verschiedener transgener Tiermodelle konnten grundlegende molekulare Mechanismen der Karzinomentstehung in der Haut aufgeklärt werden. Durch Erstellung HPV-E6- bzw. HPV-E7-transgener Tiermodelle konnte unter anderem die Rolle des Tumorsupressorproteins p53 und des Retinoblastomproteins Rb in der Entstehung von Hauttumoren analysiert werden (Song et al., 1998). Transgene Tiermodelle für Gene kutaner Papillomviren gibt es nur vereinzelt, da bisher nur wenig über die Beteiligung kutaner Papillomviren an der Entstehung von Hauttumoren bekannt ist. Lediglich in Biopsien von Plattenepithelzellkarzinomen bei EV-Patienten konnten vermehrt die kutanen HPV-Typen HPV5, 8 und 14 nachgewiesen werden. Um die EV-assoziierte Krebsentstehung näher zu untersuchen, wurden Hautstücke aus benignen und prä-malignen Läsionen von EV-Patienten in Mäuse implantiert (Majewski et al., 1994). Diese Mäuse entwickelten Zysten, in denen die EV-HPV-Typen nachweisbar waren. Einige Beispiele transgener Mausmodelle sind in Tabelle 1 und 2 aufgelistet.

**Tab. 1: Transgene Mausmodelle humaner Papillomviren**

<b>Virus</b>	<b>Onkogen</b>	<b>Promotor</b>	<b>Stamm</b>	<b>Phänotyp</b>	<b>Quelle</b>
HPV16	E6/E7	hK14	FVB/N	Plattenepithelzellkarzinome (PEC); Zunahme der myc-Expression	Hurlin et al., 1995
HPV16	E6/E7	hK14	FVB/N C57Bl/6 BALB/c	PECs nur bei FVB/N; Erhöhung von K13, K8 und K19 in differenzierten PECs; in den restlichen Linien epidermale Hyperplasien und Dysplasien.	Coussens et al., 1996
HPV16	E6/E7	hK14	FVB/N	Zervixkarzinome in situ, nach Estrogenbehandlung der Mäuse, E2 promovierte Karzinomenstehung	Arbeit et al., 1994
HPV16	E6/E7	hK14	FVB/N	PECs; Erhöhung der FGF-1-Aktivität in Karzinomen	Arbeit et al., 1996
HPV16	E6/E7	$\alpha$ A-crystallin	FVB/N	PECs; Rb und p53 sind in Hauttumorbiopsien nicht mutiert	Lambert et al., 1993

**Tab. 2: Transgene Mausmodelle für Gene humaner Papillomviren**

<b>Virus</b>	<b>Onkogen</b>	<b>Promotor</b>	<b>Stamm</b>	<b>Phänotyp</b>	<b>Quelle</b>
HPV16	E6 oder E7	hK14	FVB/N	Nach UV-Bestrahlung Entstehung von PECs; E6 unterdrückt den Anstieg von p53 und p21; CR1- und CR2-Region des E7-Proteins zur Modulation der DNA benötigt	Song et al., 1999
HPV16	E6/E7	Tyrosinkinase	FVB/N	Nach DMBA/TPA-Behandlung Entstehung von Hyperplasien und gesteigerter Papillomanzahl der Haut	Kang et al., 2000
HPV16	E6 und E7	hK14	FVB/N	Nach DMBA/TPA Behandlung Entstehung von benignen Tumoren in E7-transgenen Mäusen ; bei E6-transgenen Mäusen Entstehung von epidermalen Karzinomen Grad 1-3 (PECs); E6-Protein bewirkt Tumorprogression, E7-Protein bewirkt gesteigerte benigne Tumorentstehung der Haut	Song et al., 2000
HPV18	E6/E7	hK1	IRCxFV B/N	Spontane H-ras aktivierte Papillome im Alter von 1 Jahr; benigne Tumoren mit K1-, K6- und K13-Expression	Greenhalgh et al., 1994
HPV1	E1/E4	bK6	CBA/C57B1	Ausschließlich benigne Tumoren sowie epidermale Dysplasien, Hyperkeratosen	Tinsley et al., 1992

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die Zielsetzung dieses Projektes war die Erstellung eines transgenen Mausmodells zur Untersuchung der Auswirkungen kutaner Papillomviren auf die Tumorentstehung in der Haut.

Der Nager *Mastomys natalensis* entwickelt durch Infektion mit dem MnPV spontan benigne Hauttumoren (Rudolph et al., 1976). Die Tumorigenität des MnPV wurde anhand der hohen Frequenz entwickelter Tumoren, ausgelöst durch Infektionen gereinigter Virionen in junge Mastomys, deutlich. Hierbei entwickelten nahezu 40 % der infizierten Tiere benigne Hauttumoren (Müller und Gissmann, 1978). Bis zum Alter von einem Jahr nimmt die Anzahl der Viruskopien in den Zellen der Haut so stark zu, daß eine virusbedingte Tumorentstehung eintritt. Bei Einsatz der Tiere in eine Mehrstufenkarzinogenese traten im Gegensatz zu den Verhältnissen bei der Maus (*Mus musculus*) anstelle von Papillomen hauptsächlich Keratoakanthome auf. Bei Behandlung mit dem Tumorinitiator DMBA bzw. mit DMBA und dem Tumorpromotor TPA konnten schließlich Plattenepithelzellkarzinome induziert werden (Wayss et al., 1981).

Es wurden daher transgene Mäuse erstellt und analysiert, die Sequenzen des tumorigenen MnPV trugen. Durch die Wahl der Gene eines Nagervirus und der Interaktion seiner Genprodukte mit den Mausproteinen, könnte somit ein geeignetes System zur Analyse kutaner Papillomviren erzeugt werden. Da im Falle der genitalen ‚high-risk‘ HPV-Typen HPV16 und HPV18 die Proteine E6 und E7 die Hauptonkoproteine darstellen und nachweislich an der Entstehung von Zervixkarzinomen beteiligt sind (zur Hausen, 1984), wurden MnPV-E6- und MnPV-E7-transgene Mäuse erzeugt. Die transgenen Mauslinien wurden auf Veränderungen der Haut untersucht die entweder spontan oder unter Einwirkung zusätzlicher chemischer Karzinogene im Mehrstufenmodell der Karzinogenese auftraten.

## 2 Ergebnisse

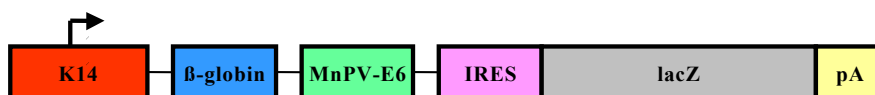
Die Darstellung der Ergebnisse dieser Arbeit ist in zwei Teile gegliedert.

Der erste Teil befaßt sich mit der Untersuchung der MnPV-E6-transgenen Mäuse. Der zweite Teil widmet sich der Erstellung induzierbarer MnPV-E7-transgener Linien.

### Teil I:

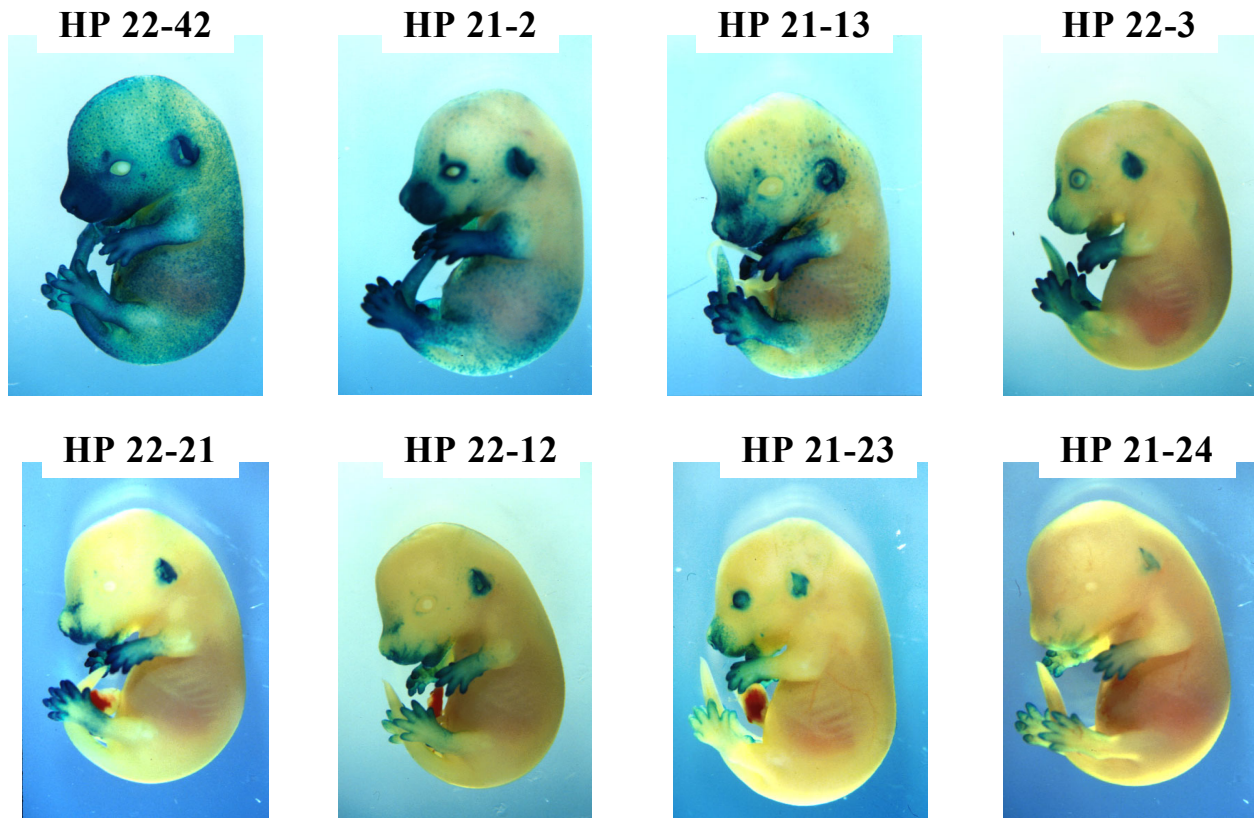
#### 2.1 Das *Mastomys natalensis* Papillomvirus E6-Protein (MnPV-E6) und seine Rolle in der Tumorentstehung der Haut transgener Mäuse

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden MnPV-E6-transgene Mauslinien untersucht. Die Erstellung der MnPV-E6-transgenen Mäuse erfolgte unter Verwendung des K14- $\beta$ globin-MnPV-E6-IRES-lacZ-pA Konstruktes (Abb. 2.1). Das Konstrukt enthält einen humanen Cytokeratin-14-Promotor, der eine Lokalisation der transgenen Expression in der Basalzellschicht der Haut bewirkt. Im Anschluß folgt eine  $\beta$ -Globin-Intronsequenz und die komplette codierende Region des viralen MnPV-E6-Gens. Durch die anschließende IRES-Sequenz wird eine bicistronische Transkription ermöglicht. Die Transkription des lacZ-Reportergens, welches für die Synthese der bakteriellen  $\beta$ -Galaktosidase codiert, kann somit erfolgen. Das Konstrukt wurde von M.Chen erstellt und anschließend die transgenen Mauslinien von H.Pöpperl (DKFZ, Heidelberg) erzeugt. Unter Verwendung dieses Konstruktes wurden acht transgene Linien erzeugt die sich in ihrer Expressionsintensität unterschieden (Chen, 2000). Die acht zu untersuchenden heterozygot-transgenen Linien zeigten eine unterschiedlich starke Transgenexpression in einem für den Cytokeratin-14-Promotor typischen Muster in der Epidermis (Abb.2.2).



**Abb. 2.1 Konstrukt zur Erstellung MnPV-E6-transgener Mäuse**

K14: Humaner Keratin-14-Promotor/Enhancer;  $\beta$ -globin: Kaninchen  $\beta$ -Globin Intronsequenz mit Exonübergängen; MnPV-E6: codierender Bereich des MnPV-E6-Gens; IRES: interne Ribosomen Eintrittsstelle des Encephalomyokarditis Virus; lacZ: Reportergen codiert  $\beta$ -Galactosidase; pA: Polyadenylierungssignal des SV40 T-Antigens



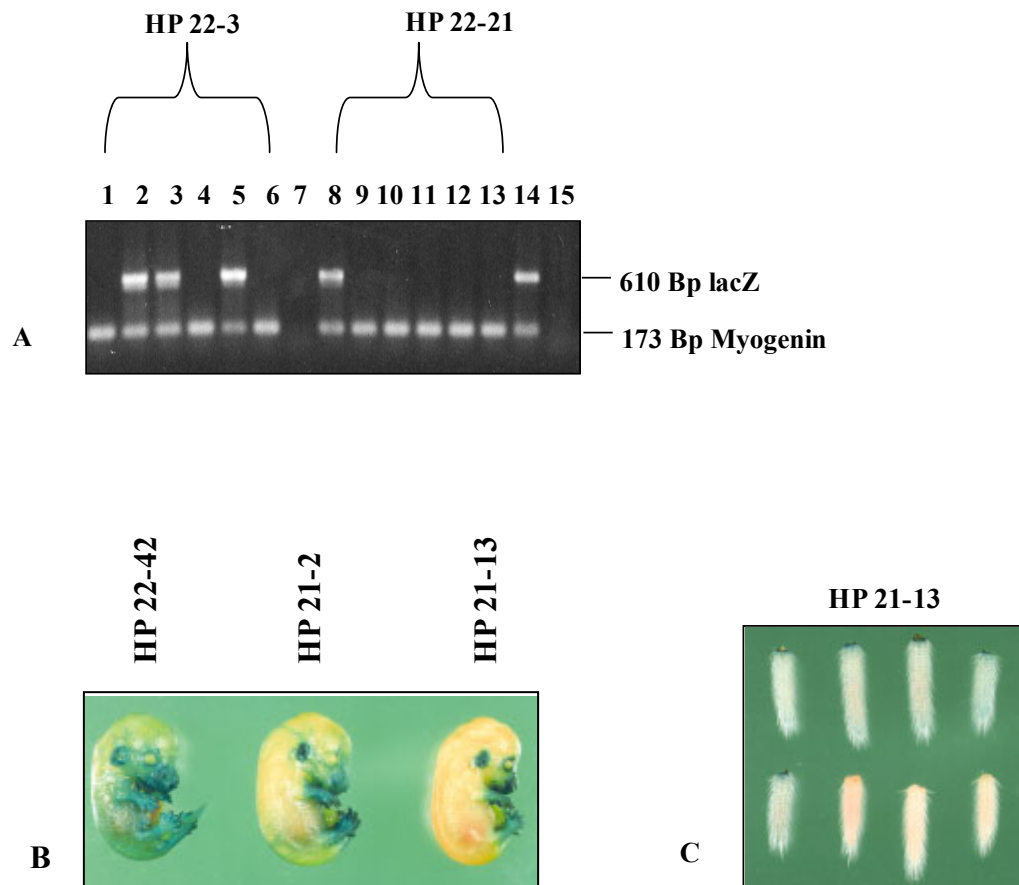
**Abb. 2.2 Transgen-Expression in Mausembryos**

Die Expressionsintensität des lacZ-Reportergens wurde an Mausembryos aller acht MnPV-E6-transgenen Linien mittels X-gal analysiert. Die Embryos wurden 14,5 Tage nach Befruchtung entnommen (Chen, 2000).

### 2.1.1 Erhaltung und Weiterzucht der MnPV-E6-transgenen Mauslinien

Zum Erhalt der acht MnPV-transgenen Linien wurden pro Linie ca. 10 transgene Tiere gehalten. Um die Paarungsfähigkeit dieser Tiere zu erhalten, wurden sie im Alter von 6-8 Monaten mit FVB/N Wildtyp-Mäusen verpaart und deren Nachkommen auf Transgenität überprüft.

Bei den schwach exprimierenden Linien ( HP 22-3, HP 22-21, HP 22-12, HP 21-23, HP 21-24) wurde der transgene Status mittels PCR an DNA aus Schwanzspitzenbiopsien überprüft. Hierzu wurde unter Verwendung spezifischer Primer ein Teil des lacZ-Reportergens zusammen mit einem Fragment des endogenen Myogenin-Gens als positive PCR-Kontrolle amplifiziert. Bei den stark exprimierenden Linien HP 22-42, HP 21-2 und HP 21-13 erfolgte der Nachweis des transgenen Status durch die Detektion der Aktivität des  $\beta$ -Gal-Reporters mit Hilfe des chromogenen Substrates X-gal (Abb. 2.3).



### Abb. 2.3 Ermittlung der Transgen-Expression mittels PCR bzw. X-gal

**A:** Von Maus-DNA aus Schwanzspitzenbiopsien wurden Teile des lacZ-Gens und des endogenen Myogenin-Gens unter Verwendung der lacZ-Primer ATV 11/ATV 12 (610 Bp) und der Myogenin-Primer Myg 1/Myg 2 (173 Bp) über PCR amplifiziert. Beide Primerpaare wurden zusammen in einer Reaktion eingesetzt. Getestet wurden Nachkommen der MnPV-E6-transgenen Linie HP 22-3 (Proben 1-6) und HP 22-21 (Proben 8-13). Proben 7 und 15 wurden als Negativkontrollen ohne DNA mitgeführt, in Probe 14 wurde als Positivkontrolle DNA einer zuvor schon als transgen analysierten Maus eingesetzt. Nach Auftrennung in einem 1,5 %igen Agarosegel wurden die PCR-Produkte durch Färbung mit Ethidiumbromid visualisiert. **B:** Transgene Expression in Embryos. Die Embryos wurden 14,5 Tage nach erfolgter Befruchtung entnommen und mit X-gal gefärbt. Dargestellt sind die Linien HP 22-42, HP 21-2 und HP 21-13. **C:** Transgene Expression in Schwanzspitzenbiopsien. Die Schwanzspitzenbiopsien wurden von MnPV-E6-transgenen Mäusen der Linie HP 21-13 entnommen und mit X-gal gefärbt.

Am Beispiel der MnPV-E6-transgenen Linie HP 22-3 wurden von insgesamt sechs getesteten Tieren drei als positiv für das lacZ-Reportergen identifiziert (Abb. 2.3A, Proben 2,3 und 5), in Linie HP 22-21 besaßen jedoch von insgesamt sechs getesteten Tieren nur eines das Transgen (Abb. 2.3A, Probe 8).

Da im Verlauf der Arbeit die Erhaltung der MnPV-E6-transgenen Linien über fünf Generationen erfolgte, wurde unter Verwendung des Substrats X-gal das Expressionsmuster der drei MnPV-E6-transgenen Mauslinien, die zur Untersuchung der transgenen Auswirkungen in der Haut verwendet wurden, wiederholt durch Färbung der

Embryos überprüft (Abb. 2.3B). Die Färbung der Embryos in diesem Altersstadium ermöglichte eine schnelle Analyse der Lokalisation des Transgens. Nach erfolgter Färbung zeigte sich ein für die Verwendung eines Cytokeratin-14-Promotors typisches Expressionsmuster (Byrne et al., 1994). Das Transgen wurde hierbei in den äußeren Schichten der Haarfollikel, in der Haut der Extremitäten, des Schwanzes, der Ohren und der Schnauze lokalisiert. Die Intensitätsunterschiede bezüglich der Expression des Transgens in den unterschiedlichen MnPV-E6-transgenen Linien, die direkt nach der Erstellung der Mauslinien festgestellt wurden (Chen, 2000), konnten hiermit erneut bestätigt werden.

Zur Analyse des transgenen Status wurden zusätzlich X-gal-Färbungen von Schwanzspitzenbiopsien stark exprimierenden Linien durchgeführt. Abb. 2.3C zeigt am Beispiel der Linie HP 22-21 die Ergebnisse von acht Tieren. Hierbei enthielten fünf Nachkommen einen positiv transgenen Status für das lacZ-Reportergen.

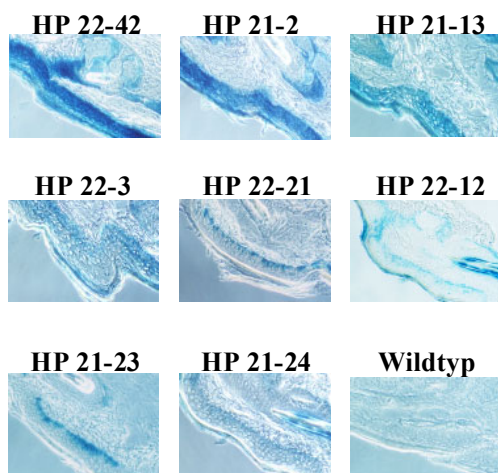
#### **2.1.1.1 Darstellung der Transgen-Expression in der Haut adulter Mäuse**

Da bisher nur die Transgen-Expression der acht MnPV-E6-transgenen Linien während der Embryonalentwicklung bekannt war (Abb. 2.2), wurde zunächst an Kryostatschnitten der Haut adulter Tiere analysiert, wie und wo das Transgen dort exprimiert wurde. Die lacZ-Transgen-Expression wurde durch X-gal Färbung an Schwanzschnitten nachgewiesen (Abb. 2.4), die aufgrund der Expression des lacZ-Reportergens im bicistronischen MnPV-E6 Konstrukt (siehe 5.9.1) synthetisiert wird. Hierbei zeigte sich, daß die Stärke der Transgenexpression in der Haut der adulten MnPV-E6-transgenen Linien mit der Expressionsstärke in der Epidermis der Mausembryos korrelierte (Abb. 2.2).

Die Expression des lacZ-Reportergens zeigte eine für den Cytokeratin-14-Promotor typische Lokalisation in der Basalzellschicht der Haut (deutlich sichtbar in den etwas schwächer exprimierenden Linien wie z.B. HP 22-12) als auch in dem äußeren Haarschaft der Haarfollikel. In den stärker exprimierenden Linien HP 22-42; HP 21-2 und HP 21-13 zeigte sich zuvor eine starke Expressionsintensität in den Embryos (Abb. 2.2). Bei adulten Tieren war die  $\beta$ -Galaktosidase in der gesamten Epidermis der Schwanzhaut zu sehen (Abb. 2.4). Dies beruht sehr wahrscheinlich auf der hohen Konzentration und Stabilität der  $\beta$ -Galaktosidase in diesen stark exprimierenden Linien. In den schwach exprimierenden Linien (z.B. HP 22-21) wurde eine Unregelmäßigkeit

des Expressionsmusters in der Basalzellschicht deutlich. Die unregelmäßige Expression des Transgens ist jedoch eine typische Darstellung der Expression bakterieller  $\beta$ -Galaktosidase (G.Fürstenberger, persönliche Mitteilung).

Als Kontrollpräparat diente die Haut von FVB/N Wildtyp-Mäusen. Somit konnte verdeutlicht werden, daß es sich bei der mittels X-gal detektierten  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität um die Aktivität der vom lacZ-Reportergen kodierten bakteriellen  $\beta$ -Galaktosidase und nicht um eine endogene, in der Haut vorhandene Aktivität handelte.



**Abb. 2.4 Detektion der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität in der Schwanzhaut der acht MnPV-E6-transgenen Linien**

Die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität wurde an 7  $\mu$ m dicken Kryostatschnitten unter Verwendung von X-gal nachgewiesen.

### 2.1.1.2 Transgen-Expression in primären Keratinozyten der MnPV-E6-transgenen Linien

Durch vorausgegangene Untersuchungen konnte die Lokalisation des Transgens in der Mauhaut analysiert werden. Durch die Herstellung primärer Keratinozyten sollte zusätzlich ein nutzbares in-vitro-System zur Analyse der durch die Transgenexpression hervorgerufenen Veränderungen erstellt werden. In Kultur wäre es möglich gewesen im Vergleich zu primären Keratinozyten des FVB/N Wildtyps verschiedene Parameter, wie z.B. das Wachstums- und Differenzierungsverhalten, als auch die Morphologie der Zellen zu beobachten und Einblicke in die Wirkungsweise der viralen E6 und E7-Proteine zu erhalten.

Die Erstellung und Kultivierung der primären Mauskeratinozyten wurde aufgrund einer Publikation durchgeführt, die diese Zellen als „einfach zu kultivieren“ bezeichnete (Dotto, 1999). Darauf hin wurden 2-3 Tage alte Mäuse herangezogen, mittels Schwanzspitzenbiopsie und PCR auf ihre transgene Expression überprüft und entsprechend der Methode zur Herstellung primärer Keratinozyten (siehe 6.2) präpariert.



---

Um eine Differenzierung primärer Keratinozyten zu vermeiden mußte der Calciumgehalt im Medium niedrig gehalten werden. In einer hohen Konzentration eingesetzt kann eine Ausdifferenzierung der Zellen erfolgen. Daher wurde ein spezielles Medium (Keratinozyten-SFM) mit einem Calciumgehalt von 0,05 mM verwendet.

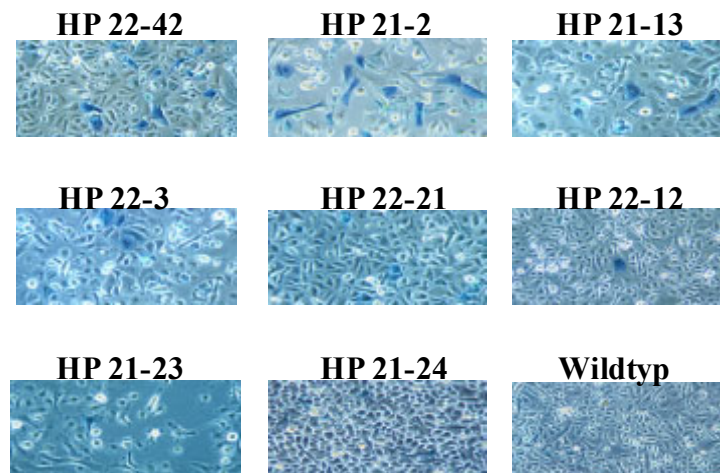
Nach den ersten Präparationen stellte sich heraus, daß sich nur sehr wenige der erhaltenen primären Keratinozyten an den Zellkulturschalen anhefteten. Um die Anheftung der Zellen zu verbessern wurden mehrere Beschichtungsmethoden der Zellkulturschalen und Verwendung verschiedener Medien ausgetestet. Zum einen wurden die Zellkulturschalen mit Collagen/Fibronectin bzw. nur mit Collagen beschichtet, sowie die Zellen mit selbst erstelltem Low-Calcium-Medium (0,05 mM Calcium) als auch mit Keratinozyten-SFM kultiviert. Durch Austesten verschiedener Kombinationen von Beschichtungslösungen und Medien stellte sich letztendlich eine Kultivierung der primären Keratinozyten auf Collagen/Fibronectin beschichteten Kulturschalen unter Verwendung von Keratinozyten-SFM als die beste Bedingung heraus. Auch eine Kultivierung der Zellen nach der Präparation für 4 Stunden in High-Calcium-Medium (1,2 mM Calcium) und eine darauf folgende Überführung der Zellen in Low-Calcium-Medium (Dotto, 1999) zeigte keine verbessernde Wirkung.

Trotz Optimierung der Kultivierungsbedingungen gelang es jedoch nicht eine langfristige Kultivierung und Vermehrung dieser Zellen zu ermöglichen. Spätestens 10 Wochen nach der Herstellung der Zellen waren alle primären Keratinozyten von der Kulturschale abgelöst. Die Problematik der Kultivierung primärer Mauskeratinozyten erwies sich nach Erkundigungen in anderen Arbeitsgruppen (G. Fürstenberger, persönliche Mitteilung) als bekannt. So sind primäre Mauskeratinozyten nur schwer in Kultur zu halten und eine erneute Anheftung nach durchgeführter Trypsinierung findet nur selten statt. Vor der Durchführung eines Versuches mußte jeweils eine neue Präparation von primären Keratinozyten erfolgen.

Die Tatsache, daß in den Kulturen stark exprimierender MnPV-E6 transgener Linien nicht alle Zellen eine  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität zeigten (Abb. 2.5), bestätigte ebenfalls das schon zuvor dargestellte Bild der unregelmäßigen Expression des Transgens in der Haut (Abb. 2.4). Die Expressionsintensität des Transgens in den primären Keratinozyten bzw. die Anzahl der exprimierenden Zellen in allen acht transgenen Linien korrelierte mit der zuvor in Embryos und der Haut adulter Tiere dargestellten, unterschiedlichen Expressionsintensität der verschiedenen transgenen Linien (Abb. 2.2). In den stark

exprimierenden Linien wurde eine höhere Anzahl gefärbter Keratinozyten als in schwach exprimierenden Linien detektiert.

Der humane Cytokeratin-14-Promotor ist in Zellen mit eingeleiteter Differenzierung nicht mehr aktiv. Eine mögliche Erklärung für das nur vereinzelt aufgetretene Anfärben der Zellen könnte der Verlust der Basalzellidentität während bereits eingeleiteter Differenzierungsprozesse sein. Daß es sich bei den isolierten Zellen zum Zeitpunkt der  $\beta$ -Galaktosidasefärbung zu 95 % um Keratinozyten handelte, wurde rein morphologisch beurteilt. Aufgrund des niedrigen Calciumgehaltes (0,05 mM) wurde ein Ablösen der zu Beginn noch vorhandenen Fibroblasten, die morphologisch deutlich von Keratinozyten zu unterscheiden waren, innerhalb der folgenden 48 Stunden sichergestellt. Nachdem sich die Transgen-Expression in den primären Keratinozytenkulturen der MnPV-E6-transgenen Linien als inhomogen darstellte (Abb. 2.5), wurden die primären Keratinozyten letztendlich lediglich zur RNA-Isolierung und für Transfektionsversuche verwendet.



**Abb. 2.5 Expression des lacZ-Reportergens in primären Keratinozyten der acht MnPV-E6-transgenen Linien**

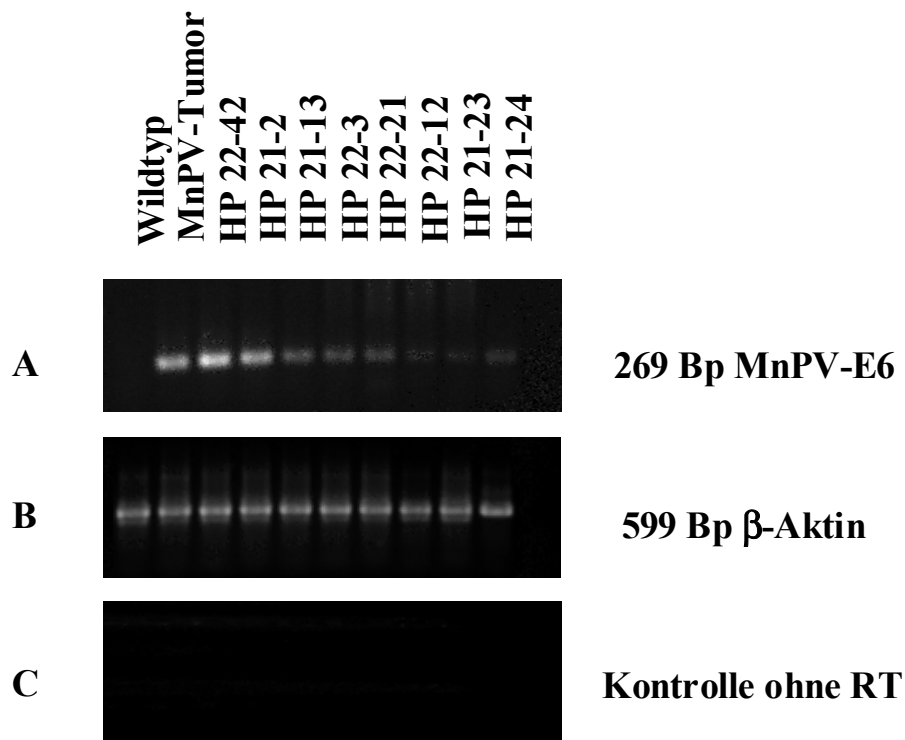
Die Überprüfung der Expression wurde 48 Stunden nach Herstellung der Zellkulturen mittels X-gal durchgeführt. Als Kontrolle wurden Keratinozyten einer FVB/N Wildtyp-Maus verwendet.

### 2.1.1.3 Nachweis der MnPV-E6 mRNA mit Hilfe primärer Keratinozyten

In den vorausgegangenen Untersuchungen wurde jeweils die transgene Expression durch das lacZ-Reportergen analysiert. Da es sich jedoch bei dem transgenen Konstrukt K14-βglo-MnPV-E6-IRES-lacZ-pA um ein bicistronisches Konstrukt handelt, kann man von einer korrelierenden Expression des MnPV-E6-Gens und des lacZ-Reportergens ausgehen (Abb. 2.1).

Um nun spezifisch die Expression des MnPV-E6-Gens zu untersuchen, wurden von allen acht MnPV-E6-transgenen Mauslinien primäre Keratinozytenkulturen zur RNA-Isolierung hergestellt (siehe 6.2). Die RNA wurde mittels TRIzol (siehe 6.11.2) isoliert, mit DNase inkubiert um einen Nachweis genomischer DNA in der nachfolgenden PCR zu vermeiden und nachfolgend in eine Reverse-Transkriptase-Reaktion eingesetzt. Hierbei wurden als wichtige Kontrollen von allen RNA-Proben Ansätze ohne Reverse-Transkriptase mitgeführt, um einen Nachweis genomischer MnPV-E6-DNA auszuschließen. Abschließend wurde unter Einsatz spezifischer MnPV-E6-Primer (ATV 176/ATV 177) eine PCR durchgeführt, wobei hier als Negativkontrolle RNA aus FVB/N Wildtyp isolierten primären Keratinozyten, sowie als Positivkontrolle RNA aus *Mastomys natalensis* Tumormaterial (von K.Wayss, DKFZ-Heidelberg zur Verfügung gestellt) verwendet wurden.

Die Analyse zeigte, daß alle transgenen Linien das MnPV-E6-Gen exprimierten (Abb. 2.6). Obwohl keine quantitative PCR durchgeführt wurde zeigte sich, daß die MnPV-E6 Banden in ihrer Intensität eindeutige Unterschiede aufwiesen. Stark exprimierende Linien zeigten ein intensiveres Signal als schwach exprimierende Linien (Abb. 2.6A). So wurde deutlich, daß die Intensität der amplifizierten MnPV-E6 Banden mit der zuvor ermittelten Expressionsintensität der einzelnen transgenen Linien übereinstimmte (Abb. 2.3C).



**Abb. 2.6 RT-PCR Analyse der MnPV-E6-Expression in primären Keratinozyten**

**A:** Durch MnPV-E6-spezifische Primer wurde bei allen MnPV-E6-transgenen Linien und der Positivkontrolle (*M.natalensis* Tumor) das MnPV-E6-Gen auf einem 1,5 %igen Agarosegel amplifiziert. **B:** Zur Kontrolle der PCR wurden  $\beta$ -Aktin Primerpaare verwandt. **C:** Die Reaktionsansätze ohne RT zeigten keine amplifizierten Banden.

Zur Detektion des MnPV-E6-Proteins wurde ein spezifischer MnPV-E6-Antikörper von M.Chen hergestellt (Chen, 2000). Die Funktion des MnPV-E6-Antikörpers wurde in MnPV-E6-transfizierten Hela- und cos-7-Zellen nachgewiesen, wo durch Überexpression eine ausreichende Menge an zu detektierendem Protein vorlag. Allerdings konnte das MnPV-E6-Protein mittels Western-blot-Technik nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Dies könnte an der nicht ausreichenden Sensitivität des erstellten MnPV-E6- Antikörpers liegen oder an der für das ‚high-risk‘ HPV16-E6-Protein bekannten kurzen Halbwertszeit des E6-Proteins (Myers et al., 1996).

### 2.1.2 Auf der Suche nach dem Phänotyp!

Bei transgenen Mäusen, welche das genitale ‚high-risk‘ HPV16-E6-Gen unter der Kontrolle eines humanen Cytokeratin-14-Promotors tragen, entwickeln sich spontan zelluläre Hyperproliferationen und epidermale Hyperplasien in der Haut. Aus diesen gutartigen Veränderungen entstanden innerhalb des ersten Lebensjahres maligne

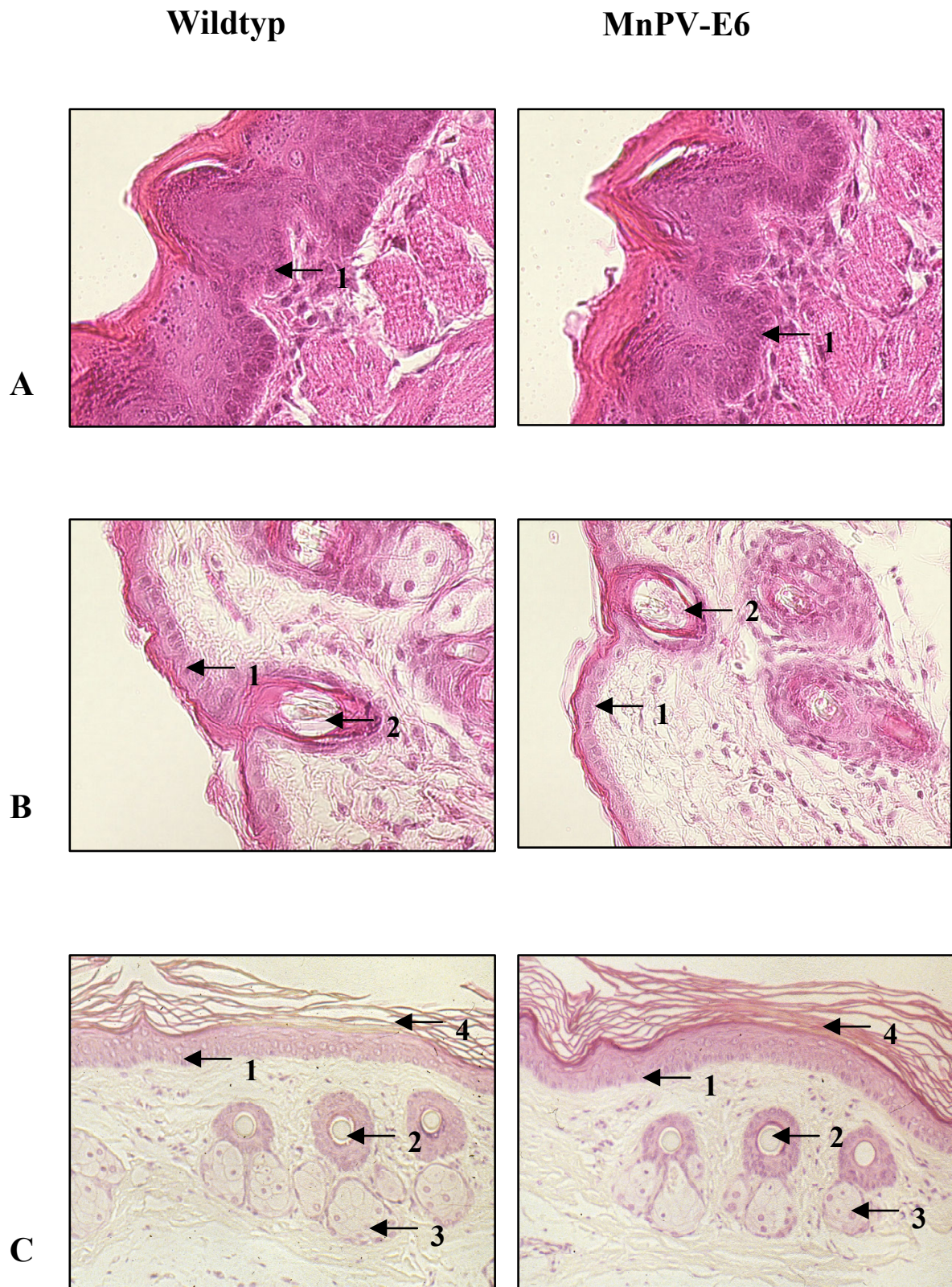
Hauttumoren (Song et al., 1999). Es stellte sich die Frage, ob ähnliche Hautveränderungen bei den MnPV-E6-transgenen Linien auftreten würden. Allerdings waren selbst nach einer Zeitspanne von 24 Monaten keine makroskopischen Veränderungen der Haut sichtbar.

### **2.1.2.1 Histologische Analysen der MnPV-E6-transgenen Linien**

Bei HPV16-E6-transgenen Mäusen sind die stärksten Hyperproliferationsunterschiede der Epidermis im Vergleich zu FVB/N Wildtyp-Mäusen im Alter von 6 Wochen gefunden worden (Song et al., 1999). Daher sind auch die MnPV-E6-transgenen Linien in diesem Stadium untersucht worden.

Da aufgrund der Verwendung eines humanen Cytokeratin-14-Promotors eine Expression des Transgens in der Basalzellschicht zu erwarten war (Byrne et al., 1994), wurde die Epidermis verschiedener Körperregionen wie Zunge, Ohren und Schwanzhaut zu histologischen Analysen herangezogen. Um einen generellen Überblick der Gewebeorganisation zu erhalten, wurde eine Hämalaun/Eosin-Färbung an Paraffinschnitten durchgeführt. Hierzu wurden sowohl MnPV-E6-transgene Mäuse als auch FVB/N Wildtyp-Mäuse im Alter von 6 Wochen (siehe 6.8.3) verwendet. Die mittels Hämalaun/Eosin durchgeführte Übersichtsfärbung zeigte keine histologischen Unterschiede der Epidermis der MnPV-E6-transgenen Mäuse im Vergleich zu FVB/N Wildtyp-Mäusen (Abb. 2.7). Anzeichen von Hyperproliferationen waren nicht festzustellen. Daher wurde zusätzlich ein spezieller Proliferationsantikörper zur Analyse verwendet. Dieser Antikörper erkennt das Ki67-Antigen granulären Komponenten des Zellkerns während der S-Phase (Endl und Gerdes, 2000) und detektiert somit sich im Teilungsvorgang befindliche Zellen. Hierzu wurden Gewebe der Haut (Schulter- und Bauchbereich), des Ohres, der Zunge und umliegende Hautareale der Schnauze von zwei stark exprimierenden MnPV-E6-transgenen Linien (HP 22-42 und HP 21-2) und FVB/N Wildtyp-Mäusen im Alter von 6 Wochen entnommen, Paraffinschnitte hergestellt und unter Verwendung des Ki67-Antikörpers auf Proliferationen getestet (siehe 6.9.1). Um eine Aussage über die Anzahl der proliferierenden Zellen treffen zu können, wurden per Zufallseinstellung am Lichtmikroskop 10 unterschiedliche Areale von ca. 100 Zellen ausgezählt. Auch die Behandlung der Gewebebiopsien mit dem Ki67-Antikörper zeigte keine histologischen Unterschiede der Haut der untersuchten MnPV-E6-transgenen Linien im Vergleich zu Gewebebiopsien der Wildtyp-Mäuse (Daten nicht gezeigt).





**Abb. 2.6 Histopathologie von Biopsien MnPV-E6-transgener Mäuse**

Dargestellt sind Hämalaun/Eosin gefärbte Paraffinschnitte von 2 µm Dicke. **A:** Zungenbiopsie, **B:** Ohrbiopsie, **C:** Biopsie der Schwanzhaut; 1= Basalzellschicht (Stratum basale), 2= Haarfollikel, 3= Talgdrüse, 4= Keratinschicht (Stratum corneum)

### **2.1.3 Das Mehrstufenmodell der Karzinogenese**

Die MnPV-E6-transgenen Mäuse zeigten spontan keinen veränderten Phänotyp. Daher wurden sie in eine Mehrstufenkarzinogenese eingesetzt. Das Modell der chemisch-induzierten Mehrstufenkarzinogenese ist in Maushaut ein etabliertes System (Berenblum, 1941). Der erste Schritt der Krebsentstehung, ausgelöst durch eine niedrige Dosis eines Karzinogens (hier DMBA), wird als Initiation bezeichnet. Dies kann in einer Reihe von Zellen zu definierten genetischen Veränderungen z.B. einer aktivierenden Mutation des zellulären Protoonkogens H-ras führen (Storey et al., 1993). Ein charakteristisches Merkmal des anschließenden Promotionsprozesses sind chronische Hyperproliferationen und Hyperplasien der Haut, die durch wiederholte Behandlung mit Tumorpromotoren (hier TPA) hervorgerufen werden (Abb. 2.8). Hierbei entstehen meist benigne Tumoren, sog. Papillome, die sich jedoch nach Beendigung der Behandlung meist wieder zurückbilden (Song et al., 1999). Mit Hilfe dieser Mehrstufenkarzinogenese ist es möglich, unter Verwendung eines Tumorinitiators und eines Tumorpromotors, die Rolle des zu untersuchenden Transgens bei der Tumorentstehung zu prüfen (siehe 6.13.). Eine möglicherweise vorhandene Beteiligung des kutanen MnPV-E6-Proteins in der Tumorentstehung könnte hierbei aufgezeigt werden.

Zur Durchführung der Versuche wurde die Konzentration des Tumorinitiators DMBA zur Behandlung der FVB/N-Mauslinie anhand der Arbeit von Kang et al., (2000) eingesetzt. Für HPV16-E6-transgene Mäuse wurde gezeigt, daß eine zu hoch eingesetzte Konzentration des Tumorpromotors die Tumorentstehung in nicht-transgenen Mäusen so stark erhöhen kann, daß kein Unterschied in der Tumorentstehung im Vergleich zur analysierten transgenen Linie mehr bestehen würde (Song et al., 1999).

#### **2.1.3.1 Planung der Mehrstufenkarzinogenese**

Mit Hilfe der Mehrstufenkarzinogenese wurde zunächst die am stärksten exprimierende MnPV-E6-transgene Linie HP 22-42 untersucht. Als Lösungsmittel für Tumorinitiator und Tumorpromotor diente hierbei Azeton. Da bisher keine Daten über die Entstehung von Tumoren in MnPV-E6-transgenen Linien vorlagen, wurde an Hand von Fallzahlüberlegungen der Biostatistik die Anzahl von Versuchstieren in den einzelnen zu untersuchenden Gruppen ermittelt.

#### 2.1.3.1.1 Fallzahlüberlegungen:

Für diese Fallzahlüberlegungen wurden Ergebnisse über die erwartete Anzahl von Papillomen und ihrer Variabilität, sowie über die Karzinomentstehung aus früheren Experimenten mit einer Initiation von 100 nmol DMBA und einer Promotion von 2,5 nmol TPA bei HPV16-E6-transgenen Mäusen des FVB/N-Stamms zugrundegelegt (Song et al., 2000).

##### Berechnung der Tierzahlen der Azeton/Azeton und Azeton/ TPA Gruppe:

In diesen Gruppen wurde als Zielgröße die maximale Papillomanzahl pro Tier angenommen.

Die Fallzahlplanung orientierte sich am Vergleich FVB/N Wildtyp zu MnPV-E6-transgen. In der Wildtyp-Linie wurden bei Behandlung 0,1 Papillome/Tier mit einer Standardabweichung von 0,1 Papillome/Tier erwartet. Eine Erhöhung der maximalen Papillomanzahl pro Tier auf 1 (mit einer Standardabweichung von 1) sollte mit einer Wahrscheinlichkeit von 80% entdeckt werden. Bei dem einseitigen t-Test zum Niveau von 5% ergab sich für die Gruppen Azeton/Azeton und Azeton/TPA sowohl für die Wildtyp-Mäuse als auch für die MnPV-E6-transgene Linie eine erforderliche Tierzahl von **10 Tieren pro Gruppe**.

##### Berechnung der Tierzahlen der DMBA/Azeton und DMBA/TPA Gruppe:

In diesen Gruppen wurde als Zielgröße für die Fallzahlplanung die Rate karzinomtragender Tiere bis zum Versuchsende angenommen.

Die Fallzahlplanung für diese beiden Gruppen orientierte sich am Vergleich FVB/N Wildtyp zu MnPV-E6-transgenen Mäusen. In der Wildtyp-Linie wurden bei Behandlung DMBA/Azeton keine karzinomtragenden Tiere erwartet. Für die Fallzahlplanung wurde hier von einer Rate von 5 % ausgegangen. Eine Erhöhung der Rate auf 20 % sollte mit einer Wahrscheinlichkeit von 80 % entdeckt werden. Beim einseitigen Test von Fischer zum Niveau von 5 % ergab sich für die Gruppe DMBA/Azeton sowohl für die Wildtyp-Tiere als auch für die MnPV-E6-transgene Linie eine erforderliche Tierzahl von **37 Tieren pro Gruppe**.

In der Wildtyp-Linie wurden bei Behandlung mit DMBA/TPA maximal 25 % karzinomtragende Tiere erwartet. Eine Erhöhung der Karzinomrate auf 50 % sollte mit einer Wahrscheinlichkeit von 80 % entdeckt werden. Beim einseitigen Test von Fischer zum Niveau von 5 % ergab sich für die Gruppe DMBA/TPA sowohl für die Wildtyp als



auch für die MnPV-E6-transgene Linie eine erforderliche Tierzahl von **54 Tieren pro Gruppe**.

Die Berechnung der Tierzahlen wurde von Frau Kopp-Schneider (Biostatistik, DKFZ-Heidelberg) durchgeführt.

Die ermittelten Tierzahlen sind folgend tabellarisch aufgeführt:

Gruppe	Initiation	Promotion	Gruppengröße	Tierzahl/Gruppe
FVBN Wildtyp	Azeton	Azeton	10	
FVBN Wildtyp	Azeton	TPA	10	
FVBN Wildtyp	DMBA	Azeton	37	
FVBN Wildtyp	DMBA	TPA	54	111

Gruppe	Initiation	Promotion	Gruppengröße	Tierzahl/Gruppe
MnPV-E6-transgen	Azeton	Azeton	10	
MnPV-E6-transgen	Azeton	TPA	10	
MnPV-E6-transgen	DMBA	Azeton	37	
MnPV-E6-transgen	DMBA	TPA	54	111

#### 2.1.3.1.2 Vorbereitungen zum Erhalt der Tierzahlen

Nach Empfehlung anderer Arbeitsgruppen (G.Fürstenberger, DKFZ-Heidelberg) sollten nur weibliche Mäuse in die Versuche eingesetzt werden. Weibchen sind leichter in Gruppen von 10 Tieren pro Käfig zu halten und zeigen auch eine geringere Aggressivität während der Behandlungs- und Beobachtungszeit.

Es mußten somit zu Beginn der Mehrstufenkarzinogenese 111 Weibchen sowohl für die Wildtyp-Linie als auch für die MnPV-E6-transgene Linie HP 22-42 zur Verfügung stehen. Zusätzlich mußten alle Tiere im Alter von 4 Wochen in den Versuch eingesetzt werden. Eine Variation im Alter der Mäuse kann zu abweichenden Ergebnissen und letztendlich zu falschen Schlußfolgerungen führen.

Da die zu untersuchenden MnPV-E6-transgenen Mäuse ihren transgenen Status nur heterozygot trugen und daher nur ca. 50 % der Nachkommen das Transgen exprimierten und davon wiederum nur ca. 50 % weibliche Tiere waren, wurden zunächst 52 transgene Männchen erzeugt, die anschließend mit jeweils zwei Wildtyp-Weibchen verpaart wurden. Bei einer Wurfgröße von sechs bis zehn Mäusen ergab sich somit eine Nachkommenanzahl von 875 Tieren, wovon statistisch nur ca. die Hälfte positiv transgen und davon wiederum nur ca. 50% Weibchen waren.

---

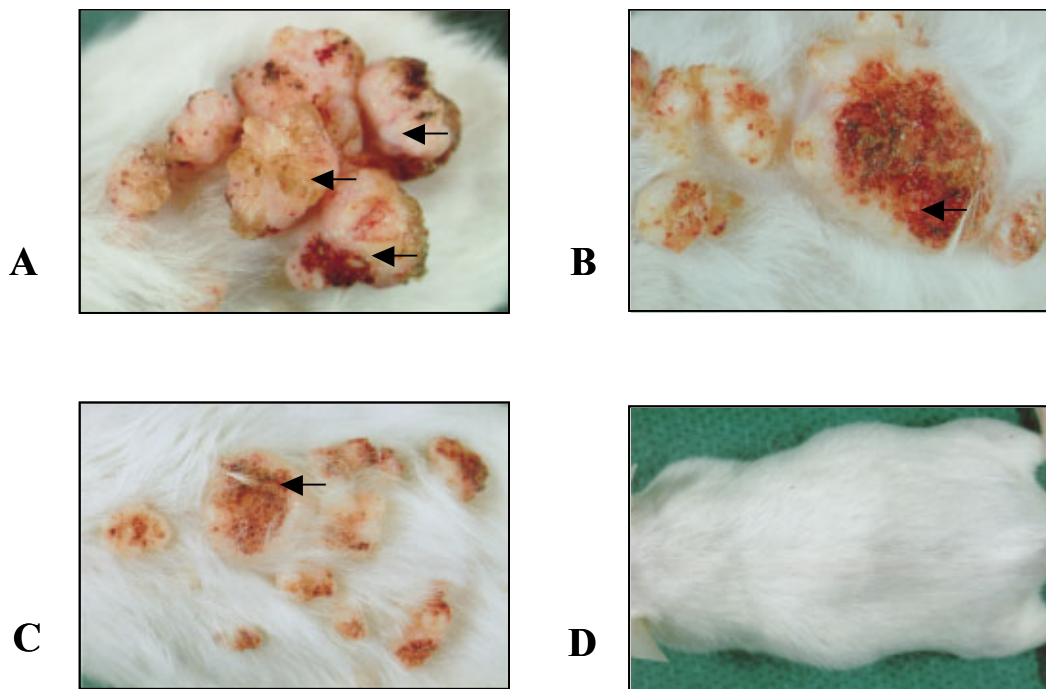
Nach ca. 21 Tagen wurden die ersten Würfe geboren und die als Männchen identifizierten Mäuse sofort abgetötet. Die geborenen 354 Weibchen wurden im Alter von 4 Wochen mit Hilfe der Schwanzspitzenbiopsie und dem Nachweis des  $\beta$ -Gal-Reporters mittels X-gal auf ihren transgenen Status hin überprüft. In die Mehrstufenkarzinogenese wurden 120  $\beta$ -Gal-positive Mäuse eingesetzt.

Als Tiere der FVB/N Wildtyp-Kontrollgruppen wurden die mittels der Schwanzspitzenbiopsie als nicht-transgen analysierten Weibchen eingesetzt.

### **2.1.3.2 Klassifizierung der Hauttumoren**

Die während der Mehrstufenkarzinogenese entstandenen Tumoren wurden wöchentlich gezählt und bei einer Größe von maximal 1 cm Durchmesser nach Abtötung der Maus durch cervikale Dislokation entnommen. Eine Hälfte des jeweiligen Tumors wurde zur histologischen Analyse über Nacht in 4% PFA fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Die zweite Hälfte wurde zur späteren DNA-Isolierung bzw. zur Herstellung von Kryostatschnitten bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Rein makroskopisch konnte schon während der Behandlung eine Unterteilung in „papillomartiger Geschwulst“ und „nicht-papillomartiger Geschwulst“ getroffen werden. Typisch für Papillome war hierbei die äußere, stark eingefaltete, blumenkohlartige Struktur, die meist sehr entzündlich und verkrustet erschien. Es wurden einige makroskopisch identifizierten Papillome und alle als „Nichtpapillom“ erkennbaren Geschwülste histologisch untersucht (Abb. 2.9).



**Abb. 2.9 Geschwülste auf der Rückenhaut von DMBA/TPA-behandelten Mäusen in der 15. Behandlungswoche**

Die zunächst makroskopische Klassifizierung der Geschwülste wurde nachfolgend histologisch bestätigt. **A:** Papillom (bzw. papillomatöse Hyperplasie des Plattenepithels), **B:** Keratoakanthom, **C:** Plattenepithelzellkarzinom, **D:** Rücken einer Maus aus einer Kontrollgruppe

Die Hauttumoren wurden mit Hämalaun/Eosin gefärbt und histologisch diagnostiziert.

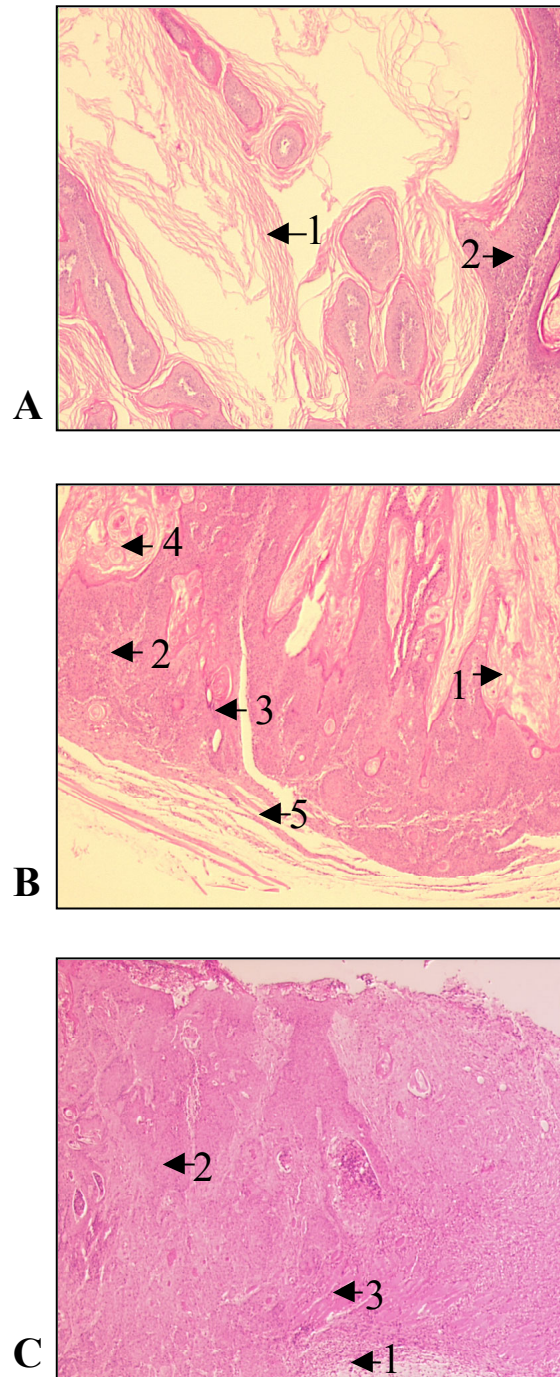
Die histologische Diagnostik wurden von Prof. Dr. Gröne und D.Trick (Pathologisches Institut, DKFZ-Heidelberg) durchgeführt.

Es wurden drei Tumorklassifizierungen vorgenommen:

1. Papillom bzw. papillomatöse Hyperplasie des Plattenepithels (benigner Tumor)
2. Keratoakanthom (benigner Tumor)
3. Plattenepithelzellkarzinom (maligner Tumor)

Beim Papillom handelt es sich um gutartige Hautwarzen, die eine sehr starke Einfaltung der basalen Zellschichten und Hyperkeratosen aufweisen (Abb. 2.10A). Im Gegensatz dazu, besitzen die ebenfalls benignen Keratoakanthome einen typischen Hornstachel im Innern, der dieser Tumorart auch ihren Namen verleiht (Kerato = Horn, Akanth = Stachel, om = Geschwulst). Keratoakanthome zeichnen sich weiterhin durch Entzündungsherde, häufig auftretende Keratinperlen und dysplastische Epithelien im Inneren des Tumors aus. Im Vergleich zu Plattenepithelkarzinomen ist dieser Tumor jedoch noch von der darunter befindlichen Muskelschicht deutlich abgegrenzt (Abb. 2.10B). Die Plattenepithelzellkarzinome können wie die Keratoakanthome Keratinperlen enthalten, besitzen jedoch sowohl entzündliche Bereiche als auch karzinome Bereiche,

die eine völlige Entartung der Zellen aufweisen. Dies wird durch eine hohe Anzahl in Mitose befindlichen Zellen und Entartung der Zellform sichtbar. Ein ebenso eindeutiger Hinweis für ein malignes Wachstum ist die typische Infiltration des Tumors in die darunterliegende Muskelschicht (Abb. 2.10C).



**Abb. 2.10 Histopathologie der während der Mehrstufenkarzinogenese entstandenen Hauttumoren**  
**A:** Papillom 1= Keratinschicht, 2= Hyperplasie der Plattenepithelzellschicht **B:** Keratoakanthom 1= Hornstachel, 2= Entzündungsherde, 3= Dysplasie des Epithels, 4= Keratinperlen, 5= Muskelschicht  
**C:** Plattenepithelzellkarzinom 1=Muskelschicht 2= Karzinomareale, 3= Infiltration des Tumors in die Muskelschicht

### 2.1.3.3 Auswertung der Mehrstufenkarzinogenese

Bei den mit Azeton/Azeton behandelten Tiergruppen (Gruppe 1) zeigten sowohl die MnPV-E6-transgenen Tieren als auch die Wildtyp-Mäuse keine Tumoren. Durch diese Kontrolle wurde gezeigt, daß alleine durch eine Applikation von Azeton, das sowohl als Lösungsmittel des Tumorinitiators (DMBA) als auch des Tumorpromotors (TPA) verwendet wurde, keine Hauttumoren ausgelöst werden konnten.

Ebenso entstanden in den Gruppen der MnPV-E6-transgenen Tiere und der Wildtyp-Mäuse, die ausschließlich mit dem Tumorinitiator DMBA (Gruppe 2) oder dem Tumorpromotor TPA (Gruppe 3) behandelt wurden, keine Hauttumoren. Während der 20 wöchigen Behandlungszeit und der anschließenden Beobachtungszeit entstanden ab der 7. Behandlungswoche ausschließlich in der mit DMBA/TPA behandelten Gruppe der Linie HP 22-42 und der Wildtyp-Kontrollgruppe Hautgeschwülste.

Mit Hilfe der Bioinformatik wurden die Daten, welche durch wöchentliches Verzeichnen der gebildeten Tumoren in der DMBA/TPA Gruppe entstanden, ausgewertet. Hierzu wurde die Anzahl der Tiere mit vorhandenen Papillomen als auch die Anzahl der Papillome pro Tier dokumentiert. Die Berechnung der prozentualen Anzahl der Tiere mit Keratoakanthomen, bzw. mit Plattenepithelzellkarzinomen pro Gruppe, wurde unter Verwendung des Kaplan-Meier Verfahrens durchgeführt. Nach der Analyse zeigte sich, daß über 90 % der MnPV-E6-transgenen Mäuse bis zum Versuchsende maligne Plattenepithelzellkarzinome bildeten. Vergleichend hierzu entwickelten bis zum Ende der Beobachtungszeit lediglich 10 % der Wildtyp-Mäuse Plattenepithelzellkarzinome. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2.12 dargestellt. Für die Papillome wurde aufgrund der biostatistischen Auswertung deutlich, daß sowohl in der Papillomanzahl pro Tier als auch in der Anzahl der papillomtragenden Tiere kein signifikanter Unterschied der MnPV-E6-transgenen Linie HP 22-42 zur Wildtyp-Kontrolle bestand (Abb. 2.12A, B). In beiden Linien traten die ersten Papillome in der 7. Behandlungswoche nach Initiation auf und die Anzahl der Papillome zeigten in beiden Linien einen größtenteils übereinstimmenden Kurvenverlauf.

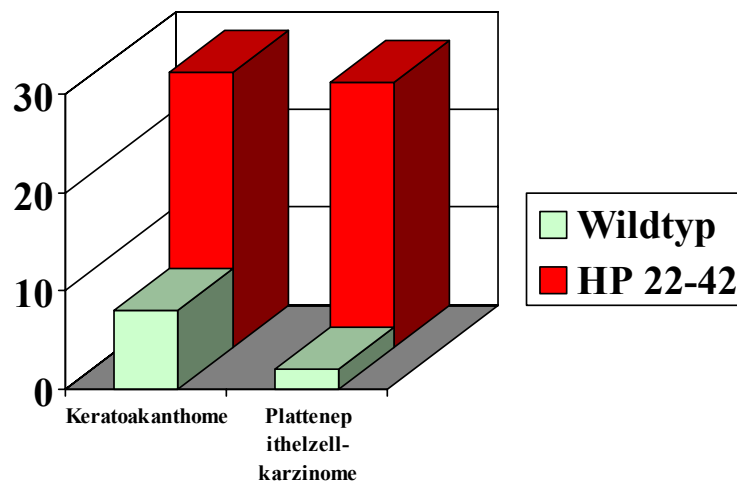
Im Gegensatz hierzu zeigten sich jedoch entscheidende Unterschiede in der Anzahl der Plattenepithelzellkarzinomen zwischen der MnPV-E6-transgenen Linie HP 22-42 und der Wildtyp-Kontrolle (Abb. 2.12C, D). So wurden mittels histologischer Diagnostik 27 Plattenepithelzellkarzinome in der transgenen Linie HP 22-42 im Vergleich zu 2 Plattenepithelzellkarzinomen in der Wildtyp-Kontrolle verzeichnet (Abb. 2.11). Der Unterschied der beiden Linien bezüglich der Karzinomentstehung war statistisch höchst

signifikant ( $p < 0,0001$ ). Die meisten Karzinome entstanden zwischen der 21. Woche, dem Ende der TPA-Behandlung, und der 36. Woche, dem Ende der Beobachtungszeit. Eine Beobachtungszeit bis zur 40. Woche konnte nicht eingehalten werden, da aufgrund der überschreitenden Tumorgöße von 1 cm Durchmesser alle Mäuse der DMBA/TPA Gruppe bis zur 36. Versuchswoche abgetötet wurden. Ein statistisch signifikanter Unterschied ( $p = 0,02$ ) bestand ebenso für die Entstehung von Keratoakanthomen. Die Keratoakanthome der MnPV-E6-transgenen Linie HP 22-42 entstanden zu einem früheren Zeitpunkt des Versuches als die Keratoakanthome der Wildtyp-Kontrolle.

In den Gruppen die ausschließlich mit dem Tumorigenitor DMBA bzw. mit dem Tumorpromotor TPA behandelt wurden, entstanden keine Hauttumoren. Hierbei wurde deutlich, daß das MnPV-E6-Protein weder die Wirkung eines Tumorigenitors noch eines Tumorpromotors ersetzen konnte. Die MnPV-E6-transgene Linie zeigte jedoch einen höchst-signifikanten Unterschied in der Anzahl der entstandenen Plattenepithelzellkarzinomen im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle.

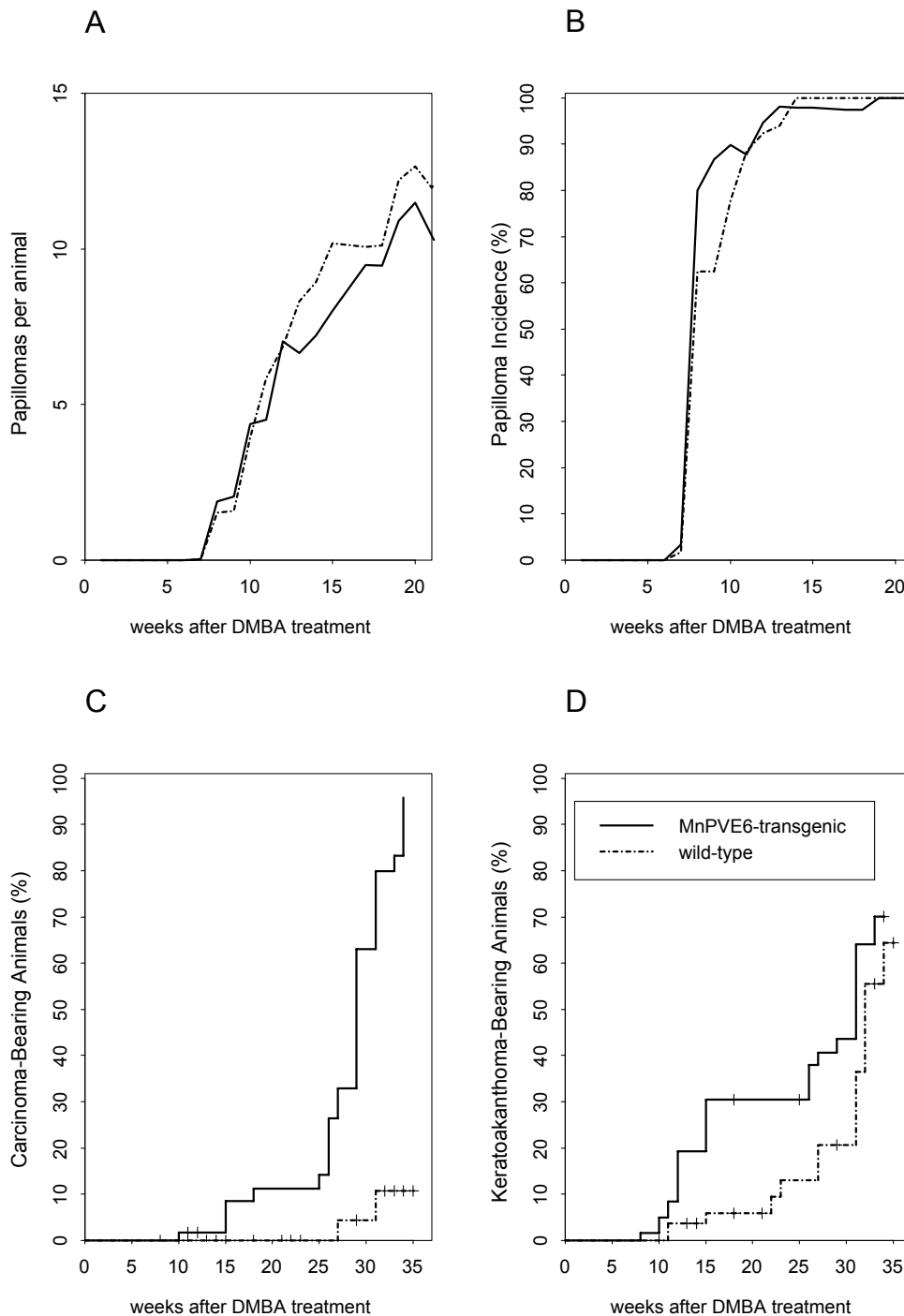
Aufgrund dieser Ergebnisse konnte man eine Beteiligung des kutanen MnPV-E6-Proteins an der Umwandlung benignen Tumoren zu malignen Stadien vermuten.

Das kutane MnPV-E6-Protein hätte somit einen Einfluß auf die Tumorprogression.



**Abb. 2.11 Anzahl entstandener Keratoakanthomen und Plattenepithelzellkarzinomen in den mit DMBA/TPA behandelten Gruppen**

Dargestellt wurde die MnPV-E6-transgene Linie HP 22-42 und die FVB/N Wildtyp-Kontrolle.



**Abb. 2.12 Tumorhäufigkeit in der mit DMBA/TPA behandelten Gruppe der MnPV-E6-transgenen Linie HP 22-42 im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle**

**A:** Anzahl der entstandenen Papillome pro Tier (während der Behandlungszeit von 20 Wochen nach Initiation), **B:** Prozentuale Anzahl der Tiere, die Papillome entwickelten (während der 20 wöchigen Behandlungszeit nach Initiation), **C:** Prozentualer Anteil der Tiere mit Plattenepithelzellkarzinomen im Zeitraum von 36 Wochen nach Initiation unter Verwendung des Kaplan-Meier Verfahrens, **D:** Prozentualer Anteil der Tiere mit Keratoakanthomen im Zeitraum von 36 Wochen nach Initiation, unter Verwendung des Kaplan-Meier Verfahrens. Alle Daten wurden sowohl für die MnPV-E6-transgene Linie HP 22-42 (durchgezogene Linie) als auch für die Wildtyp Kontrolle (unterbrochene Linie) berechnet und dargestellt. Das Kaplan-Meier Verfahren ist ein statistisches Standardverfahren zur Darstellung von Überlebensraten, wobei der Ausfall eines Untersuchungsobjektes durch vorzeitigen Tod berücksichtigt wird (Chapman und Hall, 1991).

---

Zur Bestätigung dieser Resultate wurde die Mehrstufenkarzinogenese mit einer zweiten, unabhängigen MnPV-E6-transgenen Linie durchgeführt. Die Linie HP 21-2 zeigte ebenso wie die Linie HP 22-42 eine starke Expression des MnPV-E6-Transgens in der Haut (Abb. 2.3B). Zudem konnte durch eine zweite Linie bestätigt werden, daß die Unterschiede in der auftretenden Karzinomhäufigkeit nicht durch den Integrationsort des Konstruktes im Mausgenom ausgelöst wurde.

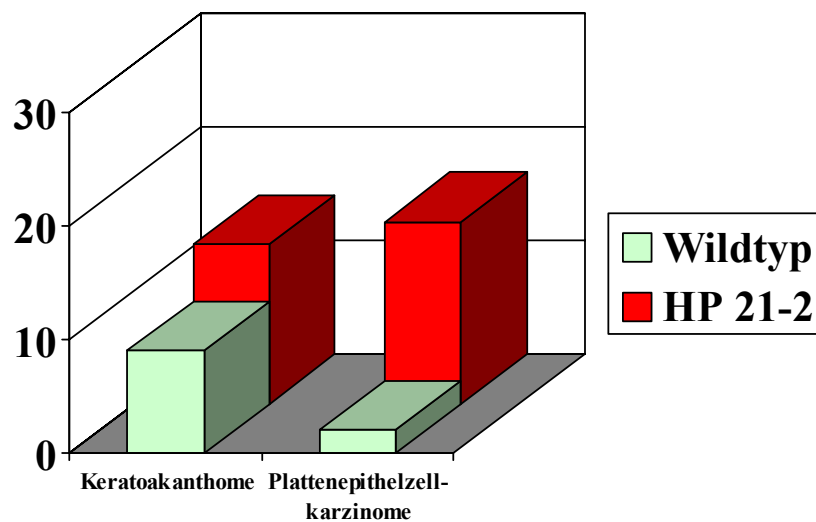
Aufgrund der sich zuvor ergebenden Unterschiede bezüglich der Karzinomentstehung, wurden 27 MnPV-E6-transgene Mäuse der Linie HP 21-2 und 30 FVB/N Wildtyp-Mäuse in die DMBA/TPA Gruppe eingesetzt und wie zuvor behandelt.

Im Gegensatz zur vorherigen Linie wurde nun eine Einzeltierbeobachtung durchgeführt. Hierzu wurde der Entstehungsort der Hautgeschwülste auf einem Umriß einer Maus wöchentlich verzeichnet, so daß eine spätere Aussage über die Entwicklung jedes einzelnen Tumors nachvollzogen werden konnte. Die entstandenen Tumoren wurden entnommen und histologisch analysiert.

Auch in dieser Linie entstanden Hautgeschwülste die als Papillom (papillomatöse Hyperplasie des Plattenepithels), Keratoakanthom und Plattenepithelzellkarzinom diagnostiziert wurden. Nach erfolgter Auswertung der Daten mit Hilfe der Biostatistik konnte auch hier, wie bei der MnPV-E6-transgenen Linie HP 22-42, ein deutlicher Unterschied in der Karzinomentstehung der MnPV-E6-transgenen Mäuse im Vergleich zur Kontrolle verzeichnet werden (Abb. 2.14C). Es konnte hierbei mit einer Signifikanz von  $p=0,002$  ein Unterschied der MnPV-E6-transgenen Linie HP 21-2 im Vergleich zur Wildtyp Kontrolle bezüglich der Karzinomentstehung und mit einer Signifikanz von  $p=0,02$  das Auftreten von Keratoakanthomen (Abb. 2.14D) ermittelt werden. Ein Unterschied bezüglich der Anzahl der Papillome pro Tier bzw. der Anzahl papillomtragender Tiere im Vergleich von MnPV-E6-transgenen Mäusen der Linie 21-2 zu Wildtyp-Tieren konnte hier ebenfalls nicht festgestellt (Abb. 2.14A, B).

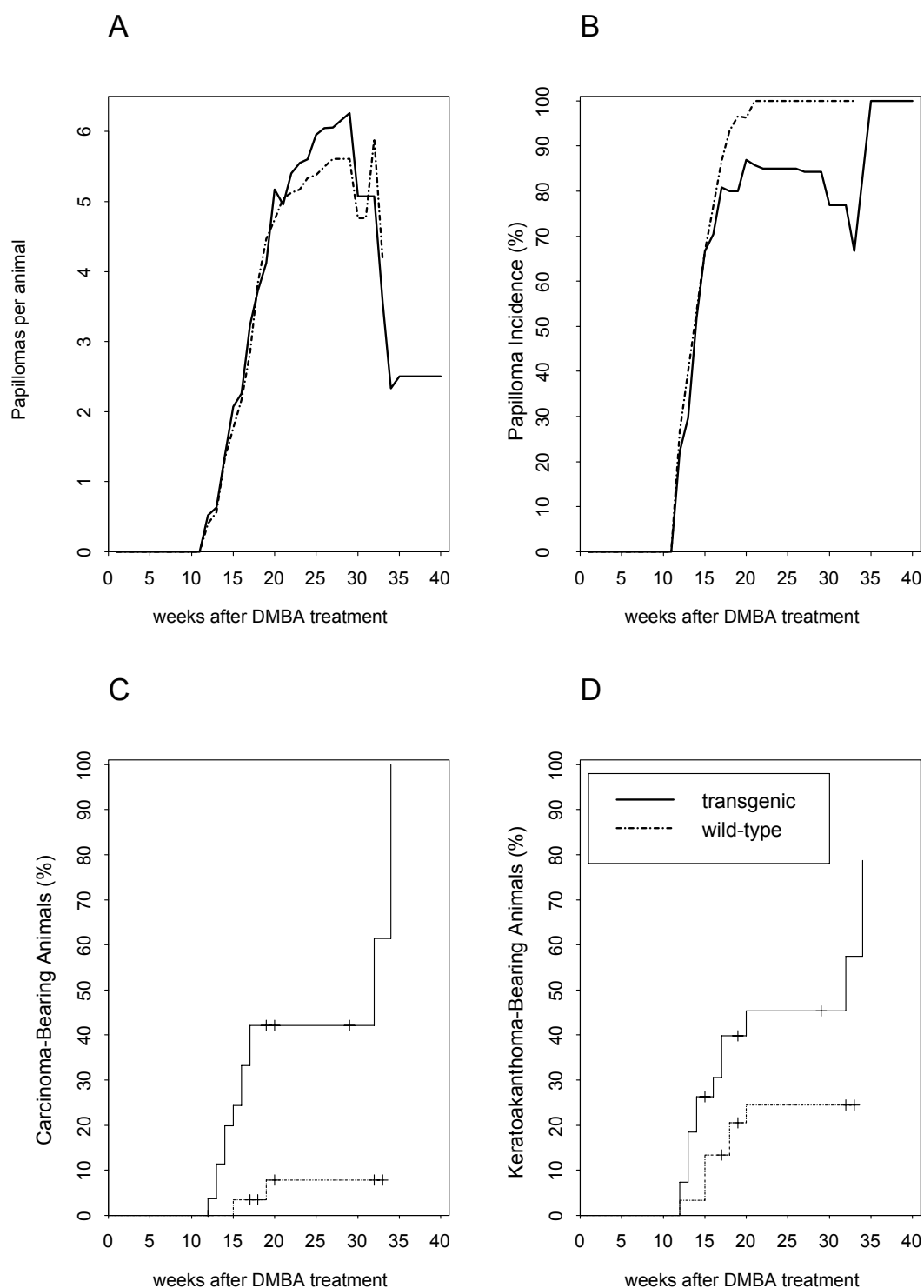


Die Ergebnisse der MnPV-E6-transgenen Linie HP 21-2 bestätigten hierbei die zuvor erhaltenen Resultate der Linie HP 22-42 bezüglich der eindeutig erhöhten Karzinomentstehung in MnPV-E6-transgenen Mäusen (Abb. 2.13). Die Vermutung, daß das E6-Protein des kutanen MnPV eine erhöhte Tumorprogression in der Haut MnPV-E6-transgener Mäuse bewirkt konnte daher erneut bestätigt werden.



**Abb. 2.13 Anzahl von Keratoakanthomen und Plattenepithelzellkarzinomen in den mit DMBA/TPA behandelten Gruppen**

Dargestellt wurde die MnPV-E6-transgene Linie HP 21-2 und die FVB/N Wildtyp-Kontrolle.



**Abb.2.14 Tumorhäufigkeit in der mit DMBA/TPA behandelten Gruppe der MnPV-E6-transgenen Linie HP 21-2 im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle**

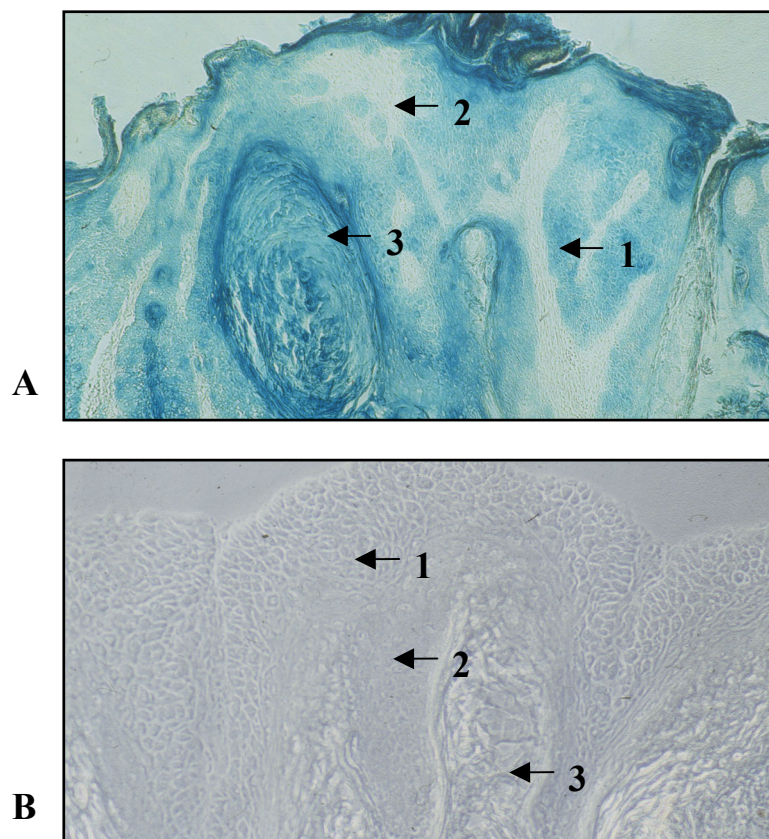
**A:** Anzahl der entstandenen Papillome pro Tier (während der Behandlungszeit von 20 Wochen nach Initiation), **B:** Prozentuale Anzahl der Tiere, die Papillome entwickelten (während der 20 wöchigen Behandlungszeit nach Initiation), **C:** Prozentualer Anteil der Tiere mit Plattenepithelzellkarzinomen im Zeitraum von 40 Wochen nach Initiation unter Verwendung des Kaplan-Meier Verfahrens, **D:** Prozentualer Anteil der Tiere mit Keratoakanthomen, im Zeitraum von 40 Wochen nach Initiation, unter Verwendung des Kaplan-Meier Verfahrens. Alle Daten wurden sowohl für die MnPV-E6-transgene-Linie HP 21-2 (durchgezogene Linie) als auch für die Wildtyp Kontrolle (unterbrochene Linie) berechnet und dargestellt.

#### 2.1.4 Lokalisation der Transgen-Expression in Keratoakanthomen

Die während der Mehrstufenkarzinogenese entstandenen Keratoakanthomen wurden auf die Lokalisation ihrer Transgen-Expression überprüft. Hierbei wurde die Expression des lacZ-Reporters mit Hilfe des chromogenen Substrates X-gal detektiert.

Es wurden hierzu Kryostatschnitte von Keratoakanthomen der MnPV-E6-transgenen Linie und der Wildtyp-Kontrollen hergestellt und diese entsprechend des Nachweises auf  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität behandelt (Abb. 2.15).

Hierbei zeigten die Keratoakanthomen der transgenen Mauslinie HP 22-42 eine  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität in den Keratinperlen und der Basalzellschicht, die aufgrund der Tumorentstehung eine starke Hyperplasie aufwies (Abb. 2.15A). Im Vergleich hierzu zeigten die Wildtyp-Keratoakanthomen keine  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität (Abb. 2.15B). Dies verdeutlichte, daß es sich bei der detektierten  $\beta$ -Galaktosidase nicht um eine endogen-produzierte sondern um die bakterielle, durch das bicistronische Transgen-Konstrukt codierte  $\beta$ -Galaktosidase handelte.



**Abb. 2.15 Lokalisation der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität in Hauttumoren**

**A:** Keratoakanthom der MnPV-E6-transgenen Linie HP 22-42, **B:** Keratoakanthom der Wildtyp-Kontrolllinie, 1= Basalmembran, 2= Dermis, 3= Keratinperle. Die Schnittdicke der Kryostatschnitte entsprach  $7\mu\text{m}$ . Die Färbung wurde entsprechend der Beschreibung in Kapitel 6.7 vorgenommen.

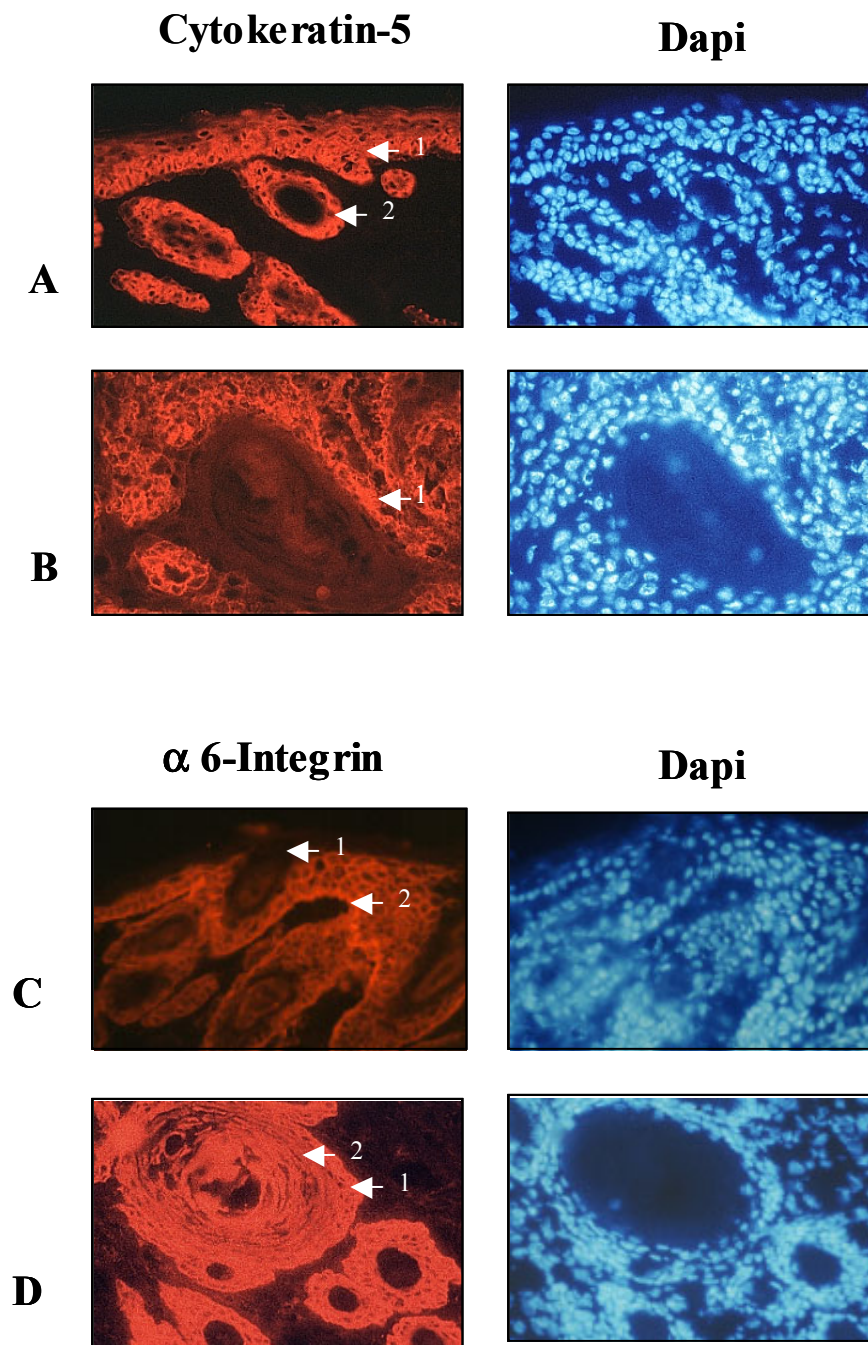
### 2.1.5 Charakterisierung der Epithelien durch molekulare Marker

Das transgene Konstrukt zur Erstellung MnPV-E6-transgener Mäuse zeigte unter Verwendung eines humanen Cytokeratin-14-Promotors eine Transgen-Expression in der Basalzellschicht. In den Epithelien der Haut kommen bevorzugt kombinierte Cytokeratinpaare vor. Hierbei ist das Cytokeratin-14 immer mit Cytokeratin-5 in der Basalzellschicht der Haut assoziiert. Erhöhte Proliferationen in der Haut führen zu typischen Veränderungen im Cytokeratinmuster. Es ist daher möglich, durch Bestimmung der Cytokeratinproteine eine Klassifizierung des Epithels vorzunehmen und den Status der zellulären Differenzierung von mehrschichtigen Epithelien zu bestimmen.

Es wurden die während der Mehrstufenkarzinogenese entstandenen Hauttumoren unter Verwendung eines gegen Cytokeratin-5 gerichteten Antikörpers auf die Lokalisation der Basalzellschicht untersucht (Abb. 2.16A, B). Nach Anfärbung eines Keratoakanthoms konnte die Basalzellschicht als hyperproliferierende Zellschicht der Epidermis dargestellt werden (Abb. 2.16A1). Der Zustand der Basalzellschicht wurde hierbei als tumorspezifisch analysiert. Es fand keine Expression des Cytokeratin-5 in den Keratinperlen statt, da aufgrund der vorhandenen Differenzierung innerhalb des Tumors diese Cytokeratine nicht mehr gebildet werden (Abb. 2.16B1).

Zusätzlich wurde unter Verwendung des Basalmembran-Markers  $\alpha 6$ -Integrin die Lokalisation der Basalmembran und der subbasalen Schichten im Keratoakanthom dargestellt (Abb. 2.16C, D).

Durch die Anwendung des gegen Cytokeratin-5 gerichteten Antikörpers und des Basalmembran-Markers  $\alpha 6$ -Integrin, konnte die zuvor vorgenommene Klassifizierung des Tumors als Keratoakanthom bestätigt werden.



**Abb. 2.13 Immunhistochemische Detektion der epithelialen Schichten bei Keratoakanthomen**

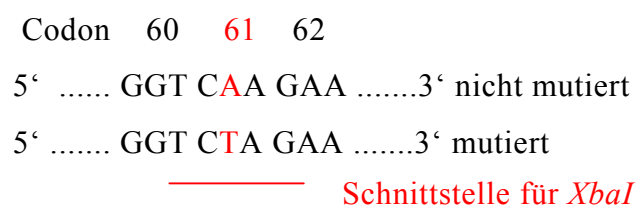
In A und B wurde ein Cytokeratin-5 Antikörper, in C und D ein  $\alpha$ 6-Integrin Marker verwendet. Die dargestellten Ausschnitte sind rechts nochmals mit einer Kernfärbung (Dapi) gezeigt. **A1:** Detektion der Basalschichten der Haut, **A2:** Detektion des um einen Haarfollikel befindlichen Stratum basale, **B1:** Keratinperle, **C1:** Stratum corneum, **C2:** Stratum basale, **D1:** Keratinperle mit umgrenzendem Stratum basale, **D2:** Subbasale Zellschichten

### 2.1.6 Untersuchung der Hauttumoren auf Mutationen im H-ras-Gen

Für HPV16-E6-transgene Mäuse wurde durch den Einsatz in eine Mehrstufenkarzinogenese nachgewiesen, daß HPV16-E6 in Kombination mit anderen Onkogenen, wie z.B. einem aktivierten H-ras-Gen, eine Tumorinduktion auslösen kann (Song et al., 1999). Hierbei wurde als Tumorinitiator ebenfalls DMBA verwendet. Bei den durch DMBA induzierten Mutationen handelte es sich stets um eine Transversion von Adenin zu Thymin in Position 2 von Codon 61 des H-ras-Gens (Lambert et al., 1993; Liu et al., 1995).

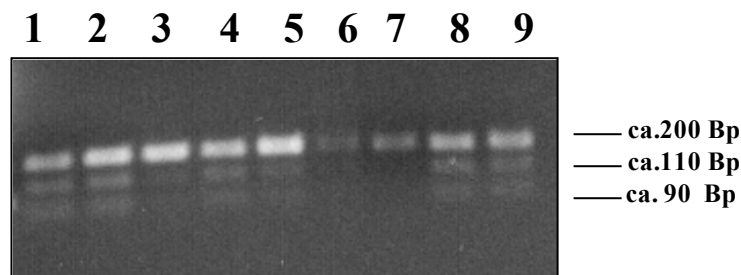
Zur Klärung, inwiefern die Wirkung des kutanen MnPV-E6-Proteins auf die Tumorprogression in der Haut transgener Tiere von einer Aktivierung des H-ras-Gens abhängig war, wurden 50 Tumoren der MnPV-E6-transgenen Mäuse und 44 Tumoren der Wildtyp-Kontrollen analysiert. Hierzu wurde eine DNA-Isolierung aus den unterschiedlichen Tumoren vorgenommen (siehe 6.10.8) und anschließend eine PCR mit spezifischen Ras-Primern durchgeführt (siehe 6.10.9).

Da eine Transversion der 2. Position von Codon 61 des H-ras-Gens eine neue Restriktionsschnittstelle für das Enzym *XbaI* schafft, konnte das PCR-Produkt auf die Anwesenheit dieser Schnittstelle hin überprüft werden (Abb. 2.17). Das durch die PCR amplifizierte Ras-Fragment von 198 Bp wird durch *XbaI* in zwei Fragmente von 110 Bp und 90 Bp geschnitten. Die Ergebnisse der Spaltung sind in Abbildung 2.18 gezeigt. Bei Anwesenheit einer Mutation in Position 2 von Codon 61 des H-ras-Gens wurden drei DNA-Fragmente sichtbar. Hierbei handelte es sich sowohl um das ungeschnittene DNA-Fragment von ca. 200 Bp, das aufgrund des heterozygoten Status der Mutation immer vorhanden sein mußte, als auch um die Spaltprodukte. War keine Mutation vorhanden, wurde nur das ursprüngliche DNA-Fragment von ca. 200 Bp dargestellt.



#### Abb. 2.17 Sequenz des H-ras-Gens

Durch Mutation findet eine Transversion von Adenin in Thymin an Position 2 des Codons 61 statt. Hierdurch entsteht eine Schnittstelle für das Enzym *XbaI*.



**Abb. 2.18 Untersuchung von Tumoren auf Mutation im H-ras-Gen**

Hier am Beispiel von Tumoren der Wildtyp-Linie gezeigt, wurden die während der Mehrstufenkarzinogenese entstandenen Geschwülste auf Anwesenheit einer Restriktionschnittstelle für das Enzym *XbaI* untersucht. Die PCR wurde unter Verwendung spezifischer Ras-Primer durchgeführt. In Probe 1-6 als auch in Probe 8 und 9 waren aufgrund der Mutation des H-ras-Gens, sowohl das ungeschnittene DNA Fragment von ca. 200 Bp als auch die Spaltprodukte mit einer Länge von ca. 110 Bp und 90 Bp sichtbar. Probe 7 enthielt keine Mutation. Nach Spaltung mit *XbaI* wurden die resultierenden Fragmente auf einem mit Ethidiumbromid gefärbten 2 %igen Metaphorgel analysiert (siehe 6.10.7).

Nach abschließender Untersuchung konnten bei 30 von 50 untersuchten Tumoren der MnPV-E6-transgenen Linie HP 22-42 eine Mutation in Position 2 des Codons 61 nachgewiesen werden. Dies entsprach einer prozentualen Mutationsrate von 61 %.

In den untersuchten Tumoren der Wildtyp Kontrolle wurde bei 30 von 44 untersuchten Tumoren eine Mutation detektiert. Hierbei ergab sich eine prozentuale Mutationsrate von 68 %. Die durch DMBA hervorgerufene prozentuale Mutationsrate des H-ras-Gens der MnPV-E6-transgenen Mäuse unterscheidet sich im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle kaum. Hierbei wurde deutlich, daß die Tumorbildung bei MnPV-E6-transgenen Mäusen die Mutationsrate des H-ras-Gens nicht beeinflusst.

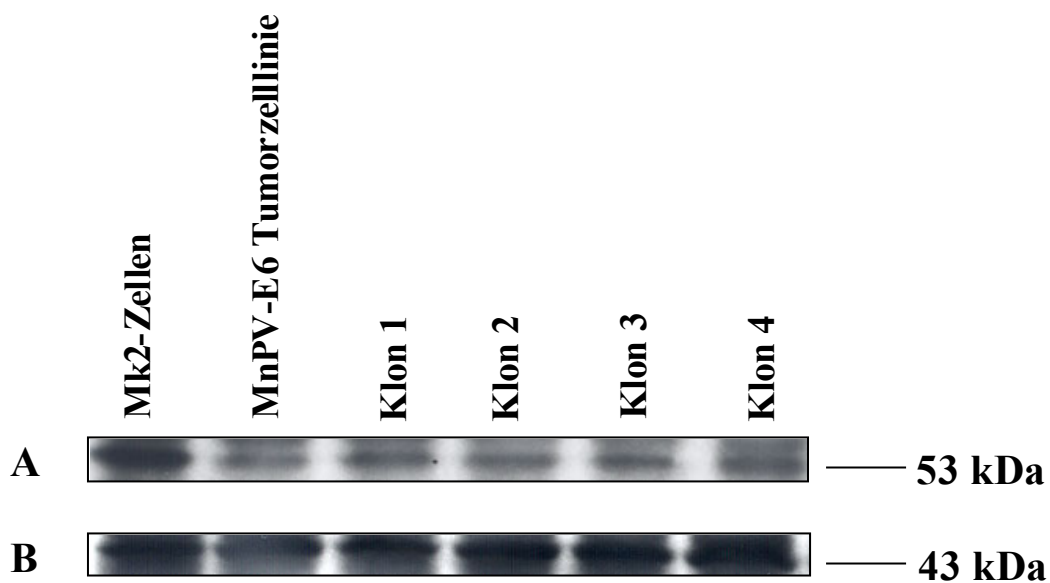
### 2.1.7 Einfluß des kutanen MnPV-E6-Proteins auf die Stabilität des Tumorsupressorproteins p53

Für die genitalen ‚high-risk‘ HPV-Typen HPV16 und 18 konnte gezeigt werden, daß das E6-Protein mit dem Tumorsupressorprotein p53 interagiert und so zu einem Abbau von p53 führt (Storey et al., 1998). Die Interaktion des E6-Proteins mit p53 in HPV16-E6 transgenen Mäusen könnte eine mögliche Erklärung für die gesteigerte Progressionsrate der während der Mehrstufenkarzinogenese entstandenen Hauttumoren darstellen. Da die MnPV-E6 transgenen Mäuse ebenfalls eindeutig eine erhöhte Progression der chemisch induzierten Hauttumoren aufzeigten, könnte dieser Effekt auch hier auf einer möglichen Interaktion mit dem p53-Protein beruhen. Die Detektion des p53-Proteins wurde mit



Hilfe eines Immunnachweises mittels Enhanced chemoluminescence (ECL) unter Verwendung der Western-blot-Technik, durchgeführt (siehe 6.12.3.). Zur Isolierung von p53-Protein wurden vier stabil transfizierte MnPV-E6-Zellklone verwendet, sowie eine Zelllinie, die von einem während der Mehrstufenkarzinogenese entstandenen Plattenepithelzellkarzinom abstammt. Die Etablierung dieser Zelllinie ist in Kapitel 6.3 beschrieben.

Das Ergebnis der p53-Analyse ist in Abbildung 2.19 dargestellt. Im Vergleich zur Mk2-Zelllinie ist eine deutlich geringere Konzentration des p53-Proteins sowohl in den stabilen MnPV-E6-Zelllinien als auch in der Tumorzelllinie zu erkennen. Dies ist ein erster Hinweis darauf, daß das MnPV-E6-Protein einen Abbau des p53 Tumorsupressorproteins bewirken könnte.



**Abb. 2.15 Nachweis des p53-Proteins mittels Westen-blot-Technik**

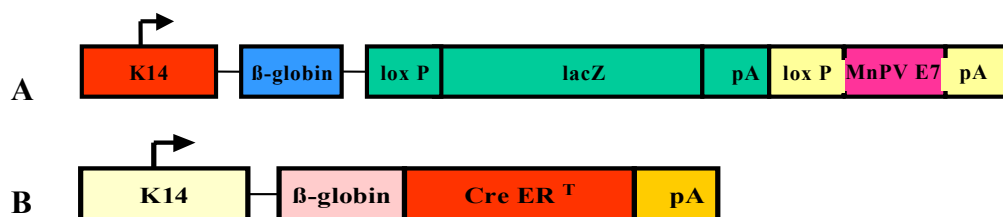
**A:** Es wurde eine Proteinkonzentration von 70 µg pro Tasche aufgetragen und auf einem 15 %igen SDS-Polyacrylamidgel analysiert (siehe 6.12.2.1). **B:** Zum Nachweis gleicher Proteinmengen der einzelnen Proben wurde die Membran mit β-Aktin nachhybridisiert. Die stabil transfizierten Zelllinien wurden durch eine Transfektion des Plasmids pCDNA3/E6 in Mk2-Zellen erstellt. Als Kontrollzelllinie wurden Mk2-Zellen eingesetzt.



**Teil II:****2.2 Etablierung und Untersuchung von induzierbaren *Mastomys natalensis* Papillomvirus-E7-transgenen Mauslinien (MnPV-E7)**

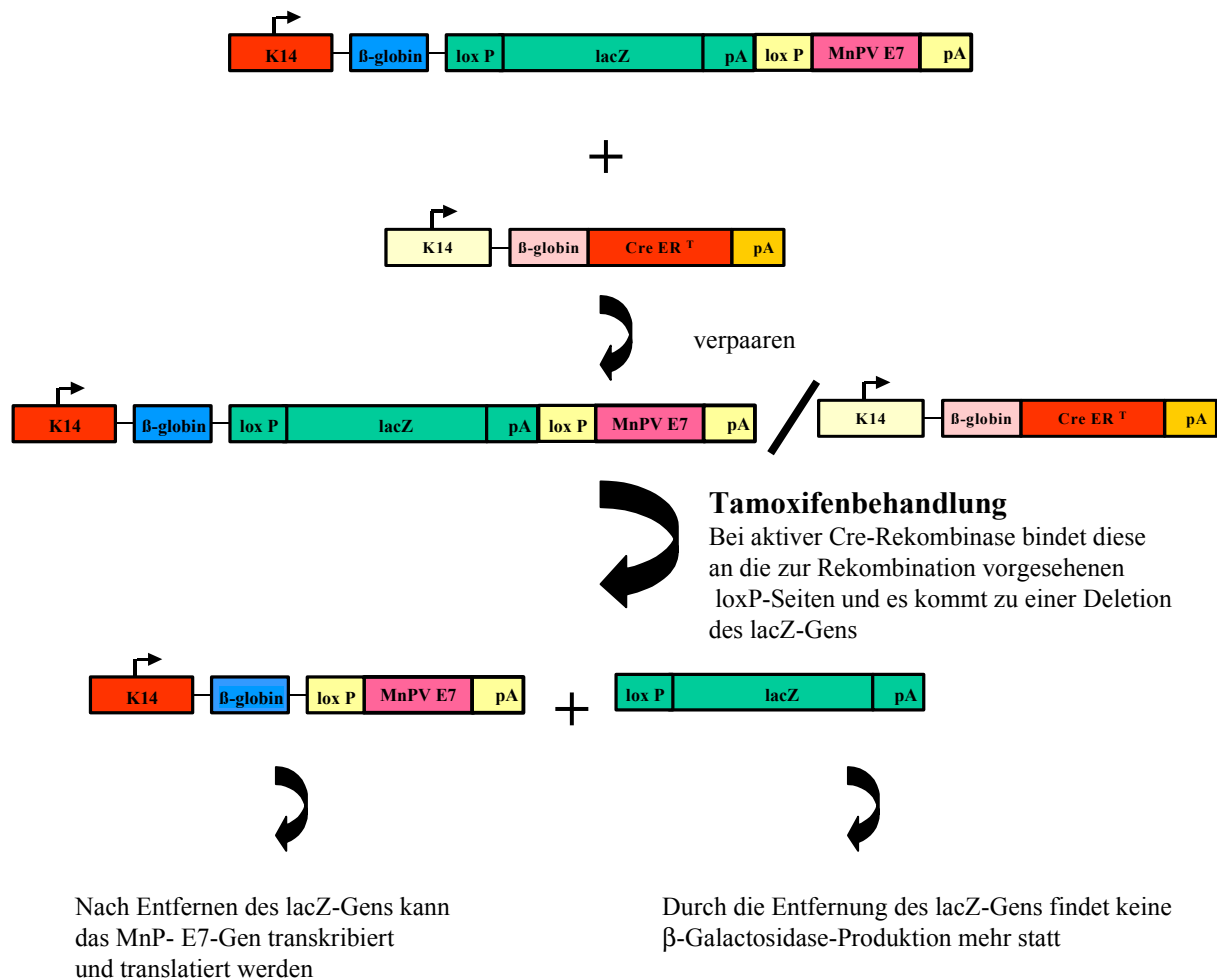
Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden transgene Mäuse mit einem induzierbaren MnPV-E7-Gen etabliert und analysiert.

Unter Verwendung eines transgenen Konstrukts mit konstitutiv-exprimiertem MnPV-E7-Gen wurden keine Nachkommen erhalten. Die Embryonen starben alle pränatal ab (H. Poepperl, persönliche Mitteilung). Daraufhin wurde die Induzierbarkeit der MnPV-E7 Expression durch die Verwendung eines Cre/loxP-Systems gezielt gesteuert (Abb. 2.21). Hierzu wurde eine zweite transgene Linie, die eine tamoxifeninduzierbare Cre-Rekombinase beinhaltet, benötigt (Abb. 2.20B). Auch diese Cre-Rekombinase-transgenen Mauslinien wurden während dieser Arbeit erstellt und die erhaltenen Tiere auf die Expression des Transgens untersucht. Sie trägt ein Fusionsprotein einer bakteriellen Cre-Rekombinase und einer für Tamoxifen anlagerungsfähigen hormonellen Bindungsdomäne eines Estrogen-Rezeptors. Die bakterielle Cre-Rekombinase liegt zuerst inaktiv vor, wird jedoch mittels Tamoxifenbehandlung aktiviert (Abb. 2.21). Durch Verpaarung der Cre-Rekombinase-transgenen Linie mit der MnPV-E7-transgenen Linie und der nachfolgenden Behandlung derer positiver, doppeltransgener Nachkommen mit Tamoxifen, wird die Cre-Rekombinase aktiviert. Folgend wird eine loxP-Seite, das lacZ-Gen und das Polyadenylierungssignal der MnPV-E7-transgenen Mauslinie durch Rekombination entfernt, wodurch das MnPV-E7-Gen schließlich transkribiert und translatiert werden kann.



**Abb. 2.20 Transgene Konstrukte zur Erstellung induzierbarer MnPV-E7-transgener Mäuse**

**A:** Induzierbares MnPV-E7-Konstrukt; K14: Humaner Keratin-14-Promotor/Enhancer;  $\beta$ -globin: Kaninchen  $\beta$ -Globin Intronsequenz mit Exonübergängen; lacZ: Reporter gen codiert  $\beta$ -Galactosidase; pA: Polyadenylierungssignal des SV40 T-Antigens; loxP: Rekombinationsstellen der Cre-Rekombinase; MnPV-E7: Sequenz der MnPV-E7codierenden Bereiche **B:** Konstruktes zur Erstellung Cre-Rekombinase-transgener Mäuse; Cre ER<sup>T</sup>: modifizierte Tamoxifen induzierbare Cre-Rekombinase des P1 Phagen



### Abb. 2.21 Rekombinationsschema des Cre/loxP-Systems

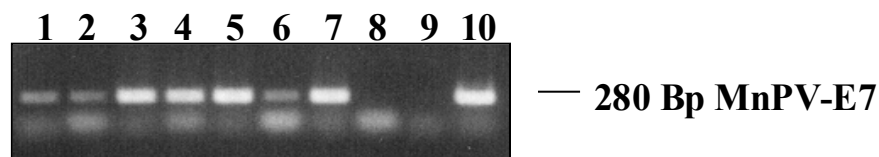
Nach Tamoxifenbehandlung bindet die aktive Cre-Rekombinase an die loxP-Seiten und es kommt zu einer Deletion eines loxP-Elements und des lacZ-Gens mit anschließendem Polyadenylierungssignal.

#### 2.2.1 Erhalt und Weiterzucht der MnPV-E7-transgenen Mäuse

Das Konstrukt K14-βglo-loxP-lacZ-pA-loxP-MnPVE7-pA zur Erstellung der MnPV-E7-transgenen Linien wurde von M. Chen konstruiert und folgend die transgenen Mauslinien von U. Kloz (Transgener Service, DKFZ-Heidelberg) mit Hilfe der Mikroinjektion des DNA-Konstruktes in den Pronukleus befruchteter Eizellen hergestellt (Abb. 2 20A). Die nach der Mikroinjektion geborenen Mäuse wurden mit Hilfe der PCR auf die Anwesenheit des Transgens hin überprüft. Hierzu wurde DNA aus Schwanzspitzenbiopsien verwendet. Von 35 geborenen Tieren zeigten 14 Tiere eine transgene Expression für das MnPV-E7-Gen. Alle 14 Tiere wurden als Founder-Tier (Gründer) einer eigenständigen, transgenen Linie verwendet, da vermutlich bei jeder

Mikroinjektion eine unterschiedliche Integrationsstelle des Konstruktes in das Genom der Tiere erfolgte.

Von 14 transgenen Foundern konnten neun MnPV-E7-transgenen Linien etabliert werden. Pro Linie wurden ca. 10 transgene Tiere gehalten. Um die Paarungsfähigkeit dieser Tiere zu erhalten, wurden sie im Alter von 6-8 Monaten mit FVB/N Wildtyp-Mäusen verpaart und deren Nachkommen mittels PCR auf Transgenität überprüft (Abb. 2.22).



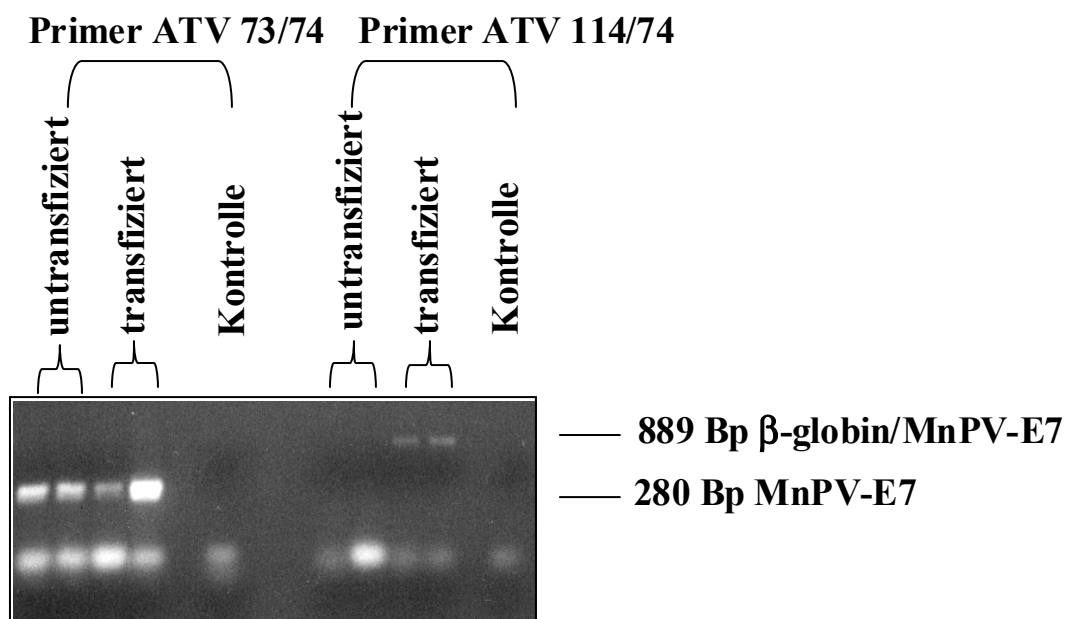
**Abb. 2.22 Überprüfung der MnPV-E7-Transgenität mittels PCR**

Unter Verwendung spezifischer Primer (ATV 73/ATV 74) die einen Teil des MnPV-E7-Gens in einer Länge von 280 Bp amplifizierten, wurden alle erhaltenen Tiere auf Transgenität überprüft. Als ein Beispiel wurde hier die MnPV-E7-transgene Linie E7-1-10 dargestellt (Probe 1-8). Probe 9 wurde als Negativkontrolle ohne beinhaltende DNA mitgeführt, in Probe 10 wurde als Positivkontrolle die DNA des Injektionskonstruktes eingesetzt. Durch Anfärbung des Agarosegels mit Ethidiumbromid wurden die amplifizierten Banden visualisiert. In Linie E7-1-10 besaßen von insgesamt acht getesteten Tieren sieben das MnPV-E7-Gen.

## 2.2.2 Überprüfung der durch Cre-bedingten Rekombination in MnPV-E7-transgenen Mauslinien

Die Rekombination des Transgens durch Cre-Rekombinase bewirkt eine Deletion des lacZ-Gens und bringt das MnPV-E7-Gen an das 5' Ende des RNA Transkripts, dessen Expression durch den Cytokeratin-14-Promotor kontrolliert wird (siehe 6.14). Eine genaue Darstellung der Rekombination ist in Abb. 2.21 aufgezeigt. Nach Erhalt der MnPV-E7-transgenen Mauslinien wurde die Rekombination überprüft. Hierzu wurden von allen neun MnPV-E7-transgenen Linien primäre Keratinozytenkulturen hergestellt und diese mit einem Expressionsplasmid transfiziert, das für eine konstitutiv aktive Cre-Rekombinase kodiert. Einen Tag nach der Transfektion wurde eine DNA-Isolierung aus den Keratinozytenkulturen vorgenommen (siehe 6.10.8) und die DNA in eine PCR eingesetzt (Abb. 2.23). Es wurde hier mit zwei verschiedenen Primerpaaren gearbeitet. Primer ATV 73 mit ATV 74 amplifizieren das MnPV-E7-Gen, Primer ATV 74 mit ATV 114 amplifizieren das MnPV-E7-Gen nur nach Rekombination. Untransfizierte Zellen und Zellen mit nicht funktionsfähiger Rekombination zeigen für die

Primerkombination ATV 74/ATV 114 keine amplifizierten MnPV-E7-Produkte, da bei fehlendem Rekombinationsvorgang, die zu amplifizierende DNA zu lang für das verwendete PCR-Programm war. Mit Hilfe der Überprüfung der Rekombination wurden alle erhaltenen MnPV-E7-transgenen Linien untersucht. Hierbei ergab sich, daß bei vier MnPV-E7-transgenen Linien der Rekombinationsvorgang durch Einsatz einer Cre-Rekombinase aktiv war. Ausschließlich die funktionsfähigen Linien wurden daher weitergeführt, die restlichen Linien wurden abgetötet.



**Abb. 2.23 Cre-abhängige-Rekombination des MnPV-E7-Transgens**

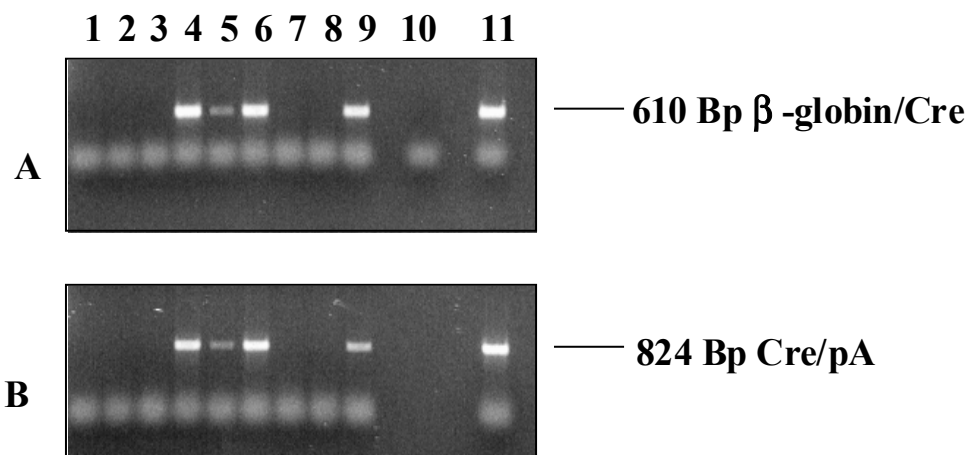
Am Beispiel der Keratinozytenkultur der MnPV-E7-transgenen Linie E7-1-12 dargestellt, wurde nach Anwendung der spezifischen MnPV-E7-Primer ATV 73/ATV 74 eine Bande von 280 Bp amplifiziert. Bei Verwendung der Primer ATV 74 /ATV 114 wurde in den transfizierten Zellen eine für die Cre-abhängige-Rekombination spezifische Bande von 889 Bp amplifiziert.

### 2.2.3 Etablierung und Weiterzucht der Cre-Rekombinase-transgenen Mauslinien

Das Konstrukt zur Erstellung Cre-Rekombinase-transgener Mauslinien stand zu Beginn der Arbeit bereits zur Verfügung (Abb. 2.20B). Es enthält ein vom Cytokeratin-14-Promotor reguliertes Transgen das eine durch Tamoxifen aktivierbare Cre-Rekombinase kodiert. Das Erstellen der transgenen Mauslinien wurde von U. Kloz (Transgener Service, DKFZ-Heidelberg) vorgenommen.

Die nach der Mikroinjektion des transgenen Konstruktes geborenen Mäuse wurden auf die Anwesenheit des Transgens hin überprüft. Hierzu wurde mittels

Schwanzspitzenbiopsie eine DNA-Isolierung vorgenommen und die so erhaltene DNA in eine PCR eingesetzt. Auch hier wurde mit zwei Primerpaaren gearbeitet, wobei Primerpaar ATV 12/ATV 174 ein Fragment des  $\beta$ -Globin-Introns bis zur Cre-Rekombinase und Primerpaar ATV 173/ATV 114 ein Fragment der Cre-Rekombinase bis zum Polyadenylierungssignals amplifizierte. Mit Hilfe der PCR konnte von insgesamt neun Tieren für vier Tiere ein für die Cre-Rekombinase positiver transgener Status ermittelt werden (Abb. 2.24). Die positiven Tiere zeigten bei beiden Primerpaarkombinationen amplifizierte PCR-Produkte in erwarteter Größe. Von insgesamt 55 geborenen Tieren enthielten nur fünf Tiere einen positiv transgenen Status für das Konstrukt der Cre-Rekombinase. Zum Erhalt dieser transgenen Mauslinien wurden die Founder-Tiere mit FVB/N Wildtyp-Mäusen verpaart und deren Nachkommen wiederum mittels PCR auf Transgenität überprüft.

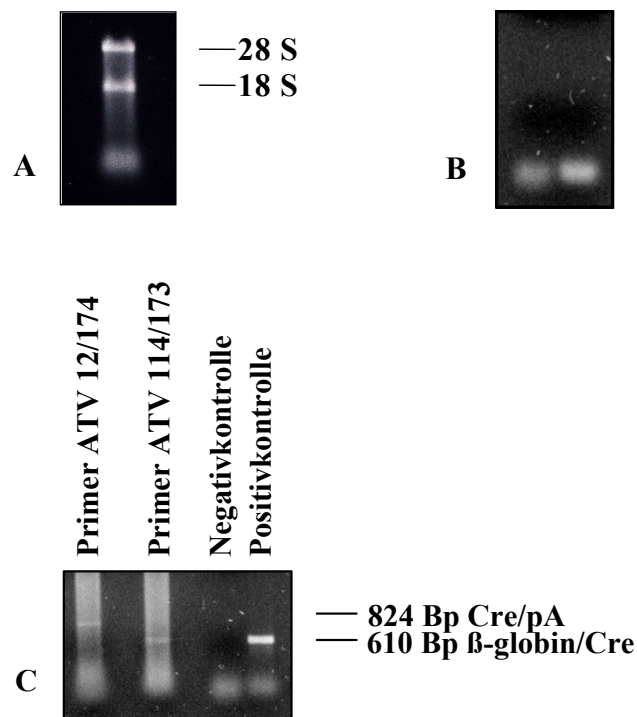


**Abb. 2.24 Überprüfung der Transgenität mittels PCR**

Getestet wurden Tiere die nach dem Transfer des Cre-Rekombinase-Konstruktes geboren wurden. Aus Schwanzspitzenbiopsien isolierte DNA wurde unter Verwendung der zwei spezifischen Cre-Rekombinase Primerpaaren ATV 12/ATV 174 (824 Bp) und ATV 173/ATV 114 (610 Bp) in eine PCR eingesetzt. Die Probenansätze 1-9 wurden mit DNA der erhaltenen Tiere durchgeführt. In Probe 10 wurde als Negativkontrolle eine PCR ohne DNA mitgeführt, in Probe 11 wurde als Positivkontrolle das Cre-Konstrukt direkt eingesetzt. Nach der PCR wurden die amplifizierten Banden auf einem Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel analysiert. **A:** PCR mit Primerpaar ATV 173/ATV174. Von neun getesteten Tieren zeigten vier ein amplifiziertes PCR-Produkt von 610 Bp und somit einen positiven transgenen Status. **B:** PCR mit Primerpaar ATV 12/ATV 174. Die zuvor ermittelten vier transgenen Mäuse zeigten auch mit der zweiten Primerpaarkombination ein amplifiziertes PCR-Produkt von 824 Bp, wodurch der transgene Status bestätigt wurde.

### 2.2.4 Analyse der Cre-Rekombinase-Expression in der Haut transgener Mäuse

Um die Expression der Cre-Rekombinase in den erhaltenen vier Cre-Rekombinase-transgenen Mauslinien zu überprüfen, wurde mit Hilfe einer RNA-Isolierung aus der Maushaut transgener Tiere eine RT-Reaktion und folgend eine PCR durchgeführt. Der Nachweis der Cre-Rekombinase Expression ist in Abbildung 2.24 dargestellt. Die zur PCR verwendeten Primerpaare ATV 12/ATV 174 und ATV 114/ATV 173 entsprachen den Primern zur Überprüfung der Transgenität der Cre-Rekombinase Linie. Nachdem alle vier Cre-Rekombinase-transgenen Linien mit Hilfe der RT-PCR auf die Expression der Cre-Rekombinase in der Haut untersucht wurden, konnte lediglich bei der transgenen Linie Cre-3-25-5 und derer Nachkommen eine Expression nachgewiesen werden.



#### Abb. 2.25 Nachweis der Cre-Rekombinase Expression in der Maushaut

Nach der RNA-Isolierung mittels TRIzol (siehe 6.11.2) wurde diese in einen DNase-Verdau eingesetzt und im Anschluß die Qualität der RNA auf einem 1 % igem MOPS-Gel überprüft. **A:** Detektion der aus Maushaut isolierten RNA nach erfolgtem DNase Verdau auf einem Agarosegel. Dargestellt sind die ribosomalen Banden 28 S und 18 S der Cre-Rekombinase-transgenen Linie Cre-3-25-5. **B:** Die Reaktionsansätze ohne RT zeigten keine amplifizierte Banden. Die amplifizierte Banden entsprachen der erwarteten Größe der PCR-Produkte, waren aber nur schwach zu erkennen. **C:** RT-PCR Analyse der Cre-Rekombinase Expression der transgenen Linie Cre-3-25-5. Als Positivkontrolle wurde das Cre-Konstrukt direkt eingesetzt (Probe 4), als Negativkontrolle wurde die PCR ohne DNA durchgeführt (Probe 3). Die spezifischen Primer zeigten in der Kombination ATV 12/ATV 174 ein amplifiziertes PCR Produkt von 824 Bp (Probe 1) bzw. unter Verwendung von ATV 114/ATV 173 ein PCR-Produkt von 610 Bp (Probe 2).

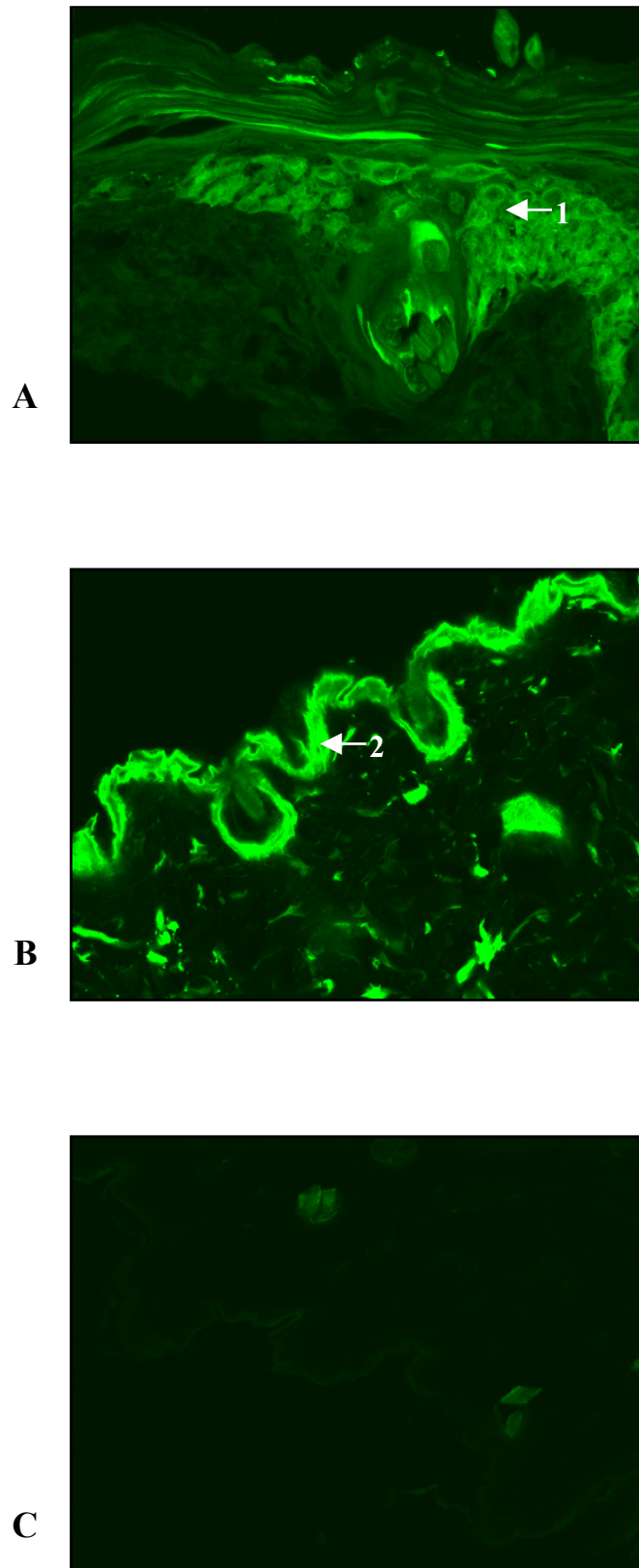
### **2.2.5 Analyse der Lokalisation der Cre-Rekombinaseaktivität in Cre-Rekombinase – transgenen Mäusen**

Um die Cre-Rekombinaseaktivität in den erstellten vier transgenen Linien *in vivo* zu überprüfen, wurde eine eGFP-Reporterlinie verwendet. Diese eGFP-Reporterlinie beinhaltet loxP-Seiten die Exon 2 bis 7 des RAGE-Gens (receptor for advanced glycated end products) flankieren (Constien, 2001). Mit Hilfe der Cre-Rekombinase werden diese RAGE-Elemente an den loxP-Seiten entfernt, wodurch ein Thymidinkinase-Promotor direkt vor die vorher promotorlose eGFP-Region gesetzt wird. Das eGFP-Gen wird transkribiert und kann mittels Immunfluoreszenz anschließend nachgewiesen werden.

Nachdem die vier Cre-Rekombinase-transgenen Mauslinien jeweils mit der eGFP-Reporterlinie verpaart worden waren, konnten Cre-positive Nachkommen im Alter von ca. 6 Wochen mit Tamoxifen behandelt werden. Bei Produktion einer funktionsfähigen Cre-Rekombinase wurde hierbei die eGFP-Transkription im entsprechenden Gewebe der Maus nachweisbar. Es wurden Biopsien der Rückenhaut und des Ohres der Tiere entnommen, Kryostatschnitte hergestellt und die Lokalisation der eGFP-Expression überprüft (Abb.2.26). Mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie konnte eine durch Cre-Rekombinase induzierte eGFP-Produktion ausschließlich in der Epidermis der Cre-Rekombinase-transgenen Mauslinie Cre-3-25-5 detektiert werden. Diese Linie war auch die einzige transgene Linie, in der eine Cre-Rekombinase Expression mittels RT-PCR nachweisbar war. Die Lokalisation des eGFPs entsprach den Erwartungen für eine durch den Cytokeratin-14-Promotor kontrollierte Cre-Rekombinase-Expression.

Es wurden zwei verschiedene Tamoxifen-Behandlungsmethoden zur Aktivierung der Cre-Rekombinase getestet. Bei Mäusen, die das Tamoxifen kutan auf die Haut appliziert bekamen, wurde jedoch eine gesteigerte Proliferation der epidermalen Hautschichten festgestellt (Abb. 2.26A). Dieser Effekt konnte auf der Verwendung von DMSO beruhen, das als Lösungsmittel für die kutane Tamoxifenbehandlung verwendet wurde. In Hautbiopsien transgener Mäuse, welche das Tamoxifen intraperitoneal verabreicht bekamen, wurde dieser proliferative Effekt nicht festgestellt (Abb. 2.26B).

Da im späteren Versuchsverlauf die Analyse der transgenen Linien bezüglich vorhandener Proliferationen in epidermalen Hautschichten analysiert werden sollte, wurde daher weiterführend eine intraperitoneale Applikation des Tamoxifens bevorzugt.



**Abb. 2.26 Lokalisation der eGFP-Transkription in Hautbiopsien**

**A:** Rückenhautbiopsie einer Maus mit kutan appliziertem Tamoxifen, **1=** Hyperproliferation der Epidermis, **B:** Rückenhautbiopsie einer Maus mit intraperitoneal verabreichter Tamoxifen, **2=** Epidermis **C:** Hautbiopsie einer mit Tamoxifen unbehandelten Maus. Die Detektion der eGFP-Expression wurde mittels konfokalem Mikroskop und entsprechendem Filter analysiert.



### **2.2.6 Erstellung E7/Cre-transgener Mauslinien**

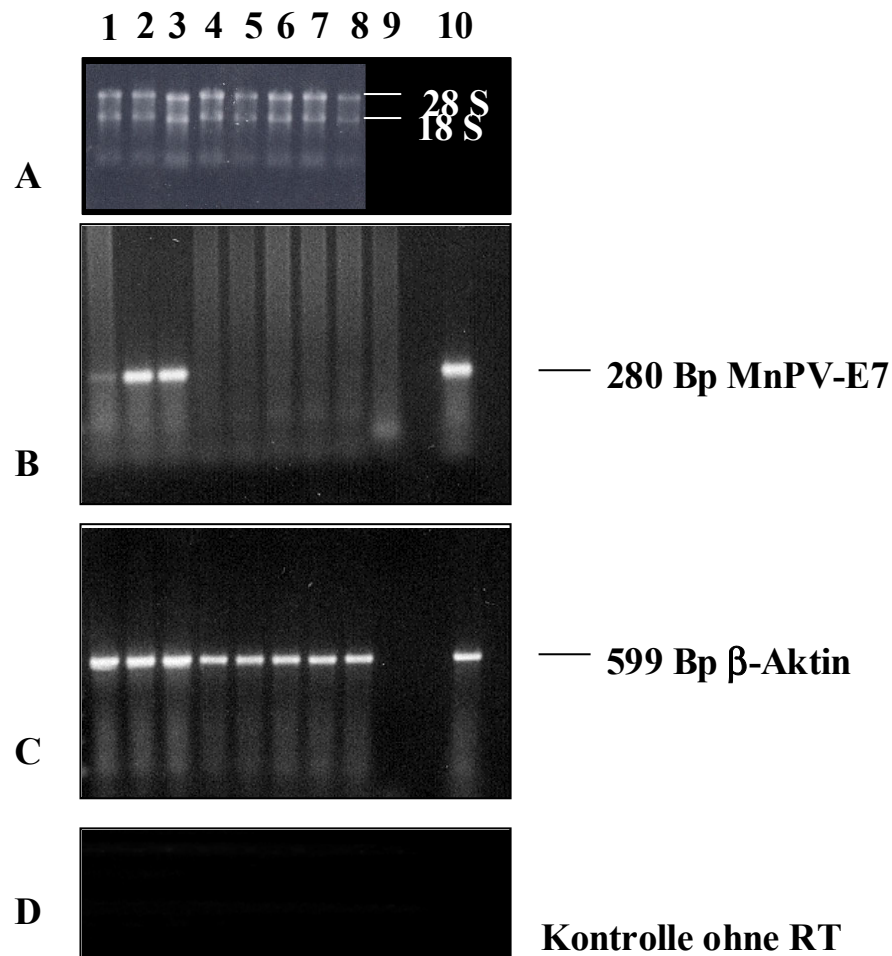
Nachdem nun die induzierbare Rekombination der MnPV-E7 Linien und die Expression der Cre-Rekombinase-transgenen Linie überprüft wurde, konnte die Linie Cre 3-25-5 mit drei verschiedenen MnPV-E7 transgenen Linien zur Erzeugung von E7/Cre-transgenen Mäusen verpaart werden. Mit Hilfe der PCR und spezifischen Primern zur Amplifikation des MnPV-E7-Gens bzw. der Cre-Rekombinase (siehe 2.2.2/2.2.3) wurden diese Tiere auf ihren transgenen Status überprüft. Die erhaltenen E7/Cre-transgenen Mäuse und einfach-transgene Kontrollen wurden intraperitoneal mit Tamoxifen behandelt um durch Rekombination die Transkription des induzierbaren MnPV-E7-Gens auszulösen.

### **2.2.7 Nachweis der MnPV-E7- mRNA aus der Haut E7/Cre-transgener Mäuse**

Um eine Transkription des MnPV-E7-Gens in der Haut dieser Mäuse nachzuweisen, wurde RNA aus Maushaut dreier unabhängiger E7/Cre-transgener, mit Tamoxifen behandelten Mäusen, isoliert. Die Ergebnisse der Analyse sind in Abbildung 2.27 gezeigt. In der anschließenden PCR unter Verwendung spezifischer MnPV-E7-Primer ATV 73/ATV 74 zeigten die Mäuse der E7/Cre-transgenen Linien eine Expression des MnPV-E7-Gens. Eine Maus einer E7/Cre-transgenen Linie zeigte hierbei ein schwaches Signal (Abb. 2.27, Probe 1B) und die zwei Mäuse der übrigen zwei E7/Cre-transgenen Linien ein starkes Signal der MnPV-E7 Expression (Abb. 2.27, Probe 2,3B).

Anhand dieser Analyse konnte bestätigt werden, daß aufgrund einer durch die Cre-Rekombinase ausgelösten Rekombination das MnPV-E7-Gen transkribiert wird und die MnPV-E7-mRNA in diesen Mäusen auch nachweisbar ist.

Die Funktionalität der erstellten transgenen Linien zur induzierbaren MnPV-E7-Produktion wurde hierdurch bestätigt.



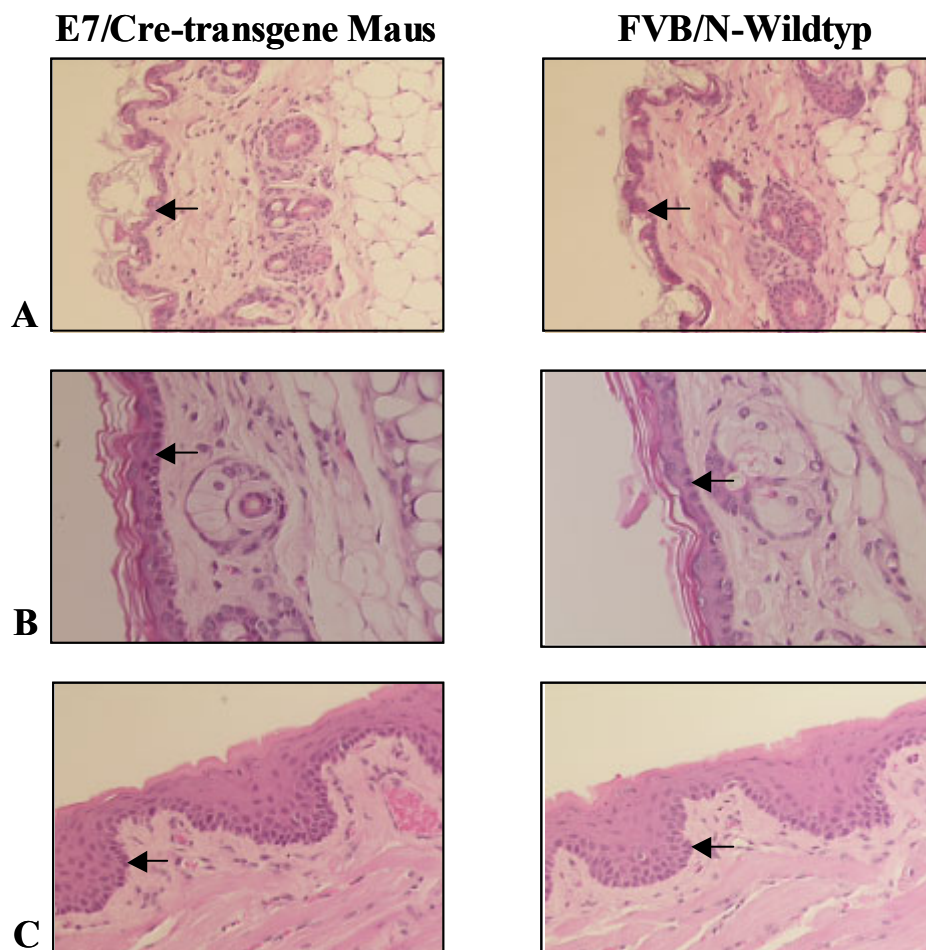
**Abb. 2.27 RT-PCR Analyse der MnPV-E7-Expression in Maushaut**

**A:** Detektion der aus Haut isolierten RNA nach DNase-Verdau auf einem Agarosegel. Zu erkennen sind die ribosomalen Banden 28 S und 18 S der transgenen Linien und Kontrollen. **B:** MnPV-E7 amplifizierte PCR-Produkte in einer Länge von 280 Bp unter Verwendung spezifischer MnPV-E7-Primer (ATV73/74). Proben 1-3 zeigen die Analyse der Mäuse der drei unabhängigen E7/Cre-transgenen Linien, Probe 4 und 5 wurde mit ausschließlich MnPV-E7-transgenen Mäusen durchgeführt, Probe 6 enthielt c-DNA einer Cre-Rekombinase-transgenen Maus, Probe 7 war für beide Konstrukte nicht-transgen wurde aber auch mit Tamoxifen behandelt und in Probe 8 wurde die Haut einer Wildtyp-Maus verwendet. In Probe 9 wurde als Negativkontrolle ein PCR-Ansatz ohne DNA mitgeführt. Zur Überprüfung der PCR wurde in Probe 10 als Positivkontrolle 10 ng des pKS E7 Plasmids eingesetzt. **C:** Zur Kontrolle der PCR wurden  $\beta$ -Aktin-Primer verwandt, die in jeder Probe eine zu amplifizierende Bande von 599 Bp aufzeigten. **D:** Es wurde für jede untersuchte Hautprobe ein Reaktionsansatz ohne Reverse-Transkriptase durchgeführt um eine Amplifikation genomischer-DNA in der PCR auszuschließen. Die Reaktionsansätze zeigten keine Banden.

### 2.2.8 Histologische Analyse von E7/Cre-transgenen Mäusen

Die E7/Cre-transgenen Mäuse der drei verschiedenen E7/Cre-transgenen Linien wurden 12 Wochen nach Tamoxifenbehandlung histologisch auf Veränderungen in der Haut untersucht. Hierzu wurden Organe isoliert in denen der Cytokeratin-14-Promotor aktiv-exprimiert wird. Nach der Entnahme von Schwanzhaut, Rückenhaut, Zunge, Speiseröhre, Speicheldrüse und Ohr wurde eine Hämalaun/Eosin-Färbung durchgeführt. In Abbildung 2.28 sind Gewebebiopsien von Rückenhaut, Ohr und Zunge dargestellt. Bei histologischer Untersuchung konnten keine Veränderungen der Haut in den entnommenen Biopsien der E7/Cre-transgenen Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen festgestellt werden.

Eine wiederholte Tamoxifenbehandlung und anschließende erneute histologische Analyse dieser transgenen Linie konnte aufgrund des zeitlichen Rahmens dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.



**Abb. 2.28 Histologische Untersuchung der E7/Cre-transgenen Mäusen**

Dargestellt sind Gewebebiopsien einer stark exprimierenden E7/Cre-transgenen Maus.

A: Rückenhaut, B: Ohr, C: Zunge. Die Pfeile markieren die Basalmembran.

### 3 Diskussion

Bisher ist nur wenig über die Beteiligung kutaner Papillomviren an der Entstehung von Hauttumoren bekannt. Die Erstellung eines geeigneten Mausmodells zur Untersuchung der Auswirkungen kutaner Papillomviren auf die Tumorentstehung in der Haut kann daher zur weiteren Aufklärung hilfreich sein.

Das MnPV ist ein kutanes Papillomvirus, dessen Fähigkeit in seinem natürlichen Wirt *Mastomys natalensis* spontan die Bildung von Keratoakanthomen auszulösen, bereits beschrieben wurde (Amtmann et al., 1987). Werden persistent MnPV-infizierte Mastomys in eine Mehrstufenkarzinogenese unter Verwendung des Tumorinitiators DMBA und des Tumorpromotors TPA eingesetzt, so kommt es zur Bildung von Plattenepithelzellkarzinomen (Wayss et al., 1981). Aufgrund seiner tumorerzeugenden Eigenschaft wurde das MnPV daher als geeigneter Vertreter kutaner Papillomviren zur Erstellung transgener Mäuse erachtet.

Viele vorausgehenden Studien haben gezeigt, daß bei den genitalen ‚high-risk‘ HPV-Typen die E6- und E7-Gene die Hauptonkogene bei der Entstehung von Tumoren darstellen (zur Hausen, 2001). Zur Erstellung transgener Tiere wurde daher das MnPV-E6- und MnPV-E7-Gen ausgewählt. Hierzu wurden Plasmid-Konstrukte verwendet, mit denen das MnPV-E6-Gen konstitutiv und das MnPV-E7-Gen induzierbar exprimiert werden kann. Die Expression der Transgene wurde unter die Kontrolle des humanen Cytokeratin-14-Promotors (K14) gestellt (Abb. 2.1; 2.20). Hierdurch wird eine Expression des Transgens in der Basalzellschicht mehrschichtiger Epithelien bewirkt (Byrne und Fuchs, 1993).

Zu Beginn der Arbeit wurden die bereits vorhandenen MnPV-E6-transgenen Mauslinien erneut auf ihre Transgen-Expression untersucht, da im Verlauf der Arbeit die transgenen Linien über mehrere Generationen gehalten wurden. Die Überprüfung der Transgen-Expression erfolgte durch Detektion der  $\beta$ -Galactosidaseaktivität des lacZ-Reportergens mit Hilfe von X-gal. Der humane Cytokeratin-14-Promotor ist erstmalig in Basalschichten von Mausembryonen 9,5 Tage nach Befruchtung aktiv (Byrne et al., 1994). Zwischen dem 13,5 und dem 14,5 Tag nach Befruchtung erfolgt eine Zunahme der Promotoraktivität und die Expression in der äußeren Schicht der Haarfollikel wird sichtbar. Daher wurden die Embryonen der transgenen MnPV-E6-Linien 14,5 Tage nach Befruchtung entnommen und gefärbt. Die Expression des Transgens war in der

---

Basalzellschicht der Haut, in den umliegenden Regionen der Augen, der Schnauze, an Extremitäten, Ohren, Schwanz und in den Haarfollikeln nachweisbar (Abb. 2.3B). An histologischen Schnitten von Schwanzhaut der MnPV-E6-transgenen Linien wurde deutlich, daß stark exprimierende Linien (z.B. HP 22-42) eine  $\beta$ -Galactosidaseaktivität in der gesamten Epidermis zeigten. Dies beruht sehr wahrscheinlich auf der hohen Konzentration an  $\beta$ -Galactosidase in der Haut stark exprimierender MnPV-E6-transgener Linien. Bei schwach exprimierenden Linien (z.B. HP 22-21) war die Expression ausschließlich in der Basalzellschicht der Haut zu erkennen (Abb. 2.3B). Da mit zunehmenden Differenzierungsgrad der Epithelien die Aktivität des K14-Promotors verloren geht (Byrne et al., 1994) ist das Expressionsmuster in den schwach exprimierenden MnPV-E6-transgenen Linien typisch für den verwendeten Promotor. Auch die unregelmäßige Expression des Transgens in den primären Keratinozytenkulturen der MnPV-E6-transgenen Linien (Abb. 2.5) bestätigt den Verlust der K14-Aktivität in Zellen mit bereits eingeleiteter Differenzierung.

Die MnPV-E6-transgenen Linien, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, zeigten bis zum Alter von 24 Monaten keinen spontan veränderten Phänotyp. Zur genaueren Analyse wurden Organe, in denen der K14-Promotor aktiv exprimiert wird, histologisch untersucht (Abb. 2.6). Die histologische Analyse ergab jedoch keinen Hinweis auf Veränderungen in der Haut der MnPV-E6-transgenen Tiere im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen. In einer Publikation von Song et al. (1999) wurden transgene Mäuse beschrieben, die das genitale ‚high-risk‘ HPV16-E6-Protein unter der Kontrolle eines humanen K14-Promotors exprimieren. Diese transgenen Tiere entwickeln spontan zelluläre Hyperproliferationen und epidermale Hyperplasien. Im Alter von einem Jahr entstanden bei 7 % dieser Mäuse maligne Tumoren. Das kutane MnPV-E6-Protein ist somit im Gegensatz zu dem genitalen HPV16-E6-Protein nicht in der Lage, ohne zusätzliche beeinflussende Faktoren zelluläre Hyperproliferationen bzw. epidermale Hyperplasien auszulösen. Der von Song et al. erhaltene Phänotyp der HPV-16-E6 transgenen Mäuse wurde jedoch auch nur in einer von mehreren transgenen Linien nachgewiesen. Eventuell wurde in dieser transgenen Linie das Transgen besonders stark exprimiert. Es besteht daher die Möglichkeit, daß in den untersuchten MnPV-E6 transgenen Mäusen die Transgen-Expression nicht stark genug ist und daher eine Veränderung im Phänotyp nicht bewirkt werden kann.

---

Zusätzlich konnten Song et al. (2000) im Mehrstufenmodell der Karzinogenese mit HPV16-E6-transgenen Mäusen die Rolle des HPV16-E6-Proteins in der Tumorenstehung der Haut näher analysieren. Hierbei stellte sich heraus, daß das HPV16-E6-Protein lediglich eine schwache Wirkung auf die Tumorpromotion aber einen starken Einfluß auf die Tumorprogression ausübt. HPV16-E6 bewirkte die Umwandlung von chemisch induzierten benignen Tumoren wie Papillomen oder Keratoakanthomen zu malignen Plattenepithelzellkarzinomen. Die hierbei ermittelte Malignitätsrate von 75 % der entstandenen Tumoren ließ auf eine kooperierende Wirkung von chemischen Karzinogenen und dem HPV16-E6-Protein schließen.

Zur Überprüfung, ob das MnPV-E6-Protein ähnlich auf chemisch induzierte Tumoren wirken kann, wurden MnPV-E6-transgene Mäuse in eine Mehrstufenkarzinogenese eingesetzt. Hierbei zeigte sich, daß während der Behandlungs- und Beobachtungszeit von insgesamt 40 Wochen in der Gruppe, die sowohl mit einem Tumorigenitor als auch mit einem Tumorpromotor behandelt wurde, nahezu 100 % der MnPV-E6-transgenen Tiere Plattenepithelzellkarzinome entwickelten. Die Wildtyp-Kontrollen zeigten im Vergleich eine Malignitätsrate von ca. 10 %.

Aufgrund dieser Resultate läßt sich eine Beteiligung des kutanen MnPV-E6-Proteins an der Umwandlung benigner Tumoren zu malignen Stadien ableiten. Das kutane MnPV-E6-Protein könnte daher, ähnlich wie das genitale ‚high-risk‘ HPV16-E6-Protein (Song et al., 2000), einen Einfluß auf die Tumorprogression chemisch induzierter Tumoren besitzen. In den Kontrollgruppen, die ausschließlich mit dem Tumorigenitor bzw. dem Tumorpromotor behandelt wurden, entwickelten sich keine Tumoren. Im Gegensatz zu dem HPV16-E6-Protein, das zusätzlich zur erhöhten Tumorprogression auch eine schwache Wirkung auf die Tumorpromotion besitzt, war für das MnPV-E6-Protein kein Einfluß auf die Promotion nachweisbar. Das MnPV-E6-Protein kann daher weder als Tumorigenitor noch als Tumorpromotor wirken, sondern benötigt beide Ereignisse für eine Tumorprogression.

Ein möglicher Mechanismus, durch den das E6-Protein die Tumorprogression beeinflussen könnte, ist die Interaktion mit dem Tumorsupressorprotein p53. Wird eine Zelle durch exogene Beeinflussung wie z.B. durch UV-Strahlung geschädigt, nimmt die p53-Konzentration im Zellkern zu. Durch die Zunahme an p53 wird die Transkription von Genen für den Reparaturmechanismus der Zelle aktiviert (z.B. p21). Der Zellzyklus wird daraufhin in der G1-Phase arretiert und es kann einer Reparatur der DNA-Schäden erfolgen. Sind die DNA-Schäden zu umfangreich, kann p53 die Apoptose der Zelle

induzieren. Bei Verlust des p53-Proteins oder einer durch Mutation ausgelösten Veränderung des p53-Gens kann die Zelle nicht mehr über diesen Reparaturmechanismus verfügen. Es kommt zu Schädigung des Erbgutes und zu Genominstabilitäten, was letztendlich auch eine Progression von benignen zu malignen Tumorstadien begünstigt. Für das E6-Protein von ‚high-risk‘ HPV-Typen wurde bereits ein Einfluß auf die Konzentration des Tumorsuppressorproteins p53 nachgewiesen (Levine, 1997; Vousden, 2000). Durch Verbindung mit der zellulären E3-Ubiquitinligase E6AP interagiert das E6-Protein der ‚high-risk‘ HPV-Typen mit p53, bewirkt dessen Ubiquitinierung und induziert seinen Abbau (Scheffner et al., 1990, 1993; Werness et al., 1990; Kim et al., 2000; Sherman et al., 2002). Das E6-Protein der genitalen ‚low-risk‘ HPV-Typen besitzt hingegen nicht die Fähigkeit das p53-Protein durch Komplexbildung mit E6AP abzubauen. Für das E6-Protein kutaner HPV-Typen konnte bisher keine Interaktion mit E6AP oder p53 nachgewiesen werden (Elbel et al., 1997).

In HPV16-E6-transgenen Mäusen konnten Song et al. (1999) nachweisen, daß die durch HPV16-E6 ausgelöste Hyperproliferation der Epidermis unabhängig von der vorhandenen p53-Konzentration in der Haut war. Wurden diese Tiere in eine Mehrstufenkarzinogenese eingesetzt, zeigten die entstandenen Hauttumoren eine erhöhte Progressionsrate. Auch p53-Knock-out-Mäuse zeigten in einer Mehrstufenkarzinogenese einen erheblichen Anstieg in der Anzahl maligner Progressionen (Kemp et al., 1993). Der Einfluß von HPV16-E6 auf die erhöhte Progressionsrate könnte durch die Verringerung der p53-Konzentration hervorgerufen werden. Inwiefern die erhöhte Progressionsrate der MnPV-E6 transgenen Mäuse auf Interaktionen des kutane MnPV-E6-Proteins mit p53 zurückzuführen ist, wurde durch Western-blot-Analyse untersucht (Abb. 2.15). Hierzu wurden stabil transfizierte MnPV-E6-Zellklone verwendet sowie eine Zelllinie, die aus einem während der Mehrstufenkarzinogenese entstandenen Plattenepithelzellkarzinom abgeleitet wurde. Im Vergleich zur Mk2-Kontrollzelllinie konnte eine deutlich geringere Konzentration des p53-Proteins sowohl in den stabilen MnPV-E6-Zelllinien als auch in der Tumorzelllinie festgestellt werden. Dies ist ein erster Hinweis darauf, daß das MnPV-E6-Protein einen Abbau des Tumorsuppressorproteins p53 bewirkt. Um diese Aussage zu bekräftigen sind jedoch weitere Untersuchungen nötig. Der Wirkungsmechanismus des MnPV-E6-Proteins auf das p53-Protein, gegebenenfalls über eine Komplexbildung mit E6AP, konnte im zeitlichen Rahmen der Arbeit nicht mehr analysiert werden. Weiterhin könnte man an

---

histologischen Schnitten der Haut MnPV-E6-transgener Mäuse und an den während der Mehrstufenkarzinogenese entstandenen Hauttumoren das p53-Protein durch Immunhistochemie direkt im Gewebe lokalisieren und mit einer Wildtyp-Kontrolle vergleichen.

Ein weiterer Kofaktor bei der Entstehung von Hautkrebs stellt das H-ras-Gen dar. Besonders in chemisch induzierten Hauttumoren ist eine Mutation des H-ras-Gens an Position 2 des Codons 61 nachweisbar (Song et al., 2000). Durch die Behandlung mit dem Tumorinitiator DMBA kommt es zu einer Transversion von Adenin zu Thymin (Chakravarti et al., 1995). In Zellkulturen konnte nachgewiesen werden, daß HPV16-E6 zusammen mit einem aktivierten H-ras-Gen zu einer Zelltransformation führt (Bedell et al., 1989; Donehower et al., 1992). HPV16-E6-transformierte Zellen erzeugten nach Transplantation in Nacktmäuse keine Tumoren, jedoch in Kombination mit anderen Onkogenen wie dem aktivierten H-ras-Gen kann dies zu einer Tumorentstehung führen (Lambert et al., 1993; Liu et al., 1995).

Um die Beteiligung von H-ras-Mutationen in den chemisch induzierten Tumoren der MnPV-E6 transgenen Linien genauer zu untersuchen, wurden 50 Tumoren der MnPV-E6-transgenen Linie HP 22-42 und 44 Tumoren der Wildtyp-Kontrollen analysiert. Hierbei konnten bei 61 % der MnPV-E6-transgenen Tumoren und bei 68 % der Tumoren aus der Wildtyp-Kontrolle eine Mutation an Position 2 des Codons 61 festgestellt werden. Dies zeigt, daß sowohl die Tumoren der MnPV-E6-transgenen Mäuse als auch die der Wildtyp-Kontrollen eine durch DMBA ausgelöste, aktivierende Mutation des H-ras-Gens in ähnlicher Häufigkeit besitzen. Die erhöhte Progression der Tumoren in den MnPV-E6-transgenen Linien ist daher nicht von einem Einfluß des E6-Proteins auf Mutationen im H-ras-Gen abhängig. Auch die durch DMBA/TPA chemisch induzierten Tumoren der HPV16-E6-transgenen Mäuse zeigten keine erhöhte Mutationsrate des H-ras-Gens. Hier konnten bei 83 % der HPV16-E6-transgenen Mäuse und bei 84 % der Wildtyp-Kontrollen eine Mutation des H-ras-Gens nachgewiesen werden. Es handelte sich hierbei ausschließlich um einen Basenaustausch in Position 2 des Codons 61. Die Basen in Position 1 und 3 des H-ras-Gens blieben unverändert. Ebenso konnte keine Mutation in Codon 12, 13 und 61 des H-ras-Gens nachgewiesen werden, welche ebenfalls bevorzugte Mutationsstellen chemisch induzierter Tumore darstellen. Zusammenfassend läßt sich daher aussagen, daß die Entstehung maligner Hauttumoren



---

in MnPV-E6-transgenen Mäusen sowie in HPV16-E6-transgenen Mäusen nicht mit einer Änderung der H-ras-Mutationsrate verbunden ist.

Das E6-Protein humaner Papillomviren kooperiert mit weiteren zellulären Faktoren wie z.B. dem Pro-Apoptosefaktor Bak, dessen Expression in den oberen epithelialen Schichten der Haut stattfindet (Krajewski et al., 1996). Für das E6 genitaler HPV-Typen wurde eine Inhibition der Bak-induzierten Apoptose bereits nachgewiesen (Thomas und Banks, 1998, 1999; Jackson und Storey, 2000). HPV18-E6 bewirkt über die Bindung mit E6AP einen Ubiquitin-vermittelten Abbau von Bak (Thomas und Banks, 1998). Das E6-Protein der kutanen HPV-Typen HPV5, 10 und 77 ist ebenfalls in der Lage, die Funktion von Bak über einen Ubiquitin-vermittelten Abbau außer Kraft zu setzen (Jackson et al., 2000). Daher ist das Bak-Protein in HPV-positiven Hauttumoren im Vergleich zu HPV-negativen Hauttumoren nicht mehr nachweisbar.

Auch für das E6-Protein des kutanen MnPV konnte durch vorläufige Versuche ein erster Hinweis auf den Abbau des Bak-Proteins in stabil-transfizierten Mk2-Zellen analysiert werden. So wurde durch UV-B-Bestrahlung eine Anreicherung von Bak in Mk2 Zellen erreicht, in MnPV-E6-transfizierten Mk2-Zellen konnte jedoch eine Abnahme der Bak-Konzentration nachgewiesen werden. Da zur Bestätigung dieser Aussage noch weitere Untersuchungen nötig sind, wurden die Daten in der Arbeit nicht gezeigt. Sie bieten jedoch einen guten Ansatzpunkt, um den Mechanismus der durch MnPV-E6 ausgelösten Erhöhung der malignen Progression von Hauttumoren näher zu analysieren.

Ein weiterer Ansatzpunkt zur Erforschung kutaner Papillomvirusonkogene und ihrer Rolle in der Tumorentstehung war die Erstellung von MnPV-E7-transgenen Mäusen. Die transformierende Eigenschaft der E7-Proteine genitaler ‚high-risk‘ HPV-Typen basiert auf der Fähigkeit, mit zellulären Tumorsupressorproteinen zu interagieren. Die E7-Proteine von ‚high-risk‘ HPV-Typen sind in der Lage, das Retinoblastom-Tumorsupressorprotein Rb und die assoziierten Proteine p107 und p130 zu binden und deren Abbau zu induzieren (Dyson et al., 1989, 1992; Jones et al., 1997). Die E7-Protein der ‚low-risk‘ HPV-Typen HPV6 und HPV11 besitzen eine reduzierte Bindungsaffinität zu Rb (Schmitt et al., 1994). Bei verschiedenen kutanen Papillomviren wie z.B. HPV1 wird Rb mit gleicher Effizienz wie bei HPV16-E6 gebunden, führt aber nicht zum Abbau des Tumorsupressorproteins (Alunni-Fabbroni et al., 2000).

---

Für das MnPV-E7-Protein konnte eine Bindung an Rb bereits nachgewiesen werden (Chen, 2000). Das E7-Protein des kutanen MnPV verhält sich somit in seiner Bindeeigenschaft von Rb wie ein genitales ‚high-risk‘-HPV-E7-Protein.

Bei der Erstellung MnPV-E7-transgener Tiere wurde zuerst ein Konstrukt mit konstitutiv exprimierendem MnPV-E7-Gen verwendet. Auf diese Weise wurden jedoch keine Nachkommen erhalten, da die Embryonen pränatal abstarben (Chen, 2000). Deshalb wurde mit Hilfe des Cre/loxP-Systems ein Konstrukt zur Tamoxifen-induzierbaren Expression des MnPV-E7-Gens erstellt (Abb. 2.20). Es erfolgte eine Überprüfung der Tamoxifen-induzierten Rekombination durch Transfektion Tamoxifen-unabhängiger-Cre-Rekombinase in primäre Keratinozyten der MnPV-E7 Linie (Abb. 2.23). Die MnPV-E7 Expression wurde durch RT-PCR in der Haut der E7/Cre-transgenen Tiere nachgewiesen (Abb. 2.27). Die E7/Cre-transgenen Tiere wurden 12 Wochen nach Tamoxifeninduktion histologisch analysiert. Es konnten bisher keine Veränderungen in der Epidermis der transgenen-Tiere nachgewiesen werden. Die E7/Cre-transgenen Tiere werden im Anschluß an diese Arbeit wiederholt mit Tamoxifen induziert und anschließend erneut histologisch untersucht.

Im Gegensatz zu den MnPV-E7-transgenen Mäusen entwickelten HPV16-E7-transgenen Linien unter der Kontrolle eines Cytokeratin-14-Promotors epitheliale Hyperplasien der Haut und Verdickungen der Ohren (Herber et al., 1996). In der Epidermis der HPV16-E7-transgenen Tiere konnten gehäuft Zellen mit fragmentierter DNA nachgewiesen werden, begründet auf E7-induzierte apoptoseähnliche Prozesse. Eingehend in eine Mehrstufenkarzinogenese zeigten HPV16-E7-transgene Mäuse eine deutlich Erhöhung in der Anzahl von entstehenden benignen Tumoren im Vergleich zur Kontrollgruppe (Song et al., 2000). Das HPV16-E7-Protein griff ausschließlich in die Promotionsphase der chemisch induzierten Tumorentstehung ein, im Gegensatz zu dem HPV16-E6-Protein, welches hauptsächlich eine Progression der benignen Tumoren bewirkte.

Für das kutane MnPV wäre durch die Erstellung MnPV-E6/E7-transgener Mäuse ein interessantes transgenes Mausmodell konstruierbar. Nachdem das kutane MnPV-E6-Protein wie das genitale ‚high-risk‘ HPV16-E6-Protein auf die Tumorprogression chemisch induzierter Tumore einwirkt, wäre eine mögliche Interaktion der Proteine E6 und E7 des MnPV analysierbar. Die Frage, ob das MnPV-E7-Protein in Übereinstimmung zu einem genitalen ‚high-risk‘ E7-Protein auf die Tumorpromotion wirkt, könnte hierdurch analysiert werden.

---

Mit Hilfe des transgenen MnPV-Mausmodells ist erstmalig die Beteiligung des E6-Proteins eines kutanen Papillomvirus an der malignen Progression chemisch induzierter Tumore in der Haut nachgewiesen worden. Durch Nutzung dieses transgenen Systems können weitergehend molekulare Mechanismen, die eine Entstehung von Plattenepithelzellkarzinomen in der Haut initiieren, analysiert werden. Gegebenenfalls können auch weitere Untersuchungen des kutanen MnPV-Mausmodells zur Aufklärung der Rolle der E6- und E7-Hauptonkogene in der Tumorentstehung der Haut weitergehend beitragen. Die Resultate in transgenen Mäusen mit den Proteinen E6 und E7 des MnPV können die Grundlage zur gezielten Untersuchung von kutanen E6- und E7-Proteinen bei HPV und ihren möglichen Funktionen bei der Entstehung von Hautkrebs darstellen. Bisher konnte eine eindeutige Beteiligung kutaner Papillomviren an der Tumorentstehung in der Haut nicht nachgewiesen werden. Lediglich in Plattenepithelzellkarzinomen bei *Epidermodysplasia verucciformis* (EV)-Patienten wurden bisher vermehrt die kutanen HPV-Typen 5, 8 und 14 aufgefunden (Majewski und Jablonska 2002). Die Frage, in wieweit diese kutanen HPV-Typen jedoch an der Progression von benignen Hautwarzen zu malignen Plattenepithelzellkarzinomen am Menschen verantwortlich sind, blieb unbeantwortet. Da bisher kein kutaner HPV-Typ als ‚potentieller‘ Kandidat für die Entstehung maligner Tumoren identifiziert werden konnte, steht mit Hilfe des kutanen MnPV-Mausmodells erstmals ein System zu Verfügung, dessen E6-Protein nachweislich eine tumorprogressive Wirkung in chemisch induzierten Hauttumoren ausübt.

## 4 Zusammenfassung

Die Rolle genitaler ‚high-risk‘ HPV-Typen an der Entstehung von Zervixkarzinomen wurde mehrfach untersucht und bestätigt. Für kutane Papillomviren konnte bisher jedoch nicht eindeutig nachgewiesen werden, daß sie bei der Entstehung von malignen Tumoren der Haut beteiligt sind. Jedoch wurden bei Patienten mit *Epidermodysplasia verruciformis* spezifische kutane HPV-Typen in malignen Tumoren nachgewiesen. Die vorliegende Arbeit untersucht die Beteiligung der E6- und E7-Onkoproteine des kutanen *Mastomys natalensis* Papillomvirus (MnPV) an der Entstehung von Hauttumoren in transgenen Mäusen. Durch den Einsatz MnPV-E6-transgener Mäuse in eine Mehrstufenkarzinogenese konnte gezeigt werden, daß das kutane E6-Protein in chemisch induzierten benignen Hauttumoren eine Progression in maligne Tumoren auslöst, die histologisch als Plattenepithelzellkarzinome diagnostiziert wurden. Diese progressive Wirkung des MnPV-E6-Proteins auf chemisch induzierte Hauttumoren entspricht der des genitalen ‚high-risk‘ HPV16-E6-Proteins. In transgenen Mäusen, die ausschließlich mit einem Tumorigenitor oder einem Tumorpromotor behandelt wurden, entstanden keine Hauttumoren. Dies zeigt, daß das MnPV-E6-Protein eine Tumorigenition oder Tumorpromotion nicht ersetzen kann, sondern beide Ereignisse benötigt um eine maligne Progression bewirken zu können. Die während der Mehrstufenkarzinogenese entstandenen Tumoren wurden auf Mutationen im H-ras-Gen geprüft. Hierbei zeigte sich, daß die Entstehung von Hauttumoren bei MnPV-E6 und HPV16-E6 transgenen Mäusen nicht mit einem Mutationsereignis im H-ras-Gen assoziiert waren. Da transgene Mäuse mit einem konstitutiv exprimierten MnPV-E7-Gen pränatal abstarben, wurden im Rahmen dieser Arbeit transgene Mauslinien erzeugt, in denen das E7-Gen durch Tamoxifen induzierbar exprimiert wird. Das genitale ‚high-risk‘ HPV16-E7-Protein bewirkt durch seine Interaktion mit Rb eine Proliferationssteigerung in Epithelien. Bei HPV16-E7-transgenen Mäusen konnte in der Mehrstufenkarzinogenese ein Einfluß auf erhöhte Tumorpromotion nachgewiesen werden. In HPV16-E6/E7-transgenen Mäusen findet daher eine kooperierende Verbindung bezüglich Tumorpromotion und Tumorigenition statt. Mit der Erstellung induzierbarer MnPV-E7-transgener Mäuse ist die Möglichkeit zur Erzeugung MnPV-E6/E7-transgener Linien gegeben. Mit Hilfe dieser zweifach-transgenen Linien steht zukünftig ein transgenes System zu Verfügung, daß weitergehende Analysen des Zusammenwirkens eines kutanen E6- und E7-Proteins bei der Tumorigenition der Haut zuläßt.

## 5 Material

### 5.1 Chemikalien und Reagenzien

Produkt	Bezugsquelle
Acrylamid/bis-Acrylamid (29:1), 30% Lösung	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agarose	Lifetechnologies, Karlsruhe
Amino-ethyl-carbazol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt
Azetone	Riedel-deHaeen, Seelze
Blocking Kit (Avidin/Biotin)	Vector, Burlingame, USA
Bovines Serum Albumin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bradford-Reagenz	BioRad, M黤nchen
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-[beta]-d-galactopyranosid (X-gal)	Preqlab, Erlangen
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Calciumchlorid-Dihydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Chloroform, p.a.	Merck, Darmstadt
Coomassie brillant blau R-250	Serva, Heidelberg
4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Deoxynukleosid-triphosphate (dNTPs)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dimethylbenz(a)anthracen (DMBA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EDTA-Disodium	Gerbu, Gaiberg
EGTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Enhanced chemiluminescence kit (ECL)	Amersham Pharmacia, Freiburg
Essigs鋗ure p.a.	Merck, Darmstadt
Ethanol absolut p.a.	Riedel-deHaeen, Seelze
Ethidiumbromid-L鰏ung 95%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Eosin	Merck, Darmstadt
Formaldehydl鰏ung p.a. 37%	Merck, Darmstadt
Formamid p.a.	Fulka, Deisenhofen
Geneclene Kit	Dianova, Hamburg
Glutaraldehyd	Merck, Darmstadt
Glycerin p.a. 87%	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Glykogen	Roche Diagnostics, Mannheim
HEPES	Gerbu, Gaiberg
Igepal CA-630 (NP-40)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Isopropanol p.a.	Riedel-deHaeen, Seelze
Kaliumferricyanit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

<b>Produkt</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kaliumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kaliumferrocyanit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Mayers Hämalaun	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Methanol p.a.	Riedel-deHaen, Seelze
Milchpulver	Fulka, Deisenhofen
3-N-Morpholino-propansulfonische Säure (MOPS)	Gerbu, Gaiberg
MetaPhor-XR-Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
Mowiol	Calbiochem, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat p.a.	Merck, Darmstadt
Natriumdiphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid-Plätzchen	Roth, Karlsruhe
Natriummonophosphat	Merck, Darmstadt
Nitro blue tetrazolium (NBT)	Serva, Heidelberg
Nitrozellulosemembran (0,1µm)	Schleicher & Schuell, Dassel
Paraformaldehyd (PFA)	Serva, Heidelberg
Phenol	Roth, Karlsruhe
2-Propanol	Riedel-deHaen, Seelze
N, N, N', N-tetramethyl-ethylenediamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Proteinase K	Roche Diagnostics, Mannheim
Qiaex II gel extraktion Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen midiprep und maxiprep Kit	Qiagen, Hilden
Streptavidin (Peroxygenase gekoppelt)	Vector, Burlingame, USA
Sodium dodecylsulfat (SDS)	Gerbu, Geiberg
Tamoxifen	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris [hydroxymethyl]aminomethan TRIZMA BASE	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Triton X-100	Serva, Heidelberg
TRIzol	Lifetechnologies, Karlsruhe
Tween-20	Gerbu, Geiberg
Wasserstoffperoxyd	Merck, Darmstadt
Xylol p.a.	Merck, Darmstadt

### 5.1.1 Reagenzien und Medien der Zellkultur

Produkt	Bezugsquelle/Zusammensetzung
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bovines Serum Albumin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Chelex 100	BioRad, München
Collagen	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DOTAP	Roche Diagnostics, Mannheim
Einfriermedium für Zellkultur	90 % FCS, 10 % DMSO
Fibronectin	Cell-systems, Cambridge
Fötales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fungizon	Lifetechnologies, Karlsruhe
Gentamycin	Lifetechnologies, Karlsruhe
Glutamin	Lifetechnologies, Karlsruhe
Hanks Balanced salts (HBSS) w/o Calcium and Magnesium	Lifetechnologies, Karlsruhe
Low Calcium-Medium (LoCa)	400 ml HBSS 16 ml MEM VITAMINES (100x) 32 ml MEM AMINO ACIDS (50x) 16 ml MEM NON-ESSENTIAL AMINO ACIDS 16 ml Sodium Bicarbonate 7,5% (w/v) 2,5 ml 2 % Magnesiumchlorid 2,5 ml 2 % Magnesiumsulfat 5 ml 200 mM Glutamin 5 ml Penicillin-Streptomycin 50 ml gechelextes FCS (LOCA Serum) mit Natronlauge auf pH 7,4 einstellen und steril filtrieren
Keratinocyte-Serum free Medium	LIFETECHNOLOGIES, Karlsruhe
MEM-AMINO ACIDS (50x) w/o L-Glutamine	Biochrom KG, Berlin
MEM-VITAMINES (100x) w 10mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	Biochrom KG, Berlin
MEM-NON-ESSENTIAL AMINO ACIDS (100x)	Biochrom KG, Berlin
PBS Dulbecco's w/o Calcium and Magnesium, w/o Sodium bicarbonat	Lifetechnologies, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin 10.000 U/ml	Lifetechnologies, Karlsruhe
Percoll	Amersham, Freiburg
Proteinase inhibitor cocktail tablets, complete <sup>TM</sup> , EDTA-free	Roche Diagnostica, Mannheim
Sodium Bicarbonate 7,5% (w/v)	Biochrom KG, Berlin
Trypsin Sol. 0,25% (1:250) prepared in GIBCO SOL. A	Lifetechnologies, Karlsruhe
Trypsin-EDTA (1x) in HBSS	Lifetechnologies, Karlsruhe
Ziegenserum	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

### 5.1.2 Reagenzien und Medien der Bakterienkultur

Produkt	Bezugsquelle/Zusammensetzung
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bacto-Tryptone	Difco, Detroit
Bacto-Yeast-Extract	Difco, Detroit
LB-Platten	1,5% Bacto-Agar für Bakterien zum LB-Medium zufügen, autoklavieren und in Bakterienplatten gießen
LB-Platten mit Antibiotikaresistenz	Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin bzw. 25 µg/ml Kanamycin in das schon autoklavierte LB-Medium
Luria-Bertani-Medium (LB)	10 g Natriumchlorid 10 g Bacto-Trypton 5 g Hefeextract mit Natronlauge auf pH 7,2 einstellen und mit dest. Wasser auffüllen, autoklavieren
2 x YT-Medium	16 g Bacto-Trypton 10 g Bacto-Yeast-extract 5 g Natriumchlorid mit Natronlauge auf pH 7,0 einstellen und mit dest. Wasser auffüllen, autoklavieren

### 5.2 Puffer und Lösungen

Alle Lösungen wurden, falls nicht anders angegeben, mit autoklaviertem dest. Wasser angesetzt.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Blockpuffer	5 % Milchpulver in TBST
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	10 mg DAPI in 100 ml dest. Wasser lösen
DEPC-Wasser	0,1 % Diethylpyrocarbonat in dest. Wasser lösen und Flasche vor Autoklaviervorgang leicht geöffnet einen Tag stehen lassen
DNA-Ladepuffer (10x) (PCR)	200 mM EDTA (pH 8,0) 50 % Glycerin 0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylenblau
DNase-Puffer (10x)	400 mM Tris pH 8,0 100 mM Magnesiumsulfat 10 mM Calciumchlorid
Gelpräequilibrierungspuffer (Western Blot)	50 mM Tris pH 7,5 20 % Glycerin vor Gebrauch frisch ansetzen



<b>Puffer/Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Fixierungslösung ( $\beta$ -Gal Nachweis)	0,2 % Glutaraldehyd 5 mM EGTA 1 % Formaldehyd (37%) mit Waschpuffer auffüllen und vor Gebrauch frisch ansetzen
Laemmli-Probenpuffer (Western Blot)	62,5 mM Natriumphosphat pH 7,0 10 % Glycerin 2 % SDS 0,001% Bromphenolblau 5 % $\beta$ -Mercaptoethanol
Laufpuffer (10x) (Western Blot)	250 mM Tris 1,9 M Glycin 1% SDS
MOPS-Puffer (20x)	400 mM MOPS 100 mM Natriumacetat 20 mM EDTA
PBS	123 mM Natriumchlorid 17,6 mM di-Natriumhydrogenphosphatdihydrat 10 mM Kaliumdihydrogenphosphat mit Salzsäure auf pH 7,2 einstellen
PCR-Puffer (10x) Fa. Lifetechnologies, Karlsruhe	100 mM Tris pH 8,3 500 mM Kaliumchlorid 15 mM Magnesiumchlorid 0,01 % Gelatine Lagerung bei $-20^{\circ}\text{C}$
RNA-Ladepuffer (5x)	50 % Formamid 2,2 M Formaldehyd 1 x MOPS-Puffer 1 % Ficoll 0,02 % Bromphenolblau in DEPC-Wasser lösen und bei $-20^{\circ}\text{C}$ lagern
RT-Puffer (5x) Fa. Lifetechnologies, Karlsruhe	200 mM Tris pH 8,3 375 mM Kaliumchlorid 15 mM Magnesiumchlorid Lagerung bei $-20^{\circ}\text{C}$
Sammelgelpuffer (Western Blot)	1,5 M Tris- $\text{H}_3\text{PO}_4$ pH 6,8
SSC (20x)	3 M Natriumchlorid 0,3 M tri-Natriumcitrat-Dihydrat mit Salzsäure auf pH 7,0 einstellen
TAE-Laufpuffer (50x)	2 M Tris 0,25 M Natriumacetat 0,05 M EDTA pH 8,0 mit Essigsäure auf pH 7,8 einstellen
TBST	10 mM Tris pH 7,5 100 mM Natriumchlorid 0,1 % Triton X

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
TE-Puffer	10 mM Tris pH 8,0 1 mM EDTA pH 8,0
Transferpuffer (Blotpuffer/Western Blot)	10 mM Natriumhydrogencarbonat 3 mM Natriumcarbonat, vor Gebrauch frisch ansetzen und bei 4°C aufbewahren
Trenngelpuffer (Western Blot)	1,5 M Tris-HCl pH 8,8
Waschpuffer für β-Gal Nachweis	0,1 M Phosphatpuffer pH 7,3 2 mM Magnesiumchlorid 0,02 % Nonidet P-40 bei 4°C aufbewahren
X-gal Färbelösung	5 mM Kaliumferricyanit 5 mM Kaliumferrocyanit 2 mM Magnesiumchlorid 0,02 % Nonidet P-40 filtrieren und bei 4°C aufbewahren; vor Gebrauch 1mg/ml der X-Gal Stocklösung zugeben und lichtgeschützt aufbewahren.
X-gal Stocklösung ( 5-bromo-4- chloro-3-indonyl-β-D- galactopyranosid)	40 mg/ml X-gal in Dimethylformamid lösen und bei -20°C lagern

### 5.3 Gelkomponenten

Gelkomponente	Zusammensetzung
Agarose-Gel 1% (Elektrophorese)	1% Agarose mit 1x TAE-Puffer aufkochen
MetaPhor XR-Gel 2% (Elektrophorese)	2% MetaPhor XR-Agarose mit 1x TAE- Puffer aufkochen
MOPS-Gel 1% (Elektrophorese)	1,5 g Agarose mit 150 ml 1x MOPS-Puffer aufkochen
Sammelgel 15% (Western Blot)	6,1 ml dest. Wasser 2,46 ml 0,5 M Tris pH 6,8 (Sammelgelpuffer) 98 µl 10 % SDS 1,28 ml 30 % Acrylamid 49 µl 10% APS 98 µl TEMED
Trenngel 15% (Western Blot)	7,05 ml dest. Wasser 7,5 ml 1,5 M Tris pH 8,8 (Trenngelpuffer) 300 µl 10% SDS 15 ml 30% Acrylamid 150 µl 10% APS 15µl TEMED

## 5.4 Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
Desoxyribonuclease I (1U/μl)	Roche Diagnostics, Mannheim
Restriktionsenzyme	Roche Diagnostics, Mannheim
Superskript II <sup>TM</sup> (200U/μl)	Lifetechnologies, Karlsruhe
RNasin (40U/μl)	Roche Diagnostics, Mannheim
Taq DNA polymerase (5U/μl)	Lifetechnologies, Karlsruhe

## 5.5 Größenstandarts

Größenstandart	Bezugsquelle
DNA-Standart 1 kB Leiter	LIFETECHNOLOGIES, Karlsruhe
DNA-Standart 100 bp Leiter	LIFETECHNOLOGIES, Karlsruhe
λ/HIND III-Marker	New England Biolabs, Schwalbach
Proteinstandart	New England Biolabs, Schwalbach
BSA-Standart (100x)	LIFETECHNOLOGIES, Karlsruhe

## 5.6 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von Herrn W.Weinig (Service-Einheit Nucleotidsynthese, DKFZ-Heidelberg) synthetisiert. Nach der Synthese wurden die Dimethoxytritylgruppen am 5'OH-Ende abgespalten und durch HPLC gereinigt.

Folgende Oligonukleotide wurden verwendet:

Oligonucleotibezeichnung	Sequenz 5'---> 3'
ATV 11	GCG ACT TCC AGT TCA ACT TC
ATV 12	GAT GAG TTT GGA CAA ACC AC
ATV 49	ACC CAC ACT GTG CCC ATC TAC GA
ATV 50	CTT GCT GAT CCA CAT CTG CTG GA
ATV 73	GCT GTC TCA CCG GCG AAA CT
ATV 74	TTC AAG ATC TTC CAT TCT TCT G
ATV 114	ACC ATG TTC ATG CCT TCT TC
ATV 173	GCC AGA TTA CGT ATA TCC TG
ATV 174	GAG TTT GTG TGC CTC AAA TC
ATV 175	AGA CGG CAA TAT GGT G
ATV 176	TGC ACA TTC TGC TCG AGG TT
ATV 177	CCC TCT TTC TGC ACA CTC TA
ATV 202	GGA AAC AGG TGG TCA TTG ATG G
ATV 203	GCT CAC GGG CTA GCC ATA GGT GG
Mgp 1	CCA AGT TGG TGT CAA AAG CC
Mgp 2	CTC TCT GCT TTA AGG AGT CAG
Oligo (dT) <sub>22</sub> wird von Fa.Amersham, Freiburg bezogen	

## 5.7 Antikörper

### 5.7.1 Primärantikörper

Antikörper	Bezugsquelle	Epitop	Verwendung
$\beta$ -Aktin	Klon C4 ICN-Biotechnology, Eschwege Nr. 69100 Maus monoklonal IgG	erkennt hochkonserviertes Epitop in allen Aktinen der Vertebratenmuskelatur	1:20.000 Western Blot
p-53	Oncogene, Bad Soden Nr. OP03 Maus monoklonal IgG	erkennt Aminosäure 371-380 des humanen p53	1: 1000 Western Blot
Cytokeratin-5	Langbein, DKFZ- Heidelberg, Meerschwein polyklonal IgG	erkennt komplettes humanes Cytokeratin-5	1:1000 Immunfluoreszenz
$\alpha$ 6-integrin	Breitkreuz, DKFZ- Heidelberg, Ratte monoklonal IgG	erkennt spezifisch $\alpha$ 6- Integrinstrang in poliferierender Basalschicht	1:400 Immunfluoreszenz

### 5.7.2 Sekundärantikörper

Antikörper	Bezugsquelle	Verwendung
Cy 2-konjugierter-anti- Kaninchen IgG	Dianova, Krubberg	1:400 Immunfluoreszenz
Meerrettichperoxydase- gekoppelter anti-Kaninchen IgG	Promega, Mannheim	1:5000 Western Blot
Meerrettichperoxydase- gekoppelter anti-Maus IgG	Promega, Mannheim	1:5000 Western Blot
Rhod X Red anti-Meerschwein IgG	Biotrend, Köln	1:400 Immunfluoreszenz
Rhod X Red anti-Ratte IgG	Biotrend, Köln	1:400 Immunfluoreszenz
Biotinylierter Ziege-anti Maus IgG	Dianova, Krubberg	1:125 in 1%BSA/PBS Immunohistochemie

## 5.8 Verwendete Plasmide

Plasmid	Länge in (bp)	Selektion	Träger	Bezugsquelle
pBlueskript KS (pKS, high copy)	2960	Ampicillin	DH5 $\alpha$	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
pcDNA3 (high copy)	5400	Neomycin	DH5 $\alpha$	Invitrogen, Carlsbad, USA
pHR2 (high copy)	6200	Ampicillin	DH5 $\alpha$	Sabine Werner, MPI, München
pcDNA3Cre (high copy)	7000	Ampicillin	DH5 $\alpha$	Denis Dubule, Genf

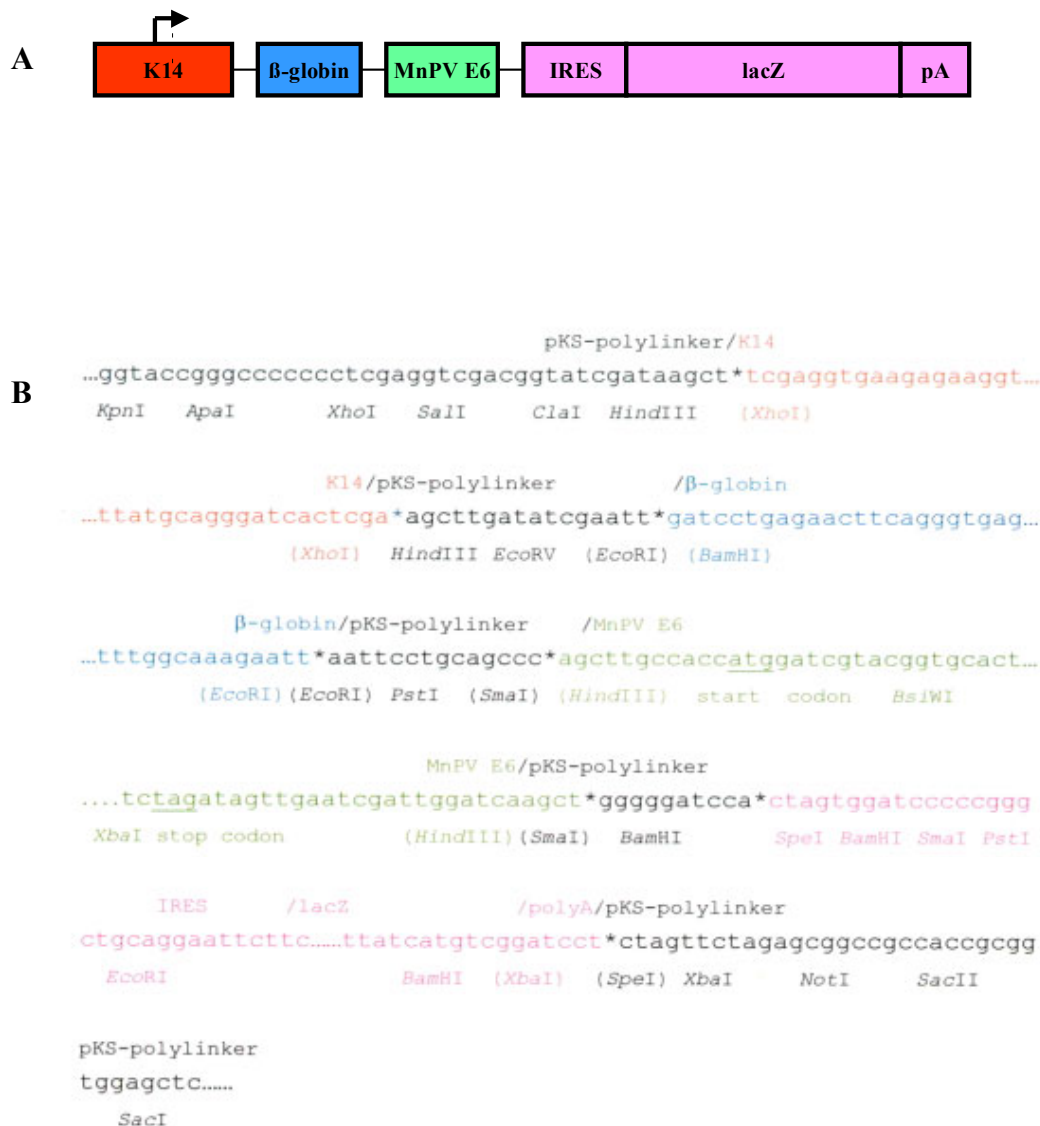
## 5.9 Konstrukte und transgene Mauslinien

Alle transgenen Mauslinien wurden unter Verwendung des FVB/N (Friend leukemia virus, B-type) Mausstamms hergestellt. Dieser Mausstamm zeichnet sich nachweislich durch besondere Sensitivität in Bezug auf Tumorentstehung in der Epidermis aus (Hennings et al., 1993). Ebenso wird er aufgrund seiner prominenter Pronuklei in befruchteten Eizellen vorzugsweise zur Erstellung transgener Linien verwendet (Mahler et al., 1996).

### 5.9.1 Konstrukt zur Erstellung MnPV-E6-transgener Mäuse

Das Konstrukt K14- $\beta$ glo-MnPV-E6-IRES-lacZ-pA wurde von M.Chen erstellt und folgend transgene Mauslinien von H.Pöpperl (DKFZ-Heidelberg) hergestellt (Abb.4.1A). Es wurden acht transgene Linien erzeugt, die sich in ihrer Expressionsintensität unterscheiden (Chen, 2000).

Die Expression des transgenen Konstruktes wurde mit Hilfe des lacZ-Reportergens über einen Farbnachweis der  $\beta$ -Galactosidaseaktivität ermittelt. Die Expression des lacZ-Reportergens war hauptsächlich in Regionen des Gesichtes, der Schnauze, Augen, Ohren, Extremitäten, in der äußeren Schicht der Haarfollikel und des Schwanzes lokalisiert (Abb.4.2). Die Expression des lacZ-Reportergens entspricht dem typischen Expressionsmuster des humanen Cytokeratin-14-Promotors (Byrne et al., 1994).



**Abb. 4.1 A: Konstrukt zur Erstellung MnPV-E6-transgener Mäuse**

Die Farbwahl der einzelnen Bereiche wurde entsprechend der Farbwahl der folgenden Sequenz in Abb. 4.1B gewählt. Die zwischen den Genbereichen befindlichen Verbindungslinien bezeichnen die vorhandene Polylinkersequenzen des pKS Plasmides.

K14: Humaner Keratin-14-Promotor/Enhancer; β-globin: Kaninchen β-Globin Intronsequenz mit Exonübergängen; MnPV-E6: codierender Bereich des MnPV-E6-Gens; IRES: interne Ribosomen Eintrittsstelle des Encephalomyokarditis Virus; lacZ: Reportergen codiert β-Galactosidase; pA: Polyadenylierungssignal des SV40 T-Antigens

**B: Nukleotidsequenz des Konstruktes zur Erstellung MnPV-E6-transgener Mäuse**

Die Farben der Sequenzen entsprechen der Farbwahl der Gene in Abb. 4.1A (Chen, 2000).



**Abb. 4.2 Expressionsmuster in MnPV-E6-transgenen Mausembryos**

Die Expressionsintensität des lacZ-Reportergens wurde an Mausembryos aller acht MnPV-E6-transgenen Linien mittels X-gal analysiert. Die Embryonen wurden 14,5 Tage nach Befruchtung isoliert (Chen, 2000).

### 5.9.2 Konstrukt zur Erstellung induzierbarer MnPV-E7-transgener Mäuse

Zur Erstellung MnPV-E7-transgener Mäuse wurde ein induzierbares System gewählt. Mit Hilfe des Bakteriophagen-P1-Cre/lox-Systems kann die Produktion des MnPV-E7-Proteins durch einen Rekombinationsvorgang gezielt induziert werden. Das verwendete Konstrukt K14- $\beta$ glo-loxP-lacZ-pA-loxP-MnPVE7-pA (Abb. 4.3A) wurde von M.Chen erstellt und folgend die transgene Mauslinie von U.Kloz (Transgener Service, DKFZ-Heidelberg) hergestellt.



**Abb. 4.3 A: Konstrukt zur Erstellung induzierbarer MnPV-E7-transgener Mäuse**

Die Farbgebung der einzelnen Elemente wurde entsprechend der Farbwahl der Sequenzen in Abb. 4.3 B gewählt. K14: Humaner Keratin-14-Promotor/Enhancer;  $\beta$ -globin: Kaninchen  $\beta$ -Globin Intronsequenz mit Exonübergängen; loxP: Rekombinationsstellen der Cre-Rekombinase; lacZ: Reportergen codiert  $\beta$ -Galactosidase; pA: Polyadenylierungssignal des SV40 T-Antigens; MnPV-E7: Sequenz der MnPV-E7codierenden Bereiche

```

                                pKS-polylinker/K14
...ggtaccgggccccccctcgaggctcgacgggtatcgataagct*tcgaggtgaagagaaggt...
B   KpnI  ApaI    XhoI   SalI    ClaI   HindIII (XhoI)

                                K14/pKS-polylinker    /β-globin
...ttatgcagggatcactcga*agcttgatatcgaatt*gatcctgagaacttcagggtgag...
                                (XhoI)  HindIII EcoRV (EcoRI) (BamHI)

                                β-globin/pKS-polylinker    /MnPV E7
...atTTTggcaagaatt*aattcctgcagccc*atcgaattcgccaccatgatagggccc...
                                (EcoRI) (EcoRI) PstI (SmaI) (EcoRV)EcoRI start codon ApaI

                                MnPV E7/pKS-polylinker                                IRES
...ttgaatagttgat*gggggatcca*ctagtggatccccgggctgcaggaattcttc.....
stop codon(EcoRV) (SmaI) BamHI SpeI BamHI SmaI PstI EcoRI

/lacZ                                /polyA/pKS-polylinker
..... ttatcatgtcggatcct*ctagttctagagcggccgccaccgcggtggagctc...
                                BamHI (XbaI) (SpeI) XbaI NotI SacII SacI

```

**Abb. 4.3 B: Nukleotidsequenz des Konstruktes zur Erstellung induzierbarer MnPV-E7 transgener Mäuse**

Die Farbwahl der Sequenzen stimmt mit der Farbgebung der Gene in Abb. 4.3A überein (Chen, 2000).

### 5.9.3 Konstrukt zur Erstellung Cre-Rekombinase-transgener Mäuse

Das verwendete Konstrukt K14-βglo-cre-pA (Abb. 4.4) wurde von H. Pöpperl (DKFZ-Heidelberg) erstellt und anschließend die transgenen Mäuse von U. Kloz (Transgener Service, DKFZ-Heidelberg) erzeugt (Abb. 4.4). Transgene Mäuse dieser Linie tragen ein Fusionsprotein der bakteriellen Cre-Rekombinase und einer für Tamoxifen anlagerungsfähigen hormonellen Bindungsdomäne eines Estrogen Rezeptors.



**Abb. 4.4 Konstrukt zur Erstellung Cre-Rekombinase-transgener Mäuse**

K14: Humaner Keratin-14-Promotor/Enhancer; β-globin: Kaninchen β-Globin Intronsequenz mit Exonübergängen; Cre ER<sup>T</sup>: modifizierte Tamoxifen induzierbare Cre-Rekombinase des P1 Phagen; pA: Polyadenylierungssignal des SV40 T-Antigens.



---

#### **5.9.4 Enhanced green fluorescence protein (eGFP)-Reporter-Maus zur Detektion der Cre-Rekombinase-Aktivität**

Zur funktionellen Untersuchung der Cre-Rekombinase-Aktivität der erstellten K14- $\beta$ glo-cre-pA Mauslinie wurde eine eGFP-Reporter-Maus verwendet. Diese eGFP-Reporterlinie beinhaltet loxP-Stellen die Exon 2 bis 7 des RAGE-Gens (receptor for advanced glycated end products) flankieren (Constien et al., 2001). Mit Hilfe der Cre-Rekombinase werden diese RAGE-Elemente an den loxP-Seiten entfernt, wodurch ein Thymidinkinase-Promotor direkt vor die vorher promotorlose eGFP-Region gesetzt wird. Das eGFP-Gen wird transkribiert und kann mittels Immunfluoreszenz anschließend nachgewiesen werden. Durch Verpaarungen dieser transgenen Linie mit den erzeugten Cre-Rekombinase-transgenen-Mäusen und anschließender Tamoxifenbehandlung derer Nachkommen kann anhand der entstandenen eGFP-Expression die Funktionalität der Cre-Rekombinase-transgenen-Linie ermittelt werden.

---

## 6 Methoden

### 6.1 Zellkulturtechniken

Im Umgang mit Zellkulturen wurden alle Arbeitsschritte unter einer sterilen Werkbank vorgenommen.

#### 6.1.1 Inkulturnahme eukaryontischer Zellen

Die gefrorene Zellsuspension wurde schnell durch Zugabe des jeweiligen Kultivierungsmediums aufgetaut und zur Entfernung des im Einfriermedium vorhandenen DMSO 5 min bei 1000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in frischem Medium resuspendiert und in der gewünschten Dichte ausplattiert. Es erfolgte eine Inkubation bei 37 °C, 5 % Kohlendioxyd und 95 % Luftfeuchtigkeit. Am darauffolgenden Tag wurde erneut das Medium gewechselt.

#### 6.1.2 Kultivierung eukaryontischer Zellen

Die subkonfluenten Zellen wurden nach Entnahme des Mediums mit PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA-Lösung vom Kultivierungsbehältnis abgelöst und im entsprechenden Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen im gewünschten Verdünnungsverhältnis erneut ausplattiert.

Bei allen Zellen wurde in einem Tonus von 3 Tagen ein Mediumwechsel vorgenommen.

#### 6.1.3 Kryokonservierung eukaryontischer Zellen

Zur Einlagerung von Zellen wurden diese wie in Kap. 2.1.1 trypsinisiert, neutralisiert und 5 min bei 1000 Upm sedimentiert. Es wurden jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen in 1,5 ml DMSO-haltigem Einfriermedium aufgenommen und in Kryokonservierungsröhrchen abgefüllt. Zunächst erfolgte eine Lagerung bei  $-70$  °C worauf am folgenden Tag die Zellen in einen Flüssigstickstoff-Tank überführt wurden und so langfristig gelagert werden konnten.

## 6.2 Herstellung primärer Keratinozyten

2-3 Tage alte Mäuse wurden dekapitiert, die Extremitäten in Gelenkhöhe abgeschnitten, der Schwanz komplett entfernt und der Körper dorsal mit einem geraden Schnitt geöffnet. Nach wiederholtem Waschen in 70 %igem Alkohol und danach in PBS wurden die Häute vorsichtig ohne Einrisse oder Verletzungen entfernt und mit der Dermis nach unten auf Kulturschalen ausgebreitet. Bei diesem Vorgang war darauf zu achten, daß die Haut keine Falten oder Fleischklumpen enthält. Die Häute wurden 20 min getrocknet und danach auf eine 0,25 %ige Trypsinlösung schwimmend aufgebracht. Hierbei war es wichtig, daß das Trypsin nicht die Epidermis berührt. Es erfolgte eine Inkubation bei 4 °C ÜN. Am darauf folgenden Tag wurde die Epidermis vorsichtig mit anatomisch gebogenen Pinzetten von der Dermis abgezogen und in Keratinozyten-serumfreiem-Medium (Keratinozyten-SFM) mit 0,05 mM CaCl<sub>2</sub> überführt. Die Epidermis wurde mit einer gebogenen Schere in kleinere Stücke geschnitten und 20 min bei 250 U/min auf einem Magnetrührer gerührt. Danach wurde der Zellbrei in Trichtergefäßen mit Hilfe von Filternetzen aus Polyester mit einer Porengröße von 1000 µm und folgend von 200 µm filtriert. Das Filtrat wurde 15 min bei 700 Upm zentrifugiert und mit PBS gewaschen. Nach einer wiederholten Zentrifugation wurden die Zellen in Keratinozyten-SFM auf Collagen/Fibronectin beschichteten Zellkulturschalen ausplattiert (siehe 6.5). Es erfolgte eine Inkubation im Brutschrank bei 5 % Kohlendioxyd und 37 °C. Nach 24 Stunden fand erneut ein Mediumwechsel statt um nicht angeheftete Zellen und Hornschuppen zu entfernen.

## 6.3 Zellkultur aus Tumormaterial

Die Tumoren wurden aus dem Hautgewebe herausgeschnitten, in PBS gewaschen und Verhornungen oder Eitermaterial entfernt. Anschließend wurden sie unter Zuhilfenahme einer gebogenen Schere zu einem Zellbrei verarbeitet der 30 min bei 37 °C in 0,25 %iger Trypsin-Lösung auf einem Schwenktisch inkubiert wurde. Es erfolgte eine Neutralisation durch Zugabe von Low-Calcium-Medium. Der Zellbrei wurde über ein 100 µm Nylon Filternetz gefiltert und im Anschluß auf 70 % Percoll 30 min bei 1200 Upm zentrifugiert. Anschließend wurde die im Percoll entstandene Zellbande mit einer Pipette abgezogen, in PBS gewaschen und wiederum 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die zurückbleibenden Zellen in Low-Calcium-Medium

auf Collagen/Fibronectin beschichteten Zellkulturschalen ausplattiert. Die im Filternetz befindlichen Teilchen wurden ebenfalls auf beschichteten Platten ausplattiert und bei 37 °C und 5 % Kohlendioxyd im Brutschrank kultiviert. Am nachfolgenden Tag wurde das Medium vorsichtig entfernt um angeheftete Tumorzellen nicht versehentlich wieder abzuspülen und durch frisches Medium ersetzt.

#### **6.4 Reduzierung des Calciumgehaltes aus fötalem Kälberserum (FCS)**

Die Reduzierung des Calciums wurde mit Chelex 100 der Fa. BioRad nach deren Standardprotokoll durchgeführt. Die Bestimmung des Calciumgehaltes des behandelten Serums wurde von Fa. Kratz, Chemisch-Technisches-Labor-Heidelberg, durchgeführt. Nach der erfolgten Calciumbestimmung wurde das behandelte Serum und das unbehandelte Serum so gemischt, daß der gewünschte Calciumgehalt von 0,05 mM erhalten wurde.

Hierzu wurde folgende Formel angewandt:

a = unbehandeltes Serum (ml)

b = behandeltes Serum (ml)

$$a = \frac{100 (20,04 - \text{Calciumgehalt behandeltes Serum})}{\text{Calciumgehalt unbehandeltes Serum} - \text{Calciumgehalt behandeltes Serum}}$$

$$b = 100 - a$$

#### **6.5 Collagen/Fibronectinbeschichtung von Kulturbehältnissen**

5 mg Fibronectin wurden 5 min in HBSS bei 37 °C gelöst. Anschließend wurden 15,5 mg Collagen und 50 mg sterilfiltriertes BSA in HBSS gelöst, mit der Fibronectinlösung vermischt und mit HBSS auf 500 ml aufgefüllt. Die Beschichtungslösung wurde bei 4 °C gelagert. Vor Gebrauch wurde die Lösung in Kulturgefäße pipettiert, homogen verteilt und ÜN im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurde die

---

Beschichtungslösung abgenommen und das Kulturbehältnis einmalig mit PBS gewaschen. Anschließend konnten die Kulturbehältnisse verwendet werden.

## **6.6 Liposomen-vermittelte Transfektion eukaryontischer Zellen**

Zur Transfektion von primären Keratinozyten der Maus und MK2-Zellen wurde das liposomale Transfektionreagenz DOTAP der Fa. Roche verwendet. Hierbei wurde der Arbeitsanweisung des Herstellers entsprochen (Schalaster et al., 1990).

## **6.7 Detektion der $\beta$ -Galaktosidaseaktivität**

Dieser Nachweis beruht auf der Detektion des Enzyms  $\beta$ -Galaktosidase, das aufgrund einer erfolgten Expression des lacZ-Gens synthetisiert wird. Dieses Enzym setzt das Substrat X-gal durch enzymatische Hydrolyse in ein blaues, unlösliches Präzipitat um.

Eine sehr verbreitete Methode zur Überprüfung der Transgenexpression in Mäusen ist daher die Verwendung des lacZ-Gens als Reportergen. Exprimiert eine Biopsie ein transgenes Konstrukt welches das lacZ-Gen beinhaltet, läßt sich dieses nach einer kurzen Behandlung mit Hilfe von X-gal nachweisen (Hogan et al., 1994). Ist das Transgen vorhanden und wird exprimiert färbte sich das zu untersuchende Material blau an.

## **6.8 Histologische Diagnoseverfahren**

Zur spezifischen Untersuchung von Gewebeveränderungen, gesteigerten Proliferationen oder Lokalisierung Transgen-exprimierender Bereiche in Geweben wurden histologische Diagnoseverfahren durchgeführt. Hierzu wurden sowohl Paraffinschnitte als auch Kryostatschnitte hergestellt.

### **6.8.1 Herstellung von Paraffinschnitten**

Die zu untersuchenden Biopsien wurde nach Entnahme ÜN bei 4 °C in 4 % Formalin/PBS fixiert, anschließend gewässert und in Paraffinblöckchen eingebettet. Die Gewebeschnitte wurden an einem Mikrotom mit einer Schnittdicke von ca. 2  $\mu$ m erstellt.

---

Danach wurden die Gewebsschnitte entparaffiniert und durch eine absteigende Alkoholreihe rehydriert (2x 10 min Xylol, je 5min 100 %, 70 %, 50 %iges Ethanol, dest. Wasser). Nach der Färbung werden die Schnitte durch eine ansteigende Alkoholreihe dehydriert und nach einer erneuten zweimaligen Inkubation mit Xylol für jeweils 10 min in Eukitt eingedeckt.

Erfolgte ein immunohistochemischer Nachweis (siehe 6.9.2) wurden die Schnitte nach der Färbereaktion mit PBS gewaschen und in Mowiol eingedeckt.

### **6.8.2 Herstellung von Kryostatschnitten**

Die frisch entnommene Biopsie wurde in einem Einbettmittel (Tissue-tek, Fa. Sakura) in Flüssigstickstoff eingefroren und an einem Gefriermikrotom bei  $-25\text{ °C}$  geschnitten. Die Schnitte von ca. 7-10  $\mu\text{m}$  Dicke wurden auf Collagen-beschichtete Objektträger gezogen, kurz luftgetrocknet und anschließend in das gewünschte Nachweisverfahren eingesetzt.

Falls kein immunohistochemische Nachweis erfolgte, wurden im Anschluß an die Behandlung die Schnitte durch eine ansteigende Alkoholreihe dehydriert und nach zweimaliger Inkubation mit Xylol in Eukitt eingedeckt (siehe 6.8.1). Erfolgte eine Immunohistochemie wurden die Schnitte nach der Färbereaktion mit PBS gewaschen und in Mowiol eingedeckt.

Bei der Erstellung von Hautschnitten wurde es aufgrund der Beschaffenheit und der extremen Zähigkeit der Haut schwierig, intakte, dünne Hautschnitte zu erhalten. Durch ein Herunterkühlen des Kryostates auf  $-25\text{ °C}$  und eine daraus resultierende Objekttemperatur von  $-27\text{ °C}$  wurden die Schneideeigenschaften erheblich verbessert. Zudem wurde darauf geachtet, daß das Hautstück in einer Orientierung von Dermis zu Epidermis geschnitten wurde, da noch vorhandene Tierhaare die Qualität des Schnittes verschlechterten.

### **6.8.3 Hämalaun/Eosin-Färbung**

Die Hämalaun/Eosin-Färbung ist eine gängige Übersichtsfärbung in der Histologie. Der Farbstoff Hämalaun färbt im alkalischen Milieu basophile Strukturen wie Zellkerne intensiv blau, wobei das Cytoplasma anschließend mittels einer eosinhaltigen Lösung rot gegengefärbt wird.

---

Nach einer vorausgehenden Rehydrierung der Schnitte erfolgte ein kurzes Spülen in dest. Wasser. Danach wurden die Präparate 10 min in 1 %iger Hämalaun-Lösung gefärbt, 10 min unter fließendem Wasser gebläut, kurz in 60 %igem Alkohol gewaschen und letztendlich 1-2 min mit einer 0,4 %igen Eosinlösung gegengefärbt. Abschließend erfolgte das Dehydrieren und Einbetten der Präparate (siehe 6.8.1).

#### **6.8.4 Nachweis der $\beta$ -Galaktosidase**

Diese Färbung konnte nur an Kryostatschnitten vorgenommen werden, da eine Paraffinisierung der Biopsie eine inhibitorische Wirkung auf das hier aktiv benötigte Enzym  $\beta$ -Galaktosidase zu Folge hätte (siehe 6.7).

Der gewünschte Nachweis erfolgte wie in Hogan et al.(1994) beschrieben. Wurde  $\beta$ -Galaktosidase in der Zelle exprimiert, färbte sie sich blau an. Negative Zellen hingegen blieben ungefärbt.

### **6.9 Immunohistochemie (IHC)**

Zur Darstellung der Verteilung zellulärer Proteine in Geweben oder Zellen wurden immunhistochemische Methoden verwendet. Hierbei wurden die Präparate (histologische Gewebsschnitte oder adhärende Zellkulturen) nach entsprechender Fixierung mit einem primären Antikörper behandelt, der spezifisch gegen die zu untersuchenden Proteine gerichtet war. Die Antikörper erkannten ihr entsprechendes Antigen und gingen dort eine Bindung ein. Zur Detektion des Primärantikörpers nutzte man einen Sekundärantikörper, der gegen konstante Regionen der entsprechenden Immunglobuline der Spezies gerichtet war, in welcher der primäre Antikörper erzeugt wurde. Dieser ist mit Detektoren gekoppelt und kann zum Nachweis aller Antikörper einer Spezies genutzt werden.

#### **6.9.1 Immunohistochemische Reaktion nach der ABC-Methode**

Die Avidin-Biotin-Methode basiert auf der Fähigkeit des Glykoproteins Avidin, vier Moleküle des Vitamins Biotin physikalisch zu binden. Hierzu werden drei Reagenzien benötigt. Das erste ist ein unkonjugierter Primärantikörper der spezifisch gegen das zu

bestimmende Antigen gerichtet ist, sowie ein biotinylierter Sekundärantikörper, welcher sich an den ersten Antikörper anlagert. Das dritte Reagenz ist ein Peroxidase-konjugierter Avidin-Biotin-Komplex, welcher eine Verstärkung des zu detektierenden Signals zur Folge hat. Die freien Stellen des Avidinmoleküls ermöglichen die Bindung an das Biotin des Sekundärantikörpers, wobei das Enzym Peroxidase mit einem geeigneten Chromogen (ACE-Substrat) sichtbar gemacht wird.

Diese Methode wurde sowohl an Paraffinschnitten als auch an Kryostatschnitten durchgeführt.

Die Paraffinschnitte wurden entsprechend entparaffiniert und danach 10 min in 0,1 M Citratpuffer pH 6,0 in einer Mikrowelle bei 650 Watt aufgeköcht. Die Schnitte durften hierbei aufgrund verdunstender Flüssigkeit nicht austrocknen. Die Objektträger abkühlen lassen und in PBS waschen. Kryostatpräparate wurden nicht vorbehandelt sondern nach einer 2-minütigen Fixierung in Azeton bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  kurz luftgetrocknet und mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine 15-minütige Inkubation von fünf Tropfen Avidin/ml 10 %igem Ziegen Serum. Anschließend wurde kurz mit PBS gespült und folgend fünf Tropfen Biotin/ml 10 %igem Ziegen Serum auftragen um unspezifische Hintergrundsignale zu blockieren. Danach wurde der Primärantikörper in einer zuvor ermittelten Verdünnung in PBS aufgetragen und eine Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Hierauf wurde 3x mit PBS gewaschen und anschließend der biotinylierte Sekundärantikörper in 1 % BSA/PBS für 40 min in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert. Nach erneutem PBS Waschvorgang wurde tropfenweise Peroxidase-gekoppeltes Streptavidin in 1 % BSA/PBS und einem Verdünnungsverhältnis von 1:200 aufgetropft und eine Stunde bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert. Es wurde anschließend 3x mit PBS gewaschen und danach tropfenweise ACE-Substrat aufpipettiert, wobei eine ständige mikroskopische Kontrolle erfolgen mußte, da die Inkubationszeit zwischen 5–60 min variieren können. Nach erneutem Waschen wurde für 1–2 min mit Hämalaun gegengefärbt, 15 min gebläut und die Objektträger abschließend mit Mowiol eingedeckt.

#### Herstellung des ACE-Substrates:

Es wurden 4 mg Amino-ethyl-carbazol in 500  $\mu\text{l}$  Dimethylformamid gelöst. Derzeit wurden 2,1 ml 0,1 M Essigsäure mit 0,1 M Natriumazetat auf 10 ml aufgefüllt und gemischt. Anschließend wurden 500  $\mu\text{l}$  dieser Lösung verworfen, das gelöste Aminoethylcarbazol hinzugegeben und gemischt (gelbliche Farbe). Die Lösung wurde



---

durch einen Papierfilter gefiltert, lichtgeschützt aufbewahrt und unmittelbar vor Verwendung mit 5 µl 30 %igem Wasserstoffperoxid versetzt.

Eine Auswertung des durchgeführten Nachweises erfolgte durch willkürliches Auswählen von zehn Arealen im Präparat, wobei pro Areal 100 Zellen mit Hilfe eines Lichtmikroskopes ausgezählt wurden. Die als positiv auszuwertenden Zellen erschienen rot-braun, im Vergleich zu negativen bläulichen Zellen.

### **6.9.2 Indirekte Immunfluoreszenz**

Durch Verwendung der indirekten Immunfluoreszenz wird das zu detektierende Antigen mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers und anschließender Behandlung eines mit Fluorochrom-gekoppelten sekundären Antikörpers nachgewiesen.

Histologische Gewebeschnitte oder auf Deckgläschen befindliche adhärende Zellkulturen wurden 10 min bei -20 °C in vorgekühltem Azeton fixiert, luftgetrocknet und die Objektträger mit einem Fixogumrand versehen. Die Präparate wurden in 1xTBST eingetunkt, kurz mit PBS gewaschen und zur Absättigung unspezifischer Bindungen 15 min mit 5 %igem Ziegenserum in PBS inkubiert. Alle Inkubationsschritte erfolgten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Die Flüssigkeit wurde abgesaugt, der Primärantikörper aufpipettiert und 60 min inkubiert. Im Anschluß wurde dreimalig mit PBS auf einem Schütteltisch gewaschen. Anschließend wurde der Sekundärantikörper aufgetragen, nach einer 30-minütigen Inkubation 1/10 Volumen DAPI zugegeben und für weitere 5 min inkubiert. Nachfolgend wurden die Präparate 3x 10 min in PBS gewaschen, kurz in dest. Wasser und 100 %igem Ethanol eingetunkt und luftgetrocknet. Abschließend wurden die Präparate mit Deckgläschen bzw. die auf Deckgläschen befindlichen Zellen auf einem Objektträger mit Mowiol eingedeckt und bei 4 °C aufbewahrt.

Die Auswertung der Fluoreszenzen erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes und den jeweilig benötigten Filtern.

---

## 6.10 Methoden zur Analyse von Nukleinsäuren

### 6.10.1 Transformation von *Escherichia coli* (*E.coli*) DH5 $\alpha$ -kompetenten Zellen

Die erwünschte Transformation erfolgte nach der Hitzeschock-Methode. Hierbei wird die Aufnahme und anschließende Vermehrung einer doppelsträngigen, zirkulären Plasmid-DNA in *E.coli* ermöglicht.

Auf Eis wurden 0,5  $\mu\text{g}$  der zu transformierenden Plasmid-DNA in 50  $\mu\text{l}$  *E.coli* DH5 $\alpha$ -kompetenten-Zellen pipettiert und 20 min inkubiert. Der Ansatz wurde 2 min bei 42 °C im Wasserbad erwärmt und anschließend erneut 5 min auf Eis inkubiert. Zu dem Reaktionsansatz wurden 500  $\mu\text{l}$  LB-Medium zugegeben und 45 min bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Nach einer Zentrifugation von 5 min bei 1000 Upm wurden 300  $\mu\text{l}$  des Überstandes verworfen und die restlichen 200  $\mu\text{l}$  auf LB-Ampicillinagarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag konnten Einzelkolonien gepickt und in eine Plasmidpräparation eingesetzt werden.

### 6.10.2 Minipräparation von Plasmid-DNA

Eine Minipräparation ermöglicht eine schnelle Gewinnung kleinerer Plasmidmengen und ist vor allem für analytische Reihenuntersuchungen (Restriktionsanalysen) von Plasmiden geeignet. Eine Isolierung von Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse basiert auf dem Prinzip der Denaturierung von genomischer DNA in einem pH-Bereich von 12,0 bis 12,5. Hierbei wird die Plasmid-DNA, im Gegensatz zur komplexen DNA, nach Neutralisation wieder renaturiert.

Hierzu wurden 4 ml YT-Medium/Ampicillin mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert. Von dieser Übernachtskultur wurden 2 ml durch Zentrifugation bei 13.000 Upm für 3 min pelletiert und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde in 100  $\mu\text{l}$  Bakterien-Puffer resuspendiert und für 10 min auf Eis gestellt. Die Lyse der Bakterien und die Denaturierung von DNA erfolgte durch Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  Bakterien-Lyse-Puffer und einer Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur. Der Abschluß der Lyse zeigte sich durch ein Aufklaren der zuvor trüben Lösung. Durch Zugabe von 150  $\mu\text{l}$  vorgekühltem Essigsäure/Kaliumacetat-Puffer verschob sich der pH-Wert der Lösung in den neutralen Bereich. Zirkuläre Plasmid-DNA wurde hierdurch vollständig renaturiert und blieb in Lösung während Proteine und

---

chromosomale DNA ausfielen. Es erfolgte eine Inubation von 5 min auf Eis, danach wurde nochmals 10 min bei 13.000 Upm zentrifugiert und aus dem Überstand die Plasmid-DNA durch Zugabe von 2 Vol Ethanol bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 30 min gefällt.

Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt für 30 min bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 13.000 Upm, wurde das Pellet mit 70 %iger Ethanol-Lösung gewaschen und in 1xTE-Puffer gelöst. Restriktionsanalysen von Plasmid-Minipräparationen wurde RNase beigefügt um einer Maskierung von kleinen Restriktionsfragmenten der RNA vorzubeugen.

### **6.10.3 Isolierung von Plasmid-DNA mit Hilfe des Qiagen Maxi-prep-Kits**

Die Großpräparation erlaubt eine Gewinnung größerer Plasmidmengen in relativ reiner Form. Die Ausbeuten an Plasmid-DNA liegen hierbei im Mikro- bis Milligrammbereich. Sie variieren natürlich je nach eingesetztem Plasmid.

Die Plasmidaufarbeitung erfolgte nach den Arbeitsvorschriften der Fa. Qiagen. Das Prinzip dieses Kits beruht auf einer modifizierten alkalischen Lyse, wobei die Plamid-DNA an eine Anionenaustauschersäule gebunden wird. Restliche Zellbestandteile werden so entfernt und letztendlich die Plasmid-DNA mit Hilfe eines Puffers der eine hohe Salzkonzentration besitzt, von der Säule eluiert.

### **6.10.4 Restriktionsspaltung von DNA**

Da Restriktionsenzyme in 50 % Glycerin gelagert werden ist das Endvolumen des Reaktionsansatzes von der eingesetzten Enzymmenge abhängig. Die Glycerinkonzentration sollte höchstens 10 % des Ansatzvolumens betragen. Die gewünschte Menge an Plasmid-DNA wurde mit dem entsprechenden Volumen an Puffer und mit 2 U/ $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA des einzusetzenden Restriktionsenzym versetzt und 2 Stunden bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Anschließend kann schon eine schnelle Kontrolle der vorgenommenen Spaltung auf einem Agarosegel erfolgen. Wird das gewünschte DNA-Stück für eine Ligation benötigt sind weitere Schritte nötig.

Im Anschluß wurde eine Phenol/Chloroform Extraktion, gefolgt von einer Chloroform Reinigung und einer anschließenden Natriumacetat/Ethanol-Fällung vorgenommen. Hierbei wurden 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat und 2 Vol. Ethanol zugegeben und 20 min bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gefällt. Die Volumenangaben beziehen sich auf den Reaktionsansatz. Danach wurde 15 min bei 13.000 rpm und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert und das entstandene Pellet

---

zweimalig mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das DNA-Pellet getrocknet und in 0,1xTE-Puffer aufgenommen.

#### **6.10.5 Vermessung von Nukleinsäuren**

Mit Hilfe der photometrischen Konzentrationsbestimmung wird die Absorption der in Lösung befindlichen Stoffe bei unterschiedlicher Wellenlänge gemessen. Hierbei verfügen Proteine und aromatische Verbindungen über ein Absorptionsmaximum bei 280 nm, wohingegen Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260 nm ihr Maximum aufweisen. Durch eine photometrische Messung kann somit sowohl die Konzentration, als auch der Reinheitsgrad einer Nukleinsäure-Lösung bestimmt werden. Hierbei entspricht 1 OD<sub>260</sub> einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 33 µg/ml einzelsträngiger Oligonukleotid-DNA bzw. 40 µg/ml RNA.

Die Nukleinsäuren wurden in dest. Wasser, TE-Puffer (DNA) oder in DEPC-Wasser (RNA) verdünnt und in Quarzglasküvetten überführt. Als Referenz diente hierbei die Lösung in der die Nukleinsäure verdünnt wurde.

#### **6.10.6 DNA-Elektrophorese in Agarose-Horizontalgelen**

Agarose-Gelsysteme dienen sowohl zur Trennung und Analyse von linearen DNA-Fragmenten, superhelikaler Plasmid-DNA, als auch präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten. Es wurde eine Agarosekonzentration von 1-1,5 % verwendet um Fragmente zwischen 0,1 und 14 kb zu detektieren. Zur spezielleren Auftrennung kleinerer Fragmente (von 0,1-0,5 kb) wurde ein 2 %iges MetaPhor gel verwendet. Die Agarose bzw. MetaPhor-Agarose wurde mit dem entsprechenden Volumen an 1xTAE-Puffer eingewogen, in der Mikrowelle aufgeköcht, mit einer Ethidiumbromidlösung (Endkonzentration 1 µg/ml) versehen und in einen Gelschlitten eingegossen. Als Laufpuffer wurde ebenfalls 1xTAE-Puffer verwendet, welcher nach Erstarren des Gels in den Schlitten eingefüllt wurde. Die Proben wurden mit 10xLadepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Zur besseren Identifikation der Bandengröße wurde ein Größenmarker aufgetragen. Die Elektrophoresen wurde bei 2-8 V/cm Elektrodenabstand durchgeführt. Die DNA-Banden wurden durch die erfolgte Interkalation des Ethidiumbromids zwischen den DNA-Basen im UV-Licht bei 260 nm sichtbar und konnten nun fotografisch festgehalten werden.

### **6.10.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der DNA-Fragmente wurde das gewünschte Fragment unter UV-Licht bei 300 nm mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten.

Die Elution der DNA im Größenbereich von 0,2 bis 20 kb erfolgte mit Hilfe des GENE CLEAN-Kits der Fa. Dianova, die der Fragmente von 0,1 bis 0,5 kb mittels Qiaex II Gel-Extraktions-Kit der Fa. Qiagen. Hierbei wurde die Arbeitsanleitung des Herstellers befolgt.

Die DNA-Konzentration des isolierten Fragmentes wurde mittels der Intensität des Ethidiumbromids einer Bande deren Konzentration bekannt war, ermittelt. Hierzu wurde ein Molekulargewichts-Standard  $\lambda$ / Hind III verdaut, verwendet.

### **6.10.8 DNA-Isolierung aus Gewebebiopsien**

Eine DNA-Extraktion mittels Proteinase K-Verdau ist eine schnelle und einfache Methode. Die erhaltene DNA enthält allerdings noch viele Verunreinigungen. Zum Einsatz in eine PCR und somit zur Bestimmung des transgenen Status ist sie jedoch ausreichend.

Das zu testende Material (Schwanzspitzenbiopsie, Tumorbiopsie usw.) wurde in folgendem Puffer über Nacht bei 55°C inkubiert:

5 mM NaCl

500  $\mu$ M Tris pH 7,5

50  $\mu$ M EDTA

0,5 % SDS

0,5 mg/ml Proteinase K

Nach der Inkubation erfolgte zweimalig eine Phenol/Chloroform- und anschließend eine Chloroform Extraktion. Generell wurde ein Volumen von 0,5  $\mu$ l der DNA-Lösung wurde nachfolgend in eine PCR eingesetzt.

### **6.10.9 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)**

Das Prinzip der PCR beruht auf einer enzymatische Vermehrung eines DNA-Abschnittes zwischen zwei Oligonukleotid-Primern die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge gebunden sind. Hierbei wird die Fähigkeit der DNA-Polymerase, einzelsträngige DNA als Matrize zur Synthese des komplementären DNA-Stranges zu verwenden, genutzt.

Als Ansatzpunkt benötigt die DNA-Polymerase freie 3'-Hydroxylgruppen, an die das nachfolgende Nucleosidtriphosphat gekoppelt werden kann. Somit erfolgt eine spezifische Amplifikation eines durch die Oligonucleotid-Primer festgelegten DNA-Bereiches unter zyklischer Abfolge von Denaturierung, Primer-Anlagerung und Extension. Durch die Hitzebeständigkeit der verwendeten Polymerase (*Thermophilus aquaticus*) kann dieser Vorgang mehrere Zyklen durchlaufen und automatisiert werden. Wichtige Kriterien einer spezifischen PCR sind die Auswahl der Oligonucleotid-Primer, die Wahl der 'annealing'-Temperatur, sowie die vorherrschenden Salzbedingungen (Arnheim und Ehrlich, 1992). Die Reaktionen wurden in einem Volumen von je 20 µl auf Eis in 0,5 µl Reaktions-gefäßen angesetzt und beinhaltete:

1xPCR Puffer  
1.5 mM MgCl<sub>2</sub>  
0,25 mM dNTP  
50 ng antisense Primer  
50 ng sense Primer  
0,75 U *Taq* DNA-Polymerase  
1,0 ng Template-DNA bzw. 2 µl der RT-Reaktion  
destilliertes Wasser

Die Amplifikation wurde mit Hilfe eines Thermocyclers mit integriertem Heizdeckel durchgeführt. Im ersten Schritt wurde bei jedem PCR-Programm eine Denaturierung des Templates durch Erhitzen auf 94 °C für 3 min durchgeführt. Anschließend erfolgten für das zu amplifizierende DNA-Stück spezifische Anzahl von Zyklen bei einer zuvor ermittelten Annealingtemperatur. Hierbei wurde anhand der GC-Verhältnisse in den verwendeten Primern die Annealingtemperatur ermittelt. Diese sollte möglichst nur 2-3 °C unter dem Schmelzpunkt der Primer liegen. Nach Ablauf der Zyklen wurden alle verbleibenden einzelsträngige DNA-Abschnitte durch eine Inkubation von 5 min auf 72 °C in den doppelsträngigen Zustand überführt und die Reaktion auf 21 °C heruntergekühlt. Zur Analyse der PCR-Produkte wurden jeweils 20 µl der Reaktion mit Hilfe der Gelelektrophorese auf einem 1 %igen Agarosegel mit 1xTAE-Puffer analysiert und mit Hilfe von Ethidiumbromid visualisiert.

Es wurden folgende PCR-Programme verwendet:

Amplifiziertes Produkt	Länge (Bp)	Primer	Bedingungen	Anzahl der Zyklen
Cre/pA	824	ATV 174 ATV 12	94°C 60 s; 55°C 60 s; 72°C 120 s	30
H-Ras	189	ATV 202 ATV 203	94°C 30 s; 60°C 30 s; 72°C 30s	30
lacZ	610	ATV 11 ATV 12	94°C 60 s; 55°C 60 s; 72°C 120 s	30
MnPV-E6	269	ATV 176 ATV 177	94°C 30 s; 50°C 45 s; 72°C 70s	30
MnPV-E7	280	ATV 73 ATV 74	94°C 30 s; 50°C 45 s; 72°C 70s	31
Myogenin	173	Myg 1 Myg 2	94°C 60 s; 55°C 60 s; 72°C 120 s	30
$\beta$ -Aktin	599	ATV 49 ATV 50	94°C 60 s; 55°C 60 s; 72°C 120 s	30
$\beta$ -Globin/Cre	610	ATV173 ATV 114	94°C 60 s; 55°C 60 s; 72°C 120 s	30
$\beta$ -Globin/ MnPV-E7	889	ATV 114 ATV 74	94°C 60 s; 55°C 60 s, 72°C 120 s	30

## 6.11 Isolierung von RNA

Es mußte während der RNA-Isolierung darauf geachtet werden, daß alle Arbeitsmaterialien und Lösungen RNase frei waren. Hierzu wurden alle Materialien mit 2 %iger SDS-Lösung über Nacht eingeweicht, gesäubert bzw. gebacken, sowie alle Lösungen mit DEPC-Wasser angesetzt.

### 6.11.1 RNA-Isolierung aus Mausepidermis

Es ist darauf zu achten, daß die entnommene Mausepidermis nach der Tötung der Maus und der darauf folgenden Rasur möglichst schnell in Flüssigstickstoff eingefroren wird um einem Angriff von RNasen entgegenzuwirken. Die RNA-Isolierung wurde unter Verwendung von TRIzol durchgeführt. Hierbei wurde der Arbeitsanweisung des Herstellers entsprochen (basiert auf Chomczynski, P. und Sacchi, N., 1987).

Es wurden pro 100 mg Mausepidermis 1 ml TRIzol in ein zuvor vorgefrostedes Teflongefäß mit Metallkugel einpipettiert und mit Hilfe eines Mikro-Dismembrators für 1-2 min pulverisiert. Das Gewebepulver wurde nach dem Auftauprozess in 2 ml Reaktionsgefäße gefüllt und 10 min bei 13.000 Upm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 200 µl Chloroform/ml Trizol zugegeben, 15 sek. geschüttelt und 2-3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde erneut zentrifugiert, der Überstand abpipettiert, 500µl Propanol/ml Trizol zugegeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer wiederholten Zentrifugation wurde das Pellet auf Eis in 80 %igem Ethanol-DEPC-Wasser gewaschen, in DEPC-Wasser aufgenommen und Natriumacetat/Ethanol gefällt. Hierzu wurden 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat und 3 Vol. Ethanol zugegeben und 30 min bei -20 °C inkubiert. Anschließend wurde 15 min bei 13.000 Upm zentrifugiert und das Pellet erneut zweimalig in 80 %igem Ethanol-DEPC-Wasser gewaschen. Nach der Trocknung des Pellets wurde es in DEPC-Wasser aufgenommen und 5-10 min bei 50 °C auf einem Schüttelheizblock gelöst.

### **6.11.2 RNA-Isolierung aus primären Keratinozyten der Maus**

Die adhären-wachsenden primären Keratinozyten wurden nach Entfernung des Kultivierungsmediums zweimalig mit PBS gewaschen und dieses sehr sorgfältig wieder entfernt. Auf Eis wurde 1 ml TRIzol pro 10 cm Zellkulturschale aufpipettiert und die Zellen sofort mit einem Zellscharber von der Kulturplatte entfernt. Anschließend wurde 10 min bei 13.000 Upm und 4 °C zentrifugiert. Die folgenden Isolierungsschritte entsprachen den Schritten der RNA-Isolierung aus Mausepidermis.

Zur Überprüfung der RNA-Qualität wurde nach der RNA-Isolierung 1 µg der RNA-Probe und 1 Vol. RNA-Ladepuffer 2 min bei 65 °C erhitzt, kurz auf Eis abgekühlt und auf ein RNA-Gel mit 1xMOPS-Puffer aufgetragen.

#### **6.11.2.1 DNase-Verdau von RNA**

Um eine Amplifikation genomischer DNA zu verhindern wurde vor Beginn der reversen Transkription ein DNase-Verdau durchgeführt. Hierzu wurden 10 µg RNA mit 7,5 µl 10xDNase-Puffer, 5 U DNase I und 80 U RNasin auf ein Volumen von 75 µl mit DEPC-



Wasser aufgefüllt und 40 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von 100µl aufgefüllt und nachfolgend Phenol/Choloroform (Vol.1/1) und Natriumacetat/Ethanol gefällt. Das nach Zentrifugation entstandene Pellet wurde mit 80 %igem Ethanol/DEPC-Wasser gewaschen, kurz getrocknet und in 20 µl DEPC-Wasser aufgenommen.

Die Qualität der RNA nach dem erfolgtem DNase-Verdau wurde erneut ermittelt. Hierzu wurde 1 µg DNase-verdaute RNA mit RNA-Ladepuffer versetzt, 5 min bei 65 °C auf einem Schüttler erhitzt und auf ein 1 %iges MOPS-Gel aufgetragen.

### **6.11.2.2 Reverse Transkription von RNA (RT-Reaktion)**

Bei der RT-Reaktion wird unter Einsatz von Reverser-Transkriptase eine vorliegende RNA durch spezifische Primer in einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Die exprimierten RNAs werden anschließend über eine Amlifikation der cDNAs mittels PCR in einem Agarosegel sichtbar.

Die RT-Reaktion setzte sich folgend zusammen:

0,1 µM Oligonukleotid T22 bzw. Primer ATV 175 (MnPV-E6-Nachweis)

2 µg DNase behandelte RNA

auf ein Volumen von 24,7 µl mit DEPC-Wasser auffüllen, 10 min bei 70 °C und folgend 10 min auf Eis inkubieren. Anschließend wurden 8 µl 5x RNA-Puffer, 4µl 0,1 M DTT, 0,8 µl 25mM dNTPs und 20 U RNasin zugegeben und 5 min bei 42 °C inkubiert. Hiernach wurden 400 U Reverse-Transkriptase (Superskript) zugegeben, 50 min bei 42 °C und abschließend 10 min bei 70 °C inkubiert. Abschließend erfolgte ein RNase H-Verdau um RNA aus RNA/DNA-Hybriden zu eliminieren. Die nun entstandene cDNA wurde in eine PCR eingesetzt.

## **6.12 Analyse von Proteinen**

### **6.12.1 Proteinbestimmung nach Bradford**

Zur Proteinbestimmung wurde der Protein-Assay der Fa. Bio-Rad verwendet. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G250

---

nach Bradford und einem hierzu benötigten BSA-Konzentrationsstandards photometrisch ermittelt.

Es wurden Proteinkonzentrationen aus primären Keratinozyten der Maus bzw. transfizierten MK2-Zellen bestimmt. Hierzu wurden die Zellen nach Entfernung des Mediums mit PBS gewaschen und mit einem schonenden Protein-Lysepuffer 20 min auf Eis inkubiert. Hierbei war es ratsam die Menge an Lysepuffer möglichst gering zu halten, da ansonsten eine starke Verdünnung der Proteine daraus resultieren würde. Es wurden für eine 10 cm Kulturschale 100 µl Lysepuffer aufpipetiert und gleichmäßig verteilt. Anschließend wurden die lysierten Zellen mit einem Zellscharber von der Kulturschale abgekratzt, in Reaktionsgefäße überführt und 2 min bei 13.000 Upm zentrifugiert um Zelltrümmer zu entfernen. Zur photometrischen Bestimmung wurden 4 µl des Überstandes in 800 µl dest. Wasser verdünnt und unter Zugabe von 200 µl BioRad Protein-Assay Färbelösung 15 min inkubiert. Zur Erstellung einer Eichgeraden wurden die BSA-Konzentrationsstandards in gewünschter Konzentration in dest. Wasser verdünnt und mit 200 µl der Färbelösung versetzt. Die Zugabe der Färbelösung muß zügig vorgenommen werden, da eine Variation der Inkubationszeiten unterschiedliche Farbresultate zu Folge hat. Die Proben wurden in Plastikkuvetten pipetiert und mit Hilfe der Konzentrationsstandards die Proteinkonzentration photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm ermittelt.

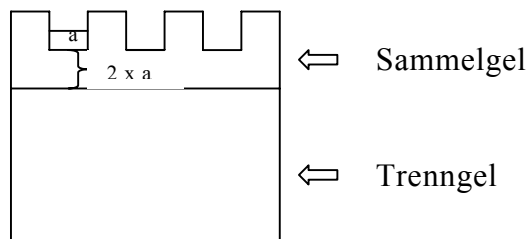
### **6.12.2 Diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Lämmli, 1970) stellt die häufigste Methode zur Auftrennung von Proteinen dar. Mit Hilfe von Puffern unterschiedlicher pH-Werte wird ein diskontinuierlicher pH-Wert und somit ein Spannungsgradient im Gel aufgebaut. Eine vorherige Denaturierung der Proben durch SDS und Mercaptoethanol ist essentiell, da ansonsten Proteine aufgrund ihres isoelektrischen Punktes und nicht entsprechend ihrer Größe im Gel laufen würden. Das negativ geladene SDS lagert sich an die Proteine an und kompensiert positive Ladungen. Proteine werden hierbei nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Mercaptoethanol reduziert in Proteinen auftretende Disulfidbrücken. Mit Hilfe eines Proteinstandards kann die Größe der zu analysierenden Proteinprobe bestimmt werden.

### 6.12.2.1 Präparation des SDS-Polyacrylamid-Gels

Die SDS-Polyacrylamid-Gele bestehen aus zwei unterschiedlichen Gelkomponenten. Hierzu gehört einmal das Sammelgel, auf das die zu analysierende Probe aufgetragen wird und folgend das Trenngel, welches über eine kleinere Porengröße und über einen höheren pH-Wert als das Sammelgel verfügt. Das Sammelgel, dessen Länge vom Volumen der aufzutragenden Proben abhängig ist, wird nach Polymerisation des Trenngels auf dieses gegossen. Das Sammelgel sollte doppelt so hoch als das aufgetragene Probenvolumen in den Taschen sein (Abb. 6.1). Die für den Aufbau des Gelsystems notwendigen Materialien wie Glasplatten, Abstandhalter und Käme müssen vor der Benutzung mit Ethanol gereinigt werden.

Es wurden in dieser Arbeit Abstandhalter und Käme von 1,0 mm Dicke eingesetzt. Die Polyacrylamidprozentigkeit des Gels betrug in den hier durchgeführten Experimenten 15 %. Die Gele wurden nach Sambrook et al. (1989) hergestellt.



**Abb. 6.1 SDS-Polyacrylamid-Gel**

Die Höhe des Sammelgels muß anhand des Probevolumens ermittelt werden. Sie sollte die doppelte Höhe des Probevolumens betragen.

### 6.12.2.2 Vorbereitung der Proteinproben

Die Proteinproben wurden mit 4xLämmli-puffer als Ladepuffer versetzt und anschließend 3 min bei 95 °C erhitzt. Die Proteinkonzentration der einzelnen Proben innerhalb eines Gels sollte identisch sein. Es wurden je nach zu analysierendem Protein zwischen 70-100 µg Protein geladen. Um ein gleichmäßiges Laufverhalten des Gels zu gewährleisten müssen freie Taschen ebenfalls mit Ladepuffer (in der gleichen Konzentration wie in den Proben) geladen werden. Die elektrophoretische Auftrennung des Gels wurde über Nacht bei 12 mA im Kühlraum vorgenommen.

### 6.12.3 Western-blot und Immunnachweis mittels Enhanced chemoluminescence (ECL)

Mit Hilfe der Western-blot-Technik können die durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf Nitrocellulosemembranen (NC-Membran) transferiert und mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert werden. Bei einem ECL-Nachweis erfolgt die Detektion spezifischer Banden mit Hilfe der Chemolumineszenz. An den Primärantikörper, welcher an das Protein spezifisch bindet, heftet sich in der nachfolgenden Reaktion ein Meerrettichperoxidase-gekoppelter Sekundärantikörper. Nach Zugabe der ECL-Entwicklerlösung wird die Peroxidase durch das in der Lösung enthaltene Wasserstoffperoxid oxidiert. Hierdurch wird das Luminol oxidiert, welches daraufhin Licht emittiert. Letzteres wird durch die p-Hydroxy-Cumarinsäure (Enhancer) verstärkt. Die Emission findet bei einer Wellenlänge von 428 nm statt und kann durch kurze Exposition auf einem blaulicht-sensitiven Autoradiographiefilm aufgefangen werden.

Nach Beendigung des Gellaufs wurde die Apparatur wieder zerlegt, das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel vorsichtig in einer Präequilibrierungslösung 2x15 min auf einem Schwenktisch equilibriert. Während dessen wurde die Blotapparatur aufgebaut, wobei Schwämme und Whatmanpapier in der Transferlösung eingeweicht wurden. Nach der Equilibrierung des Gels wurde dieses auch in der Transferlösung geschwenkt. Die Proteine wurden auf eine Nitrocellulosemembran mit 0,1 µm Porengröße geblottet. Hierzu wurde die Membran für 2-3 min in Methanol befeuchtet, in dest. Wasser geschwenkt und in Transferlösung überführt.

Der Blot wurde folgend aufgebaut:

Auf die Kathode wurde ein Schwamm und hier rauf ein Whatmanpapier gelegt, darauf wurde das Gel und anschließend die NC-Membran die der Gelgröße entsprechen muß, aufgelegt. Nachfolgend wurde wieder ein Whatmanpapier aufgelegt und mit Hilfe einer Pipette alles luftblasenfrei glattgestrichen. Abschließend wurde nochmals ein Schwamm aufgelegt und alles über Nacht bei 70 mA im Kühlraum in einer Blotapparatur geblottet. Am folgenden Tag wurde die NC-Membran in Blockpuffer für 60 min inkubiert. Anschließend wurde der Primärantikörper in 3 ml Blockpuffer verdünnt für 2 Stunden bei Raumtemperatur aufgetragen. Hierzu wurde die Membran luftblasenfrei in Plastikfolie eingeschweißt. Nachfolgend wurde 3x10 min in 1xTBST-Puffer gewaschen, im Anschluß der Sekundärantikörper aufgetragen und 1 Stunde bei Raumtemperatur (ebenfalls eingeschweißt) inkubiert. Anschließend wurde die NC-Membran erneut 3x10

min in 1xTBST-Puffer gewaschen um Reste der Blocklösung zu entfernen. Abschließend wurde die NC-Membran mit Whatmanpapier kurz angetrocknet und mit jeweils 2 ml der Entwicklerlösung 1 min inkubiert. Letztendlich wurde die Entwicklerlösung mit Whatmanpapier aufgesaugt, die NC-Membran in eine Folie verpackt und mit Hilfe eines Röntgenfilms proteinabhängig zwischen 10 sek und 10 min exponiert.

### **6.13 Mehrstufenkarzinogenese mit *Mastomys natalensis* Papillomvirus-E6-transgenen Mäusen (MnPV-E6)**

Das Modell der chemisch-induzierten Mehrstufenkarzinogenese ist in Maushaut ein etabliertes System (Berenblum, 1941). Sie wurde in dieser Arbeit zur Untersuchung von Interaktionen chemischer Noxen und Papillomvirusproteinen bei der Tumorinduktion bzw. bei der Umwandlung von benignem zu malignem Wachstum verwendet. Mit Hilfe eines Initiators, hier Dimethylbenz[a]-anthracen (DMBA) und eines Tumorpromotors 12-0-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA), beides in Azeton gelöst, wurden zwei der MnPV-E6-transgenen Mauslinien auf eine erhöhte Tumorentstehung getestet.

Hierzu wurden die in den Versuch eingehenden Tiere vor Versuchsbeginn durch Schwanzspitzenbiopsien auf ihre Transgenität geprüft. Die dabei entnommenen Biopsie entsprach maximal einer Länge von 5 mm Schwanzspitze. Eine Woche vor Initiation wurden den Mäusen im Alter von 4 Wochen mit einem Rasierer ein ca. 3 cm<sup>2</sup> großes Areal der Rückenhaare entfernt und die Ohren durch Ohrlochung markiert. In der darauf folgenden Woche wurde die Initiation durch eine einmalige epikutane Applikation von 100 nmol DMBA in 0,1 ml Azeton gelöst auf die rasierte Rückenhaut vorgenommen. Hierbei mußten aufgrund der Karzinogenität der Substanz DMBA die Tiere unter einer Werkbank mit geeignetem Abzug behandelt und nach Applikation in Einmalkäfige gesetzt werden. Die behandelten Tiere mußten für einen Zeitraum von 30 min unter dem Abzug verbleiben um aufgrund eventueller Flüchtigkeit des in Azeton gelösten DMBA eine Gefährdung der Gesundheit des Behandelnden auszuschließen. Während der DMBA Behandlung wurden spezielle, karzinogen-beständige Handschuhe getragen.

Ab der 6. Woche wurden die Tiere zweimal wöchentlich, für einen Zeitraum von 20 Wochen einer epikutanen Behandlung mit dem Tumorpromotor TPA von 5 nmol in 0,1

ml Azeton gelöst ausgesetzt. Auch diese Applikation wurde unter einem Abzug vorgenommen, wobei eine Verwendung von Einmalkäfigen nun nicht mehr nötig war. Nach der Behandlungszeit wurden die Tiere für weitere 30 Wochen beobachtet. Bei Überschreitung der zugelassenen Größe eines Tumors mit einem maximalen Durchmesser von 1 cm wurden die Tiere mittels cervikaler Dislokation getötet.

Während der Durchführung der Mehrstufenkarzinogenese mit der ersten MnPV-E6-transgenen Linie HP 22-42 erfolgte lediglich eine Gruppenbeobachtung. Hierbei wurden die entstandenen Tumoren pro Maus wöchentlich dokumentiert aber in Bezug auf die gesamte Gruppe ausgewertet. Bei der Durchführung der Mehrstufenkarzinogenese mit der zweiten MnPV-E6-transgenen Linie HP 21-2 erfolgte hingegen eine Einzeltierbeobachtung. So wurde wöchentlich auf einer Schablone der Maus, die Anzahl der entstandenen Tumoren und der Entstehungsort dokumentiert. Durch diese Art der Auswertung erhoffte ich eine Aussage über sich verändernde Geschwülste schließen zu können. Zudem konnte so genau registriert werden, wann und wo, welche Art von Geschwülsten auf der Maus entstanden. Die entwickelten Tumore wurden numeriert, für histologische Untersuchungen konserviert, sowie zur Etablierung von Zelllinien herangezogen.

Die einzelnen Gruppen und ihre Individuenanzahl wurden aufgrund der biometrischen Berechnungen folgend festgelegt:

<b>Gruppe</b>	<b>Initiation</b>	<b>Promotion</b>	<b>Gruppengröße</b>	<b>Tierzahl/Gruppe</b>
FVBN Wildtyp	Azeton	Azeton	10	
FVBN Wildtyp	Azeton	TPA	10	
FVBN Wildtyp	DMBA	Azeton	37	
FVBN Wildtyp	DMB	TPA	54	111

<b>Gruppe</b>	<b>Initiation</b>	<b>Promotion</b>	<b>Gruppengröße</b>	<b>Tierzahl/Gruppe</b>
MnPV-E6-transgen	Azeton	Azeton	10	
MnPV-E6-transgen	Azeton	TPA	10	
MnPV-E6-transgen	DMBA	Azeton	37	
MnPV-E6-transgen	DMBA	TPA	54	111

---

Abschließend wurden die folgende Parameter ausgewertet:

1. Anzahl der Papillome pro Tier
2. Prozentuale Papillomrate
3. Prozentuale Anzahl der Tiere mit Keratoakanthomen
4. Prozentuale Anzahl der Tiere mit Plattenepithelzellkarzinomen

### **6.14 Überprüfung der Rekombination der induzierbaren MnPV-E7-transgenen Mauslinie in Zellkultur**

Nachkommen der K14- $\beta$ glo-loxP-lacZ-pA-loxP-MnPV-E7-pA transgenen Mäuse wurden mittels PCR mit DNA aus Schwanzspitzenbiopsie auf Transgenität überprüft. Anschließend wurde eine primäre Keratinozytenkultur der positiv-transgenen Tiere hergestellt und diese mit einer tamoxifenunabhängigen Cre-Rekombinase mittels DOTAP transfiziert. Die Zellen wurden über Nacht mit Hilfe des Lysepuffers und Proteinase K bei 55 °C verdaut, anschließend Phenol/Chloroform extrahiert und 0,5  $\mu$ l der erhaltenen DNA in eine PCR eingesetzt. Es wurde hier mit zwei verschiedenen Primerpaaren gearbeitet. Primer ATV 73 mit ATV 74 amplifizieren das MnPV-E7-Gen, Primer ATV 74 mit ATV 114 amplifizieren das MnPV-E7-Gen nur nach Rekombination.

### **6.15 Test zur Überprüfung der Cre-Rekombinaseaktivität mit Hilfe einer eGFP-Reporter-Maus**

Um die Cre-Rekombinaseaktivität in der erstellten Cre-Rekombinase Linie zu überprüfen wurde eine eGFP-Reporterlinie verwendet. Diese eGFP-Reporterlinie beinhaltet loxP-Seiten die Exon 2 bis 7 des RAGE-Gens (receptor for advanced glycated end products) flankieren (Contien et al., 2001). Mit Hilfe einer Cre-Rekombinase werden diese RAGE-Elemente an den loxP-Seiten herausgespleißt, wodurch ein Thymidinkinase-Promotor direkt vor die vorher promotorlose eGFP-Region gesetzt wird. Bei einer aktiven Cre-Rekombinase wird daraufhin die eGFP-Transkription aktiviert und ist mittels Immunfluoreszenz nachweisbar.

Im ersten Schritt wurde die transgene Cre-Rekombinase Linie mit der eGFP-Reporterlinie verpaart und deren Nachkommen mit Tamoxifen behandelt. Die

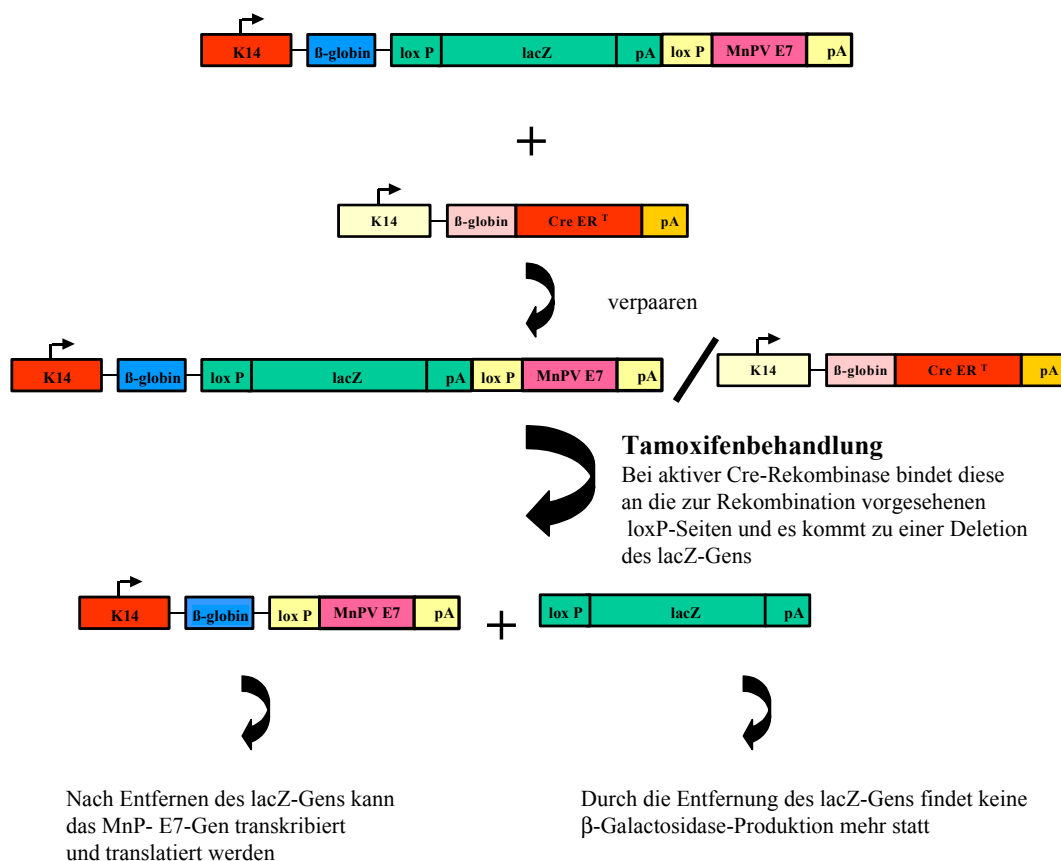
Tamoxifenbehandlung erfolgte durch eine intraperitoneale Verabreichung von 0,8 mg/0,1 ml Tamoxifen in Sonnenblumöl an 5 aufeinanderfolgenden Tagen bzw. von 20 mg Tamoxifen/0,1 ml DMSO die epikutan auf die Rückenhaut appliziert wurden. Danach wurden Biopsien der Rückenhaut und des Ohres entnommen und Kryostatschnitte hergestellt. Die Detektion der eGFP-Expression wurde mittels konfokalem Mikroskop und entsprechendem Filter analysiert.

## 6.16 Tamoxifenbehandlung der E7/Cre- transgenen Mäuse

### Behandlungsvorgang :

Die E7/Cre-transgenen Mäuse wurden mit 0,8 mg Tamoxifen/0,1 ml Sonnenblumenöl intraperitoneal an 5 aufeinanderfolgenden Tagen intraperitoneal gespritzt. Um das Tamoxifen vollständig im Sonnenblumenöl zu lösen mußte es 30 min gevortext werden.

### Rekombinationsschema:



**Abb. 6.2 Rekombinationsschema zur Erstellung induzierbarer MnpV-E7 Mäuse**

Nach Tamoxifenbehandlung bindet die aktive Cre-Rekombinase an die loxP-Seiten und es kommt zu einer Deletion. Hierbei wird eine loxP-Seite, das lacZ-Gen und ein Polyadenylierungssignal durch Rekombination entfernt.



## 7 Danksagung

Die Dissertation wurde am Institut für Angewandte Tumorstudiologie des Deutschen Krebsforschungszentrums, in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. H. zur Hausen unter der Anleitung von Dr. H. Pöpperl, in der Zeit vom 15. November 1999 bis 15. November 2002 durchgeführt.

Bei den folgenden Personen möchte ich mich herzlich bedanken, da sie zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben:

- |                                     |  |
|-------------------------------------|--|
| Prof. Dr. Dr.<br>H. zur Hausen      | für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren; die Bereitstellung der Arbeitsmittel; seine freundliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft sowie seinem regen Interesse an meiner Arbeit |
| Dr. Heike Pöpperl                   | für die Überlassung des Themas; die wissenschaftliche Betreuung während der Promotionszeit sowie die Durchsicht der Arbeit   |
| Priv.-Doz. Dr. E.<br>Schwarz        | für die Übernahme des Gutachtens; die fachliche Diskussionsbereitschaft und Durchsicht der Arbeit  |
| Prof. Dr. H.U. Schairer             | für die Übernahme des Zweitgutachtens und die nette Unterstützung  |
| Dr. G. Fürstenberger                | für seine jederzeit zur Verfügung gestellte Beratung in Fragen der Mehrstufenkarzinogenese; sein Interesse an meinen Versuchen und seine tolle Hilfsbereitschaft während der Dissertationszeit         |
| U. Kloz                             | für seine guten Ratschläge; die jederzeit freundliche Hilfe im Umgang mit Mäusen; die Erstellung der transgenen Mauslinien und die netten Gespräche in frustrierten Zeiten                             |
| Prof. Dr. H.-J. Gröne ;<br>D.Trick  | für die Übernahme der histologischen Diagnostik der transgenen Tiere   |
| I. Moll                             | für die nette Beratung in histologischen Fragen und die schnelle Bearbeitung der histologischen Biopsien sowie die witzigen, persönlichen Gespräche  |
| Priv.-Doz.<br>Dr. A. Kopp-Schneider | für die statistische Auswertung der Versuchsdaten und ihre freundliche Hilfe bei der Versuchsplanung   |
| Prof. Dr. K. Wayss                  | für seine freundlichen Auskünfte und Informationen über <i>Mastomys natalensis</i>   |
| B. Lehr; Dr. W.<br>Nicklas          | für ihre nette Hilfe in organisatorischen Dingen bezüglich Tierexperimenten und Tieranträgen   |

- 
- B. Steinbauer für die Einweisung in die Herstellung primärer Keratinozyten der Maus und ihre hilfreichen Ratschläge während der Mehrstufenkarzinogenese
- U. Ackermann für die oftmals etwas überwindungsbedürftige Erstellung der Tumorbilder
- B. Goedecke für die Betreuung der Mäuse
- Bei allen Arbeitskollegen der F0400 und F0700 die mit ihrer netten Art und den unterhaltsamen Gesprächen in den Frühstückspausen mich manchen Tiefpunkt überstehen liesen
- Melanie, Silke, Jasmin, Thorsten, Alex, Bianka, Ingo und Philipp als Retter und Helfer; für die stetst lustigen und kreativen Pausen, die freundschaftliche Unterstützung , Hilfs- und Diskussionsbereitschaft in beruflichen und privaten ‚Krisenzeiten‘ und das entstandene, private Freundschaftsverhältnis
- R.Schmidt möchte ich einen besonderen Dank aussprechen . An seine uneingeschränkte Hilfsbereitschaft, die Ratschläge während der Dissertation in beruflichen- als auch in privaten Angelegenheiten, die entspannte Atmosphäre und lustigen Gespräche werde ich mich immer erinnern. Vielen Dank!

## 8 Literatur

- Alunni-Fabbroni, M. *et al.* Induction of S phase and apoptosis by the human papillomavirus type 16 E7 protein are separable events in immortalized rodent fibroblasts. *Oncogene* **19**, 2277-2285 (2000).
- Amtmann, E. u. W. K. Papovaviridae. New York (1987).
- Amtmann, E., Volm, M. & Wayss, K. Tumour induction in the rodent *Mastomys natalensis* by activation of endogenous papilloma virus genomes. *Nature* **308**, 291-292 (1984).
- Arbeit, J.M., Howley, P.M. & Hanahan, D. Chronic estrogen-induced cervical and vaginal squamous carcinogenesis in human papillomavirus type 16 transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 2930-2935 (1996).
- Arbeit, J.M., Munger, K., Howley, P.M. & Hanahan, D. Neuroepithelial carcinomas in mice transgenic with human papillomavirus type 16 E6/E7 ORFs. *Am. J. Pathol.* **142**, 1187-1197 (1993).
- Arbeit, J.M., Munger, K., Howley, P.M. & Hanahan, D. Progressive squamous epithelial neoplasia in K14-human papillomavirus type 16 transgenic mice. *J. Virol.* **68**, 4358-4368 (1994).
- Arbeit, J.M., Olson, D.C. & Hanahan, D. Upregulation of fibroblast growth factors and their receptors during multi-stage epidermal carcinogenesis in K14-HPV16 transgenic mice. *Oncogene* **13**, 1847-1857 (1996).
- Armuth, V. & Berenblum, I. A possible in vivo skin model for tumour promoter assays. *Cancer Lett.* **15**, 343-346 (1982).
- Avantaggiati, M.L. *et al.* Recruitment of p300/CBP in p53-dependent signal pathways. *Cell* **89**, 1175-1184 (1997).
- Band, V., De Caprio, J.A., Delmolino, L., Kulesa, V. & Sager, R. Loss of p53 protein in human papillomavirus type 16 E6-immortalized human mammary epithelial cells. *J. Virol.* **65**, 6671-6676 (1991).
- Banks, L., Edmonds, C. & Vousden, K.H. Ability of the HPV16 E7 protein to bind RB and induce DNA synthesis is not sufficient for efficient transforming activity in NIH3T3 cells. *Oncogene* **5**, 1383-1389 (1990).
- Be, X. *et al.* Solution structure determination and mutational analysis of the papillomavirus E6 interacting peptide of E6AP. *Biochemistry* **40**, 1293-1299 (2001).
- Bedell, M.A., Jones, K.H., Grossman, S.R. & Laimins, L.A. Identification of human papillomavirus type 18 transforming genes in immortalized and primary cells. *J. Virol.* **63**, 1247-1255 (1989).
- Berenblum, I. The cocarcinogenic action of croton resin. *Cancer Res.* 1:44-51 (1941).
- Berenblum, I. & Armuth, V. Two independent aspects of tumor promotion. *Biochim. Biophys. Acta* **651**, 51-63 (1981).
- Bernard, B.A. *et al.* The human papillomavirus type 18 (HPV18) E2 gene product is a repressor of the HPV18 regulatory region in human keratinocytes. *J. Virol.* **63**, 4317-4324 (1989).
- Bosch, F.X. *et al.* The early genes E6 and E7 of cancer associated human papilloma viruses as targets of tumor suppression? *Behring Inst. Mitt.* 108-121 (1991).

- Bouvard, V., Storey, A., Pim, D. & Banks, L. Characterization of the human papillomavirus E2 protein: evidence of trans-activation and trans-repression in cervical keratinocytes. *EMBO J.* **13**, 5451-5459 (1994).
- Braspenning, J. *et al.* The CXXC Zn binding motifs of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein are not required for its in vitro transforming activity in rodent cells. *Oncogene* **16**, 1085-1089 (1998).
- Breitkreutz, D. *et al.* Integrin and basement membrane normalization in mouse grafts of human keratinocytes--implications for epidermal homeostasis. *Differentiation* **61**, 195-209 (1997).
- Brune, W. & Durst, M. Epithelial differentiation fails to support replication of cloned human papillomavirus type 16 DNA in transfected keratinocytes. *J. Invest Dermatol.* **104**, 277-281 (1995).
- Burkhardt, A., DiMaio, D. & Schlegel, R. Genetic and biochemical definition of the bovine papillomavirus E5 transforming protein. *EMBO J.* **6**, 2381-2385 (1987).
- Burkhardt, A., Willingham, M., Gay, C., Jeang, K.T. & Schlegel, R. The E5 oncoprotein of bovine papillomavirus is oriented asymmetrically in Golgi and plasma membranes. *Virology* **170**, 334-339 (1989).
- Burtscher, H., Grunberg, W. & Meingassner, G. [Infectious keratoacanthomas of the epidermis in *Pracomys (Mastomys) natalensis*]. *Naturwissenschaften* **60**, 209-210 (1973).
- Byrne, C., Tainsky, M. & Fuchs, E. Programming gene expression in developing epidermis. *Development* **120**, 2369-2383 (1994).
- Chakravarti, D., Pelling, J.C., Cavalieri, E.L. & Rogan, E.G. Relating aromatic hydrocarbon-induced DNA adducts and c-H-ras mutations in mouse skin papillomas: the role of apurinic sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**, 10422-10426 (1995).
- Chellappan, S. *et al.* Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**, 4549-4553 (1992).
- Chen, E.Y., Howley, P.M., Levinson, A.D. & Seeburg, P.H. The primary structure and genetic organization of the bovine papillomavirus type 1 genome. *Nature* **299**, 529-534 (1982).
- Chen, M. *Mastomys natalensis* papillomavirus as a model for the analysis of E6 and E7 protein functions during skin tumorigenesis (2000).  
Ref Type: Thesis/Dissertation
- Chesters, P.M., Vousden, K.H., Edmonds, C. & McCance, D.J. Analysis of human papillomavirus type 16 open reading frame E7 immortalizing function in rat embryo fibroblast cells. *J. Gen. Virol.* **71** ( Pt 2), 449-453 (1990).
- Chiang, C.M. *et al.* Viral E1 and E2 proteins support replication of homologous and heterologous papillomaviral origins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**, 5799-5803 (1992).
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159 (1987).
- Cohen, B.D. *et al.* Transformation-specific interaction of the bovine papillomavirus E5 oncoprotein with the platelet-derived growth factor receptor transmembrane domain and the epidermal growth factor receptor cytoplasmic domain. *J. Virol.* **67**, 5303-5311 (1993).
- Cohen, B.D., Lowy, D.R. & Schiller, J.T. The conserved C-terminal domain of the bovine papillomavirus E5 oncoprotein can associate with an alpha-adaptin-like molecule: a possible link between growth factor receptors and viral transformation. *Mol. Cell Biol.* **13**, 6462-6468 (1993).

- 
- Cole, S.T. & Danos, O. Nucleotide sequence and comparative analysis of the human papillomavirus type 18 genome. Phylogeny of papillomaviruses and repeated structure of the E6 and E7 gene products. *J. Mol. Biol.* **193**, 599-608 (1987).
- Connolly, J.A., Morgan, I.M., Jackson, M.E. & Campo, M.S. The BPV-4 co-carcinogen quercetin induces cell cycle arrest and up-regulates transcription from the LCR of BPV-4. *Oncogene* **16**, 2739-2746 (1998).
- Constien, R. *et al.* Characterization of a novel EGFP reporter mouse to monitor Cre recombination as demonstrated by a Tie2 Cre mouse line. *Genesis*. **30**, 36-44 (2001).
- Coussens, L.M., Hanahan, D. & Arbeit, J.M. Genetic predisposition and parameters of malignant progression in K14-HPV16 transgenic mice. *Am. J. Pathol.* **149**, 1899-1917 (1996).
- Cripe, T.P. *et al.* Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by a keratinocyte-dependent enhancer, and by viral E2 trans-activator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis. *EMBO J.* **6**, 3745-3753 (1987).
- Crum, C.P. *et al.* Coexpression of the human papillomavirus type 16 E4 and L1 open reading frames in early cervical neoplasia. *Virology* **178**, 238-246 (1990).
- Crusius, K., Auvinen, E. & Alonso, A. Enhancement of EGF- and PMA-mediated MAP kinase activation in cells expressing the human papillomavirus type 16 E5 protein. *Oncogene* **15**, 1437-1444 (1997).
- Cullen, A.P., Reid, R., Campion, M. & Lorincz, A.T. Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J. Virol.* **65**, 606-612 (1991).
- Danos, O., Mulligan, R.C. & Yaniv, M. Production of spliced DNA copies of the cottontail rabbit papillomavirus genome in a retroviral vector. *Ciba Found. Symp.* **120**, 68-82 (1986).
- Davis D.H.S. and Oettle, A.G. The multimammate mouse *Rattus (Mastomys) natalensis*. *Proc. Zool. Soc. London* **131**:293-299 (1958).
- Davies, R., Hicks, R., Crook, T., Morris, J. & Vousden, K. Human papillomavirus type 16 E7 associates with a histone H1 kinase and with p107 through sequences necessary for transformation. *J. Virol.* **67**, 2521-2528 (1993).
- de Villiers, E.M. Human pathogenic papillomavirus types: an update. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **186**, 1-12 (1994).
- de Villiers, E.M., Gissmann, L. & zur, H.H. Molecular cloning of viral DNA from human genital warts. *J. Virol.* **40**, 932-935 (1981).
- Del Vecchio, A.M., Romanczuk, H., Howley, P.M. & Baker, C.C. Transient replication of human papillomavirus DNAs. *J. Virol.* **66**, 5949-5958 (1992).
- Dell, G. & Gaston, K. Human papillomaviruses and their role in cervical cancer. *Cell Mol. Life Sci.* **58**, 1923-1942 (2001).
- Denk, C., Butz, K., Schneider, A., Durst, M. & Hoppe-Seyler, F. p53 mutations are rare events in recurrent cervical cancer. *J. Mol. Med.* **79**, 283-288 (2001).
- Donehower, L.A. *et al.* Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* **356**, 215-221 (1992).
- Doorbar, J., Campbell, D., Grand, R.J. & Gallimore, P.H. Identification of the human papilloma virus-1a E4 gene products. *EMBO J.* **5**, 355-362 (1986).

- Dotto, G.P. Signal transduction pathways controlling the switch between keratinocyte growth and differentiation. *Crit Rev. Oral Biol. Med.* **10**, 442-457 (1999).
- Dotto, P. The keratinocyte growth-differentiation switch. *Front Biosci.* **3**, d502-d508 (1998).
- Durst, M., Dzarlieva-Petrusevska, R.T., Boukamp, P., Fusenig, N.E. & Gissmann, L. Molecular and cytogenetic analysis of immortalized human primary keratinocytes obtained after transfection with human papillomavirus type 16 DNA. *Oncogene* **1**, 251-256 (1987).
- Durst, M., Glitz, D., Schneider, A. & zur, H.H. Human papillomavirus type 16 (HPV 16) gene expression and DNA replication in cervical neoplasia: analysis by in situ hybridization. *Virology* **189**, 132-140 (1992).
- Durst, M., Kleinheinz, A., Hotz, M. & Gissman, L. The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumours. *J. Gen. Virol.* **66 ( Pt 7)**, 1515-1522 (1985).
- Durst, M., Seagon, S., Wanschura, S., zur, H.H. & Bullerdiek, J. Malignant progression of an HPV16-immortalized human keratinocyte cell line (HPKIA) in vitro. *Cancer Genet. Cytogenet.* **85**, 105-112 (1995).
- Dyson, N., Buchkovich, K., Whyte, P. & Harlow, E. Cellular proteins that are targeted by DNA tumor viruses for transformation. *Princess Takamatsu Symp.* **20**, 191-198 (1989).
- Dyson, N., Howley, P.M., Munger, K. & Harlow, E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* **243**, 934-937 (1989).
- Elbel, M., Carl, S., Spaderna, S. & Iftner, T. A comparative analysis of the interactions of the E6 proteins from cutaneous and genital papillomaviruses with p53 and E6AP in correlation to their transforming potential. *Virology* **239**, 132-149 (1997).
- Endl, E. & Gerdes, J. The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function. *Exp. Cell Res.* **257**, 231-237 (2000).
- Endl, E., Hollmann, C. & Gerdes, J. Antibodies against the Ki-67 protein: assessment of the growth fraction and tools for cell cycle analysis. *Methods Cell Biol.* **63**, 399-418 (2001).
- Favre, M., Breitbart, F., Croissant, O. & Orth, G. Chromatin-like structures obtained after alkaline disruption of bovine and human papillomaviruses. *J. Virol.* **21**, 1205-1209 (1977).
- Favre, M., Orth, G., Croissant, O. & Yaniv, M. Human papillomavirus DNA: physical map. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **72**, 4810-4814 (1975).
- Favre, M., Orth, G., Croissant, O. & Yaniv, M. Human papillomavirus DNA: physical mapping of the cleavage sites of *Bacillus amyloliquefaciens* (BamI) and *Haemophilus parainfluenzae* (HpaII) endonucleases and evidence for partial heterogeneity. *J. Virol.* **21**, 1210-1214 (1977).
- Feil, R. *et al.* Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 10887-10890 (1996).
- Filatov, L. *et al.* Chromosomal instability is correlated with telomere erosion and inactivation of G2 checkpoint function in human fibroblasts expressing human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *Oncogene* **16**, 1825-1838 (1998).
- Finch, J.T. & Klug, A. The structure of viruses of the papilloma-polyoma type 3. Structure of rabbit papilloma virus, with an appendix on the topography of contrast in negative-staining for electron-microscopy. *J. Mol. Biol.* **13**, 1-12 (1965).

- Frattini, M.G. & Laimins, L.A. Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 12398-12402 (1994).
- Fuchs, E. Keratins and the skin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **11**, 123-153 (1995).
- Gemsa, D. *et al.* Stimulation of macrophage activity by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *IARC Sci. Publ.* 319-336 (1984).
- Gissmann, L. *et al.* Presence of human papillomavirus in genital tumors. *J. Invest Dermatol.* **83**, 26s-28s (1984).
- Gissmann, L., deVilliers, E.M. & zur, H.H. Analysis of human genital warts (condylomata acuminata) and other genital tumors for human papillomavirus type 6 DNA. *Int. J. Cancer* **29**, 143-146 (1982).
- Gissmann, L. *et al.* Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **80**, 560-563 (1983).
- Gissmann, L. & zur, H.H. Physical characterization of deoxyribonucleic acids of different human papilloma viruses (HPV). *Med. Microbiol. Immunol. (Berl)* **166**, 3-11 (1978).
- Gissmann, L. & zur, H.H. Partial characterization of viral DNA from human genital warts (Condylomata acuminata). *Int. J. Cancer* **25**, 605-609 (1980).
- Goertler, K., Loehrke, H., Schweizer, J. & Hesse, B. Two-stage skin carcinogenesis by systemic initiation of pregnant mice with 7,12-dimethylbenz(a)anthracene during gestation days 6-20 and postnatal promotion of the F 1-generation with the phorbol ester 12-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **98**, 267-275 (1980).
- Griep, A.E. *et al.* Tumorigenicity by human papillomavirus type 16 E6 and E7 in transgenic mice correlates with alterations in epithelial cell growth and differentiation. *J. Virol.* **67**, 1373-1384 (1993).
- Griep, A.E. *et al.* Multiple genetic loci modify risk for retinoblastoma in transgenic mice. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* **39**, 2723-2732 (1998).
- Griep, A.E. & Lambert, P.F. Role of papillomavirus oncogenes in human cervical cancer: transgenic animal studies. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **206**, 24-34 (1994).
- Gulliver, G.A., Herber, R.L., Liem, A. & Lambert, P.F. Both conserved region 1 (CR1) and CR2 of the human papillomavirus type 16 E7 oncogene are required for induction of epidermal hyperplasia and tumor formation in transgenic mice. *J. Virol.* **71**, 5905-5914 (1997).
- Haller, K., Stubenrauch, F. & Pfister, H. Differentiation-dependent transcription of the epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus type 5 in benign lesions. *Virology* **214**, 245-255 (1995).
- Hansen, L.A. & Tennant, R. Focal transgene expression associated with papilloma development in v-Ha-ras-transgenic TG.AC mice. *Mol. Carcinog.* **9**, 143-154 (1994).
- Hansen, L.A. & Tennant, R.W. Follicular origin of epidermal papillomas in v-Ha-ras transgenic TG.AC mouse skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 7822-7826 (1994).
- Hasskarl, J. *et al.* Differential cell cycle response of nontumorigenic and tumorigenic human papillomavirus-positive keratinocytes towards transforming growth factor-beta1. *J. Mol. Med.* **78**, 94-101 (2000).
- Hecker, E. Three stage carcinogenesis in mouse skin--recent results and present status of an advanced model system of chemical carcinogenesis. *Toxicol. Pathol.* **15**, 245-258 (1987).

- 
- Hecker,E., Adolf,W., Hergenahn,M., Schmidt,R. & Sorg,B. Irritant diterpene ester promoters of mouse skin: contributions to etiologies of environmental cancer and to biochemical mechanisms of carcinogenesis. *Princess Takamatsu Symp.* **14**, 3-36 (1983).
- Hecker,E. *et al.* International symposium: skin carcinogenesis in man and in experimental models. Heidelberg, Federal Republic of Germany, 29-31 October 1991. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **118**, 321-328 (1992).
- Hecker,E. *et al.* [On the active substances of croton oil. VII. Phorbol]. *Z. Naturforsch. B* **21**, 1204-1214 (1966).
- Hennings,H. *et al.* FVB/N mice: an inbred strain sensitive to the chemical induction of squamous cell carcinomas in the skin. *Carcinogenesis* **14**, 2353-2358 (1993).
- Hennings,H., Holbrook,K., Steinert,P. & Yuspa,S. Growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture: effects of extracellular calcium. *Curr. Probl. Dermatol.* **10**, 3-25 (1980).
- Hennings,H. *et al.* Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell* **19**, 245-254 (1980).
- Herber,R., Liem,A., Pitot,H. & Lambert,P.F. Squamous epithelial hyperplasia and carcinoma in mice transgenic for the human papillomavirus type 16 E7 oncogene. *J. Virol.* **70**, 1873-1881 (1996).
- Hogan,B. Manipulating the mouse embryo. (1994).
- Hurlin,P.J. *et al.* Regulation of Myc and Mad during epidermal differentiation and HPV-associated tumorigenesis. *Oncogene* **11**, 2487-2501 (1995).
- Iftner,T., Bierfelder,S., Csapo,Z. & Pfister,H. Involvement of human papillomavirus type 8 genes E6 and E7 in transformation and replication. *J. Virol.* **62**, 3655-3661 (1988).
- Inaba,Y., Egawa,K., Yoshimura,K. & Ono,T. Demonstration of human papillomavirus type 1 DNA in a wart with bowenoid histologic changes. *Am. J. Dermatopathol.* **15**, 172-175 (1993).
- Indra,A.K. *et al.* Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases. *Nucleic Acids Res.* **27**, 4324-4327 (1999).
- Jablonska,S. & Majewski,S. Epidermodysplasia verruciformis: immunological and clinical aspects. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **186**, 157-175 (1994).
- Jablonska,S., Majewski,S., Obalek,S. & Orth,G. Cutaneous warts. *Clin. Dermatol.* **15**, 309-319 (1997).
- Jablonska,S. *et al.* The morphology of butchers' warts as related to papillomavirus types. *Arch. Dermatol. Res.* **279 Suppl**, S66-S72 (1987).
- Jablonska,S. *et al.* Immunological studies in epidermodysplasia verruciformis. *Bull. Cancer* **65**, 183-190 (1978).
- Jackson,S., Harwood,C., Thomas,M., Banks,L. & Storey,A. Role of Bak in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins. *Genes Dev.* **14**, 3065-3073 (2000).
- Jewers,R.J., Hildebrandt,P., Ludlow,J.W., Kell,B. & McCance,D.J. Regions of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein required for immortalization of human keratinocytes. *J. Virol.* **66**, 1329-1335 (1992).



- Jones,D.L., Alani,R.M. & Munger,K. The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. *Genes Dev.* **11**, 2101-2111 (1997).
- Jones,D.L. & Munger,K. Analysis of the p53-mediated G1 growth arrest pathway in cells expressing the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *J. Virol.* **71**, 2905-2912 (1997).
- Kamimura,J., Lee,D., Baden,H.P., Brissette,J. & Dotto,G.P. Primary mouse keratinocyte cultures contain hair follicle progenitor cells with multiple differentiation potential. *J. Invest Dermatol.* **109**, 534-540 (1997).
- Kanda,T. *et al.* Human papillomavirus type 16 E6 proteins with glycine substitution for cysteine in the metal-binding motif. *Virology* **185**, 536-543 (1991).
- Kang,J.K. *et al.* Development of spontaneous hyperplastic skin lesions and chemically induced skin papillomas in transgenic mice expressing human papillomavirus type 16 E6/E7 genes. *Cancer Lett.* **160**, 177-183 (2000).
- Kemp,C.J., Donehower,L.A., Bradley,A. & Balmain,A. Reduction of p53 gene dosage does not increase initiation or promotion but enhances malignant progression of chemically induced skin tumors. *Cell* **74**, 813-822 (1993).
- Kim,S.K. *et al.* The detection of p53 gene mutation using a microdissection technique in primary intracranial germ cell tumors. *Int. J. Oncol.* **18**, 111-116 (2001).
- Kiyono,T., Hiraiwa,A. & Ishibashi,M. Differences in transforming activity and coded amino acid sequence among E6 genes of several papillomaviruses associated with epidermodysplasia verruciformis. *Virology* **186**, 628-639 (1992).
- Klug,S.J. *et al.* TP53 polymorphism, HPV infection, and risk of cervical cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **10**, 1009-1012 (2001).
- Krajewski,S., Krajewska,M. & Reed,J.C. Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of Bak expression, a proapoptotic member of the Bcl-2 protein family. *Cancer Res.* **56**, 2849-2855 (1996).
- Kreibich,G., Witte,I. & Hecker,E. On the biochemical mechanism of tumorigenesis in mouse skin. IV. Methods for determination of fate and distribution of phorbol ester TPA. *Z. Krebsforsch. Klin. Onkol. Cancer Res. Clin. Oncol.* **76**, 113-123 (1971).
- Laemmli,U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
- Lambert,P.F. *et al.* Epidermal cancer associated with expression of human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncogenes in the skin of transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**, 5583-5587 (1993).
- Lechner,M.S. *et al.* Human papillomavirus E6 proteins bind p53 in vivo and abrogate p53-mediated repression of transcription. *EMBO J.* **11**, 3045-3052 (1992).
- Leder,A., Kuo,A., Cardiff,R.D., Sinn,E. & Leder,P. v-Ha-ras transgene abrogates the initiation step in mouse skin tumorigenesis: effects of phorbol esters and retinoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **87**, 9178-9182 (1990).
- Levine,A.J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **88**, 323-331 (1997).
- Liang,X.H., Volkmann,M., Klein,R., Herman,B. & Lockett,S.J. Co-localization of the tumor-suppressor protein p53 and human papillomavirus E6 protein in human cervical carcinoma cell lines. *Oncogene* **8**, 2645-2652 (1993).

- Liu,S., Lin,D., Hong,B. & Huang,G. Analysis of C-Ha-ras gene amplification and mutation in laryngeal carcinoma. *Chin Med. Sci. J.* **10**, 59-60 (1995).
- Liu,Z., Ghai,J., Ostrow,R.S. & Faras,A.J. The expression levels of the human papillomavirus type 16 E7 correlate with its transforming potential. *Virology* **207**, 260-270 (1995).
- Luft,F. *et al.* Detection of integrated papillomavirus sequences by ligation-mediated PCR (DIPS-PCR) and molecular characterization in cervical cancer cells. *Int. J. Cancer* **92**, 9-17 (2001).
- Mahler,J.F., Stokes,W., Mann,P.C., Takaoka,M. & Maronpot,R.R. Spontaneous lesions in aging FVB/N mice. *Toxicol. Pathol.* **24**, 710-716 (1996).
- Majewski,S. *et al.* A mouse model for studying epidermodysplasia-verruciformis-associated carcinogenesis. *Int. J. Cancer* **56**, 727-730 (1994).
- Majewski,S., Favre,M., Orth,G. & Jablonska,S. Specific human papillomaviruses could participate in epidermal hyperproliferation and autoimmune phenomena in psoriasis. *Acta Derm. Venereol.* **81**, 312 (2001).
- Majewski,S. & Jablonska,S. Human papillomavirus-associated tumors of the skin and mucosa. *J. Am. Acad. Dermatol.* **36**, 659-685 (1997).
- Majewski,S. & Jablonska,S. Do epidermodysplasia verruciformis human papillomaviruses contribute to malignant and benign epidermal proliferations? *Arch. Dermatol.* **138**, 649-654 (2002).
- Majewski,S., Jablonska,S. & Orth,G. Epidermodysplasia verruciformis. Immunological and nonimmunological surveillance mechanisms: role in tumor progression. *Clin. Dermatol.* **15**, 321-334 (1997).
- Maki,C.G., Huibregtse,J.M. & Howley,P.M. In vivo ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53(1). *Cancer Res.* **56**, 2649-2654 (1996).
- Mantovani,F. & Banks,L. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene* **20**, 7874-7887 (2001).
- Martin,P., Vass,W.C., Schiller,J.T., Lowy,D.R. & Velu,T.J. The bovine papillomavirus E5 transforming protein can stimulate the transforming activity of EGF and CSF-1 receptors. *Cell* **59**, 21-32 (1989).
- Massimi,P. & Banks,L. Repression of p53 transcriptional activity by the HPV E7 proteins. *Virology* **227**, 255-259 (1997).
- Masterson,P.J., Stanley,M.A., Lewis,A.P. & Romanos,M.A. A C-terminal helicase domain of the human papillomavirus E1 protein binds E2 and the DNA polymerase alpha-primase p68 subunit. *J. Virol.* **72**, 7407-7419 (1998).
- Matlashewski,G. *et al.* Human papillomavirus type 16 DNA cooperates with activated ras in transforming primary cells. *EMBO J.* **6**, 1741-1746 (1987).
- Meyers,C., Harry,J., Lin,Y.L. & Wettstein,F.O. Identification of three transforming proteins encoded by cottontail rabbit papillomavirus. *J. Virol.* **66**, 1655-1664 (1992).
- Mohr,I.J. *et al.* Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science* **250**, 1694-1699 (1990).
- Muller,H. & Gissmann,L. Mastomys natalensis papilloma virus (MnPV), the causative agent of epithelial proliferations: characterization of the virus particle. *J. Gen. Virol.* **41**, 315-323 (1978).

- Munger, K. *et al.* Biochemical and biological differences between E7 oncoproteins of the high- and low-risk human papillomavirus types are determined by amino-terminal sequences. *J. Virol.* **65**, 3943-3948 (1991).
- Myers, G., Lu, H., Calif, C. & Leitner, T. Heterogeneity of papillomaviruses. *Semin. Cancer Biol.* **7**, 349-358 (1996).
- Nasiell, K., Roger, V. & Nasiell, M. Behavior of mild cervical dysplasia during long-term follow-up. *Obstet. Gynecol.* **67**, 665-669 (1986).
- Nees, M., van Wijngaarden, E., Bakos, E., Schneider, A. & Durst, M. Identification of novel molecular markers which correlate with HPV-induced tumor progression. *Oncogene* **16**, 2447-2458 (1998).
- Nilsson, C.H., Bakos, E., Petry, K.U., Schneider, A. & Durst, M. Promoter usage in the E7 ORF of HPV16 correlates with epithelial differentiation and is largely confined to low-grade genital neoplasia. *Int. J. Cancer* **65**, 6-12 (1996).
- Nuber, U., Schwarz, S.E. & Scheffner, M. The ubiquitin-protein ligase E6-associated protein (E6-AP) serves as its own substrate. *Eur. J. Biochem.* **254**, 643-649 (1998).
- O'Banion, M.K., Sundberg, J.P., Reszka, A.A. & Reichmann, M.E. Cross-hybridization and relationships of various papillomavirus DNAs at different degrees of stringency. *Intervirology* **28**, 114-121 (1987).
- O'Banion, M.K., Sundberg, J.P., Shima, A.L. & Reichmann, M.E. Venereal papilloma and papillomavirus in a colobus monkey (*Colobus guereza*). *Intervirology* **28**, 232-237 (1987).
- Offerhaus, G.J. & Slebos, R.J. [Molecular-genetic detection of colorectal carcinoma in the feces]. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* **139**, 2714-2715 (1995).
- Orth, G. Epidermodysplasia verruciformis: a model for understanding the oncogenicity of human papillomaviruses. *Ciba Found. Symp.* **120**, 157-174 (1986).
- Orth, G., Favre, M., Majewski, S. & Jablonska, S. Epidermodysplasia verruciformis defines a subset of cutaneous human papillomaviruses. *J. Virol.* **75**, 4952-4953 (2001).
- Orth, G., Jablonska, S., Breitburd, F., Favre, M. & Croissant, O. The human papillomaviruses. *Bull. Cancer* **65**, 151-164 (1978).
- Padlewska, K. *et al.* Mutation and abnormal expression of the p53 gene in the viral skin carcinogenesis of epidermodysplasia verruciformis. *J. Invest Dermatol.* **117**, 935-942 (2001).
- Park, P. *et al.* The cellular DNA polymerase alpha-primase is required for papillomavirus DNA replication and associates with the viral E1 helicase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 8700-8704 (1994).
- Pfister, H. & Gissmann, L. Heterogeneity of human papilloma viruses. *Bull. Cancer* **65**, 165-167 (1978).
- Phelps, W.C. *et al.* Analysis of trans activation by human papillomavirus type 16 E7 and adenovirus 12S E1A suggests a common mechanism. *J. Virol.* **65**, 6922-6930 (1991).
- Phelps, W.C., Yee, C.L., Munger, K. & Howley, P.M. The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A. *Cell* **53**, 539-547 (1988).
- Rehman, I. *et al.* Frequent codon 12 Ki-ras mutations in mouse skin tumors initiated by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and promoted by mezerein. *Mol. Carcinog.* **27**, 298-307 (2000).

- Reinacher, M., Müller, H., Thiel, W. & Rudolph, R.L. Localization of papillomavirus and virus-specific antigens in the skin of tumor-bearing *Mastomys natalensis* (GRA Giessen). *Med. Microbiol. Immunol. (Berl)* **165**, 93-99 (1978).
- Reiss, M., Radin, A.I. & Weisberg, T.F. Constitutive expression of the c-fos protooncogene in murine keratinocytes: potentiation of the mitogenic response to insulin-like growth factor 1. *Cancer Res.* **50**, 6641-6648 (1990).
- Reuter, S. *et al.* APM-1, a novel human gene, identified by aberrant co-transcription with papillomavirus oncogenes in a cervical carcinoma cell line, encodes a BTB/POZ-zinc finger protein with growth inhibitory activity. *EMBO J.* **17**, 215-222 (1998).
- Reuter, S. *et al.* Characterization of a novel human papillomavirus DNA in the cervical carcinoma cell line ME180. *J. Virol.* **65**, 5564-5568 (1991).
- Roberts, S., Ashmole, I., Johnson, G.D., Kreider, J.W. & Gallimore, P.H. Cutaneous and mucosal human papillomavirus E4 proteins form intermediate filament-like structures in epithelial cells. *Virology* **197**, 176-187 (1993).
- Romanczuk, H. & Howley, P.M. Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**, 3159-3163 (1992).
- Romanczuk, H., Thierry, F. & Howley, P.M. Mutational analysis of cis elements involved in E2 modulation of human papillomavirus type 16 P97 and type 18 P105 promoters. *J. Virol.* **64**, 2849-2859 (1990).
- Rosl, F., Waldeck, W. & Sauer, G. Isolation of episomal bovine papillomavirus chromatin and identification of a DNase I-hypersensitive region. *J. Virol.* **46**, 567-574 (1983).
- Rowson, K.E. & Mahy, B.W. Human papova (wart) virus. *Bacteriol. Rev.* **31**, 110-131 (1967).
- Rudolph, R. & Thiel, W. [Pathological anatomy and histology of spontaneous, epithelial skin tumors in *Mastomys natalensis*]. *Zentralbl. Veterinarmed. A* **23**, 429-441 (1976).
- Sambrook, J. & Gething, M.J. Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature* **342**, 224-225 (1989).
- Schairer, H.U. *et al.* [On the chemistry of phorbol. IV. Polybenzoate and acetate of phorbol and phorbol-3-ol and functional derivatives of the allyl grouping of phorbol]. *Z. Naturforsch. B* **23**, 1430-1443 (1968).
- Scheffner, M., Werness, B.A., Huibregtse, J.M., Levine, A.J. & Howley, P.M. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* **63**, 1129-1136 (1990).
- Schmidt, R. & Hecker, E. Biological assays for irritant, tumor-initiating and tumor-promoting activities. II. Standardized initiation/promotion protocol and semiquantitative estimation of promoting (or initiating) potencies in skin of NMRI mice. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **115**, 516-524 (1989).
- Schmitt, A., Harry, J.B., Rapp, B., Wettstein, F.O. & Iftner, T. Comparison of the properties of the E6 and E7 genes of low- and high-risk cutaneous papillomaviruses reveals strongly transforming and high Rb-binding activity for the E7 protein of the low-risk human papillomavirus type 1. *J. Virol.* **68**, 7051-7059 (1994).
- Schneider, A. & Koutsky, L.A. Natural history and epidemiological features of genital HPV infection. *IARC Sci. Publ.* 25-52 (1992).
- Schwarz, E. *et al.* DNA sequence and genome organization of genital human papillomavirus type 6b. *EMBO J.* **2**, 2341-2348 (1983).

- Schwarz,E. *et al.* Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* **314**, 111-114 (1985).
- Seagon,S. & Durst,M. Genetic analysis of an in vitro model system for human papillomavirus type 16-associated tumorigenesis. *Cancer Res.* **54**, 5593-5598 (1994).
- Seedorf,K., Krammer,G., Durst,M., Suhai,S. & Rowekamp,W.G. Human papillomavirus type 16 DNA sequence. *Virology* **145**, 181-185 (1985).
- Segrelles,C. *et al.* Functional roles of Akt signaling in mouse skin tumorigenesis. *Oncogene* **21**, 53-64 (2002).
- Sherman,L. *et al.* Inhibition of serum- and calcium-induced terminal differentiation of human keratinocytes by HPV 16 E6: study of the association with p53 degradation, inhibition of p53 transactivation, and binding to E6BP. *Virology* **292**, 309-320 (2002).
- Sherman,L. & Schlegel,R. Serum- and calcium-induced differentiation of human keratinocytes is inhibited by the E6 oncoprotein of human papillomavirus type 16. *J. Virol.* **70**, 3269-3279 (1996).
- Siegmund,M., Wayss,K. & Amtmann,E. Activation of latent papillomavirus genomes by chronic mechanical irritation. *J. Gen. Virol.* **72 ( Pt 11)**, 2787-2789 (1991).
- Smith-McCune,K. *et al.* Intranuclear localization of human papillomavirus 16 E7 during transformation and preferential binding of E7 to the Rb family member p130. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 6999-7004 (1999).
- Smith-McCune,K., Zhu,Y.H., Hanahan,D. & Arbeit,J. Cross-species comparison of angiogenesis during the premalignant stages of squamous carcinogenesis in the human cervix and K14-HPV16 transgenic mice. *Cancer Res.* **57**, 1294-1300 (1997).
- Song,S., Gulliver,G.A. & Lambert,P.F. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncogenes abrogate radiation-induced DNA damage responses in vivo through p53-dependent and p53-independent pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 2290-2295 (1998).
- Song,S., Liem,A., Miller,J.A. & Lambert,P.F. Human papillomavirus types 16 E6 and E7 contribute differently to carcinogenesis. *Virology* **267**, 141-150 (2000).
- Song,S., Pitot,H.C. & Lambert,P.F. The human papillomavirus type 16 E6 gene alone is sufficient to induce carcinomas in transgenic animals. *J. Virol.* **73**, 5887-5893 (1999).
- Stoler,M.H., Wolinsky,S.M., Whitbeck,A., Broker,T.R. & Chow,L.T. Differentiation-linked human papillomavirus types 6 and 11 transcription in genital condylomata revealed by in situ hybridization with message-specific RNA probes. *Virology* **172**, 331-340 (1989).
- Storey,A. & Banks,L. Human papillomavirus type 16 E6 gene cooperates with EJ-ras to immortalize primary mouse cells. *Oncogene* **8**, 919-924 (1993).
- Storey,A., Osborn,K. & Crawford,L. Co-transformation by human papillomavirus types 6 and 11. *J. Gen. Virol.* **71 ( Pt 1)**, 165-171 (1990).
- Storey,A. *et al.* Comparison of the in vitro transforming activities of human papillomavirus types. *EMBO J.* **7**, 1815-1820 (1988).
- Storey,A. *et al.* Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* **393**, 229-234 (1998).
- Stubenrauch,F. & Laimins,L.A. Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Semin. Cancer Biol.* **9**, 379-386 (1999).

- Taketo, M. *et al.* FVB/N: an inbred mouse strain preferable for transgenic analyses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**, 2065-2069 (1991).
- Tan, S.H., Bartsch, D., Schwarz, E. & Bernard, H.U. Nuclear matrix attachment regions of human papillomavirus type 16 point toward conservation of these genomic elements in all genital papillomaviruses. *J. Virol.* **72**, 3610-3622 (1998).
- Tanaka, A., Noda, T., Yajima, H., Hatanaka, M. & Ito, Y. Identification of a transforming gene of human papillomavirus type 16. *J. Virol.* **63**, 1465-1469 (1989).
- Thomas, M. & Banks, L. Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6. *Oncogene* **17**, 2943-2954 (1998).
- Thomas, M. & Banks, L. Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types. *J. Gen. Virol.* **80** ( Pt 6), 1513-1517 (1999).
- Tinsley, J.M., Fisher, C. & Searle, P.F. Abnormalities of epidermal differentiation associated with expression of the human papillomavirus type 1 early region in transgenic mice. *J. Gen. Virol.* **73** ( Pt 5), 1251-1260 (1992).
- Tober, K.L. *et al.* Comparative expression of novel vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor transcripts in skin, papillomas, and carcinomas of v-Ha-ras Tg.AC transgenic mice and FVB/N mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **247**, 644-653 (1998).
- Tyring, S.K. Human papillomavirus infections: epidemiology, pathogenesis, and host immune response. *J. Am. Acad. Dermatol.* **43**, S18-S26 (2000).
- Ullman, C.G., Haris, P.I., Galloway, D.A., Emery, V.C. & Perkins, S.J. Predicted alpha-helix/beta-sheet secondary structures for the zinc-binding motifs of human papillomavirus E7 and E6 proteins by consensus prediction averaging and spectroscopic studies of E7. *Biochem. J.* **319** ( Pt 1), 229-239 (1996).
- Van Regenmortel, M.H. & Choulier, L. Recognition of peptides by antibodies and investigations of affinity using biosensor technology. *Comb. Chem. High Throughput. Screen.* **4**, 385-395 (2001).
- Vasioukhin, V., Degenstein, L., Wise, B. & Fuchs, E. The magical touch: genome targeting in epidermal stem cells induced by tamoxifen application to mouse skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 8551-8556 (1999).
- Vousden, K.H. p53: death star. *Cell* **103**, 691-694 (2000).
- Waldeck, W., Rosl, F. & Zentgraf, H. Origin of replication in episomal bovine papilloma virus type 1 DNA isolated from transformed cells. *EMBO J.* **3**, 2173-2178 (1984).
- Watanabe, S. & Yoshiike, K. Transformation of rat 3Y1 cells by human papillomavirus type-18 DNA. *Int. J. Cancer* **41**, 896-900 (1988).
- Wayss, K., Reyes-Mayes, D. & Volm, M. Chemical carcinogenesis by the two-stage protocol in the skin *Mastomys natalensis* (Muridae) using topical initiation with 7,12-dimethylbenz(a)anthracene and topical promotion with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* **38**, 13-21 (1981).
- Wazer, D.E., Liu, X.L., Chu, Q., Gao, Q. & Band, V. immortalization of distinct human mammary epithelial cell types by human papilloma virus 16 E6 or E7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**, 3687-3691 (1995).
- Werness, B.A., Levine, A.J. & Howley, P.M. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* **248**, 76-79 (1990).

- Wettstein,F.O., Barbosa,M.S. & Nasser,M. 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 (1987).
- Yuspa,S.H., Ben,T., Hennings,H. & Lichti,U. Phorbol ester tumor promoters induce epidermal transglutaminase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **97**, 700-708 (1980).
- Yuspa,S.H., Hawley-Nelson,P., Stanley,J.R. & Hennings,H. Epidermal cell culture. *Transplant. Proc.* **12**, 114-122 (1980).
- Yuspa,S.H., Lichti,U., Morgan,D. & Hennings,H. Chemical carcinogenesis studies in mouse epidermal cell cultures. *Curr. Probl. Dermatol.* **10**, 171-191 (1980).
- Zhao,K.N., Sun,X.Y., Frazer,I.H. & Zhou,J. DNA packaging by L1 and L2 capsid proteins of bovine papillomavirus type 1. *Virology* **243**, 482-491 (1998).
- Zhou,J., Sun,X.Y., Louis,K. & Frazer,I.H. Interaction of human papillomavirus (HPV) type 16 capsid proteins with HPV DNA requires an intact L2 N-terminal sequence. *J. Virol.* **68**, 619-625 (1994).
- zur Hausen,H. Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **78**, 1-30 (1977).
- zur Hausen,H. Papovaviruses and human tumors. *Hamatol. Bluttransfus.* **28**, 289-292 (1983).
- zur Hausen,H. Genital papillomavirus infections. *Prog. Med. Virol.* **32**, 15-21 (1985).
- zur Hausen, H. Host cell regulation of HPV transforming gene expression. *Princess Takamatsu Symp.* **20**, 207-219 (1989).
- zur Hausen,H. The role of papillomaviruses in anogenital cancer. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl* **69**, 107-111 (1990).
- zur Hausen,H. Are human papillomavirus infections not necessary or sufficient causal factors for invasive cancer of the cervix? *Int. J. Cancer* **63**, 315-316 (1995).
- zur Hausen,H. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochim. Biophys. Acta* **1288**, F55-F78 (1996).
- zur Hausen,H. Papillomavirus and p53. *Nature* **393**, 217 (1998).
- zur Hausen,H. Papillomaviruses in human cancers. *Proc. Assoc. Am. Physicians* **111**, 581-587 (1999).
- zur Hausen,H. Viruses in human cancers. *Eur. J. Cancer* **35**, 1878-1885 (1999).
- zur Hausen,H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* **92**, 690-698 (2000).
- zur Hausen,H. Cervical carcinoma and human papillomavirus: on the road to preventing a major human cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **93**, 252-253 (2001).
- zur Hausen,H. Oncogenic DNA viruses. *Oncogene* **20**, 7820-7823 (2001).
- zur Hausen,H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 342-350 (2002).
- zur Hausen,H. & de Villiers,E.M. Human papillomaviruses. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**, 427-447 (1994).

---

zur Hausen,H., de Villiers,E.M. & Gissmann,L. Papillomavirus infections and human genital cancer. *Gynecol. Oncol.* **12**, S124-S128 (1981).

zur Hausen,H., Gissmann,L. & Schlehofer,J.R. Viruses in the etiology of human genital cancer. *Prog. Med. Virol.* **30**, 170-186 (1984).

zur Hausen,H., Gissmann,L., Steiner,W., Dippold,W. & Dreger,I. Human papilloma viruses and cancer. *Bibl. Haematol.* 569-571 (1975).

Zwerschke,W. & Jansen-Durr,P. Cell transformation by the E7 oncoprotein of human papillomavirus type 16: interactions with nuclear and cytoplasmic target proteins. *Adv. Cancer Res.* **78**, 1-29 (2000).

Zwerschke,W. *et al.* Modulation of type M2 pyruvate kinase activity by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 1291-1296 (1999).