

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Mikrobiologie, Virologie und Hygiene

Professor Dr. rer. nat. Nicole Fischer

Nachweis des Merkelzellpolyomavirus in Merkelzellkarzinomen Norddeutschlands durch PCR und Proteinexpression

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin an der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Miriam Leitz
aus Bad Mergentheim

Hamburg 2015

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 19.01.2016**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinische Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. N. Fischer

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. I. Moll

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in:

Merkel Cell Polyomavirus Detection in Merkel Cell Cancer Tumors in Northern Germany Using PCR and Protein Expression

Miriam Leitz,¹ Kristin Stieler,¹ Adam Grundhoff,² Ingrid Moll,³ Johanna M. Brandner,³ and Nicole Fischer^{1,*}

¹Institute for Microbiology and Virology, University Medical Center Eppendorf, Hamburg, Germany

²Heinrich-Pette Institute, Leibniz Institute for Experimental Virology, Hamburg, Germany

³Department for Dermatology and Venerology, University Medical Center Eppendorf, Hamburg, Germany

Merkel cell carcinoma is a highly malignant skin cancer which predominantly occurs in elderly and immunocompromised persons. The identification of the Merkel cell polyomavirus (MCPyV) has inaugurated a new understanding of Merkel cell carcinoma pathogenesis. The frequent detection of the virus in Merkel cell carcinoma tissue (70–90%), its monoclonal integration in the tumor cells and the expression of viral oncogenes highly suggest that MCPyV is causally linked to the pathogenesis of the majority of Merkel cell cancer (MCC) cases. Using qualitative and quantitative PCR together with immunohistochemical staining this study aimed at characterizing the presence of MCPyV sequences and viral early gene expression in a cohort of MCC cases ($n=32$) selected in Northern Germany. 40–57% of the cases were identified as MCPyV positive with 40.6% of the cases positive by immunohistochemical staining and 51.6–57.6% positive by PCR. Interestingly, in the majority (64%) of LT-Antigen positive tumors only 25–50% of tumor cells express LT-Antigen. These data are in accord with published studies describing heterogeneity in MCPyV viral loads and suggest that detection of MCPyV in Merkel cell carcinoma by PCR should be undertaken using multiple primer pairs. **J. Med. Virol.** 2013 Wiley Periodicals, Inc.

KEY WORDS: Merkel cell polyomavirus; immunohistochemistry; LT-Antigen expression; Merkel cell cancer; polyomavirus and skin cancer

INTRODUCTION

Merkel cell cancer (MCC) is a rare but highly aggressive neuroendocrine tumor of the skin predominantly found in elderly and immunosuppressed patients. Solid organ transplant patients, patients suffering from leukemia as well as HIV patients have a 15-fold higher risk to develop MCC [Albores-Saavedra et al., 2010]. A panel of immunohistochemical marker proteins including cytokeratin 20 (CK20), neurofilaments, chromogranin, and neuron specific enolase are used to confirm the histological diagnosis of MCC [Albores-Saavedra et al., 2010]. The development of MCC, in particular cellular pathways contributing to MCC pathogenesis is still poorly understood.

In 2008, a new polyomavirus from MCC primary tumor material was identified, the Merkel cell polyomavirus [Feng et al., 2008]. Using mostly PCR several groups worldwide confirmed that up to 90% of all MCC cases carry viral sequences [Foulongne et al., 2008; Kassem et al., 2008; Shuda et al., 2008; Becker et al., 2009; Garneski et al., 2009]. The viral DNA is monoclonal integrated in the host genome [Feng et al., 2008; Shuda et al., 2008], which together with LT-Antigen expression within the tumor cells contributes to the classification of Merkel cell polyomavirus (MCPyV) as a human tumor virus [Shuda et al., 2009; Bouvard et al., 2012]. Interestingly, all

Virus Nomenclature: dsDNA virus, Order not assigned, Family *Polyomaviridae*, Genus *Polyomavirus*, Species Merkel cell polyomavirus.

*Correspondence to: Nicole Fischer, Institute for Medical Microbiology and Virology, University Medical Center Eppendorf, Martinistrasse 52, D-20246 Hamburg, Germany.
E-mail: nfischer@uke.de

Accepted 3 September 2013

DOI 10.1002/jmv.23808

Published online in Wiley Online Library
(wileyonlinelibrary.com).

early gene regions of the virus isolated from MCC tumor material carry premature STOP codon mutations within the LT-Antigen region resulting in a truncated LT protein lacking the origin binding domain and the C-terminus of the protein [Shuda et al., 2008; Fischer et al., 2010], which suggest a positive selection for the N-terminal region of the protein encompassing DNAJ domain as well as a retinoblastoma protein (Rb) binding motif or a negative selection against the C-terminal part of the protein essential for viral replication.

Most studies addressing MCPyV association with MCC applied qualitative PCR technology to detect viral sequences using genomic DNA isolated from MCC paraffin sections [Feng et al., 2008; Foulongne et al., 2008; Kassem et al., 2008; Becker et al., 2009; Busam et al., 2009; Duncavage et al., 2009; Garneski et al., 2009; Helmbold et al., 2009; Sihto et al., 2009; Touze et al., 2009; Wieland et al., 2009; Bhatia et al., 2010; Loyo et al., 2010]. To increase sensitivity some studies additionally applied nested PCR or southern blot technology [Feng et al., 2008; Kassem et al., 2008; Touze et al., 2009; Wieland et al., 2009]. Quantitative PCR technique used by several studies detecting a 162-bp fragment in the LT-region increased sensitivity and specificity of the detection of MCPyV especially in DNA isolated from paraffin section [Becker et al., 2009; Busam et al., 2009; Garneski et al., 2009; Sihto et al., 2009; Bhatia et al., 2010; Loyo et al., 2012; Hattori et al., 2013]. Reports using PCR to detect MCPyV in MCC vary in MCPyV positivity depending on primer pairs used ranging from 40% to 100% [Feng et al., 2008; Kassem et al., 2008; Becker et al., 2009; Busam et al., 2009; Duncavage et al., 2009; Garneski et al., 2009; Sastre-Garau et al., 2009; Shuda et al., 2009; Sihto et al., 2009; Touze et al., 2009; Varga et al., 2009; Wetzels et al., 2009; Bhatia et al., 2010; Houben et al., 2010; Loyo et al., 2010; Andres et al., 2011]. Immunohistochemistry using the only commercially available antibody against MCPyV early gene product, CM2B4, recognizing a peptide in the second exon of the LT-Antigen was used in only a few studies so far [Busam et al., 2009; Shuda et al., 2009, 2011; Paik et al., 2011; Ly et al., 2012; Erovcic et al., 2013]. Based on the majority of these studies IHC of MCPyV LT-Antigen expression using CM2B4 is highly suitable as a diagnostic tool, however, as observed for PCR based results, discrepancies applying LT IHC exist: frequency of MCC sections positive for LT expression vary from 63% to 97% [Shuda et al., 2009; Ly et al., 2012; Erovcic et al., 2013]. In addition, the number of MCC tumors with more than 60% of tumor cells expressing LT-Antigen varies from 35% to 97% [Busam et al., 2009; Erovcic et al., 2013].

Interestingly, an earlier report demonstrated that the CM2B4 antibody failed to detect LT-Antigen in several cases of MCC and that a combined use of CM2B4 and a small T (sT)-Antigen specific antibody (CM5E1) significantly increased sensitivity [Shuda

et al., 2011]. Furthermore, a more recent study reported significantly increased sensitivity of IHC using a different noncommercial LT-Antigen specific antibody, Ab3 [Rodig et al., 2012].

Intrigued by the discrepancies in nucleic acid based as well as IHC based MCPyV detection in MCC cohorts this study with regard to MCC diagnostics sought to (1) compare widely used qualitative and quantitative MCPyV PCR detection, (2) compare PCR based and immunohistochemistry based detection of MCPyV, and (3) quantify the number of LT-Antigen expressing tumor cells in a cohort of MCC cases collected in Northern Germany.

MATERIALS AND METHODS

Patients

MCC cases were collected in the department of Dermatology at the University Medical Center Hamburg-Eppendorf between the years 1999 and 2011. The study was approved by the local ethics committee (060900).

Immunohistochemical Staining

LT-Antigen expression: Sections were deparaffinized using xylene and rehydrated using a series of graded ethanol. Endogenous peroxidase expression was blocked using 3% hydrogen peroxidase solution. Sections were heated 4 × 2 min in citrate buffer using a microwave oven (650 W) and cooled down to room temperature. Blocking of nonspecific binding sites was performed for 30 min at RT with 10% swine serum in antibody dilution buffer (Dako, BIOZOL Diagnostica, Germany). CM2B4 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Germany) 1:100 diluted was incubated for 2 hr at RT followed by incubation with the secondary antibody (Dako K4000) for 30 min. Staining was performed with DAB chromagen (Dako K3467) for 10 min at RT. Samples were counterstained with Mayers hamlin solution. Sections were coated with crystal mount mounting medium and embedded with Eukitt. Sections were analyzed on an upright Zeiss Axioskop 2 plus microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany), equipped with a Leica DFC 290 FX camera using HC PLAN S 10×/25 and N PLAN APO 5×/0.11 lenses. Images were acquired using Openlab software (Improvision, Coventry, UK) and Leica Application Suite software.

CK20 staining was applied following protocol 2 using a CK20 mAb (IT-Ks 20.10, Progen Biotechnik, Germany) at a 1:75 dilution.

Quantification of LT Expressing Cells

Analysis was based on five representative tumor sections of each tumor. Sections were photo documented and analyzed based on number of tumor cells expressing LT-Antigen and staining intensity: With regard to proportion of LT-Antigen expressing tumor cells, tumors were divided into subgroups with <25%,

25–50%, 50–75%, and >75% positive tumor cells. Concerning the staining intensity, positive tumor cells were visually graded in + weak, ++ intermediate, and +++ strong. Sections were analyzed using an upright Zeiss Axioskop 2 plus microscope (Carl Zeiss), equipped with a Leica DFC 290 FX camera using HC PLAN S 10×/25 and N PLAN APO 5×/0.11 lenses. Images were processed using Photoshop CS5.

MCPyV Detection of LT Sequences by Qualitative PCR

MCPyV specific PCR was performed as described [Feng et al., 2008; Fischer et al., 2010]. Briefly, genomic DNA was extracted using QIAamp DNA FFPE tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions. DNA (100 ng) was amplified with the two different primer sets located in the LT-Antigen region: Primer set I: M1M2F: 5'-GGCATGCCTGTGAATTAGGA, M1M2R: 5'-TTGCA-GTAATTTGTAAGGGGACT and primer set II: LT3F: 5'-TTGTCTCGCCAGCATTGTAG, LT5R: 5'-TGGGAA-AGTACACAAAATCTGTCA. PCR fragments were submitted to automated sequencing using an ABI Prism 3100 genetic analyzer.

Detection of LT Sequences by Quantitative PCR

LT quantitative real time PCR was performed as described earlier [Fischer et al., 2010]. Briefly, 100 ng of genomic DNA was amplified in a total volume of 10 μ l using the primers LT3F and LT3R [Feng et al., 2008; Fischer et al., 2010] in the presence of Fermentas SyBr Green Master Mix on a Qiagen Rotorgene Q 5plex instrument and Rotorgene 1.7 software using the following conditions: 5 min 95°C, 40 \times 5 sec 95°C, 20 sec 60°C, 20 sec 72°C. A MCPyV standard was included for calculation of MCPyV copy numbers. Each sample was normalized against GAPDH; GAPDH F: GAAGGTGAAGGTCGGAGTC; GAPDH R: GAAGATGGTGATGGGATTTTC. A plasmid containing the genomic GAPDH sequences (pCR2.1-GAPDH-F/R) was included as a standard to determine absolute copy numbers. PCR efficiency for each primer set was determined by plotting the Ct values (determined by using the Rotorgene Software version 1.7) against the log₁₀ value of template concentration; the slope (M) determines the reaction according to $(10 - 1/M) - 1 = 1$.

RESULTS

MCC Patient Data

Twenty-seven patients (32 MCC samples) were included in the current analysis: four patients developed metastasis with one patient having multiple metastases (Table I). MCC diagnosis was based on histopathology, CK20, chromogranin A, neuron specific enolase (NSE) staining and neurofilament expression. 48.15% of patients were female and 51.85% were male. The age of patients ranged between 40

and 94 years with a median age of 75.5 years. MCC tumors were localized in 18.5% of the patients on cheek, forehead and ear, 18.5% of the tumors were localized in the upper torso, and 29.6% of MCC lesions were localized on the upper or lower extremities, while in 33.3% of the MCC cases no data on tumor localization were available.

MCPyV Detection by PCR Using DNA From Paraffin Sections

To detect MCPyV by PCR qualitative and quantitative PCR was performed. MCPyV sequences, at least one primer pair had to amplify MCPyV specific sequences, were detected in 19/32 cases (59.4%) applying qualitative PCR. Using a different set of primer sequences amplifying a shorter region within the MCPyV genome by real-time PCR 16/29 (55.2%) MCC cases were positive for LT sequences (Table I). Viral copy numbers varied ranging from 0.03 to 152 copies/sample. In six MCC cases very low copy numbers were detected, less than 0.1 copies/cell.

LT-Antigen Expression in MCC Tissue Sections

PCR results were compared to immunohistochemical staining of MCPyV LT-Antigen (Fig. 1, Table I). 41.9% of MCC samples were positive for LT-Antigen expression.

To evaluate the number of MCPyV LT-Antigen expressing cells within the tumor, LT-Antigen expressing cells were calculated in 11 out of 13 LT-Antigen positive MCC cases according to a recently published study [Erovic et al., 2013]. The results of IHC staining, number of LT-Antigen expressing cells representative for one of the four classes, class I: less than 25%, class II: 25–50%, class III: 50–75%, and class IV: more than 75%, are illustrated in Figure 1A–C and subsequently summarized in Table II. In 7/11 (63.6%) of MCC cases only 25–50% of all tumor cells express LT-Antigen; 3/11 (27.3%) displayed 50–75% of tumor cells positive for LT-Antigen, while in none of the MCC cases all tumor cells stained positive for LT-Antigen expression (Table II).

DISCUSSION

Identification of MCPyV in MCC tissue in 2008 [Feng et al., 2008] and subsequent association of the virus with up to 90% of MCC [Chang and Moore, 2012] has opened a new understanding in the initiation and progression of MCC. The majority of studies analyzing the association of the virus with MCC have been performed applying qualitative or real-time PCR technology. Discrepancies in MCPyV detection in MCC cases using nucleic acid based technologies range from 40% to 100%. Some discrepancies between percentages of MCC cases positive for the virus can be attributed to geographical differences, for example, MCC cases collected in Australia

TABLE I. Summary of MCC Samples

Sample ID	Age	Gender	Origin of tumor	Location of the lesion	% LT express. cells	MCPyV qualitative PCR ^a	MCPyV quantitative PCR ^b	CM2B4 IHC ^c	CK20
1	83	F	Primary	—	—	—	—	—	(+)
2	87	M	Primary	Cheek	—	+	4.8	—	+
3			Metastasis	—	55.4	+	152	++	—
4	88	F	—	Cheek	44.9	+	3.7	+++	+
5	69	F	Primary	Forehead	61.2	—	0.85	+	+
6	66	M	Primary	Arm	35.3	+	0.14	++	+
7	94	F	—	Cheek	33.1	+	0.75	++	+
8	65	F	Primary	—	—	—	—	—	+
9	55	M	Primary	Knee	—	—	—	—	—
10	70	F	Primary	Thigh	n.t.	+	0.04	++	+
11	73	F	Primary	Upper arm	40.2	+	0.04	+	+
12	69	F	Primary	Lower leg	n.t.	+	0.08	+	+
13			Lymphnode	Groin	n.t.	+	n.t.	+	+
14	68	M	Primary	Torso	—	—	—	—	+
15			Lymphnode	Groin	—	—	—	—	+
16	79	F	Primary	Upper leg	n.t.	+	0.03	n.t.	+
17	79	F	Primary	Lower leg	30.4	+	0.06	+	+
18	81	M	Metastasis	Cheek	—	—	—	—	+
19	77	M	Primary	Upper arm	—	+	0.4	—	+
20	81	M	Primary	Lower arm	—	+	0.09	—	+
21	78	M	Metastasis	Torso	—	—	—	—	(+)
22	69	F	Primary	—	—	+	—	—	+
23	75	M	Metastasis	—	7.7	+	0.15	+	(+)
24	82	M	Primary	—	39.2	+	0.24	++	+
25			Lymphnode	—	48.9	+	n.t.	+	+
26			Lymphnode	—	29.2	+	n.t.	+	+
27	90	M	Primary	Ear	—	—	—	—	+
28	70	M	Metastasis	Groin	—	—	—	—	+
29	85	M	Metastasis	—	53.9	+	0.55	++	+
30	80	M	Metastasis	—	n.t.	—	—	—	+
31	87	F	Metastasis	—	n.t.	—	—	—	+
32	40	F	Metastasis	—	40.5	+	1.2	++	+

MCPyV+: 19/32 (59.4%) qualitative PCR; 16/29 (55.2%) real-time PCR; IHC: 13/31 (41.9%).

n.t., not tested; (+), partially positive CK20 staining; LT IHC: +, weak staining; ++, moderate staining; +++, strong staining.

^aTwo individual qualitative PCRs targeting different regions (1711–1889; 571–879; GenBank accession no.: EU375803) in LT were applied.

^bPrimers and protocols have been published earlier [Feng et al., 2008; Fischer et al., 2010].

^cShuda et al. [2009].

show significant less viral prevalence. In general, the studies are difficult to compare due to different PCR technologies applied, nucleic acid extraction used and/or number of cases included in the study. However, the differences between studies in Europe and/or North America demonstrate the need for standardization in MCPyV detection.

Only few studies used immunohistochemical staining against the viral LT-Antigen applying the so far only commercially available antibody CM2B4 [Busam et al., 2009; Bhatia et al., 2010; Paik et al., 2011; Shuda et al., 2011; Ly et al., 2012; Erovcic et al., 2013]. These results, with exception of Australian MCC cases (18.1% LT-Antigen positive) are slightly more consistent with a prevalence of LT-expression of 63–97% [Busam et al., 2009; Bhatia et al., 2010; Paik et al., 2011; Shuda et al., 2011; Ly et al., 2012; Erovcic et al., 2013]. However, recent studies applying a combination of CM2B4 and sT-Antigen staining or applying a more sensitive LT-

Antigen specific antibody (Ab3) significantly increased sensitivity [Shuda et al., 2011; Rodig et al., 2012]. Studies which include both PCR and IHC have only sparsely been conducted [Busam et al., 2009; Bhatia et al., 2010].

This study is the first study comparing qualitative, quantitative PCR, and immunohistochemistry detection of MCPyV in one MCC cohort. There was a good concordance between qualitative and real-time PCR: 59.4% or 55.2% of all cases were MCPyV sequence positive. However, only 8/32 of MCC cases (25%) were positive by both primer sets used in qualitative PCR. This indicates that frequent point mutations within the LT-Antigen occur [Shuda et al., 2008; Neumann et al., 2011; Rodig et al., 2012] and multiple primer sets are necessary to unambiguously detect MCPyV sequences.

IHC using the MCPyV antibody, CM2B4, has been suggested as a diagnostic tool to diagnose or discriminate MCC from other endocrine tumors. Subsequent

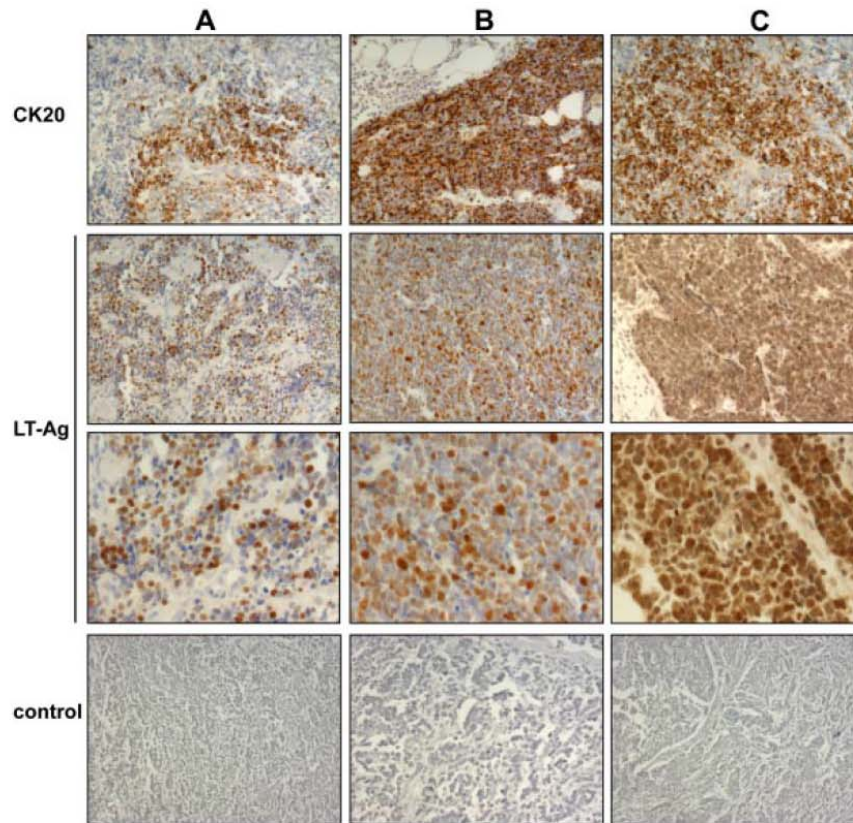


Fig. 1. Representative tissue section pattern of MCC tumors (A) class I, <25% of the tumor cells express LT-Antigen (CM2B4 staining). CK20 staining of the respective tumor is illustrated as well as a negative control (lower row). The figure shows representative visual fields (200 \times magnification) of one tumor. LT-Antigen and CK20 staining illustrate different visual fields. B: class II, 25–50% of tumor cells express LT-Antigen. C: class III, 50–75% of tumor cells demonstrate CM2B4 positive staining.

studies resulted in the detection of MCC in 63–97% of samples. This study detected 55.2–59.4% of MCC cases positive by PCR while 41.9% were positive for LT expression. Discrepancies between these findings could have technical explanations, lack of monoclonal antibody reactivity because of sequence variations within the Ab epitope or reduced sensitivity of CM2B4 IHC staining compared to real-time PCR. Alternatively, the observed differences might be explained with the possibility that in the course of the disease MCC tumor cells could become indepen-

dent of LT expression or not all tumor cells express LT-Antigen.

These results are in good concordance with a recent publication showing that a viral abundance of 0.06–1.2 DNA copies/cell together with LT-Antigen expression visualized by IHC is detected in virus positive MCC cases [Bhatia et al., 2010]. Since this study as well as previous studies did not microdissect tumor cells instead used DNA isolated from paraffin sections, it cannot be excluded that the calculation of viral copy numbers is underestimated. Furthermore, this study shows that some PCR positive cases do not show CM2B4 reactivity thereby strengthening the observation of earlier publications [Busam et al., 2009]. While this study was in preparation a publication reported the development and application of a new monoclonal antibody, called Ab3, recognizing the N-terminal region, aa 79–260, within the LT-Antigen [Rodig et al., 2012]. Application of Ab3 on MCC paraffin sections resulted in an increased sensitivity compared to CM2B4 IHC staining as well

TABLE II. Percentage of Tumor Cells Expressing LT-Antigen

	Number of LT + cells		
Group I	<25% + cells	1	9.1%
Group II	25–50%	7	63.6%
Group III	50–75%	3	27.3%
Group IV	>75%	0	0%
Total		11	

as reduced unspecific staining (no infiltrating lymphocytes were stained). Furthermore, it was demonstrated that with regard to frequent mutations in the LT-Antigen sequence PCR has to be performed with primer sequences of five different regions to reach comparable sensitivity when comparing PCR to Ab3 immunohistochemical staining [Rodig et al., 2012].

In general, the presented study finds significantly less MCC cases positive for MCPyV sequences and/or MCPyV LT-expression (using CM2B4 Ab) than described in the literature. These discrepancies can be explained by the different cohort sizes used in different studies. However, the main aim of this work was not to describe MCPyV prevalence in yet another cohort but rather to compare different techniques (which have been applied before and suggested as a useful routine diagnostic tool) to detect MCPyV. Based on the presented findings together with the recently published work [Rodig et al., 2012] it is highly suggestive that immunohistochemistry applying the commercially available monoclonal antibody CM2B4 needs to be improved with regard to diagnostic use. This sensitivity can be significantly increased and therefore might be a very useful tool in diagnosing MCC using the recently described, however so far not commercially available mAb called Ab3 [Rodig et al., 2012].

In general, in the presented study in the majority of LT-Antigen positive tumors only 25–50% of tumor cells expressing LT-Antigen which is in concordance with recently published studies describing heterogeneity in MCPyV viral loads [Busam et al., 2009; Ly et al., 2012; Erovic et al., 2013]. Regardless the already mentioned sensitivity problems of CM2B4 IHC staining, there are multiple explanations for the observed differences in viral load/LT-Antigen expression within one MCC tumor: there are two populations of cells in the tumor, virus positive and virus negative with paracrine signaling of MCPyV positive cells influencing MCC tumorigenesis or all MCC tumor cells contain the viral genome monoclonally integrated, however during disease progression tumor cells can become independent of LT-expression with the early gene locus being silenced in some MCC tumor cells. The experimental confirmation of either explanation are challenging: FISH analysis could discriminate between these two explanations, however, a negative result using a 5.4 kbp probe to detect a single integration per cell on paraffin sections does not rule out technical artifacts.

In summary, this study compares the sensitivity of PCR techniques published previously as well as IHC staining using the mAb CM2B4 in detecting MCPyV sequences and/or LT-Antigen expression in MCC cases (n = 32). The results of this study demonstrate that with regard to diagnostic use multiple primer pairs targeting different regions within the MCPyV genome need to be applied to increase sensitivity. Furthermore, IHC staining applying CM2B4 to FFPE material does not detect all MCPyV positive MCC

cases, sensitivity can be increased by combined use of sT-Antigen specific Ab or the LT-Antigen mAb Ab3.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Claudia Schmidt and Pia Houdek for excellent technical assistance. We are grateful to Patrick Moore, University of Pittsburgh, USA for help with LT-Antigen immunohistochemistry.

REFERENCES

- Alboreo-Saavedra J, Batich K, Chable-Montero F, Sagy N, Schwartz AM, Henson DE. 2010. Merkel cell carcinoma demographics, morphology, and survival based on 3870 cases: A population based study. *J Cutan Pathol* 37:20–27.
- Andres C, Belloni B, Jaeger T, et al. 2011. Immunohistochemical features of Merkel cell carcinoma in correlation with presence of Merkel cell polyomavirus DNA. *Acta Derm Venereol* 91:722–723.
- Becker JC, Houben R, Ugurel S, Trefzer U, Pfohler C, Schrama D. 2009. MC polyomavirus is frequently present in Merkel cell carcinoma of European patients. *J Invest Dermatol* 129:248–250.
- Bhatia K, Goedert JJ, Modali R, Preiss L, Ayers LW. 2010. Merkel cell carcinoma subgroups by Merkel cell polyomavirus DNA relative abundance and oncogene expression. *Int J Cancer* 126:2240–2246.
- Bouvard V, Baan RA, Grosse Y, Lauby-Secretan B, El Ghissassi F, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Straif K. 2012. Carcinogenicity of malaria and of some polyomaviruses. *Lancet Oncol* 13:339–340.
- Busam KJ, Jungbluth AA, Rektman N, Coit D, Pulitzer M, Bini J, Arora R, Hanson NC, Tassello JA, Frosina D, Moore P, Chang Y. 2009. Merkel cell polyomavirus expression in Merkel cell carcinomas and its absence in combined tumors and pulmonary neuroendocrine carcinomas. *Am J Surg Pathol* 33:1378–1385.
- Chang Y, Moore PS. 2012. Merkel cell carcinoma: A virus-induced human cancer. *Annu Rev Pathol* 7:123–144.
- Duncavage EJ, Zehnbauser BA, Pfeifer JD. 2009. Prevalence of Merkel cell polyomavirus in Merkel cell carcinoma. *Mod Pathol* 22:516–521.
- Erovic BM, Al Habeeb A, Harris L, Goldstein DP, Ghazarian D, Irish JC. 2013. Significant overexpression of the Merkel cell polyomavirus (MCPyV) large T antigen in Merkel cell carcinoma. *Head Neck* 35:184–189.
- Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS. 2008. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science* 319:1096–1100.
- Fischer N, Brandner J, Fuchs F, Moll I, Grundhoff A. 2010. Detection of Merkel cell polyomavirus (MCPyV) in Merkel cell carcinoma cell lines: Cell morphology and growth phenotype do not reflect presence of the virus. *Int J Cancer* 126:2133–2142.
- Foulongne V, Kluger N, Dereure O, Brieu N, Guillot B, Segondy M. 2008. Merkel cell polyomavirus and Merkel cell carcinoma, France. *Emerg Infect Dis* 14:1491–1493.
- Garneski KM, Warcola AH, Feng Q, Kiviat NB, Leonard JH, Nghiem P. 2009. Merkel cell polyomavirus is more frequently present in North American than Australian Merkel cell carcinoma tumors. *J Invest Dermatol* 129:246–248.
- Hattori T, Takeuchi Y, Takenouchi T, Hirofujii A, Tsuchida T, Kabumoto T, Fujiwara H, Ito M, Shimizu A, Okada E, Motegi S, Tamura A, Ishikawa O. 2013. The prevalence of Merkel cell polyomavirus in Japanese patients with Merkel cell carcinoma. *J Dermatol Sci* 70:99–107.
- Helmbold P, Lahtz C, Enk A, Herrmann-Trost P, Marsch W, Kutzner H, Dammann RH. 2009. Frequent occurrence of RASSF1A promoter hypermethylation and Merkel cell polyomavirus in Merkel cell carcinoma. *Mol Carcinog* 48:903–909.
- Houben R, Schrama D, Alb M, et al. 2010. Comparable expression and phosphorylation of the retinoblastoma protein in Merkel cell polyoma virus-positive and negative Merkel cell carcinoma. *Int J Cancer* 126:796–798.
- Kassem A, Schopflin A, Diaz C, Weyers W, Stickeler E, Werner M, Zur Hausen A. 2008. Frequent detection of Merkel cell polyomavirus in human Merkel cell carcinomas and identification of a unique deletion in the VP1 gene. *Cancer Res* 68:5009–5013.
- Loyo M, Guerrero-Preston R, Brait M, Hoque MO, Chuang A, Kim MS, Sharma R, Liegeois NJ, Koch WM, Califano JA, Westra

- WH, Sidransky D. 2010. Quantitative detection of Merkel cell virus in human tissues and possible mode of transmission. *Int J Cancer* 126:2991–2996.
- Loyo M, Schussel J, Colantuoni E, Califano J, Brait M, Kang S, Koch WM, Sidransky D, Westra WH, Taube JM. 2012. Detection of Merkel cell virus and correlation with histologic presence of Merkel cell carcinoma in sentinel lymph nodes. *Br J Cancer* 106:1314–1319.
- Ly TY, Walsh NM, Pasternak S. 2012. The spectrum of Merkel cell polyomavirus expression in Merkel cell carcinoma, in a variety of cutaneous neoplasms, and in neuroendocrine carcinomas from different anatomical sites. *Hum Pathol* 43:557–566.
- Neumann F, Borchert S, Schmidt C, Reimer R, Hohenberg H, Fischer N, Grundhoff A. 2011. Replication, gene expression and particle production by a consensus Merkel Cell Polyomavirus (MCPyV) genome. *PLoS ONE* 6:e29112.
- Paik JY, Hall G, Clarkson A, Lee L, Toon C, Colebatch A, Chou A, Gill AJ. 2011. Immunohistochemistry for Merkel cell polyomavirus is highly specific but not sensitive for the diagnosis of Merkel cell carcinoma in the Australian population. *Hum Pathol* 42:1385–1390.
- Rodig SJ, Cheng J, Wardzala J, DoRosario A, Scanlon JJ, Laga AC, Martinez-Fernandez A, Barletta JA, Bellizzi AM, Sadasivam S, Holloway DT, Cooper DJ, Kupper TS, Wang LC, DeCaprio JA. 2012. Improved detection suggests all Merkel cell carcinomas harbor Merkel polyomavirus. *J Clin Invest* 122:4645–4653.
- Sastre-Garau X, Peter M, Avril MF, et al. 2009. Merkel cell carcinoma of the skin: pathological and molecular evidence for a causative role of MCV in oncogenesis. *J Pathol* 218:48–56.
- Shuda M, Feng H, Kwun HJ, Rosen ST, Gjoerup O, Moore PS, Chang Y. 2008. T antigen mutations are a human tumor-specific signature for Merkel cell polyomavirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:16272–16277.
- Shuda M, Arora R, Kwun HJ, Feng H, Sarid R, Fernandez-Figueras MT, Tolstov Y, Gjoerup O, Mansukhani MM, Swerdlow SH, Chaudhary PM, Kirkwood JM, Nalesnik MA, Kant JA, Weiss LM, Moore PS, Chang Y. 2009. Human Merkel cell polyomavirus infection I. MCV T antigen expression in Merkel cell carcinoma, lymphoid tissues and lymphoid tumors. *Int J Cancer* 125:1243–1249.
- Shuda M, Kwun HJ, Feng H, Chang Y, Moore PS. 2011. Human Merkel cell polyomavirus small T antigen is an oncoprotein targeting the 4E-BP1 translation regulator. *J Clin Invest* 121:3623–3634.
- Sihto H, Kukko H, Koljonen V, Sankila R, Bohling T, Joensuu H. 2009. Clinical factors associated with Merkel cell polyomavirus infection in Merkel cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 101:938–945.
- Touze A, Gaitan J, Maruani A, Le Bidre E, Doussinaud A, Clavel C, Durlach A, Aubin F, Guyetant S, Lorette G, Coursaget P. 2009. Merkel cell polyomavirus strains in patients with Merkel cell carcinoma. *Emerg Infect Dis* 15:960–962.
- Varga E, Kiss M, Szabo K, et al. 2009. Detection of Merkel cell polyomavirus DNA in Merkel cell carcinomas. *Br J Dermatol* 161:930–932.
- Wetzels CT, Hoefnagel JG, Bakkers JM, et al. 2009. Ultrastructural proof of polyomavirus in Merkel cell carcinoma tumour cells and its absence in small cell carcinoma of the lung. *PLoS One* 4:e4958.
- Wieland U, Mauch C, Kreuter A, Krieg T, Pfister H. 2009. Merkel cell polyomavirus DNA in persons without Merkel cell carcinoma. *Emerg Infect Dis* 15:1496–1498.

1. Einleitung

1.1 Das Merkelzellkarzinom

Das Merkelzellkarzinom (MCC) ist ein maligner neuroendokriner Tumor der Haut. Mit einer Inzidenz von bis zu 0,6/ 100 000 Personen ist das Merkelzellkarzinom eine seltene Erkrankung, mit aber deutlich zunehmender Tendenz (Agelli, Clegg et al. 2010; Schrama, Ugurel et al. 2012; Hasan, Liu et al. 2013). Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt über dem 70. Lebensjahr. Selten erkranken aber auch junge Menschen (Albores-Saavedra, Batich et al. 2009; Santamaria-Barria, Boland et al. 2012). Vermeintlicher Ursprung und namensgebend sind die neuroendokrinen Merkelzellen der basalen Epidermis, wobei Beweise für diese ätiologische Verbindung fehlen (Moll, Roessler et al. 2005). Auf Grund der Expression von B-Zell-spezifischen Proteinen, wie Immunglobulinbestandteilen und spezifischen Enzymen von unreifen B-Zellen (TdT (terminale Desoxyribonuklytransferase) und PAX5 (Paired Box Gene 5), ein B-Zell-Aktivator), stehen seit kurzem Vorläufer der B-Zellen im Verdacht die Ursprungszellen des Merkelzellkarzinoms zu sein. Dies könnte das auffällig häufige Vorkommen von Merkelzellkarzinommanifestationen erklären, ohne dass ein Primärtumor gefunden werden kann (Zur Hausen, Rennspiess et al. 2013). Das Merkelzellkarzinom ist ein aggressiver Tumor, häufig mit nur kurzer Evolution. Äußerlich fällt es durch eine schmerzlose, knotig-derbe Raumforderung mit rötlich-livider Farbe und glänzender Oberfläche auf (siehe Abbildung 1) (Goessling, McKee et al. 2002; Nicolaidou, Mikrova et al. 2011).



Abbildung 1: Merkelzellkarzinom am Oberarme einer 97-jährigen Patientin mit 2-jähriger Evolution. Tumor 2,2 x 2,3 cm, Lymphknoten klinisch nicht befallen (Pippirs, Buhren et al. 2009).

Mikroskopisch imponiert das Merkelzellkarzinom durch ein dicht gepacktes, kleinzelliges Zellbild (Schrama, Ugurel et al. 2012). Wegweisend für die Diagnose des MCC ist der Nachweis von Zytokeratin 20 (CK20), neben der Expression weiterer typischer, aber unspezifischer neuroendokriner Markern wie NSE (Neuronen spezifische Enolase) und Chromogranin A (Abbildung 3) (Nicolaidou, Mikrova et al. 2011; Schrama, Ugurel et al. 2012).

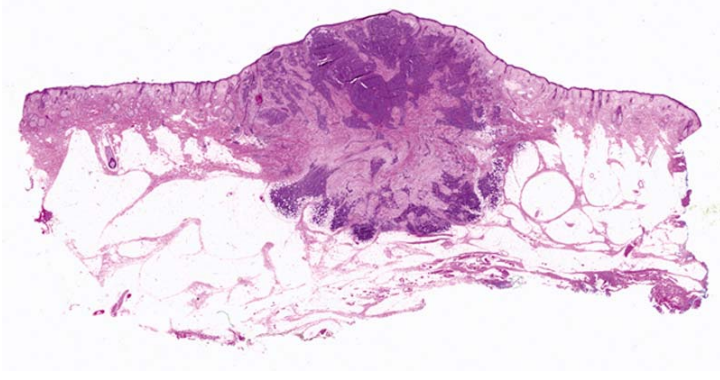


Abbildung 2: Mikroskopische Aufnahme eines Merkelzellkarzinoms mit Ausbreitung bis in die Subkutis (Pulitzer, Amin et al. 2009).

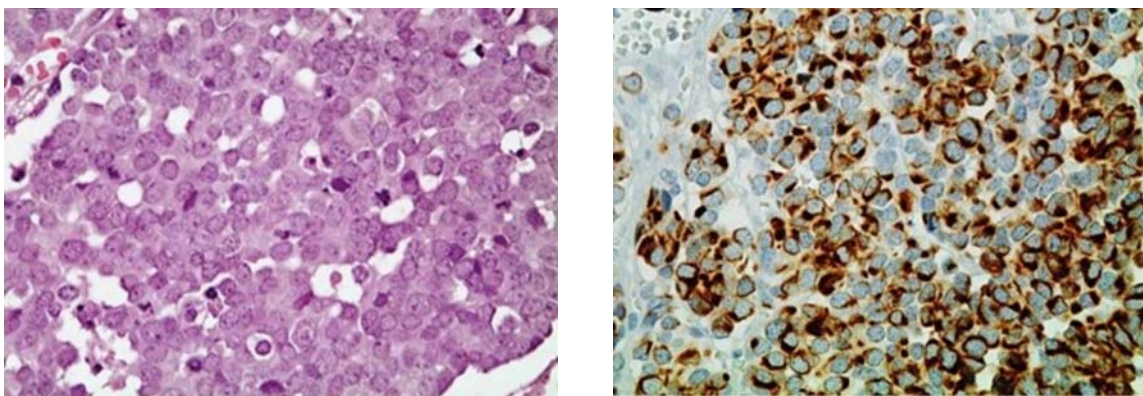


Abbildung 3: Mikroskopische Ausschnitte eines Merkelzellkarzinoms. Links: HE-Färbung, dicht gepackte Zellen mit prominenten Zellkernen und Nukleoli. Rechts: Die immunhistochemische Färbung gegen CK20 zeigt ein charakteristisches paranukleäres Reaktionsmuster. Abgewandelt aus (Scalvenzi, Palmisano et al. 2013).

Risikofaktoren für die Entstehung des Merkelzellkarzinoms sind chronische Sonnenexposition, hohes Lebensalter und Immunsuppression (Nicolaidou, Mikrova et al. 2011). Entscheidend für die Prognose der Merkelzellkarzinom-Patienten ist die frühzeitige Diagnose und Therapie der Tumorerkrankung. So haben Patienten mit einer lokal begrenzten Tumorausbreitung mit einer 86%igen 5-Jahresüberlebensrate eine wesentlich bessere Prognose als häufig angenommen. Sind bei Diagnose bereits Lymphknoten befallen, sinkt die 5-Jahresüberlebensrate auf 42% (Busam, Jungbluth et al. 2009; Santamaria-Barria, Boland et al. 2012).

Als wichtigster Bestandteil der kurativen Therapie des Merkelzellkarzinoms gilt die chirurgische Tumorexzision unter Einhaltung eines ausreichenden Sicherheitsabstandes (Schrama, Ugurel et al. 2012). Zusätzlich wird die chirurgische Entfernung des Wächter- oder Sentinellymphknotens (d.h. des ersten Lymphknotens im Lymphabflussgebiets des betroffenen Areals) empfohlen, da bei 30-40% der MCC-Patienten trotz klinisch unauffälliger Lymphknoten bereits Mikrometastasen gefunden werden können (Nicolaidou, Mikrova et al. 2011; Schrama, Ugurel et al. 2012). Auf Grund der guten Strahlensensibilität des MCC wird in allen Stadien eine Radiatio empfohlen (Foote, Harvey et al. 2010; Schrama, Ugurel et al. 2012). Der Einsatz von Chemotherapeutika wird, insbesondere auf Grund starker Nebenwirkungen und fehlendem eindeutigen Nutzen für die Patienten kritisch bewertet

(Schrama, Ugurel et al. 2012). Aktuell wird an verschiedenen zielgerichteten immunologischen Therapiemöglichkeiten gegen das Merkelzellkarzinom gearbeitet (Hughes, Hardee et al. 2014). In einer vielversprechenden Studie von Chapuis und Kollegen wurde ein 67-jähriger Patient mit einem metastasierten MCV-positiven Merkelzellkarzinom mit einem autologen Transfer von CD8-positiven T-Zellen nach ex vivo-Exposition mit MCV-Tetrameren und gleichzeitiger HLA-1-Hochregulation behandelt. In der Folge blieb der Patient über nahezu 1,5 Jahre (535 Tage vs. 200 Tage) ohne Progress der Metastasierung (Chapuis, Afanasiev et al. 2014). Ein weiteres therapeutisches Ziel könnte der PD-1-/PDL-1-Signalweg (programmed death-1/programmed death ligand1) sein. Der PD-1-Rezeptor auf Immunzellen wird vom Immunsystem, aber auch von Tumorzellen genutzt um mittels PDL-1 (programmed death ligand-1) eine Immunreaktion zu terminieren. Über die Expression von PDL-1 in der Umgebung von Tumorzellen können diese den intratumoralen Lymphozyten entkommen (Pardoll 2012; Afanasiev, Yelistratova et al. 2013). Auch ein Impfstoff gegen MCV-Tumorantigene wurde bereits im Rahmen von in vitro-Untersuchungen getestet (Gomez, He et al. 2013).

1.2 Das Merkelzellpolyomavirus

Auffällig häufig erkranken immunsupprimierte oder alte Menschen an einem Merkelzellkarzinom. Erkrankungen, die mit einer ausgeprägten Reduktion der Immunabwehr einhergehen, wie beispielsweise AIDS oder CLL (chronisch lymphatische Leukämie) führen sogar zu einem 13 – 30 fach erhöhten Risiko für die Entwicklung eines Merkelzellkarzinoms (Nicolaidou, Mikrova et al. 2011). Nach Wiederherstellung der Immunkompetenz wurden hingegen vereinzelt spontane Tumorregressionen beobachtet (Wooff, Trites et al. 2010).

Die auffallende Assoziation von Merkelzellkarzinomen und Immunschwäche legt die Vermutung einer infektiologischen Ätiologie des Merkelzellkarzinoms nahe (Feng, Taylor et al. 2007; Garneski, DeCaprio et al. 2008). Mit Hilfe der Hochdurchsatzsequenzierung und der digitalen Transkriptomsubtraktion (DTS), einer neuen Technik zur Identifikation zellfremder Gensequenzen konnten Feng und Kollegen 2008 Polyomavirus-ähnliche Sequenzen aus Merkelzellkarzinomen isolieren (Feng, Shuda et al. 2008). Die DTS vergleicht die zellulären mRNA-Transkripte mit bekannten Gensequenzen (humaner, viraler, bakterieller Herkunft) einer Genbank. Übrig bleibende unbekannte Nukleinsäuresequenzen werden durch BLASTX-Vergleiche (Basic Local Alignment Search Tool von translatierten Sequenzen) nach verwandten hochkonservierten Sequenzen, wie z.B. Proteindomänen untersucht (Feng, Taylor et al. 2007). Der Vergleich dieser unbekannt Sequenzen mit bekannten Virusgenomen führte zur Entdeckung eines neuen, humanen Polyomavirus, welches die Autoren auf Grund der später gezeigten hohen Assoziation mit dem Merkelzellkarzinom Merkelzellpolyomavirus (MCV oder MCPyV) nannten.

Polyomaviren (Py) sind kleine, nicht behüllte, doppelsträngige DNA-Viren. Sie werden sowohl in Vögeln, als auch verschiedenen Säugetierarten gefunden und können dabei zu schweren Erkrankungen, aber auch asymptomatischer Virusträgerschaft führen (Gross 1953a; Stewart, Eddy et al. 1958; Chang and Moore 2012).

Das MCV ist eines der 13 bisher bekannten humanen Polyomaviren (siehe Abbildung 4). Wenige davon sind mit Erkrankungen, ausschließlich immunsupprimierter Personen assoziiert. Das humane Polyomavirus JC-Virus ist Verursacher der seltenen, aber oft letal verlaufende progressiven multifokalen Leukenzephalopathie (PML) bei AIDS-Patienten (Padgett, Walker et al. 1971; Chang and Moore 2012). Weitere humanpathogene Polyomaviren sind das BK-Virus (Verursacher einer Nierentransplantations-assoziierten Nephropathie) und das Trichodysplasia spinulosum-assoziierte Polyomavirus (TSV) (verursacht die Hauterkrankung Trichodysplasia spinulosa) die ebenfalls bei immunsupprimierten Patienten auftreten (Gardner, Field et al. 1971; van der Meijden, Janssens et al. 2010). Zuletzt wurde das New Jersey Polyomavirus (NJPyV/ HPyV 13) in einer immunsupprimierten Patientin nach Pankreas-Transplantation mit zunehmender Muskelschwäche und Visusminderung entdeckt. Ursächlich zeigte sich eine, möglicherweise NJPyV-assoziierte entzündliche Reaktion von Gefäßen und Muskulatur (Mishra, Pereira et al. 2014).

Das MCV ist jedoch bislang das einzige Polyomavirus, das nachweislich mit der Entstehung eines Tumors im Menschen assoziiert ist (Chang and Moore 2012).

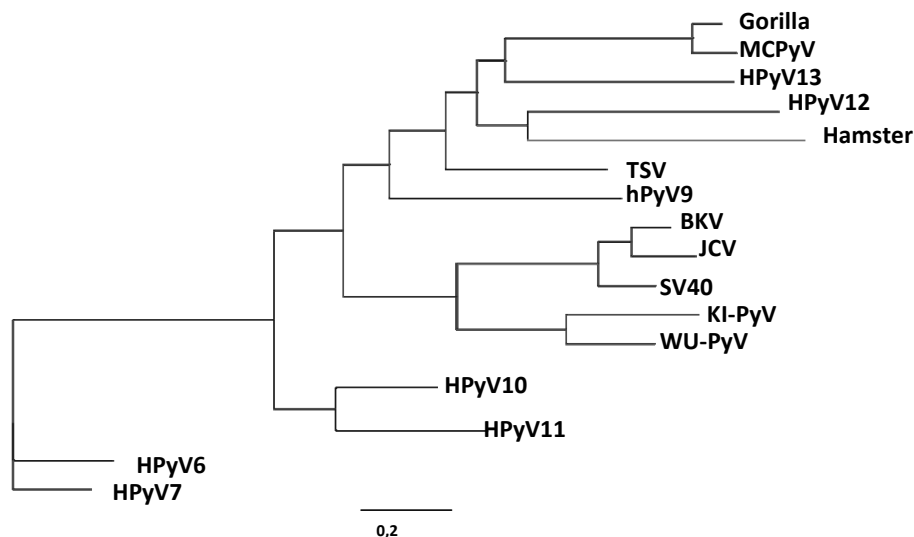


Abbildung 4: Phylogenetischer Stammbaum basierend auf der Nukleotidsequenz des LT-Antigens ausgewählter Polyomaviren. Humanen Polyomaviren: HPyV 6 (NC 014406.1), HPyV 7 (NC 014407.1), HPyV 9 (HQ 696593.1), HPyV 10 (JX 262162.1), HPyV11 (NC 020106.1), HPyV 12 (NC 020890.1) und HPyV13 (NJPyV, KF 954417), MCPyV (JN 707599.1) (MCV, Merkelzellpolyomavirus), TSV (NC 001538.1) (Trichodysplasia spinulosum-assoziiertes Polyomavirus), BK- (NC 001538.1) und JC-Viren (NC 001699.1) (nach Initialen der erstbeschriebenen Patienten mit diesen Viren), KI- (NC 009238.1) und WU-Virus (NC 009539.1) (nach Initialen der erstbeschreibenden Institute). Sowie einiger nichthumaner Polyomaviren wie SV40 (NC 001669.1) (Simian vacuolating Virus 40, Modelvirus der Polyomaviren), Gorilla Polyomavirus (NC 025380.1), Hamster Polyomavirus (NC 001663.2). GenBank Accession No. jeweils in Klammer. Abbildung zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. rer. nat. Nicole Fischer.

Das zirkuläre Genom des MCV besteht aus 5387 Basenpaaren und wird, wie für Polyomaviren charakteristisch, in 3 Bereiche unterteilt (siehe Abbildung 5):

1.) Der Bereich der frühen Transkription kodiert für die Tumorantigene Large-, Small- und 57k-Tumorantigen (LT, ST und 57kT), welche durch alternatives Splicen entstehen. Außerdem kodiert der frühe Bereich für einen kürzlich identifizierten offenen Leserahmen ALTO (Alternate frame of the LT Open reading frame), der von einem alternativen Startcodon innerhalb des LT-Transkriptes initiiert

wird (Chang and Moore 2012; Carter, Daugherty et al. 2013). Ebenfalls in der frühen Region, jedoch antisense (d.h. mit gegenläufigem Leserichtung) zu den frühen Transkripten wird eine microRNA (MCV-mi-R-M1) gebildet, welche perfekt komplementär zu den LT-Transkripten ist (Seo, Chen et al. 2009).

2.) Der Bereich der späten Transkription, die nach Beginn der Virusreplikation startet, führt zur Bildung der Strukturprotein des Viruskapsids Virusproteine 1 und 2 (VP 1 und 2). Im Gegensatz zu vielen anderen Polyomaviren besitzt das MCV wahrscheinlich kein VP 3 Protein (Schowalter and Buck 2013). Die 3. Region enthält den nicht-kodierenden regulatorischen Bereich mit dem Replikationsursprung ori (origin of replication) und Promotorbereiche, welche die frühe und späte Transkription regulieren (Feng, Shuda et al. 2008; Chang and Moore 2012).

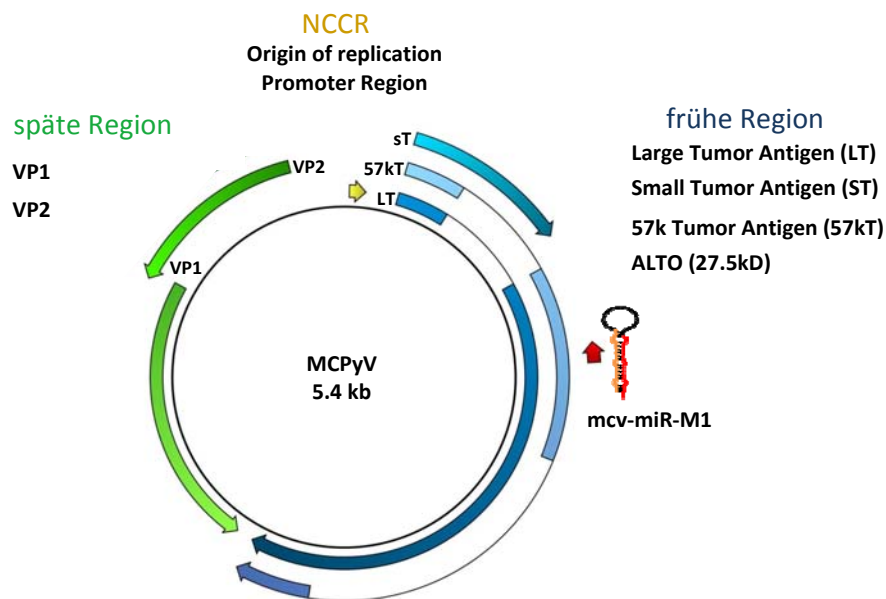


Abbildung 5: MCV-Genom mit dem Bereich der frühen Gene (blau), die für LT, ST, 57kT und ALTO kodieren und dem Bereich der späten Gene (grün), die für VP1 und VP2 kodieren. Im nicht-kodierenden regulatorischen Bereich (oben, NCCR: non coding regulatory region) befinden sich der Replikationsursprung ori und Promotoren der frühen und späten Transkription. Zusätzlich kodiert das MCV-Genom für eine microRNA (mcv-miR-M1) (Seo, Chen et al. 2009). Abbildung zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. rer. nat. Nicole Fischer.

Sowohl LT als auch ST besitzen onkogenes Potential. LT durch seine Bindungsstellen und Interaktion mit den Tumorsuppressorproteinen pRb und p53 (Spurgeon and Lambert 2012; Borchert, Czech-Sioli et al. 2013; Cheng, Rozenblatt-Rosen et al. 2013). ST durch die Bindung von PP2A (Proteinphosphatasen 2A) und seinen Einfluss auf mTOR-Signalwege (mammalian Target of Rapamycin) in zellulärem Wachstum und Differenzierung, sowie PP2A-unabhängig in der Stabilisierung von LT und anderer zellulärer Protoonkogene (Shuda, Kwun et al. 2011; Spurgeon and Lambert 2012; Kwun, Shuda et al. 2013).

Das MCV kann durchschnittlich in 80% der Merkelzellkarzinome nachgewiesen werden (Chang and Moore 2012). Eine Ausnahme stellen Merkelzellkarzinome von Patienten aus Gegenden besonders hoher Sonnenexposition, wie z.B. Australien dar. Hier tritt das Merkelzellkarzinom zwar wesentlich häufiger auf, allerdings mit einem deutlich niedrigeren Anteil MCV-positiver Merkelzellkarzinome (Garneski, Warcola et al. 2009; Schrama, Ugurel et al. 2012).

Im Vergleich zum Wildtyp-MCV unterscheidet sich das aus Merkelzellkarzinomen isolierte MCV in einigen charakteristischen Punkten. Während das Wildtyp-MCV episomal in einer infizierten Zelle vorliegt, findet man in Merkelzellkarzinomzellen das MCV-Genom in das Wirtszellgenom integriert. Außerdem besitzen Merkelzellkarzinom-MCV charakteristische Mutationen in ihrem LT-Gen, die zu einem verfrühten Stopcodon führen und damit zur Bildung eines verkürzten LT-Antigens (Feng, Shuda et al. 2008). Diese verkürzten LT-Antigene besitzen keine Helikaseaktivität, folglich kann das Virus nicht replizieren. Bedeutende transformierende Eigenschaften der MCV-Tumorantigene, wie die pRb-Bindungsstelle des LT-Antigens bleiben davon unbeeinträchtigt (Feng, Shuda et al. 2008; Shuda, Feng et al. 2008; Borchert, Czech-Sioli et al. 2013). Zellen MCV-positiver Merkelzellkarzinome tragen das virale Genom stets in das Wirtszellgenom integriert (Feng, Shuda et al. 2008). Die Integration folgt keinem wiederkehrenden Integrationsmuster oder -ort. Wohingegen alle Zellen eines Tumors und seiner Metastasen das MCV-Genom in monoklonaler Form tragen, was für die Integration des Virusgenoms vor der malignen Zellexpansion spricht (Feng, Shuda et al. 2008; Chang and Moore 2012). Die Integration eines Wildtyp-MCV würde durch simultanen Ablauf der viralen und zellulären Replikation zu DNA-Schäden und in der Folge zur Apoptose der Zelle führen. Durch die ausbleibende Replikation bleibt die Integration des mutierten MCV hingegen unentdeckt. Gleichzeitig werden so die viralen Gene an alle Tochterzellen weitergegeben (Chang and Moore 2012).

Beim MCV handelt es sich um eine nahezu ubiquitär verbreitete, in der Regel harmlose Infektion, die primär asymptomatisch verläuft. Die Übertragung findet vermutlich durch häusliche Kontakte während der Kindheit statt (Chang and Moore 2012; Martel-Jantin, Pedernana et al. 2013). Bei einem großen Teil der Bevölkerung lässt sich MCV-DNA in Hautabstrichen nachweisen (Wieland, Mauch et al. 2009; Schowalter, Pastrana et al. 2010). Man nimmt an, dass das MCV im Bereich der Haut repliziert, wobei nicht bekannt ist, welche (kutanen) Zellen das MCV zur Replikation nutzt (Pastrana, Tolstov et al. 2009; Pastrana, Wieland et al. 2012). Eine Erklärung hierfür könnte die mögliche Abhängigkeit der viralen Replikation von bestimmten Differenzierungsstadien der Wirtszelle sein, wie es für die humanen dermatotropen Onkoviren HPV (Humane Papillomaviren), Verursacher des Zervixkarzinoms, der Fall ist (Stanley 2010; Feng, Kwun et al. 2011; Spurgeon and Lambert 2012).

Während gesunde Virusträger in der Regel niedrigtitrige Antikörper gegen Kapsidbestandteile des MCV (anti-VP1-AK) besitzen, findet man bei Merkelzellkarzinom-Patienten neben erhöhten anti-VP1-Antikörpern auch Antikörper gegen MCV-Tumorproteine. Es konnte gezeigt werden, dass der Verlauf dieser viralen Tumorprotein-Antikörpertiter den Krankheitsverlauf widerspiegelt. Die Bestimmung dieser Titer könnten als sogenannte Tumormarker helfen eine Tumorphase frühzeitig zu erkennen (Paulson, Carter et al. 2010; Arora, Chang et al. 2012).

Heute sprechen eine Reihe gewichtiger Erkenntnisse für die ursächliche Rolle der MCV-Infektion in der Entstehung von Merkelzellkarzinomen. Die charakteristische Mutation des LT-Antigens und die genomische Integration des MCV-Genoms wiesen bereits initial auf eine Verbindung hin (Feng, Shuda et al. 2008; Shuda, Feng et al. 2008). Überdies lässt sich die Expression der viralen Onkoproteine LT und ST des MCV in MCV-positiven Merkelzellkarzinomen nachweisen (Busam, Jungbluth et al. 2009; Bhatia, Goedert et al. 2010; Erovic, Al Habeeb et al. 2012). Werden diese viralen Onkoproteine experimentell durch spezifische shRNAs herunterreguliert, führt dies zum Verlust der Malignität bis hin zur Apoptose der Merkelzellkarzinomzellen (Houben, Shuda et al. 2010). Nicht zuletzt der große Anteil

von MCV-positiven Merkelzellkarzinome macht einen kausalen Zusammenhang von MCV und Merkelzellkarzinomen wahrscheinlich (Becker, Houben et al. 2009; Shuda, Arora et al. 2009; Andres, Belloni et al. 2010).

Im Rahmen von in vivo-Untersuchungen konnte zuletzt in Modellen transgener Mäuse die Rolle des MCV in einer möglichen viralen Kanzerogenese differenzierter untersucht werden. Spurgeon und Kollegen wiesen durch die Expression der MCV ST- und verkürzten LT-Antigene aus Merkelzellkarzinomen in epidermalen Zellen transgener Mäuse auch in vivo ein transformierendes Potential der MCV-T-Antigene nach (Spurgeon, Cheng et al. 2015). Morphologisch wurde eine epitheliale Hypertrophie, Hyperplasie und die Entstehung von gutartigen Hauttumoren dokumentiert. Es konnte eine gesteigerte Expression von MCM7 (Mini-Chromosom Maintainance Protein 7) und eine Aktivierung von Survivin in den Epithelzellen nachgewiesen werden, welches für die Freisetzung von E2F durch T-Antigen-induzierte Inaktivierung von pRB spricht. Wenngleich im Rahmen der Expression von ST und LT keine Entstehung von Merkelzellkarzinomen oder anderer maligner Tumore beobachtet werden kann, sind sowohl die histomorphologischen als auch die molekularbiologischen Veränderungen vergleichbar mit der Wirkung einer epithelialen Expression der Onkoproteine E6 und E7 in einem transgenen Mausmodell des Humanen Papillomavirus 16 (HPV 16), dem Verursacher des Zervixkarzinoms (Spurgeon, Cheng et al. 2015).

Während zunächst, wie auch bei anderen Polyomaviren, dem MCV-LT-Antigen die Schlüsselrolle in einer Virus-induzierten malignen Zelltransformation zugeschrieben wurde (Spurgeon and Lambert 2012), konnten Verhaegen und Kollegen in einem weiteren transgenen Mausmodell zeigen, dass die isolierte Expression von MCV-ST-Antigen in epithelialen Zellen zu einer in vivo-Transformation bis zur Bildung maligner Vorstufen von Plattenepithelkarzinomen führt. Es wird angenommen, dass das MCV-ST-Antigen dabei, PP2A-unabhängig, durch Bindung von FBXW7 (F-Box/ WD repeat-containing Protein 7) den Abbau zellulärer Protoonkogene hemmt, wodurch es zu einer Entkopplung des Zellzyklus kommt. Dies lässt zum Einen annehmen, dass die Rolle von ST-Antigen für die in vivo-Transformation eine größere Rolle einnimmt als zunächst angenommen. Zum Anderen äußern die Autoren, dass MCV möglicherweise auch eine Rolle in der Kanzerogenese anderer Malignome spielen könnte (Kwun, Shuda et al. 2013; Verhaegen, Mangelberger et al. 2014). Beide Untersuchungen gehen jedoch davon aus, dass das transformierende Potential der MCV-Tumor-Antigene alleine nicht für eine maligne Entartung ausreichend ist (Verhaegen, Mangelberger et al. 2014; Spurgeon, Cheng et al. 2015).

2. Ergebnisse und Diskussion

Zahlreiche Studien zur Assoziation von MCV und Merkelzellkarzinomen, bestätigen den hohen Anteil MCV-positiver Merkelzellkarzinome und bekräftigen somit einen ursächlichen Zusammenhang von MCV und Tumorentstehung (Chang and Moore 2012). Einige Studien mit deutlich geringer Prävalenz MCV-positiver Merkelzellkarzinome stellen diese generelle Gültigkeit jedoch in Frage (Garneski, Warcola et al. 2009; Andres, Belloni et al. 2010; Ly, Walsh et al. 2012). Abweichungen entstehen unter anderem durch Anwendung uneinheitlicher Methoden und Versuchsbedingungen

(unterschiedliche PCR-Methoden unterschiedlicher Sensitivität, uneinheitliche Materialvoraussetzungen wie Frischgewebe versus Paraffin fixiertes Gewebe), weshalb die Ergebnisse der verschiedenen Untersuchungen nur eingeschränkt zu vergleichen sind. Die Anwendung alternativer Antikörper gegen das LT- und auch das ST-Antigen des MCV deuten auf eine weitaus höhere Prävalenz des MCV in Merkelzellkarzinomen hin, als bisher angenommen, und damit auf die Bedeutung in der Merkelzellkarzinom-Entstehung (Shuda, Kwun et al. 2011; Rodig, Cheng et al. 2012; DeCaprio and Garcea 2013). Für die Diagnose des Merkelzellkarzinoms wird, neben dem Nachweis unspezifischer neuroendokriner Antigene, insbesondere der immunhistochemische Nachweis von CK20 herangezogen. Einige Autoren vermuten, dass innerhalb der Diagnose „Merkelzellkarzinom“ verschiedene Tumor(sub)entitäten existieren, die sich zumindest in der An- bzw. Abwesenheit von MCV, aber möglicherweise auch durch die Expression zellulärer Proteine wie CK20 oder auch Onkoproteinen wie pRB unterscheiden (Bhatia, Goedert et al. 2010; Arora, Chang et al. 2012). In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass sich speziell MCV-positive Merkelzellkarzinome durch eine günstigere Krankheitsprognose auszeichnen (Sihto, Kukko et al. 2009; Bhatia, Goedert et al. 2010; Bhatia, Goedert et al. 2010), was allerdings in vergleichbaren Untersuchungen nicht bestätigt werden konnte (Hall, Pincus et al. 2012; Schrama, Peitsch et al. 2012). Für eine differenzierte Therapie und Prognose der Merkelzellkarzinompatienten könnte eine mögliche Existenz von Merkelzellkarzinomen unterschiedlicher Ätiologie wegweisend sein (Bhatia, Goedert et al. 2010). Die Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit war die immunhistochemische Untersuchung von Merkelzellkarzinomen aus dem norddeutschen Raum auf die Expression des MCV-LT-Antigens. Mit den in der Arbeitsgruppe vorliegenden Ergebnissen aus nested PCR und realtime PCR des LT-Gens des MCV wurde die MCV-Prävalenz im Patientenkollektiv bestimmt. Neben der epidemiologischen Auswertung wurden die verschiedenen Methoden verglichen und deren Aussagekraft evaluiert.

2.1 Etablierung der Immunhistochemie

Der erste Schritt dieser Arbeit war die Etablierung der Immunhistochemie mit dem monoklonalen Maus anti-LT-Antikörper CM2B4, um diese anschließend auf den Merkelzellkarzinomschnitten anzuwenden. Um seltenes MCV-LT-positives Patientenmaterial zu sparen, wurde ein zellkulturbasiertes LT-positives, histologisches Präparat erzeugt, an dem die Färbebedingungen und das Färbeergebnis getestet und optimiert werden konnten. Dafür wurde das verkürzte MCV-LT-Antigen einer MCV-positiven Merkelzellkarzinomzelllinie (MCCL11 (Fischer, Brandner et al. 2010)) in 293 Zellen überexprimiert und die erfolgreiche Transfektion und Expression des LT-Gens mittels Western-Blot überprüft (siehe Abbildung 6). Die 293 Zellen wurden dann mit Paraformaldehyd (PFA) fixiert und zunächst in Agarose eingebettet. Für die Schaffung vergleichbarer Bedingungen mit den Tumorpräparaten wurde das Agarose-Zellpellet in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet (siehe Abbildung 7). Die Schnitte des Zellpräparats wurden nach der Etablierung auch als Positivkontrolle in der Immunhistochemie eingesetzt. Abbildung 7 zeigt exemplarisch das Ergebnis der Immunhistochemie mit CM2B4 an einem LT-positiven Zellpräparat.

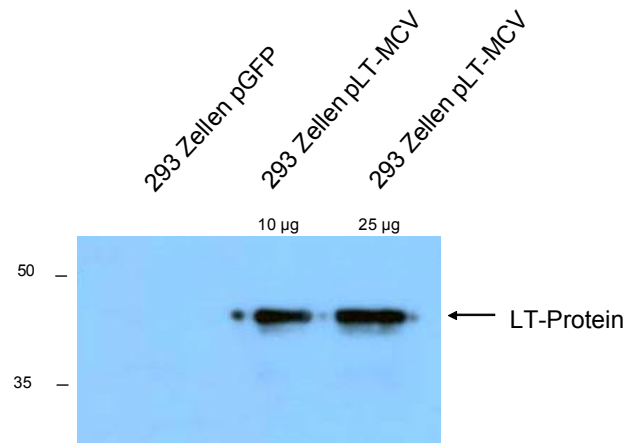


Abbildung 6: Nachweis der LT-Expression in 293 Zellen 48 Stunden nach Transfektion mit einem LT-Expressionskonstrukt, welches für das verkürzte, aus Tumoren stammende LT-Antigen kodiert. Unterschiedliche Mengen an Gesamtprotein 10 µg oder 25 µg wurden pro Geltasche aufgetragen. Das LT-Antigen wurde mit dem mAb CM2B4, welcher spezifisch MCV-LT erkennt nachgewiesen. Daneben als Negativkontrolle 293 Zellen nach Transfektion mit einem GFP-Expressionskonstrukt.

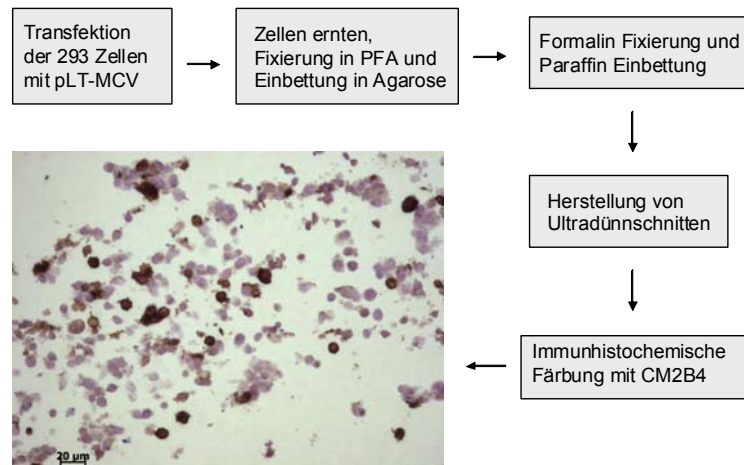


Abbildung 7: Etablierung der immunhistochemischen Färbung des monoklonalen anti-LT-Antikörpers CM2B4 über die Herstellung eines zellkultur-basierten histologischen LT-positiven Präparats. 1) Transfektion der 293 Zellen mit einem Plasmid pLT-MCV, welches die verkürzte LT-Antigen-Sequenz von MCV trägt. 2) Ernten der Zellen, Fixierung in 5% Paraformaldehyd (PFA) und Einbettung in Agarose. 3) Formalin-Fixierung und Einbettung des Agarose-Zellpellet in Paraffin. 4) Herstellung von Ultradünnschnitten am Mikrotom. 5) Immunhistochemische Färbung mit mAb CM2B4. 6) Die Expression von LT führt zur Bindung von CM2B4 und zur immunchemischen Färbereaktion mittels Diaminobenzidin (DAB). Das Färberegebnis zeigt neben LT-positiven Zellen (braun) auch LT-negative Zellen im Präparat.

2.2 Patientendaten

Patient		Präparat #	Tumormaterial	Lokalisation	MCV-DNA PCR		IHC MCV-LT	% LT pos. Zellen	IHC CK20
Alter	Sex				qualitativ	quantitativ			
83	W	1	Primarius	u.	-	-	-	-	(+)
87	M	2	Primarius	Wange	+	4,8	-	-	+
		3	Metastase	u.	+	152	++	55,4	-
88	W	4	u.	Wange	+	3,7	+++	44,9	+
69	W	5	Primarius	Stirn	-	0,85	+	61,2	+
66	M	6	Primarius	Ellbogen	+	0,14	++	35,3	+
94	W	7	u.	Wange	+	0,75	++	33,1	+
65	W	8	Primarius	u.	-	-	-	-	+
55	M	9	Primarius	Knie	-	-	-	-	-
70	W	10	Primarius	Oberschenkel	+	0,04	++	n.u.	+
73	W	11	Primarius	Oberarm	+	0,04	+	40,2	+
69	W	12	Primarius	Unterschenkel	+	0,08	+	n.u.	+
		13	Lymphknoten	Leiste	+	n.u.	+	n.u.	+
68	M	14	Primarius	Rücken	-	-	-	-	+
		15	Lymphknoten	Flanke	-	-	-	-	+
79	W	16	Primarius	Oberschenkel	+	0,03	n.u.	n.u.	+
79	W	17	Primarius	Unterschenkel	+	0,06	+	30,4	+
81	M	18	Metastase	Wange	-	-	-	-	+
77	M	19	Primarius	Oberarm	+	0,4	-	-	+
81	M	20	Primarius	Unterarm	+	0,09	-	-	+
78	M	21	Metastase	Thorax	-	-	-	-	(+)
69	W	22	Primarius	u.	+	-	-	-	+
75	M	23	Metastase	u.	+	0,15	+	7,7	(+)
82	M	24	Primarius	u.	+	0,24	++	39,2	+
		25	Lymphknoten	u.	+	n.u.	+	48,9	+
		26	Lymphknoten	u.	+	n.u.	+	29,2	+
90	M	27	Primarius	Ohr	-	-	-	-	+
70	M	28	Metastase	Leiste	-	-	-	-	+
85	M	29	Metastase	u.	+	0,55	++	53,9	+
80	M	30	Metastase	u.	-	-	-	n.u.	+
87	W	31	Metastase	u.	-	-	-	n.u.	+
40	W	32	Metastase	u.	+	1,2	++	40,5	+

Tabelle 1: Ergebnisse der PCR und immunhistochemischen Untersuchungen der Merkelzelltumor-Präparate von 27 Merkelzellkarzinom-Patienten aus dem norddeutschen Raum. m männlich, w weiblich, u. unbekannt, n.u. nicht untersucht. + positiv, (+) teilweise positiv, - negativ. Eingerahmt sind die jeweils von einem Patienten stammenden Tumorpräparate. Siehe auch Tabelle in (Leitz, Stieler et al. 2013).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 32 Präparate von 27 Merkelzellkarzinom-Patienten aus dem norddeutschen Raum auf das Vorliegen von MCV-DNA und die Expression des LT-Antigens untersucht (siehe Tabelle 1) (Leitz, Stieler et al. 2013). Von 4 Patienten lag, neben dem Primärtumor, zusätzliches Tumormaterial in Form von (Lymphknoten-) Metastasen vor (in Tabelle 1 eingerahmt).

Das Patientenkollektiv weist charakteristische Merkmale der Merkelzellkarzinom-Erkrankung auf; darunter ein hohes mittleres Erkrankungsalter von 75,5 Jahren, neben vereinzelt auch jüngeren Merkelzellkarzinompatienten (2 Patienten <60 Jahren, 7%). Die Geschlechterverteilung zeigt wie in der Literatur beschrieben eine leicht erhöhte Prävalenz des männlichen Geschlechts (Kwun, Shuda et al. 2013). Eine deutliche Lokisationshäufung sonnenexponierter Arealen kann in dieser relativ kleinen MCC-Kohorte, im Gegensatz zur allgemeinen Merkelzellkarzinom-Charakteristika jedoch nicht gefunden werden (Chang and Moore 2012).

2.3 Prävalenz

Das Ziel dieser Arbeit war die Ermittlung der MCV-Prävalenz in Merkelzellkarzinomen und der Vergleich der unterschiedlichen Untersuchungsmethoden (PCR und IHC). Angewandt wurden qualitative bzw. quantitative PCR-Techniken zum Nachweis von LT-Gensequenzen nach einem etablierten Protokoll (quantitative nested PCR mit 2 Primerpaaren im LT-Gen von MCV; Nukleotid 571-879 bzw. 1711-1889) (Feng, Shuda et al. 2008; Leitz, Stieler et al. 2013). Außerdem erfolgte der Nachweis einer LT-Expression über die immunhistochemische Färbung mit dem monoklonalen anti-LT-Antikörper CM2B4. Die Ergebnisse von quantitativer und qualitativer PCR stimmten mit 59,4 % bzw. 55,2 % MCV-positiver Tumorpräparate relativ gut überein. Immunhistochemisch wiesen dagegen nur 41,9 % der MCC-Präparate eine LT-Expression auf. Dabei waren in der Mehrzahl der Tumoren weniger als 50% der Tumorzellen LT-positiv. Kein Tumor enthielt ausschließlich LT-positive Tumorzellen.

Vergleichbare PCR-Untersuchungen zum Nachweis von MCV-DNA in Merkelzellkarzinomen zeigten eine weite Spanne von 40 bis 100 % MCV-positiver Merkelzellkarzinome (Feng, Shuda et al. 2008; Kassem, Schopflin et al. 2008; Becker, Houben et al. 2009; Duncavage, Zehnauer et al. 2009; Garneski, Warcola et al. 2009; Loyo, Guerrero-Preston et al. 2009; Sastre-Garau, Peter et al. 2009; Shuda, Arora et al. 2009; Sihto, Kukko et al. 2009; Touze, Gaitan et al. 2009; Varga, Kiss et al. 2009; Wetzels, Hoefnagel et al. 2009; Bhatia, Goedert et al. 2010; Houben, Schrama et al. 2010; Andres, Belloni et al. 2011). Die verschiedenen Studien weisen allerdings deutliche Unterschiede in methodischen Bedingungen auf, wodurch die Vergleichbarkeit der verschiedenen Ergebnisse nur bedingt sinnvoll ist. Problematisch ist beim PCR-Nachweis des MCVs, neben der Untersuchung von FFPE-Gewebe (Formalin-fixiert und Parafin-eingebettet, wie in der vorliegenden Arbeit), insbesondere die Anwendung von singulären bzw. wenigen Primersets. Sodass Mutationen im Bereich der Primer-Bindungsstelle leicht zu falsch negativen Ergebnissen führen können (Shuda, Feng et al. 2008; Rodig, Cheng et al. 2012). Rodig und Kollegen konnten dieses Risiko durch die simultane Anwendung von

fünf verschiedenen Primersets reduzieren und somit die Sensitivität des MCV-Nachweises durch PCR erhöhen (Rodig, Cheng et al. 2012).

Andere immunhistochemische Untersuchungen von Merkelzellkarzinomen mit CM2B4 fanden durchweg einen größeren Anteil LT-positiver Tumoren mit 63-97% im Vergleich zu 41,9 % LT-exprimierender MCC in der vorliegenden Untersuchung. Eine deutlich geringere Prävalenz (von 18,1% LT-positiver Merkelzellkarzinome) ergab lediglich eine australische Studie, welche durch einen lokal stärkeren Einfluss der UV-Exposition auf die Merkelzellkarzinom-Entstehung erklärt wird (Busam, Jungbluth et al. 2009; Paik, Hall et al. 2011; Shuda, Kwun et al. 2011; Erovic, Al Habeeb et al. 2012; Ly, Walsh et al. 2012). Die Heterogenität in der Zusammensetzung der Tumore aus LT-positiven und LT-negativen Zellen ist ein bekanntes Charakteristikum von Merkelzellkarzinomen und auch anderer Virus-induzierter Tumore (Martin and Gutkind 2008; Busam, Jungbluth et al. 2009; Bhatia, Goedert et al. 2010; Erovic, Al Habeeb et al. 2012).

Mögliche Ursachen für den geringen Anteil LT-positiver Merkelzellkarzinome in der vorliegenden Studienpopulation können, neben einer möglichen Ungenauigkeit auf Grund des kleinen Patientenkollektivs, in einer fehlende Sensitivität des LT-Antikörpers CM2B4 liegen (Rodig, Cheng et al. 2012). Untersuchungen mit einem neuen, bislang nicht-kommerziellen, monoklonalen anti-LT-Antikörper Ab3 lieferten einen weitaus höheren Anteil LT-positiver Merkelzellkarzinome als bislang berichtet. Ab3 besitzt eine höhere Sensitivität für die Erkennung des MCV-LT-Antigens als CM2B4, daneben wird auch eine höhere Spezifität von Ab3 beschrieben (Rodig, Cheng et al. 2012).

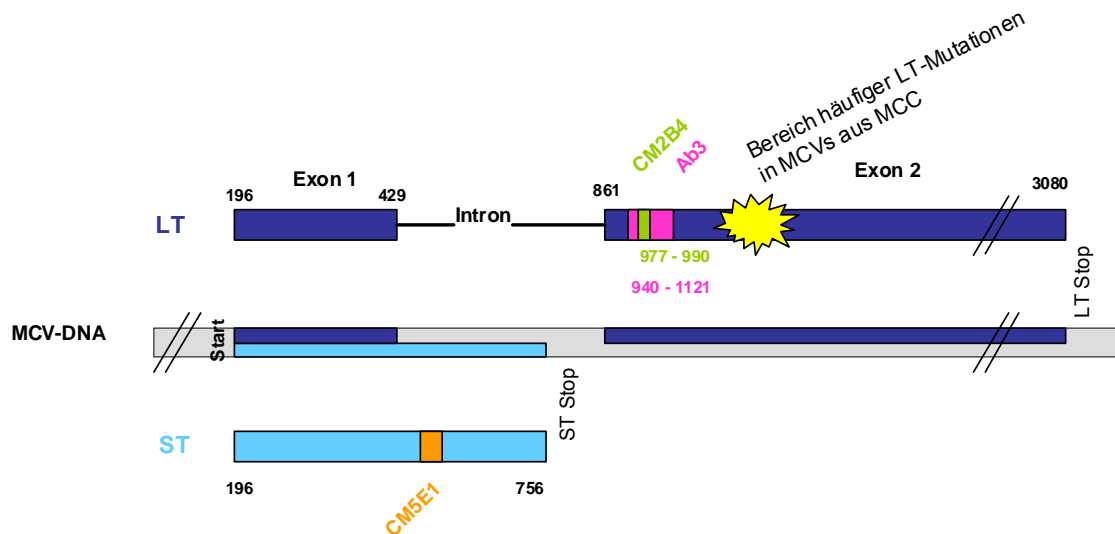


Abbildung 8: Epitope der monoklonalen Antikörper CM2B4 (grün), Ab3 (pink) und CM5E1 (orange) gegen Bestandteile von LT (dunkelblau) bzw. ST (hellblau) von MCV. Die Antikörper CM2B4 und Ab3 gegen das LT-Ag binden in einem ähnlichen N-terminalen Bereich des 2. Exons von LT. Der Antikörper CM5E1 gegen das ST-Ag bindet in einem Bereich, der von LT ein Intron darstellt. Die numerische Orientierung entspricht der Nummer der Nukleotide im MCV-Genom. Abbildung erstellt nach (Feng, Shuda et al. 2008; Shuda, Kwun et al. 2011; Rodig, Cheng et al. 2012).

Neben dem Nachweis der LT-Expression in Merkelzellkarzinomen könnte auch die Expression des ST-Antigens mit Hilfe des, ebenfalls nicht kommerziell erhältlichen, anti-ST-Antikörpers CM5E1 genutzt werden um eine verlässlichere Aussagekraft von Virusproteinexpression und MCV-Prävalenz in Merkelzellkarzinomen zu erhalten. Im direkten Vergleich von immunhistochemischen Färbungen mit CM2B4 und CM5E1 waren mehr Merkelzellkarzinome ST-positiv als für LT, wenn auch mit geringerer

Intensität (Shuda, Kwun et al. 2011). Zuverlässige Kenntnisse über den tatsächlichen Anteil MCV-positiver Merkelzellkarzinome sind für das Verständnis zum Einfluss des MCV in der Kanzerogenese des Merkelzellkarzinoms bedeutend.

2.4 Fallanalysen

Von 4 Patienten lagen neben dem primären Merkelzellkarzinom auch entfernte Metastasen bzw. Lymphknoten vor. In der Untersuchung des Tumormaterials zweier Patienten finden sich konstante Ergebnisse bezüglich MCV-DNA und LT-Ag Expressions-Nachweis in Tumor und Metastase. Präparat #12 bzw. 13 entsprechen dem primären Merkelzellkarzinom und einer Lymphknotenmetastase einer 69-jährigen Patientin. Primärtumor und Lymphknotenmetastase sind in der PCR positiv für MCV-DNA. Beide zeigen LT- bzw. CK20-Expression. Der zweite Fall ist das Merkelzellkarzinom und die Lymphknotenmetastase eines 68-jährigen männlichen Patienten (Präparat #14 bzw. 15). Beide Präparate sind negativ für MCV in der PCR und zeigen keine LT-Expression in der Immunhistochemie, sind jedoch beide für CK20 positiv. In diesen Fällen sind sowohl CK20- bzw. LT-Expressionsmuster, als auch Virusnachweis in Tumor und dessen Metastasen erwartungsgemäß identisch. Die Tumorpräparate zweier weiterer Patienten (A: Präparate #2 und 3 eines 87-jährigen männlichen Patienten sowie B: Präparate #24, 25 und 26 eines 82-jährigen männlichen Patienten) zeigen hingegen unerwartet inkonstante Untersuchungsergebnisse und werden auf Grund dieser besonderen Konstellationen hier detaillierter besprochen.

2.4.1 Variierendes Antigenprofil von Merkelzellkarzinom und Metastase

	Primarius	Metastase
Qualitative PCR	+	+
Quantitative PCR	+	+
Viruskopien/ Zelle	4,8	152
IHC LT-Ag Expression	-	+
Anteil LT-Ag positiver Zellen	-	55,4%
IHC CK20 Expression	+	-

Tabelle 2: PCR und immunhistochemische Untersuchungsergebnisse von Merkelzellkarzinom (Präparat #2) und Metastase (Präparat #3) eines 87-jährigen Mannes. Die Metastase wurde an der Wange entfernt, die Lokalisation des Primarius ist nicht bekannt.

Präparat #2 und 3 stammen von einem 87-jährigen männlichen Patienten und entsprechen dem Merkelzellkarzinom und einer Metastase der Wange. Primarius und Metastase sind positive für MCV-Sequenzen in der PCR-Analyse, unterscheiden sich aber deutlich in der Höhe der Viruslast von 4,8 Kopien/ Zelle im Primärtumor und 152 Kopien/Zelle in der Metastase.

Während die Immunhistochemie mit dem monoklonalen anti-LT-Antikörper CM2B4 in der Metastase eine LT-Expression nachweisen konnte (mit 55,4 % LT-positiven Tumorzellen), war der Primärtumor LT-negativ.

Eine mögliche Erklärung für ein abweichendes Antigenprofil von Tumor und Metastasen kann im heterogenen Zellbild der Merkelzellkarzinome mit sowohl LT-positiven und LT-negativen Zellen liegen (Busam, Jungbluth et al. 2009; Erovic, Al Habeeb et al. 2012). Vorstellbar ist eine isolierte metastatische Expansion eines positiven bzw. negativen Zellklons mit einem konsekutiv identischen oder abweichenden Expressionsmusters der Tumorabsiedelung. Allerdings wäre der umgekehrte Fall mit einem (teilweise) LT-positiven Primärtumor und einer davon abweichenden positiveren oder negativeren Metastase wahrscheinlicher.

Auf Grund des positiven PCR-Nachweises von MCV-Sequenzen wäre ein zweites Erklärungsmodell, die Veränderung der Proteinexpression durch Silencen/ Abschalten eines vorhandenen viralen Gens auf Grund erworbener Unabhängigkeit vom viralen onkogenen Stimulus. Auch für diese Hypothese wäre aber der umgekehrte Fall mit einem LT-exprimierenden Primärtumor und der Expansion eines von LT-unabhängig gewordenen Zellklons wahrscheinlicher.

Eine dritte Hypothese wird durch die ebenfalls inkonstante CK20-Expression der beiden Präparate gestützt. Während der Primärtumor LT-negativ und CK20-positiv ist, zeigt die Metastase eine Expression von LT, nicht aber von CK20. Ein Verlust der Merkelzellkarzinom-charakteristischen CK20-Expression im Verlauf der Tumorprogression und Metastasierung lässt einen nicht-monoklonalen Ursprung der Tumorpräparate #2 und #3 vermuten. Eine vergleichbare Konstellation einer multiklonalen Entstehung multizentrischer Tumorabsiedelungen in einem Patienten ist für das HHV-8 (Humanes Herpesvirus 8) induzierte Kaposisarkom bei immunsupprimierten HIV-Patienten beschrieben (Duprez, Lacoste et al. 2007). Auch für das Merkelzellkarzinom wurde ein derartiger Fall von Schrama und Kollegen dokumentiert (Schrama, Thiemann et al. 2010). Die simultane aber unabhängige Entstehung von mehr als einem Merkelzellkarzinom in einem Patienten ist zwar unwahrscheinlich aber unter chronischer Immunsuppression denkbar.

Zur Untersuchung der Klonalität der beiden Tumormanifestationen kann eine genetische Sequenzierung beider Präparate hilfreich sein. Handelt es sich um zwei unabhängige Merkelzellkarzinomentitäten können diese somit differenziert werden.

2.4.2 LT-Expression in Merkelzellkarzinom und Lymphknoten

	Primarius	Lymphknoten 1	Lymphknoten 2
PCR MCV-DNA	+	+	+
IHC LT-Ag Expression	+	+	+
Anteil LT-Ag positiver Zellen	39,2%	48,9%	29,2%
IHC CK20 Expression	+	+	+

Tabelle 3: Untersuchung eines Merkelzellkarzinoms (Präparat #24) und 2 entfernter Lymphknoten (Präparate #25 und 26) eines 82-jährigen männlichen Patienten auf MCV-DNA und die Expression von MCV-LT-Ag und CK20.

Die Präparate #24, #25 und #26 stammen von einem 82-jährigen männlichen Patienten. Präparat #24 entspricht dem primären Merkelzellkarzinom, #25 und #26 entsprechen entfernten Lymphknoten. Alle 3 Präparate sind MCV-positiv in der qualitativen PCR. Quantitative PCR-Daten liegen nur für den Primarius vor und messen 0,24 Viruskopien/ Zelle. Die Anzahl der LT-exprimierenden Zellen in den 3 Präparaten unterscheiden sich mit 39,2% LT-positiver Tumorzellen im Primarius und 48,9 bzw. 29,2% positiver Tumorzellen in den beiden Lymphknoten. Erklärungsmodelle sind zum Einen eine unspezifische Färbung von Lymphozyten durch den Antikörper CM2B4, die auf Grund der Ähnlichkeiten des mikroskopischen Zellbildes von Merkelzellkarzinomzellen und Lymphozyten (beide klein, rund und blau) nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann (Rodig, Cheng et al. 2012). Zum Anderen ist die Migration von Tumorzellklone mit divergierender LT-Expression in die Lymphknoten vorstellbar, sodass dort eine abweichende Zusammensetzung der Tumorzellmasse zum Primarius gefunden werden kann. Alternativ kann auch hier die Hypothese des sekundären Abschaltens der Transkription früher viraler Gene durch epigenetische Mechanismen diskutiert werden (DeCaprio and Garcea 2013). Insgesamt sollte die Analyse der LT-positiven Tumorzellanteile wiederholt und die Ergebnisse validiert werden. Eine eventuelle unspezifische Färbung kann aber auch hierdurch nicht ausgeschlossen werden. Eine erneute immunhistochemische Untersuchung mit sensitiveren bzw. spezifischeren monoklonalen Antikörpern gegen MCV-Tumorprotein wie den anti-ST-AK CM5E1 und anti-LT-AK Ab3 wäre eine gute Möglichkeit diese Ergebnisse zu überprüfen (Shuda, Kwun et al. 2011; Rodig, Cheng et al. 2012). Jedoch sind beide Antikörper bislang nicht kommerziell erhältlich.

3. Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression des LT-Antigens mit dem qualitativen bzw. quantitativen MCV-DNA-Nachweis in Merkelzellkarzinomen verglichen. Während es sich bei den 27 Merkelzellkarzinompatienten um ein weitgehend charakteristisches Patientenkollektiv handelte, zeigten sich mehrere Besonderheiten:

- 1.) Abweichung der MCV-Prävalenz in PCR und Immunhistochemie
- 2.) Vergleichsweise geringer Anteil an MCV-positiven Merkelzellkarzinome für die geografische Lage des norddeutschen Raumes
- 3.) Nur in einer Minderheit der Tumorzellen aus MCV-positiven Merkelzellkarzinomen kommt es zu einer LT-Expression
- 4.) Inkonstante Expression von LT in Tumor und Metastasen bzw. Lymphknoten.

Mögliche Erklärungen können in der mutmaßlich mangelnden Sensitivität der herkömmlichen MCV-PCR und der CM2B4-IHC gefunden werden (Rodig, Cheng et al. 2012). Eine Hypothese die durch Anwendung neuer sensitiverer und spezifischerer Methoden, wie PCR mit multiplen Primersets und IHC mit LT-AK Ab3 oder dem ST-AK CM5E1 validiert werden kann.

Die Untersuchung von Merkelzellkarzinomen und deren Metastasen bezüglich der Evolution der viralen Genexpression im Laufe der Krankheitsprogression stellt ein interessantes Objekt zukünftiger Untersuchungen dar.

4. Referenzen

- Afanasiev, O. K., L. Yelistratova, et al. (2013). "Merkel polyomavirus-specific T cells fluctuate with merkel cell carcinoma burden and express therapeutically targetable PD-1 and Tim-3 exhaustion markers." *Clin Cancer Res* 19(19): 5351-60.
- Agelli, M., L. X. Clegg, et al. (2010). "The etiology and epidemiology of merkel cell carcinoma." *Curr Probl Cancer* 34(1): 14-37.
- Albores-Saavedra, J., K. Batich, et al. (2009). "Merkel cell carcinoma demographics, morphology, and survival based on 3870 cases: a population based study." *J Cutan Pathol* 37(1): 20-7.
- Andres, C., B. Belloni, et al. (2011). "Immunohistochemical features of Merkel cell carcinoma in correlation with presence of Merkel cell polyomavirus DNA." *Acta Derm Venereol* 91(6): 722-3.
- Andres, C., B. Belloni, et al. (2010). "Prevalence of MCPyV in Merkel cell carcinoma and non-MCC tumors." *J Cutan Pathol* 37(1): 28-34.
- Arora, R., Y. Chang, et al. (2012). "MCV and Merkel cell carcinoma: a molecular success story." *Curr Opin Virol* 2(4): 489-98.
- Becker, J. C., R. Houben, et al. (2009). "MC polyomavirus is frequently present in Merkel cell carcinoma of European patients." *J Invest Dermatol* 129(1): 248-50.
- Bhatia, K., J. J. Goedert, et al. (2010). "Immunological detection of viral large T antigen identifies a subset of Merkel cell carcinoma tumors with higher viral abundance and better clinical outcome." *Int J Cancer* 127(6): 1493-6.
- Bhatia, K., J. J. Goedert, et al. (2010). "Merkel cell carcinoma subgroups by Merkel cell polyomavirus DNA relative abundance and oncogene expression." *Int J Cancer* 126(9): 2240-6.
- Borchert, S., M. Czech-Sioli, et al. (2013). "High-affinity Rb-binding, p53 inhibition, subcellular localization and transformation by wild type or tumor-derived shortened Merkel Cell Polyomavirus Large T-antigens." *J Virol*.
- Busam, K. J., A. A. Jungbluth, et al. (2009). "Merkel cell polyomavirus expression in merkel cell carcinomas and its absence in combined tumors and pulmonary neuroendocrine carcinomas." *Am J Surg Pathol* 33(9): 1378-85.
- Carter, J. J., M. D. Daugherty, et al. (2013). "Identification of an overprinting gene in Merkel cell polyomavirus provides evolutionary insight into the birth of viral genes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(31): 12744-9.
- Chang, Y. and P. S. Moore (2012). "Merkel cell carcinoma: a virus-induced human cancer." *Annu Rev Pathol* 7: 123-44.
- Chapuis, A. G., O. K. Afanasiev, et al. (2014). "Regression of metastatic Merkel cell carcinoma following transfer of polyomavirus-specific T cells and therapies capable of re-inducing HLA class-I." *Cancer Immunol Res* 2(1): 27-36.
- Cheng, J., O. Rozenblatt-Rosen, et al. (2013). "Merkel cell polyomavirus large T antigen has growth-promoting and inhibitory activities." *J Virol* 87(11): 6118-26.
- DeCaprio, J. A. and R. L. Garcea (2013). "A cornucopia of human polyomaviruses." *Nat Rev Microbiol* 11(4): 264-76.
- Duncavage, E. J., B. A. Zehnbaue, et al. (2009). "Prevalence of Merkel cell polyomavirus in Merkel cell carcinoma." *Mod Pathol* 22(4): 516-21.
- Duprez, R., V. Lacoste, et al. (2007). "Evidence for a multiclonal origin of multicentric advanced lesions of Kaposi sarcoma." *J Natl Cancer Inst* 99(14): 1086-94.
- Erovic, B. M., A. Al Habeeb, et al. (2012). "Significant overexpression of the Merkel cell polyomavirus (MCPyV) large T antigen in Merkel cell carcinoma." *Head Neck* 35(2): 184-9.
- Feng, H., H. J. Kwun, et al. (2011). "Cellular and viral factors regulating Merkel cell polyomavirus replication." *PLoS One* 6(7): e22468.
- Feng, H., M. Shuda, et al. (2008). "Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma." *Science* 319(5866): 1096-100.
- Feng, H., J. L. Taylor, et al. (2007). "Human transcriptome subtraction by using short sequence tags to search for tumor viruses in conjunctival carcinoma." *J Virol* 81(20): 11332-40.
- Fischer, N., J. Brandner, et al. (2010). "Detection of Merkel cell polyomavirus (MCPyV) in Merkel cell carcinoma cell lines: cell morphology and growth phenotype do not reflect presence of the virus." *Int J Cancer* 126(9): 2133-42.
- Foote, M., J. Harvey, et al. (2010). "Effect of radiotherapy dose and volume on relapse in Merkel cell cancer of the skin." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 77(3): 677-84.
- Gardner, S. D., A. M. Field, et al. (1971). "New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation." *Lancet* 1(7712): 1253-7.

- Garneski, K. M., J. A. DeCaprio, et al. (2008). "Does a new polyomavirus contribute to Merkel cell carcinoma?" *Genome Biol* 9(6): 228.
- Garneski, K. M., A. H. Warcola, et al. (2009). "Merkel cell polyomavirus is more frequently present in North American than Australian Merkel cell carcinoma tumors." *J Invest Dermatol* 129(1): 246-8.
- Goessling, W., P. H. McKee, et al. (2002). "Merkel cell carcinoma." *J Clin Oncol* 20(2): 588-98.
- Gomez, B., L. He, et al. (2013). "Creation of a Merkel cell polyomavirus small T antigen-expressing murine tumor model and a DNA vaccine targeting small T antigen." *Cell Biosci* 3(1): 29.
- Gross, L. (1953a). "A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice." *Proc Soc Exp Biol Med* 83(2): 414-21.
- Hall, B. J., L. B. Pincus, et al. (2012). "Immunohistochemical prognostication of Merkel cell carcinoma: p63 expression but not polyomavirus status correlates with outcome." *J Cutan Pathol* 39(10): 911-7.
- Hasan, S., L. Liu, et al. (2013). "The role of postoperative radiation and chemoradiation in merkel cell carcinoma: a systematic review of the literature." *Front Oncol* 3: 276.
- Houben, R., D. Schrama, et al. (2010). "Comparable expression and phosphorylation of the retinoblastoma protein in Merkel cell polyoma virus-positive and negative Merkel cell carcinoma." *Int J Cancer* 126(3): 796-8.
- Houben, R., M. Shuda, et al. (2010). "Merkel cell polyomavirus-infected Merkel cell carcinoma cells require expression of viral T antigens." *J Virol* 84(14): 7064-72.
- Hughes, M. P., M. E. Hardee, et al. (2014). "Merkel Cell Carcinoma: Epidemiology, Target, and Therapy." *Curr Dermatol Rep* 3: 46-53.
- Kassem, A., A. Schopflin, et al. (2008). "Frequent detection of Merkel cell polyomavirus in human Merkel cell carcinomas and identification of a unique deletion in the VP1 gene." *Cancer Res* 68(13): 5009-13.
- Kwun, H. J., M. Shuda, et al. (2013). "Merkel cell polyomavirus small T antigen controls viral replication and oncoprotein expression by targeting the cellular ubiquitin ligase SCFFbw7." *Cell Host Microbe* 14(2): 125-35.
- Leitz, M., K. Stieler, et al. (2013). "Merkel Cell Polyomavirus detection in Merkel cell cancer tumors in Northern Germany using PCR and protein expression." *J Med Virol* in press.
- Loyo, M., R. Guerrero-Preston, et al. (2009). "Quantitative detection of Merkel cell virus in human tissues and possible mode of transmission." *Int J Cancer* 126(12): 2991-6.
- Ly, T. Y., N. M. Walsh, et al. (2012). "The spectrum of Merkel cell polyomavirus expression in Merkel cell carcinoma, in a variety of cutaneous neoplasms, and in neuroendocrine carcinomas from different anatomical sites." *Hum Pathol* 43(4): 557-66.
- Martel-Jantin, C., V. Pedergrana, et al. (2013). "Merkel cell polyomavirus infection occurs during early childhood and is transmitted between siblings." *J Clin Virol*.
- Martin, D. and J. S. Gutkind (2008). "Human tumor-associated viruses and new insights into the molecular mechanisms of cancer." *Oncogene* 27 Suppl 2: S31-42.
- Mishra, N., M. Pereira, et al. (2014). "Identification of a novel polyomavirus in a pancreatic transplant recipient with retinal blindness and vasculitic myopathy." *J Infect Dis* 210(10): 1595-9.
- Moll, I., M. Roessler, et al. (2005). "Human Merkel cells--aspects of cell biology, distribution and functions." *Eur J Cell Biol* 84(2-3): 259-71.
- Nicolaidou, E., A. Mikrova, et al. (2011). "Advances in Merkel cell carcinoma pathogenesis and management: a recently discovered virus, a new international consensus staging system and new diagnostic codes." *Br J Dermatol* 166(1): 16-21.
- Padgett, B. L., D. L. Walker, et al. (1971). "Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy." *Lancet* 1(7712): 1257-60.
- Paik, J. Y., G. Hall, et al. (2011). "Immunohistochemistry for Merkel cell polyomavirus is highly specific but not sensitive for the diagnosis of Merkel cell carcinoma in the Australian population." *Hum Pathol* 42(10): 1385-90.
- Pardoll, D. M. (2012). "The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy." *Nat Rev Cancer* 12(4): 252-64.
- Pastrana, D. V., Y. L. Tolstov, et al. (2009). "Quantitation of human seroresponsiveness to Merkel cell polyomavirus." *PLoS Pathog* 5(9): e1000578.
- Pastrana, D. V., U. Wieland, et al. (2012). "Positive correlation between Merkel cell polyomavirus viral load and capsid-specific antibody titer." *Med Microbiol Immunol* 201(1): 17-23.
- Paulson, K. G., J. J. Carter, et al. (2010). "Antibodies to merkel cell polyomavirus T antigen oncoproteins reflect tumor burden in merkel cell carcinoma patients." *Cancer Res* 70(21): 8388-97.

- Pippirs, U., B. A. Buhren, et al. (2009). "[Merkel cell carcinoma. Viral genesis and new therapeutic options?]." *Hautarzt* 60(4): 275-8.
- Pulitzer, M. P., B. D. Amin, et al. (2009). "Merkel cell carcinoma: review." *Adv Anat Pathol* 16(3): 135-44.
- Rodig, S. J., J. Cheng, et al. (2012). "Improved detection suggests all Merkel cell carcinomas harbor Merkel polyomavirus." *J Clin Invest* 122(12): 4645-53.
- Santamaria-Barria, J. A., G. M. Boland, et al. (2012). "Merkel Cell Carcinoma: 30-Year Experience from a Single Institution." *Ann Surg Oncol*.
- Sastre-Garau, X., M. Peter, et al. (2009). "Merkel cell carcinoma of the skin: pathological and molecular evidence for a causative role of MCV in oncogenesis." *J Pathol* 218(1): 48-56.
- Scalvenzi, M., F. Palmisano, et al. (2013). "Clinical, dermoscopic and histological features of a Merkel cell carcinoma of the hand." *J Dermatol Case Rep* 7(1): 15-7.
- Schowalter, R. M. and C. B. Buck (2013). "The Merkel cell polyomavirus minor capsid protein." *PLoS Pathog* 9(8): e1003558.
- Schowalter, R. M., D. V. Pastrana, et al. (2010). "Merkel cell polyomavirus and two previously unknown polyomaviruses are chronically shed from human skin." *Cell Host Microbe* 7(6): 509-15.
- Schrama, D., W. K. Peitsch, et al. (2012). "Merkel cell polyomavirus status is not associated with clinical course of Merkel cell carcinoma." *J Invest Dermatol* 131(8): 1631-8.
- Schrama, D., A. Thiemann, et al. (2010). "Distinction of 2 different primary Merkel cell carcinomas in 1 patient by Merkel cell polyomavirus genome analysis." *Arch Dermatol* 146(6): 687-9.
- Schrama, D., S. Ugurel, et al. (2012). "Merkel cell carcinoma: recent insights and new treatment options." *Curr Opin Oncol* 24(2): 141-9.
- Seo, G. J., C. J. Chen, et al. (2009). "Merkel cell polyomavirus encodes a microRNA with the ability to autoregulate viral gene expression." *Virology* 383(2): 183-7.
- Shuda, M., R. Arora, et al. (2009). "Human Merkel cell polyomavirus infection I. MCV T antigen expression in Merkel cell carcinoma, lymphoid tissues and lymphoid tumors." *Int J Cancer* 125(6): 1243-9.
- Shuda, M., H. Feng, et al. (2008). "T antigen mutations are a human tumor-specific signature for Merkel cell polyomavirus." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(42): 16272-7.
- Shuda, M., H. J. Kwun, et al. (2011). "Human Merkel cell polyomavirus small T antigen is an oncoprotein targeting the 4E-BP1 translation regulator." *J Clin Invest* 121(9): 3623-34.
- Sihto, H., H. Kukko, et al. (2009). "Clinical factors associated with Merkel cell polyomavirus infection in Merkel cell carcinoma." *J Natl Cancer Inst* 101(13): 938-45.
- Spurgeon, M. E., J. Cheng, et al. (2015). "Tumorigenic activity of merkel cell polyomavirus T antigens expressed in the stratified epithelium of mice." *Cancer Res* 75(6): 1068-79.
- Spurgeon, M. E. and P. F. Lambert (2012). "Merkel cell polyomavirus: a newly discovered human virus with oncogenic potential." *Virology* 435(1): 118-30.
- Stanley, M. (2010). "Pathology and epidemiology of HPV infection in females." *Gynecol Oncol* 117(2 Suppl): S5-10.
- Stewart, S. E., B. E. Eddy, et al. (1958). "Neoplasms in mice inoculated with a tumor agent carried in tissue culture." *J Natl Cancer Inst* 20(6): 1223-43.
- Touze, A., J. Gaitan, et al. (2009). "Merkel cell polyomavirus strains in patients with merkel cell carcinoma." *Emerg Infect Dis* 15(6): 960-2.
- van der Meijden, E., R. W. Janssens, et al. (2010). "Discovery of a new human polyomavirus associated with trichodysplasia spinulosa in an immunocompromized patient." *PLoS Pathog* 6(7): e1001024.
- Varga, E., M. Kiss, et al. (2009). "Detection of Merkel cell polyomavirus DNA in Merkel cell carcinomas." *Br J Dermatol* 161(4): 930-2.
- Verhaegen, M. E., D. Mangelberger, et al. (2014). "Merkel Cell Polyomavirus Small T Antigen Is Oncogenic in Transgenic Mice." *J Invest Dermatol*.
- Wetzels, C. T., J. G. Hoefnagel, et al. (2009). "Ultrastructural proof of polyomavirus in Merkel cell carcinoma tumour cells and its absence in small cell carcinoma of the lung." *PLoS One* 4(3): e4958.
- Wieland, U., C. Mauch, et al. (2009). "Merkel cell polyomavirus DNA in persons without merkel cell carcinoma." *Emerg Infect Dis* 15(9): 1496-8.
- Wooff, J. C., J. R. Trites, et al. (2010). "Complete spontaneous regression of metastatic merkel cell carcinoma: a case report and review of the literature." *Am J Dermatopathol* 32(6): 614-7.
- Zur Hausen, A., D. Rennspiess, et al. (2013). "Early B-cell differentiation in Merkel cell carcinomas: clues to cellular ancestry." *Cancer Res* 73(16): 4982-7.

5. Erklärung des Eigenanteils an der Publikation

In der vorgelegten Arbeit habe ich das zellkulturbasierte LT-positive Kontrollpräparat entwickelt und hergestellt. Die immunhistochemischen Färbung mit dem monoklonalen anti-LT-Antikörper CM2B4 habe ich im Labor etabliert und anschließend auf den Merkelzellkarzinomen durchgeführt. Weiter wertete ich die immunhistochemischen Merkelzellkarzinom-Färbungen aus. Nach Sichtung der Patientendaten führte ich diese mit den Ergebnissen der PCR-Untersuchungen und den immunhistochemischen Färbungen zusammen. Für die Publikation erstellte ich die Hintergrunddaten und arbeitete an der Verfassung mit.

6. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Nicole Fischer für die Bereitstellung des Themas und die konstruktive Betreuung über die gesamte Zeit meiner Promotion hinweg. Für die praktische Unterstützung danke ich Dr. Kristin Stieler und den Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Fischer und Ruckdeschel.

Ich danke meiner Familie und meinen Freunden für die Begleitung und den Beistand in allen Lebenslagen im Rahmen dieser Arbeit, ganz besonders Caroline Fenner, Dr. Elena Terhalle und Rahel Decker sowie meinen Hamburger Mädels.

7. Curriculum vitae

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

8. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Miriam Leitz