

**Prävalenz und Penetranz des Merkel-Zell-Polyomavirus
bei Merkel-Zell-Karzinomen, deren Metastasen und
diversen Hauttumoren**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Hackmann, Johannes

2015

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Privatdozent Dr. A. S. Yazdi

2. Berichterstatter:

Privatdozentin Dr. A. Staebler

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung	1
1.1 Inzidenz und Zahlen	1
1.2 Klinik	1
1.3 Histologie	2
1.4 Immunhistochemie und Differentialdiagnosen	4
1.5 Die Merkel-Zelle	6
1.6 Diagnose	7
1.7 Stadien	9
1.8 Therapie	10
1.9 Nachsorge	13
1.10 Pathogenese	14
1.11 Das Merkel-Zell-Polyomavirus	15
2. Fragestellung	17
3. Material und Methoden	18
3.1 Erstellung der Paraffinschnitte	18
3.2 Entparaffinierung der Schnitte	18
3.3 DNA-Extraktion	18
3.4 PCR-Primer	20
3.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	21
3.6 Gelelektrophorese	22
3.7 Aufreinigung der PCR-Produkte	23
3.8 Sequenzierung	24
4. Ergebnisse	25
4.1 Patientenkollektiv und Untersuchungsmaterial	25
4.2 Ergebnisse des β -Globin-Nachweises aus Tumorgewebe	29

4.3	Prävalenznachweis des MCPyV in Primärtumorgewebe über MCV138	30
4.4	Prävalenznachweis des MCPyV in Primärtumorgewebe über MCV191	33
4.5	Übersicht: Prävalenznachweis des MCPyV in Primärtumorgewebe	35
4.6	Prävalenznachweis des MCPyV in Primärtumorgewebe und Metastase über MCV 138	37
4.7	Prävalenznachweis des MCPyV in Primärtumorgewebe und Metastase über MCV 191	43
4.8	Übersicht: Prävalenznachweis des MCPyV in Primärtumorgewebe und Metastasen	49
4.9	Gesamtübersicht: Primärtumore unabhängig vom Metastasierungsgrad	54
4.10	Prävalenz des MCPyV in nicht-MZK-Hauttumoren über MCV138	60
4.11	Prävalenz des MCPyV in nicht-MZK-Hauttumoren über MCV191	63
4.12	Prävalenznachweis des MCPyV in Sekundärtumorgewebe	65
4.13	Ergebnisse der DNA-Sequenzanalyse von MCV191	66
5.	Diskussion	68
6.	Zusammenfassung	82
7.	Literaturverzeichnis	84
8.	Erklärung zum Eigenanteil	89
9.	Danksagung	90

Abkürzungsverzeichnis:

A:	Adenin
AJCC:	American Joint Committee on Cancer
AK:	Aktinische Keratosen
APUD-System:	Amine precursor uptake and decarboxylation system
b-globin:	Beta-globin
bp:	Basenpaar
BZK:	Basalzellkarzinom
C:	Cytosin
CA:	Carcinom, Karzinom
CD45:	LCA: Leucocyte common antigen
CK20:	Cytokeratin 20
DIPS-PCR:	Detection of integrated papillomavirus sequences by ligation-mediated PCR
dNTPs:	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA:	Double-stranded DNA, Doppelstrang-DNA
DTS:	Digital transcriptome subtraction
ELND:	Elektive Lymphadenektomie
FFPE:	Formaldehyde fixed-paraffin embedded
G:	Guanin
Gy:	Gray
HE-:	Hämatoxylin-Eosin
HIV:	Humanes Immundefizienz-Virus
HMB 45:	Human melanoma black 45
H ₂ O:	Wasser, Wasserkontrolle ohne DNA
HPV:	Humanes Papillomavirus
ik:	Immunkompetent
is:	Immunsupprimiert
L:	Längenstandard
LK:	Lymphknoten
LT:	Large-T
m:	Männlich
MALT-:	Mucosa associated lymphoid tissue
MASH1:	Mammalian achaete-scute-homolog-1
M. Bowen:	Morbus Bowen
MCV/ MCPyV:	Merkel cell polyomavirus, Merkel-Zell-Polyomavirus

Met.:	Metastase
MZK:	Merkel-Zell-Karzinom
NCDB:	National Cancer Data Base of the USA
NMSC:	Non-melanoma skin cancer
NSE:	Neuronenspezifische Enolase, Neuronen spezifische Enolase
PCR:	Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PET-CT:	Positronenemissionstomographie
PTPRG-Gen:	Human protein tyrosine phosphatase, receptor type G gene
qPCR:	Quantitative PCR
Rb:	Retinoblastom-Protein
SCLC:	Kleinzelliger Lungenkarzinome, small cell lung cancer
SK:	Seborrhoische Keratose
SLNB:	Sentinel lymph node biopsie, Sentinel-Lymphknoten-Biopsie
ST:	Small-T
SV40:	Simian vacuolating virus 40
T:	Thymin
TAE:	Tris-Acetat-EDTA
TNM:	Tumor, Nodes, Metastases (Stadieneinteilung maligner Tumore)
TTF-1:	Thyroid transcription factor 1
UV:	Ultraviolett
V:	Volt
VP1:	Viral protein 1
w:	Weiblich
3':	3'-Ende
5':	5'-Ende
18FDG:	18-Fluor-Desoxyglucose
+	Positiv
-:	Negativ

1. Einleitung

1.1 Inzidenz und Zahlen

Das Merkel-Zell-Karzinom (MZK), auch kutanes neuroendokrines Karzinom genannt, ist eine seltene, hochgradig aggressive, maligne kutane Neoplasie. Auf Grund seiner Histomorphologie wurde es durch seinen Erstbeschreiber Cyril Toker 1972 zunächst als „Trabekuläres Karzinom“ bezeichnet.

Insbesondere von Merkel-Zell-Karzinomen betroffen sind ältere und immunsupprimierte Menschen (Calder and Smoller 2010).

Die Inzidenz ist mit 0,2 - 0,3/100.000/Jahr im Vergleich zu anderen Tumoren der Haut niedrig (Malignes Melanom 14/100.000/Jahr in den USA und 40 - 50/100.000/Jahr in Australien, Basalzellkarzinom 300/100.000/Jahr in den USA) (Harrison and Bergfeld 2009). Allerdings steigt die Inzidenzrate, wobei das Alter bei Diagnosestellung im Mittel bei 75 Jahren liegt (Toberer, Werchau et al. 2011).

Primär tritt die Mehrzahl der Merkel-Zell-Karzinome auf sonnenexponierter Haut prädominierend männlicher Kaukasier auf, wobei 50% im Kopf- und Halsbereich lokalisiert sind und 40% im Extremitätenbereich. Nur selten finden sich Merkel-Zell-Karzinome auf sonnengeschützter Haut. Hier gehen sie jedoch mit einer weitaus schlechteren Prognose einher (Jaeger, Ring et al. 2012).

Das MZK ist ein hochgradig aggressiver Tumor mit schnellem Wachstum und mit einer Drei-Jahres-Mortalitätsrate von 33%, die die des malignen Melanoms um 15% übertrifft (Heath, Jaimes et al. 2008).

1.2 Klinik

Das MZK tritt meist als solitärer, glatter, glänzender, rötlicher bis livider, fester Knoten mit Teleangiektasien in Erscheinung (Calder and Smoller 2010; Jaeger, Ring et al. 2012). Der Tumor ist häufig als Knoten zu palpieren, der sich dem „Eisberg-Phänomen“ gleich in die Tiefe fortpflanzt (Becker 2010).

Plaquetartige Wachstumsformen kommen ebenfalls vor und fortgeschrittene Tumore ulzerieren sekundär (Wong and Wang 2010).

Der schmerzlose Tumor zeigt eine rasche Wachstumstendenz mit hohen lokalen Rezidivraten (25-75% der Fälle), regionären Lymphknotenmetastasen (52-75% der Fälle) und Fernmetastasen (34-75% der Fälle), insbesondere in Leber (13%), Lunge (10-23%), Gehirn (18%), Knochen (10-15%), Haut (9-30%) und distalen Lymphknoten (9%) (Majewska and Biernat 2010, Duprat and Landman et al. 2011).

Zur Diagnosestellung dient der AEIOU-Algorithmus, der Hinweise zur Diagnosestellung des Merkel-Zell-Karzinoms zusammenfasst: Asymptomatic/ lack of tenderness, Expanding rapidly, Immune suppression, Older than age 50, UV-exposed site/ fair skin (Heath, Jaimes et al. 2008).

Differentialdiagnostisch müssen klinisch vor allem atypische Keratoakanthome, Leiomyosarkome, Basalzellkarzinome, sowie neuroendokrine Tumore und Neuroblastome in Betracht gezogen werden (Kempf 2007 et al., Toberer, Werchau et al. 2011).

1. 3 Histologie

Histologisch ist das Merkel-Zell-Karzinom eine vorwiegend in der Dermis lokalisierte Neoplasie. Die Tumorzellen breiten sich in Richtung des Stratum reticulare der Dermis und der Subkutis aus. In der Regel bleiben das Stratum papillare, die Epidermis und die Adnexstrukturen ausgespart (Wong and Wang 2010).

Zytomorphologisch sind dicht stehende basophile Zellen oft zu Strängen oder Nestern angeordnet (Abbildung 1). Das Tumorstroma kann das Tumorgewebe durchbrechen und Septen ausbilden. Dies ist besonders beim trabekulären, aber auch beim intermediären Subtyp der Fall. Charakteristisch für das MZK sind die monomorphen Tumorzellen mit typischem nukleären Chromatinmuster (Becker 2010). Die Zellen sind klein und rund. Der ebenfalls rund imponierende Nukleus mit charakteristisch pulvrigem Chromatin besitzt einen unauffälligen Nukleolus (Wong and Wang 2010). Ein weiteres histologisches Merkmal ist die

oft mit atypischen Mitosen vergesellschaftete hohe Proliferationsrate (Abbildung 2), (Becker 2010). Auch Einzelzellnekrosen, vaskuläre und perineurale Infiltrate können das histologische Bild prägen (Wong and Wang 2010).

Drei histologische Subtypen des MZK werden unterschieden (trabekulärer, intermediärer Typ bzw. kleinzelliger Typ), denen je nach Subtyp unterschiedliche Häufigkeiten und Prognosen zugeordnet werden können. Der ursprünglich von Toker beschriebene trabekuläre und der kleinzellige Typ nehmen jeweils einen Anteil von etwa 10% an allen Merkel-Zell-Karzinomen ein. Der häufigste histologische Subtyp ist der intermediäre Typ mit einem Anteil von 80%. Häufig prägen Misch- und Übergangsformen zwischen den drei Subtypen das histologische Bild (Becker 2010).

Die prognostischen Unterschiede der Subtypen sind nur marginal (Toberer, Werchau et al. 2011). Trotzdem gilt das trabekuläre MZK als besser differenziert als die übrigen Formen und soll mit einer besseren Prognose einhergehen. Der kleinzellige Typ gilt als undifferenziert und geht mit der schlechtesten Prognose einher; der intermediäre Typ nimmt eine Mittelstellung ein (Jaeger, Ring et al. 2012).

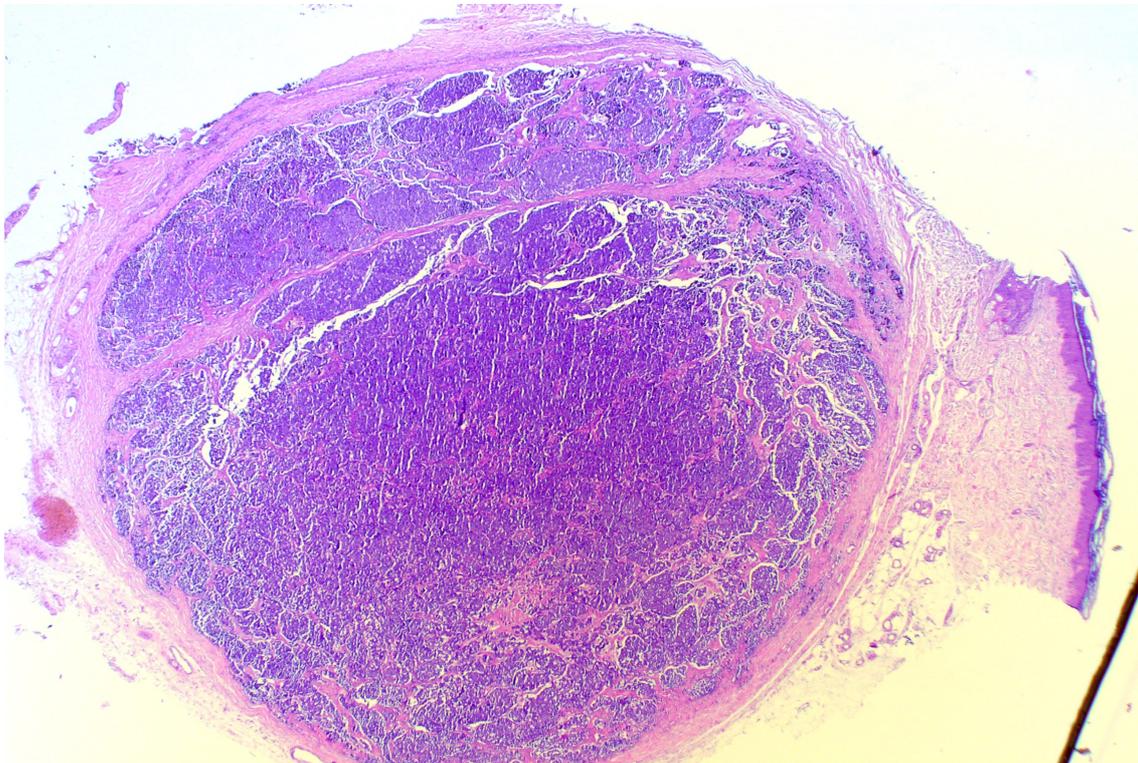


Abbildung 1: Histologisches Bild eines MZK mit basophilen Tumorzellen im Bereich der Dermis und Subcutis.

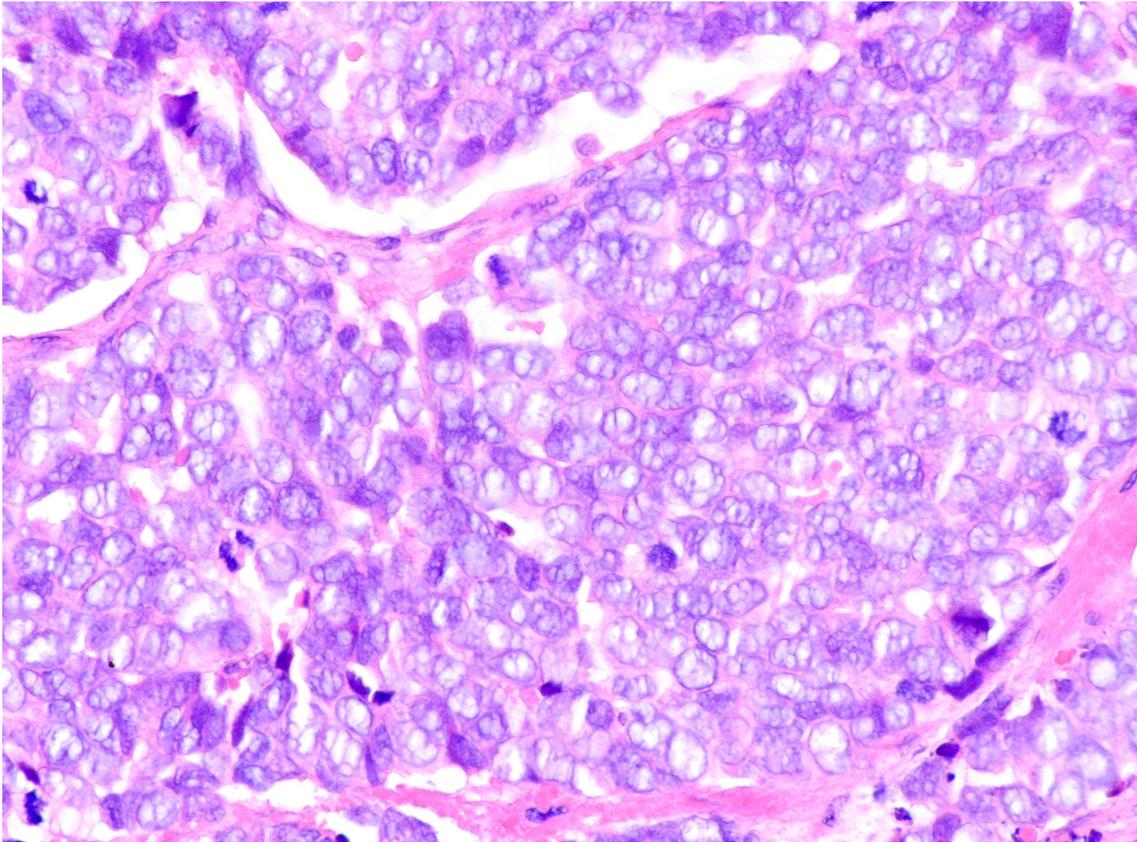


Abbildung 2: Histologisches Bild eines MZK mit monomorphen, zytoplasmareichen Tumorzellen und zahlreichen Mitosefiguren

1. 4 Immunhistochemie und Differentialdiagnosen

Goldstandard zur Diagnosesicherung ist die Immunhistochemie (Tabelle 1). Wichtige Differentialdiagnosen, die histologisch und vor allem immunhistochemisch vom MZK abgegrenzt werden müssen, sind kutane Metastasen kleinzelliger Lungenkarzinome (SCLC, small cell lung cancer), maligne Lymphome und kleinzellige maligne Melanome.

Zur Diagnosestellung werden immunhistochemisch sowohl die epitheliale als auch die neuroendokrine Differenzierung des MZK ausgenutzt.

Epitheliale Marker sind Zytokeratine. Beim MZK wird Zytokeratin 20 (CK20), das in 87% der Merkel-Zell-Karzinome positiv ist, jedoch auch in 4,6% von kleinzelligen Lungenkarzinomen exprimiert wird als wichtigster Oberflächenmarker eingesetzt (Calder and Smoller 2010). Obwohl CK20 als verlässlicher Marker für das MZK gilt (Abbildung 3), dürfen die Ausnahmen nicht unberücksichtigt bleiben. Um eine Metastase eines SCLC abzugrenzen,

kann TTF-1 (thyroid transcription factor 1) gefärbt werden (Majewska and Biernat 2010). TTF-1 wird in 73% aller SCLC exprimiert, allerdings auch in 3% aller Merkel-Zell-Karzinome. Um besser zwischen der Metastase des SCLC – der wichtigsten Differentialdiagnose – und dem MZK zu differenzieren, kann neuerdings auch MASH1 (mammalian achaete-scute-homolog-1) als zusätzlicher Marker herangezogen werden. MASH1 ist in 83% aller SCLC positiv und präsentiert sich stets negativ in Merkel-Zell-Karzinomen (Ralston, Chiriboga et al. 2008).

Als neuroendokrine Marker stehen die Neuronen-spezifische Enolase (NSE), Chromogranin und Synaptophysin zur Verfügung (Calder and Smoller 2010).

Lymphome können über CD45 (LCA: Leucocyte common antigen) abgegrenzt werden, das in Merkel-Zell-Karzinomen negativ ist; Melanome lassen sich über die Marker S100, HMB-45 und Melan A differenzieren (Toberer, Werchau et al. 2011).

Tabelle 1: Immunhistochemische Marker für MZK, kleinzellige Lungenkarzinome (SCLC), maligne Lymphome und Melanome modifiziert nach (Toberer, Werchau et al. 2011). CK20: Cytokeratin 20; NSE: neuron specific enolase; TTF-1: thyroid transcription factor 1; MASH1: mammalian achaete-scute-homolog-1; CD45: LCA: Leucocyte common antigen; HMB 45: Human melanoma black 45; + positiv; -: negativ

	MZK	SCLC	Malignes Lymphom	Malignes Melanom
CK20	(+ 87%; - 13%)	(+ 4,6%; - 95,4%)	(-)	(-)
Synaptophysin	(+/-)	(+/-)	(-)	(-)
Chromogranin A	(+/-)	(+/-)	(-)	(-)
NSE	(+)	(+/-)	(-)	(-)
TTF-1	(+3%; - 97%)	(+73%; - 27%)	(-)	(-)
MASH1	(-)	(+83%; - 17%)		
CD45 (LCA)	(-)	(-)	(+)	(-)
Melan A	(-)	(-)	(-)	(+)
S 100	(-)	(-)	(-)	(+)
HMB-45	(-)	(-)	(-)	(+)

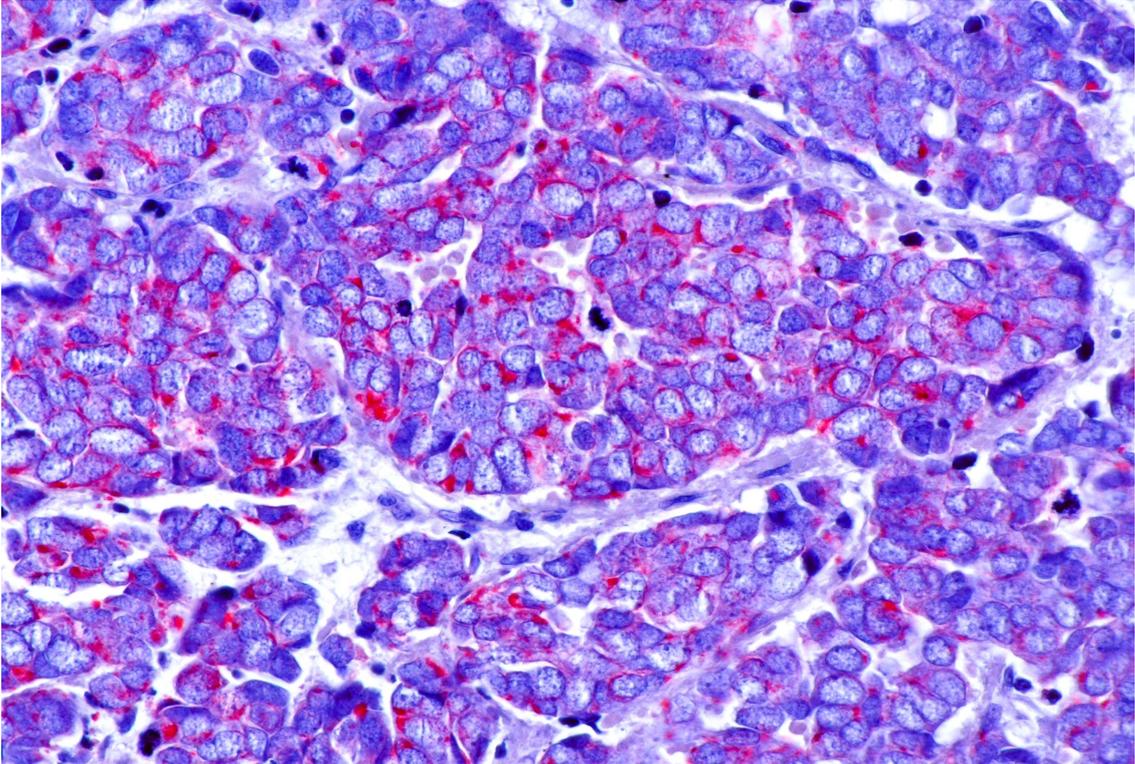


Abbildung 3: Charakteristische punktförmige Markierung mit Anti-CK20.

1. 5 Die Merkel-Zelle

Da die genaue Pathogenese des MZK bis heute unklar ist, existieren diverse Überlegungen und Hypothesen zum Ursprung des Merkel-Zell-Karzinoms:

Seit Friedrich Sigmund Merkel 1875 erstmals die im Stratum basale der Epidermis lokalisierte Merkel-Zelle als Nervenendigung beschrieb, die als Mechanorezeptor der Haut dient, wird kontrovers diskutiert, ob das Merkel-Zell-Karzinom aus der residenten Merkelzelle, die aus der Neuralleiste in die Haut einwandert, oder aber aus einer pluripotenten epidermalen Stammzelle entsteht (Halata, Grim et al. 2003, Becker 2010, Toberer, Werchau et al. 2011).

Interessanterweise konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass sich die Merkelzelle selbst aus einer pluripotenten epidermalen Stammzelle ableitet, (Van Keymeulen, Mascre et al. 2009), so dass die Stammzellhypothese aktuell plausibler erscheint.

Die Merkelzelle – als Mechanorezeptor fungierend – adaptiert langsam an anhaltende mechanische Reize (Halata, Grim et al. 2003). Aufgrund ihres

Adaptionscharakters wird sie auch als „slowly adapting mechanoreceptor type 1“ bezeichnet (Moll, Roessler et al. 2005). Aktionspotentiale werden sowohl durch Berührung als auch durch Haarbewegungen ausgelöst (Calder and Smoller 2010).

Histologisch sind Merkelzellen große, blasse Zellen mit gelapptem Kern. Es besteht synapsen-ähnlicher Kontakt zu vergrößerten, myelinisierten Nervenendigungen (Halata, Grim et al. 2003). Merkelzellen werden darüber hinaus durch Granula, die diverse Neuropeptide enthalten, ihre teils dendritenartige Plasmamembran und durch ihr typisches Zytoskelett (insbesondere CK20) charakterisiert (Moll, Roessler et al. 2005). Sie gehören wie die neuroendokrinen Zellen der Atemwege und des Magen-Darm-Traktes zum APUD-System (amine precursor uptake and decarboxylation system), (Toberer, Werchau et al. 2011). Der Immunphänotyp der gesunden Merkelzelle zeigt den identischen Immunphänotyp zum Merkel-Zell-Karzinom mit Positivität für CK20, NSE und Chromogranin. Auch in Merkel-Zell-Karzinomen gelang der Nachweis von neurosekretorischen Granula, der erlaubte, das MZK der Gruppe der neuroendokrinen Karzinome zuzuordnen (Calder and Smoller 2010).

1. 6 Diagnose

Da Merkelzellkarzinome eine seltene Entität darstellen, sich rasch und klinisch oft asymptomatisch über Monate entwickeln können, ist die frühzeitige Diagnosestellung essentiell. Die Diagnose wird meist histomorphologisch gestellt, so dass die histopathologische und immunhistochemische Beurteilung einer Exzisionsbiopsie zielführend in der Diagnostik ist. Diagnostischer Goldstandard ist somit die komplette operative Entfernung des Primärtumors (Toberer, Werchau et al. 2011, Jaeger, Ring et al. 2012, Nicolaidou, Mikrova et al. 2012).

Nach Diagnosestellung ist eine akkurate Ausbreitungsdiagnostik entscheidend für die Prognose und das weitere therapeutische Vorgehen.

Diese beinhaltet die Untersuchung des Lymphabflussgebietes mittels Palpation und Sonographie. Ferner werden weitere bildgebende Verfahren eingesetzt, um

Fernmetastasen auszuschließen. Die computertomographische Untersuchung des Thorax, um vor allem die wichtige Differentialdiagnose des kleinzelligen Lungenkarzinoms auszuschließen, des Abdomens und die des Schädels schließen sich an. Gegebenenfalls kann auch eine Magnetresonanztomographie des Gehirns durchgeführt werden. Die Positronenemissionstomographie (PET-CT) mit ¹⁸F-DG wird nur noch unter speziellen Konstellationen angewendet (Hauschild und Garbe 2005, Toberer, Werchau et al. 2011).

Die operative Entfernung des Schildwächterlymphknotens (Sentinel-Lymphknoten-Biopsie, SLNB) zur histologischen und immunhistochemischen Evaluation des Lymphknotens wird aktuell diskutiert, da kontrollierte Studien bisher fehlen. Fürsprecher der SLNB argumentieren, dass durch Untersuchung des Wächterlymphknotens vermieden werde, dass ein zu niedriges klinisches Stadium bei sonst unauffälligem Staging angenommen wird und somit ein regionärer Lymphknotenbefall früher detektiert werden kann. Hauptargument der Befürworter der SLNB ist das auf Boden einer Studie belegte verbesserte Überleben, wenn Patienten mit befallenem Sentinel-Lymphknoten eine Strahlentherapie erhielten (Gupta, Wang et al. 2006). Allerdings wird die adjuvante Radiatio der Lymphabstromgebiete bei allen primär auftretenden Merkel-Zell-Karzinomen zunehmend Standard und somit wird die Indikation zur SLNB relativ, da eine Radiatio bei jedem MZK indiziert ist. Gleichzeitig zeigen andere Studien, dass kein besseres Überleben für den Patienten durch SLNB besteht. Somit ist der Nutzen der SLNB noch nicht abschließend geklärt (Calder and Smoller 2010, Toberer, Werchau et al. 2011).

Wertvoll für die Verlaufskontrolle der Erkrankung sind jedoch die Bestimmung von NSE und Chromogranin A als Tumormarker im Serum (Calder and Smoller 2010, Toberer, Werchau et al. 2011).

1.7 Stadien

In den letzten zwei Dekaden wurden fünf verschiedene Staging-Systeme eingeführt, die teils widersprüchlich waren. Dadurch entstand insbesondere im Hinblick auf eine stadienadaptierte Therapie und die prognostische Einordnung eine große Unsicherheit. Basierend auf 5832 Falldaten der National Cancer Data Base of the USA (NCDB) wurde ein neues Prognose- und Stagingssystem (Tabelle 2) entwickelt, um diesen Missverhältnissen aus dem Weg zu gehen und eine gemeinsame Basis für Merkel-Zell-Karzinome zu schaffen. Dieses System wurde sowohl vom American Joint Committee on Cancer (AJCC) als auch der International Union Against Cancer übernommen (Lemos, Storer et al. 2010, Nicolaidou, Mikrova et al. 2012).

Tabelle 2: TNM-Kriterien und AJCC-Einteilung für MZK modifiziert nach (Lemos, Storer et al. 2010, Duprat, Landman et al. 2011, Nicolaidou, Mikrova et al. 2012). T: Tumor; N: Lymphknoten; M: Metastase

T	N
Tx: Primärtumor kann nicht beurteilt werden	Nx: Lokale Lymphknoten (LK) können nicht beurteilt werden
T0: Kein Primärtumor	N0: Keine Lymphknotenmetastasen
Tis: In situ Primärtumor	cN0: Klinisch unauffällige LK
T1: Primärtumor ≤ 2 cm	cN1: Klinisch auffällige LK
T2: Primärtumor > 2 aber ≤ 5 cm	pN0: Pathologisch unauffällige LK
T3: Primärtumor > 5 cm	pNx: Pathologisch nicht untersuchte LK
T4: Primärtumor infiltriert Knochen, Muskel, Faszie oder Knorpel	N1a: Mikrometastasen
	N1b: Makrometastasen
	N2: In-Transit-Metastasen
M	
Mx: Fernmetastasen können nicht beurteilt werden	
M0: Keine Fernmetastasen	
M1: Fernmetastasen	
M1a: Entfernt liegende Haut, entfernt liegendes Subkutangewebe oder distale LK infiltriert	
M1b: Lunge	
M1c: Andere Viszeralorgane	

Stadium				5-Jahres-Überleben (%)
0	Tis	N0	M0	
IA	T1	pN0	M0	79
IB	T1	cN0	M0	60
IIA	T2/T3	pN0	M0	58
IIB	T2/T3	cN0	M0	49
IIC	T4	N0	M0	47
IIIA	Jegliches T	N1a	M0	45
IIIB	Jegliches T	N1b/N2	M0	30
IV	Jegliches T	Jegliches N	M1	18

Das neue vierstufige System ist analog der AJCC-Klassifikation des malignen Melanoms aufgebaut. Während Stadium I kleine Primärtumore umfasst, sind größere Tumore ohne Metastasen im Stadium II klassifiziert. Bei Lymphknotenmetastasierung liegt Stadium III, bei Organmetastasierung Stadium IV vor. Zusätzlich unterschieden werden die Unterstufen IA und IB beziehungsweise IIA und IIB. Falls der Lymphknotenstatus in der pathologisch-histologischen Untersuchung als negativ eingestuft wurde (A) ist die Prognose günstiger zu sehen als bei ausschließlich klinischer Untersuchung der Lymphknoten (B), da hier das Risiko Mikrometastasen zu übersehen hoch einzustufen ist. Daher wird gefordert, klinisch unauffällige Lymphknoten zu untersuchen, beispielsweise durch SLNB, um Mikrometastasen auszuschließen (Lemos, Storer et al. 2010, Duprat, Landman et al. 2011, Nicolaidou, Mikrova et al. 2012).

1. 8 Therapie

Auf Grund der Seltenheit des Merkel-Zell-Karzinoms besteht aktuell ein Mangel an therapeutischen Standards. Dies trifft insbesondere für die lokal fortgeschrittene Erkrankung zu. Die chirurgische Exzision des Tumors und die Radiotherapie sind Mittel der Wahl zur Behandlung des MZK im Initialstadium (Duprat, Landman et al. 2011).

Bei Primärtumoren ohne detektierbare Organmetastasen oder Lokalrezidive ist eine operative Entfernung unter Einhaltung eines großzügigen Sicherheitsabstandes von 3 cm Grundlage der Therapie (Becker 2010, Toberer,

Werchau et al. 2011). Die Exzision sollte tief bis zur Muskelfaszie reichen. Alternativ kann auch mikrochirurgisch nach Mohs vorgegangen werden. Allerdings ist hier die anschließende adjuvante Radiotherapie wesentlicher Bestandteil des weiteren Vorgehens (Duprat, Landman et al. 2011).

In Ausnahmefällen können auch geringere Sicherheitsabstände gewählt werden. Hier ist es dann aber von noch größerer Bedeutung, dass anschließend die histologische Aufarbeitung mit konsekutiver Immunhistochemie folgt, um eine lückenlose Schnitttrandkontrolle zu gewährleisten.

Falls die histologische Begutachtung des Wächterlymphknotens positiv ausfallen sollte, ist im Anschluss eine radikale Lymphadenektomie indiziert (Becker 2010).

Ohne erwiesene verbesserte Überlebenschance sollte auf die routinemäßige elektive Lymphadenektomie (ELND) aufgrund möglicher Morbidität verzichtet werden (Toberer, Werchau et al. 2011, Nicolaidou, Mikrova et al. 2012). Bei inoperablen Tumoren ist auch eine primär der Operation vorangestellte Radiotherapie oder gegebenenfalls sogar eine isolierte Behandlung mit Radiotherapie denkbar. Hier liegt die empfohlene Strahlendosis bei 45-70 Gy, bei einer Aufteilung von etwa 5x2 Gy pro Woche (Duprat, Landman et al. 2011, Toberer, Werchau et al. 2011).

Retrospektiv betrachtet senkt die postoperative lokoregionale adjuvante Radiotherapie das Auftreten von Lokalrezidiven und verbessert sogar die Überlebenschance (Becker 2010, Nicolaidou, Mikrova et al. 2012).

Dabei werden mindestens 50 Gy bei der adjuvanten Radiotherapie und 60-66 Gy bei nicht-erbrachter R0-Resektion empfohlen (Toberer, Werchau et al. 2011).

Bei regionärem Lymphknotenbefall wird der Primärtumor weitreichend exzidiert. Zusätzlich wird auch eine Lymphadenektomie durchgeführt. In beiden Operationsfeldern sollte eine Radiotherapie folgen, das heißt eine Radiatio des Primärtumorgebietes, der In-transit-Strecke und des regionalen Lymphknotengebiets. Eine zusätzliche systemische Behandlung mittels adjuvanter Chemotherapie ergab bisher keine verbesserte Überlebenschance (Nicolaidou, Mikrova et al. 2012). Allerdings kann

sie in speziellen Fällen durchgeführt werden, insbesondere bei jüngeren Patienten oder bei Patienten in reduziertem Allgemeinzustand. Zwar wird das MZK als chemosensitiv angesehen, jedoch kann es durch Chemotherapie nicht kuriert werden. (Toberer, Werchau et al. 2011, Nicolaidou, Mikrova et al. 2012). Bisher ist die Chemotherapie die am wenigsten validierte Therapieform bei Merkel-Zell-Karzinomen und es existiert auch keine evidenz-basierte Form der Chemotherapie (Bichakjian, Lowe et al. 2007, Becker 2010).

In-Transit-Metastasen, also loko-regionäre Metastasen zwischen Primärtumor und der ersten Lymphknotenstation, treten häufig bei MZKs auf. Eine Kombination aus Operation und Radiotherapie kommt hier therapeutisch zum Einsatz. Eine Therapiealternative, insbesondere bei multiplen Filiae im Extremitätenbereich, stellt hier die hypertherme Extremitätenperfusion dar, bei der eine Extremität lokal chemotherapeutisch behandelt werden kann. So können höhere Dosen, die bei systemischer Applikation toxisch wären, appliziert werden (Bichakjian, Lowe et al. 2007, Duprat, Landman et al. 2011, Toberer, Werchau et al. 2011).

Patienten mit Fernmetastasierung müssen individuell therapiert werden, da es bisher keinerlei Studien oder Therapieleitlinien gibt.

Die Indikation zur Operation wird in diesem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung zurückhaltender gestellt. Im Vordergrund steht die Kontrolle der palliativen Situation vor allem durch Radio- und/oder Chemotherapie.

Chemotherapie-Regime, die der Behandlung bei SCLC ähneln, werden bevorzugt. So werden oft Kombinationstherapien aus Cisplatin, Doxorubicin, Vincristin oder mit Etoposid und Platinderivaten eingesetzt. Auch eine Polychemotherapie mit Cyclophosphamid/Methotrexat/5-Fluorouracil dient als Therapieoption.

Bei Patienten mit reduziertem Allgemeinzustand oder Immunsuppression ist eine weniger aggressive Behandlung mit oraler Niedrigdosistherapie mit Etoposid indiziert. Als Zweitlinientherapie können wegen ihrer Wirkung in neuroendokrinen Tumoren auch Topotecan, wie oben bereits erwähnt, oral verabreichtes Etoposid, Irinotecan, Taxane oder Gemcitabin in Erwägung

gezogen werden (Bichakjian, Lowe et al. 2007, Toberer, Werchau et al. 2011, Nicolaidou, Mikrova et al. 2012).

Obwohl bei Merkel-Zell-Karzinomen Chemosensibilität und hohe Ansprechraten der Systemtherapie von bis zu 60-70% beschrieben wurden, ist die Dauer der Ansprechrate mit durchschnittlich 8 Monaten kurz. Daher erbrachte bisher kein Chemotherapie-Protokoll einen Überlebensvorteil bei metastasierten Merkel-Zell-Karzinomen. Dies ist nicht nur durch das unzureichende Ansprechen, sondern bei älteren oder immunsupprimierten Patienten auch durch die mit der Chemotherapie assoziierte Toxizität, die vor allem zu einer Knochenmarkdepression führen kann, bedingt. Auch Hauttoxizität und das Tumorlysesyndrom mit konsekutivem akuten Nierenversagen sind mögliche Risiken (Bichakjian, Lowe et al. 2007).

1. 9 Nachsorge

Regelmäßig eingehaltene Nachsorgeuntersuchungen sind wegen der hohen Wahrscheinlichkeit für Lokalrezidive und regionäre Lymphknotenmetastasen von essentieller Bedeutung für alle Patienten mit MZK. Die Nachsorge beinhaltet die klinische Untersuchung des Patienten einschließlich der Palpation der Lymphabstromgebiete, des Operationsfeldes und der Inspektion des gesamten Integuments. Außerdem sollte eine sonographische Untersuchung der Lymphknoten erfolgen. Die Bestimmung der Marker NSE und Chromogranin A sind sinnvolle serologische Ergänzungsuntersuchungen, ebenso wie die jährlich durchgeführte Röntgenthoraxuntersuchung und Abdomensonographie. Im ersten Jahr nach Diagnosestellung sollte die Nachsorge in Abständen von sechs Wochen stattfinden. Im weiteren Verlauf können die Nachuntersuchungsintervalle auf 3-6 Monate ausgeweitet werden und sollten sich über mindestens 5 Jahre erstrecken (Hauschild and Garbe 2005, Toberer, Werchau et al. 2011, Nicolaidou, Mikrova et al. 2012).

1. 10 Pathogenese

Bis heute ist die Pathogenese des Merkel-Zell-Karzinoms nicht vollständig geklärt. Da die meisten Merkel-Zell-Karzinome auf sonnenexponierter Haut auftreten, wird eine Assoziation mit UV-Licht angenommen. Insbesondere in Körperarealen intensiver kumulativer UV-Belastung ist die Inzidenz höher. Der Tumor tritt jedoch auch an Körperstellen auf, die sonnengeschützt sind (Nicolaidou, Mikrova et al. 2012). Charakteristisch für einen durch UVB ausgelösten Lichtschaden ist die Ausbildung von Thymindimeren, die zu Mutationen führen. In Merkel-Zell-Karzinomen wurden zum Beispiel Mutationen im p53-Gen gefunden (Calder and Smoller 2010).

Neben UVB-Strahlung wird auch durch UVA-Strahlung induzierter oxidativer Stress bei der Entstehung von Merkel-Zell-Karzinomen diskutiert. Besonders bei Psoriasispatienten, die eine Phototherapie mit UVA-Licht erhielten, konnten Calder und Smoller eine gesteigerte Inzidenz feststellen (Calder and Smoller 2010).

Auch Immunsuppression gilt als bedeutender Risikofaktor (Nicolaidou, Mikrova et al. 2012), denn Patienten mit Malignomen in der Eigenanamnese, Patienten unter medikamentöser Immunsuppression nach Organtransplantation oder HIV-positive Patienten zeigen ein gehäuftes Auftreten des neuroendokrinen Karzinoms (Martel-Jantin, Filippone et al. 2012).

1. 11 Das Merkel-Zell-Polyomavirus

Durch die höhere Prävalenz bei Immundefizienz wurde schon früh eine infektiöse Genese des Tumors vermutet. So beschrieben Feng et al. 2008 erstmals ein neuartiges Polyomavirus, das Merkel cell polyomavirus (MCV oder MCPyV), welches sich in 80% aller Merkel-Zell-Karzinome fand. Durch den Nachweis des Fusionstranskripts zwischen dem menschlichen PTPRG-Gen (human protein tyrosine phosphatase, receptor type G gene) und dem viralen T-Antigen auf Chromosom 3p14.2 wurde gezeigt, dass das MCV klonal in das Wirtsgenom integriert wird. Beim MCV handelt es sich um ein kleines dsDNA-Virus von etwa 40-50 nm Durchmesser mit einem zirkulären Genom von 5387 Basenpaaren (Abbildung 4). Die dsDNA des Virus kodiert unter anderem für das Large-T-Antigen. Ihm kommt Bedeutung hinsichtlich der Aufrechterhaltung des Zellzyklus sowohl des Virus selbst, als auch der Wirtszelle zu (Becker 2010). In das menschliche Genom integriert, wird das virale Large-T (LT)- und small-T-Antigen exprimiert und mit der genomischen DNA im Rahmen der Zellteilung amplifiziert. Die beiden Gene beeinflussen Proteine, die sowohl für den Zellzyklus als auch für die Tumorsuppression zuständig sind. Diese Proteine sind Rb (Retinoblastom-Protein), p53, Protein Phosphatase 2A und Bub1 (Wong and Wang 2010).

SV40 (simian vacuolating virus 40) ist das am besten charakterisierte Polyomavirus und besitzt ebenfalls eine Large-T-Antigen-Region. Es interagiert vor allem mit den Tumorsuppressoren p53 und Rb und hat damit Einfluss auf den Zellzyklus (Wong and Wang 2010). Analogie kann für das MCV angenommen werden, denn sein LT-Antigen ähnelt dem des SV40 und anderen Polyomaviren. Das MCV in Wildtyp-Form liegt episomal vor und präsentiert sein T-Antigen in voller Länge. Allerdings zeigen die bei Merkel-Zell-Karzinomen in das Wirtsgenom integrierten Sequenzen des MCV Mutationen, die das LT-Antigen verkürzen (Arron, Jennings et al. 2011, Martel-Jantin, Filippone et al. 2012). Die oben erwähnten Risikofaktoren, wie UV- oder ionisierende Strahlung könnten für derartige T-Antigen-Mutationen verantwortlich sein (Wong and Wang 2010). Durch diesen Mechanismus könnte

insbesondere die für die autonome Virusreplikation essentielle virale Helikase-Funktion des LT-Antigens unterdrückt werden. Vermutlich resultiert durch die mutierte virale Helikase eine verlängerte Lebensdauer der betroffenen Zellen und konsekutiv eine höhere Tendenz zur malignen Transformation, denn durch Ausbleiben der autonomen Virusreplikation bleibt auch virale Lyse der Zelle aus (Arron, Jennings et al. 2011, Toberer, Werchau et al. 2011, Martel-Jantin, Filippone et al. 2012).

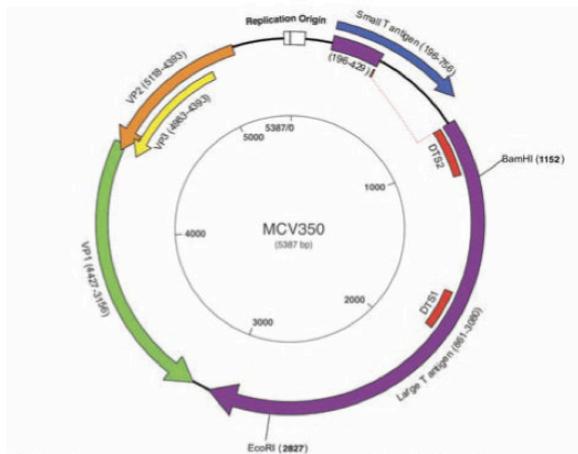


Abbildung 4: Das Merkel-Zell-Polyomavirus mit seinem zirkulären Genom (Feng, Shuda et al. 2008)

2. Fragestellung

Seit dem Nachweis des Fusionstranskript auf Chromosom 3p14.2 zwischen dem humanen PTPRG-Gen (human protein tyrosine phosphatase, receptor type G gene) und dem viralen T-Antigen und anschließender Identifikation des bisher unbekanntes Merkel cell polyomavirus (MCPyV oder MCV) in MZK durch Feng et al. im Jahr 2008, wurden diverse Studien zur Erhebung des MCPyV-Prävalenzstatus sowohl in MZK-Tumorgewebe, inklusive Metastasen, als auch in nicht-MZK Tumoren der Haut veröffentlicht (Feng, Shuda et al. 2008).

Allerdings wurde bisher nie explizit die Penetranz des MCPyV-Virus in metastasierten und nicht-metastasierten MZK mit der zu Primärtumoren assoziierten MZK-Metastasen und nicht-MZK-Tumoren der Haut verglichen. Dies ist Ziel dieser Arbeit. Hier soll herausgearbeitet werden, ob eine Infektion mit MCPyV eine generelle Infektion eines Patienten darstellt, in der sämtliche Hauttumore Virusträger sind, oder ob MZKs exklusiv infiziert sind.

Zusätzlich erhofften wir uns durch Analyse der Konkordanz zwischen MZK-Primärtumor und Metastase eine Aussage zu machen, inwiefern MCPyV-Integration in Tumorzellen möglicherweise zu einer Proliferation und erhöhter Metastasenabsiedlung führen könnte.

Wir erwarteten in unserer Arbeit eine hohe Prävalenz des MCPyV sowohl in MZK-Primärtumoren als auch in MZK-Metastasen. Diesbezüglich vermuteten wir einen identischen MCPyV-Status in Primärtumor und assoziierter Metastase, unter der Annahme, dass es zu einer Weitergabe der integrierten MCPyV-DNA der virustragenden Tumorzelle an die Tochterzellen kommt.

Um eine unspezifische Infektion durch MCPyV auszuschließen, wurden auch nicht-MZK Hauttumore untersucht, die bei MZK-Patienten exzidiert wurden.

Um unsere Ergebnisse zu validieren und um gegebenenfalls Mutationen, die bereits in der LT- und ST-Region beschrieben wurden, zu detektieren, sollen alle MCPyV-positiven PCR-Produkte sequenziert werden. Vor allem bei einer Mutation sollte diese identische Mutation auch in den Metastasen detektiert werden.

3. Material und Methoden

3. 1 Erstellung der Paraffinschnitte

Die Gewebeproben liegen bereits als in Paraffin eingebettete Gewebeblöcke vor, die zu diagnostischen Zwecken angefertigt wurden.

Mit Hilfe eines Mikrotoms werden 5µm dicke Paraffinschnitte aus den bereits archivarisch zur Verfügung stehenden Paraffinwachsblöcken hergestellt. Die Schnitte werden in einem warmen Wasserbad auf Objektträger übertragen und somit dem Vorgang der Entparaffinierung zugänglich gemacht.

3. 2 Entparaffinierung der Schnitte

Bevor potentielles Tumorgewebe aus den erstellten Paraffinschnitten isoliert werden kann, müssen diese entparaffiniert werden. Zu Beginn werden die Objektträger für 60 Minuten bei 55°C inkubiert. Nach zweimal je 10 Minuten Xylol werden die Schnitte zweimal für jeweils 1 Minute in einer Ethanolverdünnungsreihe absteigender Konzentration (100%, 90% und zuletzt 70%) rehydriert und abschließend in destilliertem Wasser zweimal für jeweils 1 Minute gespült.

3. 3 DNA-Extraktion

Nach Abschluss des Entparaffinierungsvorgangs kann nun das gewünschte Gewebe isoliert werden. Dazu wird mit einem sauberen Skalpell, das zuvor von einem Dermatohistopathologen auf einer korrespondierenden Hämatoxylin-Eosin-gefärbten (HE-) -Serienschnittstufe identifizierte und markierte Gewebe, vorsichtig vom entparaffinierten Schnitt mikrodisseziert. Um den Vorgang zu erleichtern und zu verfeinern werden die gewünschten Schnitte unter dem Manipulationsmikroskop unter zehnfacher Vergrößerung an den miteinander übereinstimmenden Stellen übereinander gelegt und so zur Deckung gebracht. Mithilfe des Skalpells und gegebenenfalls einer Pipettenspitze kann nun das

gewonnene reine Tumorgewebe in 180µl QIAGEN® ATL-Puffer und 20µl Proteinase K überführt werden. Die Probe wird nun kurz gevortext und anschließend über Nacht bei 56°C in einem Thermomixer unter Rotation inkubiert. Am Folgetag werden die Proben bei 6000xg für 30 Sekunden zentrifugiert, um zu überprüfen, ob sich noch unverdautes Gewebe am Boden der Eppendorfgefäße ansammelt. Sollte dies der Fall sein, werden die Proben nach Zugabe von 20µl Proteinase K für weitere 3 Stunden im Thermomixer inkubiert, bis der Verdau komplett ist.

Anschließend werden die komplett verdauten Proben im Thermomixer bei 90°C eine Stunde lang erhitzt, um die Proteinase K zu inaktivieren. Darauf wird ein identisches Volumen QIAGEN® AL-Puffer hinzugegeben. Nach Zugabe des identischen Volumens AL-Puffers wird die Probe durch Vortexen gemischt und für 30 Sekunden bei 6000xg zentrifugiert. Nun wird das identische Volumen 100%igen Ethanols den Proben beigegeben, gevortext und anzentrifugiert, um den Deckel des Eppendorfgefäßes von Flüssigkeit zu befreien. Das gesamte Lysat wird nun auf eine QIAamp MiniElute Säule pipettiert und 6000xg für eine Minute zentrifugiert, um das Lysat an die Säule zu binden. Falls das Lysat nicht komplett die Membran der Säule durchdrungen haben sollte, wird mit höherer Geschwindigkeit erneut zentrifugiert bis die Säule leer ist. Der Durchfluss wird verworfen.

Die an die Säule gebundene DNA wird zunächst mit 500µl AW1-Puffer und anschließend mit 500µl AW2 Puffer gewaschen und jeweils bei 6000xg für eine Minute zentrifugiert. Die Säule wird auf ein sauberes Collection Tube gesetzt und der Durchfluss verworfen. Abschließend wird bei voller Geschwindigkeit mit 17.000xg für 3 Minuten zentrifugiert, um die Membran der Säule komplett zu trocknen. Der Durchfluss wird erneut verworfen und die Säule nun in ein frisches Eppendorf gegeben. Abschließend wird die isolierte und gewaschene DNA in 2x30µl ATE-Puffer von der Säule eluiert. Hier wird der Elutionspuffer über 5 Minuten auf der Säule inkubiert, um dann die DNA durch Zentrifugation mit 17.000xg zu eluieren.

Die DNA wird photometrisch quantifiziert. Das Photometer wird mit ATE Puffer als Nullwert geeicht und die gewonnenen Proben gemessen. DNA wird bei 4°C gelagert.

3. 4 PCR-Primer

Nachdem die DNA über die Qiagen®-Säulen extrahiert wurde, werden nun die Primer für β -Globin - einem Housekeeping-Gen - und die für den Nachweis des MCV benötigten Primer MCV138 und MCV191 aufgelöst. Dazu wird mit Nuklease-freiem Wasser eine Konzentration von 100pmol/ μ l hergestellt. In unten stehender Tabelle sind die Sequenzen der Primer und die Volumina an Nuklease-freiem Wasser angegeben, die zu deren Auflösung benötigt werden (Tabelle 3). Anschließend wird durch Vortexen gemischt.

Tabelle 3: Eingesetzte Primer mit ihren Sequenzen und Auflösungsvolumina. A: Adenin; G: Guanin; C: Cytosin; T: Thymin; 5': 5'-Ende; 3': 3'-Ende; forward: Vorwärts-Primer; reverse: Rückwärts-Primer

Primer/ Oligonukleotid	Sequenz (5' zu 3')	Volumen für 100pmol/μl
β -globin forward	ACA CAA CTG TGT TCA CTA GCA AC (23)	393
β -globin reverse	TGG TCT CCT TAA ACC TGT CTT G (22)	399
MCV 138 forward	GGT TAG AGA TGC TGG AAA TGA CC (23)	400
MCV 138 reverse	CAA ATA AGC AGC AGT ACC AGG C (22)	338
MCV 191 forward	CCA CTT TAT TAT CTT AGC CCA T (22)	531
MCV 191 reverse	TCC TTT TGG CTA GAA CAG TGT C (22)	515

Um die Möglichkeit einer Kontamination so gering wie möglich zu halten, wird eine Arbeitslösung erstellt. Dazu werden 10 μ l der Primer-Stammlösung entnommen und mit 90 μ l Nuklease-freiem Wasser in einem neuen Eppendorfgefäß versetzt. Diese Arbeitslösung wird nun für alle folgenden Arbeitsschritte verwendet. Die Primer selbst werden bei einer Temperatur von minus 20°C gelagert.

3. 5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Nachdem die Primer verdünnt und eine Arbeitslösung erstellt wurde, wird der PCR-Mastermix für β -Globin, MCV 138 und MCV 191 angesetzt. Dieser besteht pro PCR-Ansatz aus 10xHotStar Puffer (2,5 μ l), 10mM Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs 0,5 μ l), 10 μ M Vorwärts- und 10 μ M Rückwärts-Primer (jeweils 0,5 μ l), hitzestabiler HotStarTaq DNA-Polymerase (0,125 μ l) und unter Berücksichtigung der später beigefügten Template-DNA wird mit Nuklease-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 25 μ l aufgefüllt. Bei der Erstellung des Mastermix muss immer ein Ansatz mit Wasser ohne Template-DNA als Vergleichswert und eine Reserve von 10% berücksichtigt werden (Tabelle 4).

Tabelle 4: PCR-Mastermix und die hierfür verwendeten Volumina und Konzentrationen. dNTPs: Desoxyribonukleosidtriphosphaten; forward: Vorwärts-Primer; reverse: Rückwärts-Primer

PCR-Mastermix	ein Ansatz	17 Ansätze + H₂O (ohne DNA) + 10% Reserve
10x HotStar Buffer	2,5 μ l	50 μ l
10 mM dNTPs	0,5 μ l	10 μ l
10 μ M Forward Primer	0,5 μ l	10 μ l
10 μ M Reverse Primer	0,5 μ l	10 μ l
HotStarTaq DNA Polymerase	0,125 μ l	2,5 μ l
Template DNA	6 μ l	(-)
Nuclease-free water	14,875 μ l auf 25 μ l auffüllen	297,5 μ l

Jeweils 19 μ l des erstellten Mastermix werden in 0,2ml fassende PCR-Tubes pipettiert und mit Template-DNA versetzt.

Um eine identische Menge an DNA in die PCR-Reaktion einsetzen zu können, wird anhand der photometrisch quantifizierten DNA-Menge die Probe mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt. Als Nullwert diente die Probe C1 mit einer Konzentration von 42 ng/ μ l, bei der die Menge an eingesetzter Template-DNA 6 μ l betrug. Bei allen Arbeitsschritten werden die Reagenzien auf Eis gelagert.

Nach Zugabe der Template-DNA wird die Polymerase-Kettenreaktion mit einer Temperatur von 95°C über 15 Minuten in einem Thermocycler gestartet, um die Doppelstrang-DNA (dsDNA) zu denaturieren und die Taq-Polymerase durch Hitze zu aktivieren. Dieser Initialphase folgt ein sich achtmal wiederholender Zyklus aus Denaturierung der dsDNA (bei 95°C über 1:30min.), Anlagerung der spezifischen Primer an die Einzelstränge (bei 61°C über 1:30min.) und letztlich der Amplifikation des gewünschten DNA-Abschnitts (bei 72°C über 1:30min.). Dem Zyklus schließt sich ein weiterer Zyklus an, der 34mal durchlaufen wird. Dieser besteht aus Denaturierung (bei 95°C über 1min.), Anlagerung (bei 57°C über 1min.) und anschließender Elongation (bei 72°C über 1min.). Nach Abschluss der Zyklen wird die Elongationstemperatur von 72°C für weitere 15 Minuten gehalten, worauf der Thermozykler auf 10°C abkühlt und die Reaktion beendet wird.

Alle PCR-Produkte werden bei 4°C gelagert.

3. 6 Gelelektrophorese

Nach erfolgter PCR kann nun das Amplifikationsprodukt auf ein 1,5%iges Agarose-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt werden. Zur Herstellung des Gels wird neben Agarose in entsprechender Menge TAE-Puffer verwendet.

Für die folgende Gelelektrophorese selbst werden 80ml des hergestellten 1,5%igen Agarosegels verwendet und mit 8µl des lichtgeschützten Farbstoffes Gel Red Nucleid Acid Stain (10.000x) versetzt, um die DNA im Agarosegel zu färben.

Anschließend werden 5µl des Amplifikationsproduktes mit 1µl Ladepuffer auf einer 96-Well-Platte gemischt, blau angefärbt und beschwert. Das mit dem Ladepuffer beschwerte Amplifikationsprodukt wird nun in die Taschen des 1,5%igen Agarosegels pipettiert. Dabei wird in die erste Tasche der Qiagen®-Leiter (GelPilot 50bp Ladder) als molekularer Gewichtsmarker (Längenstandard, 50bp), in die letzte Tasche ein PCR-Ansatz mit Aqua als Negativkontrolle pipettiert. Bei einer Spannung von 120V, und einer Laufzeit von 45 Minuten

werden die Proben gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach erfolgter Gelelektrophorese kann die DNA durch UV-Licht visualisiert und dokumentiert werden. Das Housekeeping-Gen β -Globin besitzt eine Größe von 167bp, die beiden MCPyV-Produkte 191bp oder respektive 138bp.

3. 7 Aufreinigung der PCR-Produkte

Um das gewonnen PCR-Produkt sequenzieren zu können muss dieses zunächst gereinigt werden. Dazu wird das QIAquick® PCR Purification Kit von QIAGEN® eingesetzt.

Im ersten Schritt der Purifizierung wird PB-Puffer versetzt mit pH-Indikator eingesetzt. Einem Verhältnis von 1:250 entsprechend werden 120 μ l pH-Indikator 30ml PB-Puffer beigemischt. Die Farbe des PB-Puffers mit pH-Indikator sollte nun gelblich sein und damit einen pH-Wert $\leq 7,5$ anzeigen. Nur in diesem Bereich ist eine Bindung der DNA an die Säulenmembran gewährleistet.

50 μ l PB-Puffer werden nun mit 10 μ l des PCR-Produkts in einer frischen PCR-Tube gemischt.

Die Probe wird nun auf die Membran einer QIAquick®-Säule aufgetragen und bei 17.000xg über 60 Sekunden bei Raumtemperatur zentrifugiert. Dadurch wird die DNA an die Säulenmembran gebunden. Der Durchfluss wird in einem Sammelgefäß aufgefangen und verworfen. Die Säule wird in das alte Sammelgefäß eingesetzt und dessen Membran nun mit 750 μ l PE-Puffer gewaschen. Erneut wird bei 17.000xg zweimalig für 60 Sekunden zentrifugiert und der Durchfluss verworfen, um die Membran der Säule komplett zu trocknen. Die Säule wird nun in ein sauberes 1,5 Eppendorfgefäß gesetzt. Abschließend wird die gewaschene DNA in 1x50 μ l und 1x30 μ l EB-Puffer von der Säule eluiert. Der Elutionspuffer wird jeweils über 1 Minute auf der Säule inkubiert, um dann die DNA durch Zentrifugation mit 17.000xg zu eluieren. Das aufgereinigte PCR-Produkt wird photometrisch und in einem Agarosegel quantifiziert. Geeicht wird das Photometer mit EB-Puffer als Nullwert. Sämtliche gewonnene Proben werden bei minus 20°C gelagert.

3. 8 Sequenzierung

Zur Sequenzierung wird eine 96well-Platte der Firma Eurofins mit einem Gesamtvolumen von 15µl pro Feld sowohl mit dem purifizierten PCR-Produkt mit einem Volumen von 10µl und einer Konzentration von 2ng/µl im Gesamtvolumen, als auch mit dem jeweiligen Primer (MCV138 reverse oder MCV191 reverse) mit einem Volumen von 5µl und einer Konzentration von 15pmol/µl im Gesamtvolumen beschickt. Die beladene 96well-Platte wird versiegelt und bei Zimmertemperatur zur Sequenzierung an das Eurofins Genomics Sequencing Department Deutschland versandt.

4. Ergebnisse

4. 1 Patientenkollektiv und Untersuchungsmaterial

Das Untersuchungsmaterial umfasste sowohl Exzisionen von Patienten mit Merkel-Zell-Karzinom (MZK) ohne Metastasierung als auch Exzisionen von Patienten mit zum Erfassungszeitraum metastasiertem MZK. Ferner wiesen 5 Patienten einen weiteren oder mehrere weitere nicht-MZK Tumore der Haut auf. Diese wurden ebenfalls in die Untersuchung eingeschlossen.

Bei 17 Patienten lag zum Zeitpunkt der Erfassung ein MZK ohne Filiae vor. Das Verhältnis männlich zu weiblich betrug 9:8 bei einem Durchschnittsalter von 80 Jahren im erfassten Kollektiv (Abbildung 5 und 6). Dabei lag das durchschnittliche Alter der Frauen bei 81,25 Jahren, das der Männer bei 78,67 Jahren. Drei der Patienten präsentierten zusätzlich nicht-MZK Tumore der Haut: Patient 2 zwei Basalzellkarzinome, Patientin 5 einen Morbus Bowen und Patient 9 ein weiteres Basalzellkarzinom (Tabelle 5).

In der Vergleichsgruppe wiesen 12 Patienten sowohl ein Merkel-Zell-Karzinom als auch mindestens eine Haut- bzw. Lymphknotenmetastase desselben auf. Dabei fanden sich prädominierend Frauen mit einem Verhältnis von 9:3 (Abbildung 7). Das Durchschnittsalter in der Vergleichsgruppe lag bei 77,5 Jahren (Abbildung 8). Das durchschnittliche Alter der Frauen lag auch hier mit 78,33 Jahren höher als das der Männer mit 75 Jahren. Die Patienten 18 und 24 hatten zusätzlich einen Sekundärtumor. Es fanden sich bei ihnen zwei primär kutane Marginalzonen-B-Zell-Lymphome (Synonym: MALT-Lymphom) bzw. ein dysplastischer melanozytärer Nävus vom Junktionsstyp (Tabelle 6).

Das Durchschnittsalter im Gesamtkollektiv betrug 78,9 Jahre, wobei das Verhältnis Männer zu Frauen 12:17 betrug. Das durchschnittliche Alter der Frauen im Gesamtkollektiv lag bei 79,71 Jahren, das der Männer bei 77,75 Jahren.

Als Untersuchungsmaterial diente in Formalin fixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe (FFPE-Tissue), das in den Jahren 2003 bis 2012 entnommen wurde. Die Patienten befanden sich in ambulanter oder stationärer Betreuung der Universitäts-Hautklinik Tübingen.

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität und des Universitätsklinikums Tübingen bewilligt.

Tabelle 5: Patientenkollektiv: Merkel-Zell-Karzinom ohne Metastasierung. m: männlich; w: weiblich

Patient	(m/w)	Alter	nicht-MZK Tumor der Haut
1	w	84	
2	m	90	Basalzellkarzinome (Diagnosestellung zeitgleich mit MZK)
3	w	93	
4	w	76	
5	w	97	MZK in Assoziation mit M. Bowen (Diagnosestellung zeitgleich mit MZK)
6	w	76	
7	w	74	
8	m	76	
9	m	73	Basalzellkarzinom (Diagnosestellung ein Jahr nach MZK)
10	w	85	
11	m	70	
12	m	90	
13	m	76	
14	m	70	
15	w	65	
16	m	80	
17	m	83	

Verhältnis: Männlich zu weiblich im Kollektiv MZK ohne Metastasierung

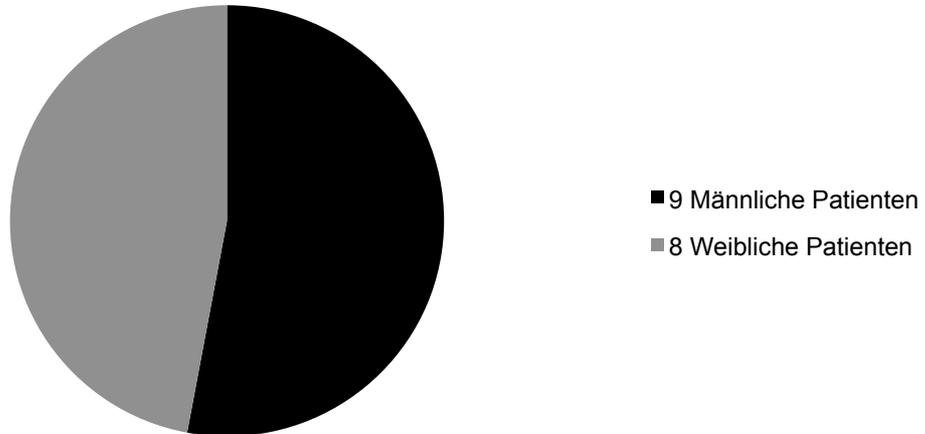


Abbildung 5: Geschlechterverteilung im Patientenkollektiv: Merkel-Zell-Karzinom ohne Metastasierung

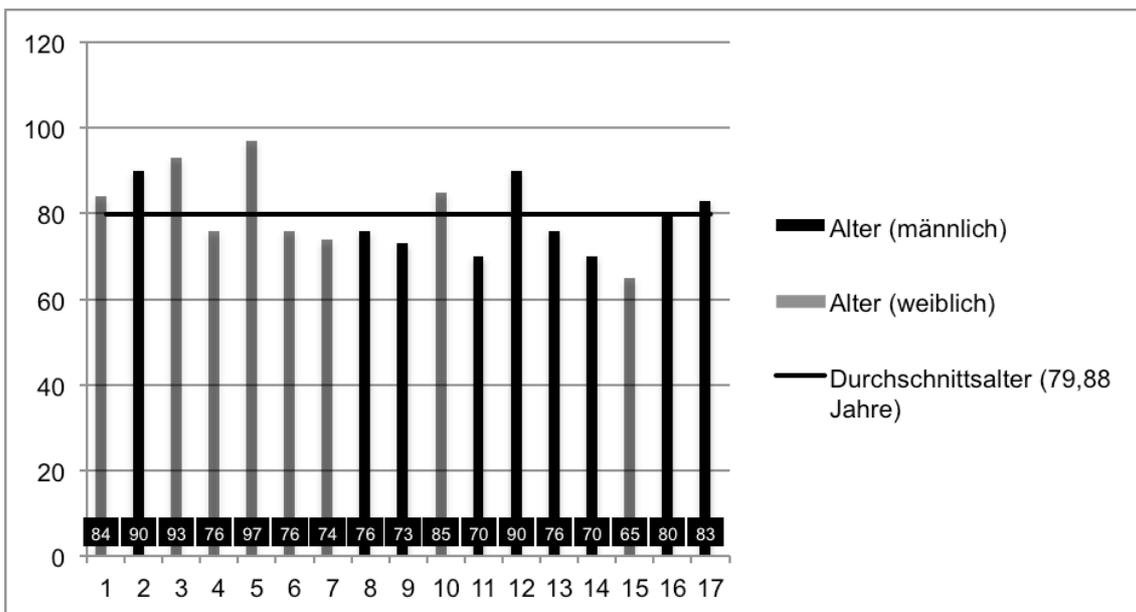


Abbildung 5: Altersverteilung im Patientenkollektiv: Merkel-Zell-Karzinom ohne Metastasierung. x-Achse: Patient; y-Achse: Alter in Jahren; Schwarze Box: Alter des Patienten; Waagerechte Linie: Durchschnittsalter

Tabelle 6: Patientenkollektiv: Merkel-Zell-Karzinom mit Metastasierung. m: männlich; w: weiblich; Met: Metastase; LK: Lymphknoten

Patient	(m/w)	Alter	Art der Metastase	nicht-MZK Tumor der Haut
18	m	67	Sentinel-Lymphknoten	Primär kutanes Marginalzonen-B-Zell-Lymphom (Diagnosestellung 5 Jahre vor MZK)
19	w	85	ossäre Metastase	
20	w	87	Intransitfilia	
21	w	91	LK-Metastase	
22	w	63	Sentinel-Lymphknoten	
23	w	64	Sentinel-Lymphknoten	
24	w	81	LK-Met./ dermale Met./ LK-Met./ LK-Met.	Dysplastischer melanozytärer Nävus vom Junktionstyp (Diagnosestellung 2 Jahre nach MZK)
25	m	83	LK-Metastase	
26	m	75	Sentinel-Lymphknoten	
27	w	98	LK-Met.	
28	w	51	LK-Met.	
29	w	85	LK-Met.	

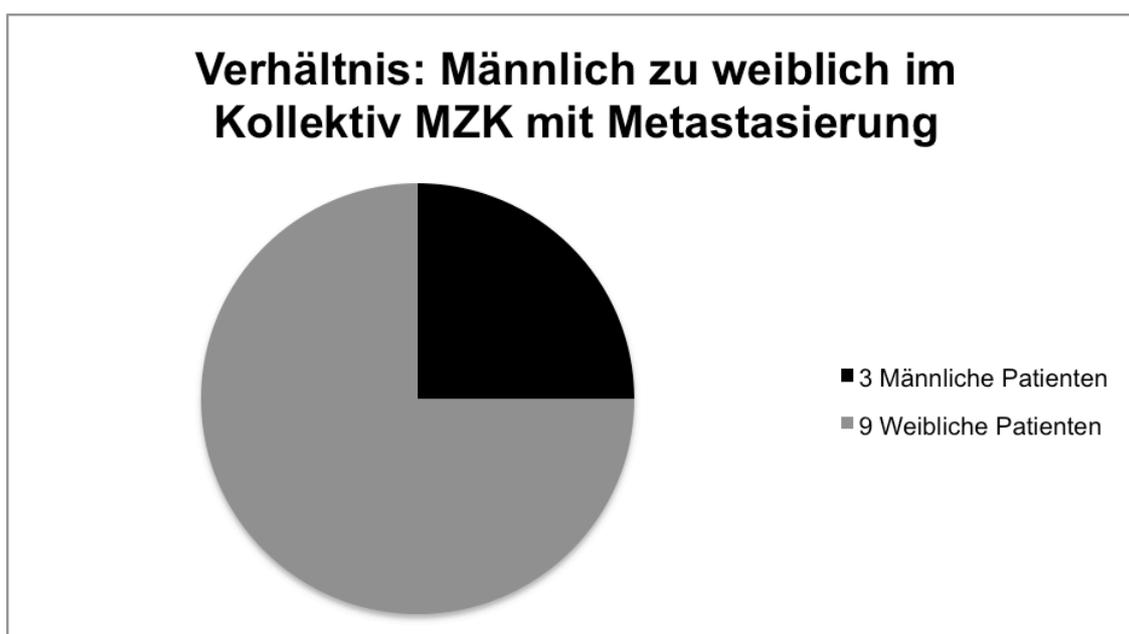


Abbildung 6: Geschlechtsverteilung im Patientenkollektiv: Merkel-Zell-Karzinom mit Metastasierung

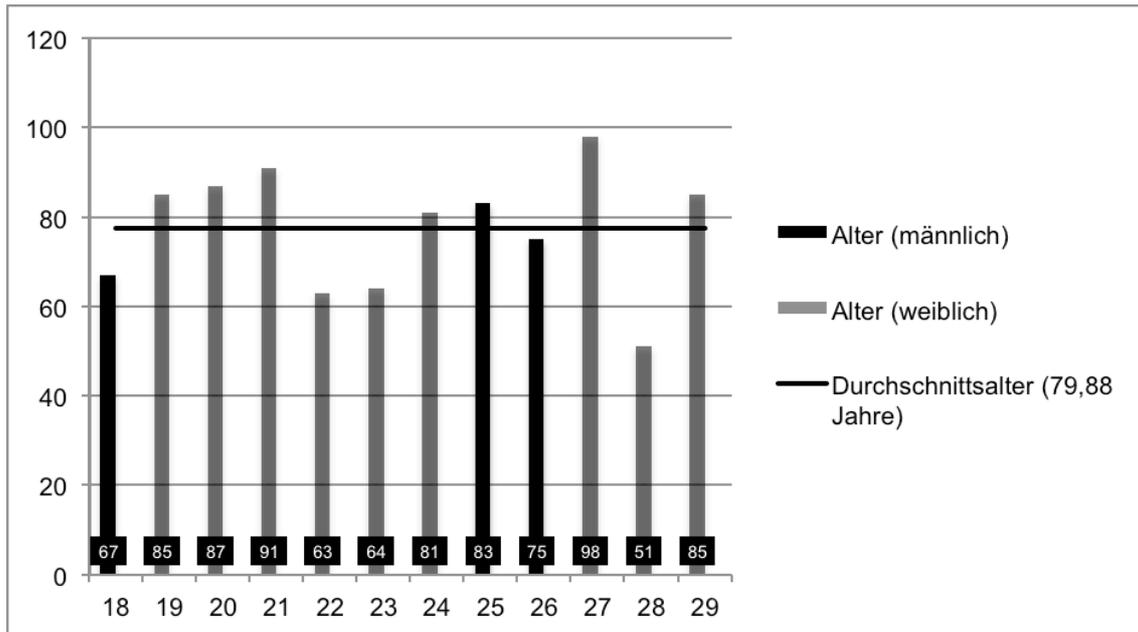
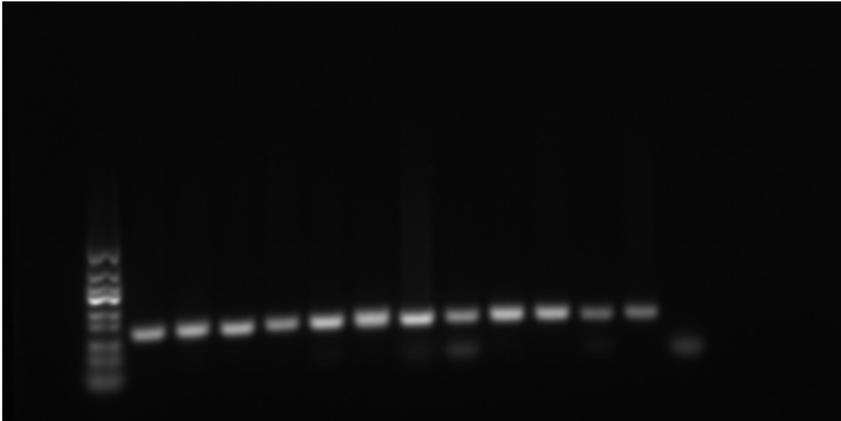


Abbildung 7: Altersverteilung im Patientenkollektiv: Merkel-Zell-Karzinom mit Metastasierung. X-Achse: Patient; y-Achse: Alter in Jahren; Schwarze Box: Alter des Patienten; Waagerechte Linie: Durchschnittsalter

4. 2 Ergebnisse des β -Globin-Nachweises aus Tumorgewebe

Die Qualität der amplifizierten DNA wurde über den Nachweis des beta-Globin-Gens mittels PCR geprüft. Nur wenn es zu einem Nachweis des konstitutiv exprimierten Housekeeping-Gens als Zeichen suffizienter DNA kam, wurden die DNA-Proben weiterverarbeitet und der PCR zum Nachweis des Merkel-Zell-Polyomavirus überführt. Es wurden der Forward-Primer (β -globin for 5' - ACA CAA CTG TGT TCA CTA GCA AC - 3') und der Reverse-Primer (β -globin rev 5' - TGG TCT CCT TAA ACC TGT CTT G - 3') eingesetzt. Bei erfolgreichem Nachweis des beta-Globins und bei ausreichender Menge amplifizierter DNA zeigte sich nach Anfärben des Gels mit Gel Red Nucleic Acid Stain unter UV-Licht eine Bande bei 167 bp (Abbildung 9).



L 25P 25M 26P 26M 27P 27P 27M 27M 28P 28M 29P 29M H₂O

Abbildung 8: Agarose-Gelelektrophorese zum Nachweis von β -Globin-DNA bei Patienten mit metastasiertem Merkel-Zell-Karzinom.

L: Längenstandard; H₂O: Wasserkontrolle ohne DNA; P: Primärtumor; M: Metastase; S: Sekundärtumor; Zahl: Patientenummer

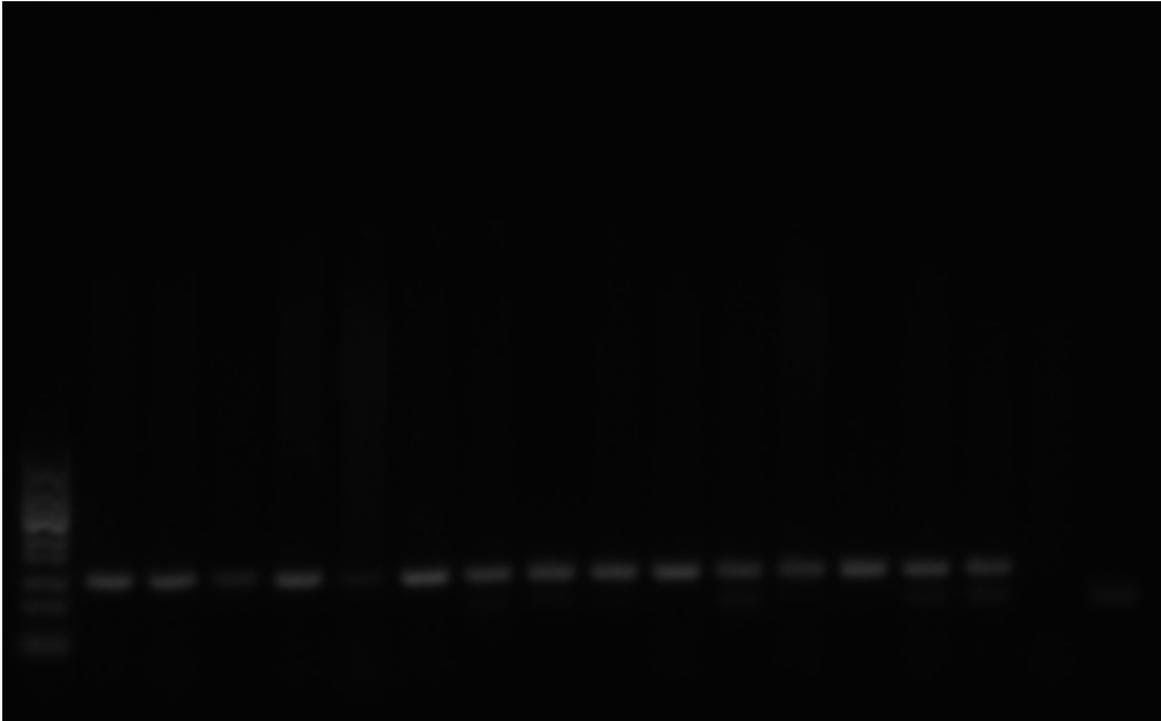
Bei allen gewonnenen Gewebeproben der 29 Patienten konnte somit ausreichend DNA amplifiziert werden. Das Vorhandensein der Bande in Höhe der Positivkontrolle bei 167bp rechtfertigte somit die anschließende Untersuchung der DNA auf das Merkel-Zell-Polyomavirus mittels PCR.

4. 3 Prävalenznachweis des MCPyV in Primärtumorgewebe über MCV138

Für den Nachweis des MCPyV wurden zwei verschiedene Primersets eingesetzt.

Neben dem Primerset für ein 191bp langes Produkt wurde auch eines für ein 138bp großes Fragment verwendet. Eingesetzt wurde der Primer MCV138forward (5' - GGT TAG AGA TGC TGG AAA TGA CC - 3') und der Primer MCV138reverse (5' - CAA ATA AGC AGC AGT ACC AGG C - 3'). Diese zielen auf die Large T-Antigen Region (Andres, Belloni et al. 2010).

a)



L 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 H₂O

b)



L 17 H₂O

Abbildung 9 a), b): Gelelektrophorese zum Nachweis des 138bp-Produktes mit Merkel-Zell-Karzinom ohne Metastasierung

L: Längenstandard; H₂O: Wasserkontrolle ohne DNA; Zahl: Spur

Tabelle 7: MCPyV-Nachweis bei Merkel-Zell-Karzinom ohne Metastasierung über MCV138. +: positiv für MCPyV; -: negativ für MCPyV

Patient	PCR (MCV138)	Art des Tumorgewebes	Spur
1	+	Primärtumor: MZK	1
2	+	Primärtumor: MZK	2
3	+	Primärtumor: MZK	3
4	+	Primärtumor: MZK	4

5	+	Primärtumor: MZK	5
6	+	Primärtumor: MZK	6
7	+	Primärtumor: MZK	7
8	+	Primärtumor: MZK	8
10	+	Primärtumor: MZK	9
11	+	Primärtumor: MZK	10
12	+	Primärtumor: MZK	11
13	+	Primärtumor: MZK	12
14	+	Primärtumor: MZK	13
15	+	Primärtumor: MZK	14
16	+	Primärtumor: MZK	15
17	-	Primärtumor: MZK	16
9	+	Primärtumor: MZK	17

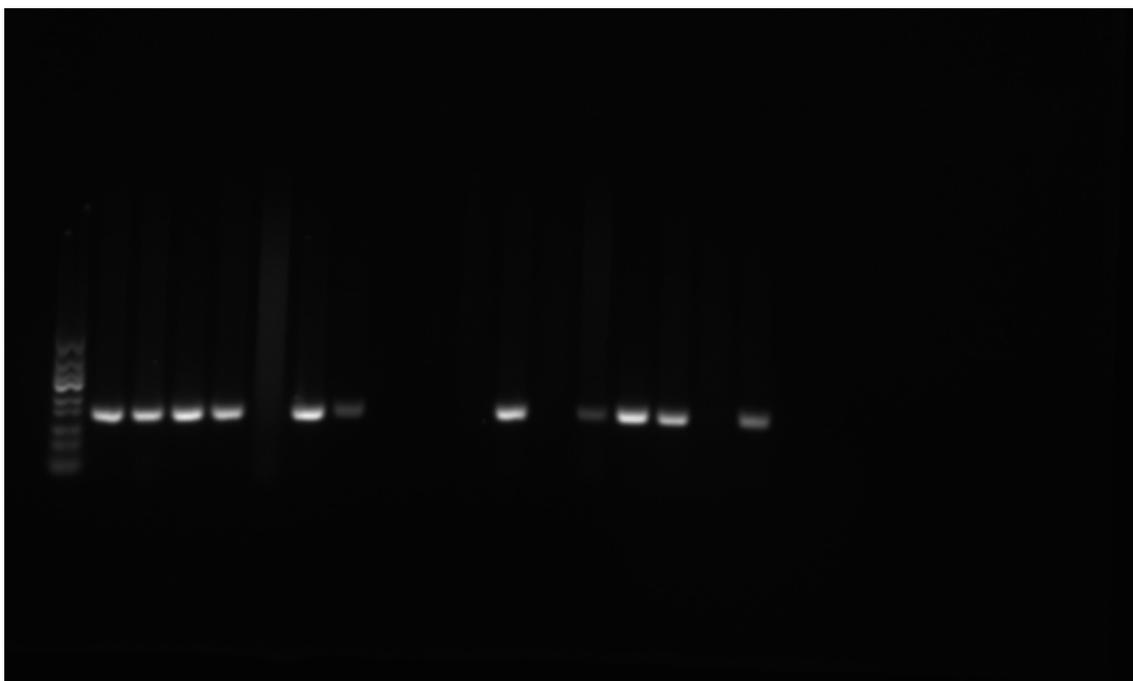


Abbildung 11: MCPyV-Nachweis bei Merkel-Zell-Karzinom ohne Metastasierung über MCV138

Von 17 Patienten in der Gruppe mit Merkel-Zell-Karzinom ohne Metastasenabsiedlung (Tabelle 7) zeigten sich 16/17 (94,12%) Patienten positiv für MCPyV-DNA. Nur bei 1/17 (5,88%) MZK konnte keine MCPyV-DNA detektiert werden (Abbildung 11). Die Spuren 1 bis 15 zeigen spezifische Banden im Bereich von 138bp auf (Abbildung 10a). Aus dem ursprünglichen Kollektiv wurde Patient 9 in einem gesonderten Gel dargestellt. Auf Spur 17 zeigt seine DNA ein Amplifikat für MCV138 (Abbildung 10b).

4. 4 Prävalenznachweis des MCPyV in Primärtumorgewebe über MCV191

Für den Nachweis eines 191bp langen Produktes wurden die Primer MCV191forward (5' - CCA CTT TAT TAT CTT AGC CCA T - 3) und MCV191reverse (5' - TCC TTT TGG CTA GAA CAG TGT C - 3') eingesetzt. Diese zielen insbesondere auf die Small T-Antigen Region (Andres, Belloni et al. 2010).



L 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 H₂O

Abbildung 12: Agarose-Gelelektrophorese zum Nachweis des 191bp-Produktes des MCPyV bei Patienten mit Merkel-Zell-Karzinom ohne Metastasierung.

L: Längenstandard; H₂O: Wasserkontrolle ohne DNA; Zahl: Spur

Tabelle 8: MCPyV-Nachweis bei Merkel-Zell-Karzinom ohne Metastasierung über MCV191. +: positiv für MCPyV; -: negativ für MCPyV

Patient	PCR (MCV191)	Art des Tumorgewebes	Spur
1	+	Primärtumor: MZK	1
2	+	Primärtumor: MZK	2
3	+	Primärtumor: MZK	3
4	+	Primärtumor: MZK	4
5	-	Primärtumor: MZK	5
6	+	Primärtumor: MZK	6
7	+	Primärtumor: MZK	7

8	-	Primärtumor: MZK	8
9	-	Primärtumor: MZK	9
10	-	Primärtumor: MZK	10
11	+	Primärtumor: MZK	11
12	-	Primärtumor: MZK	12
13	+	Primärtumor: MZK	13
14	+	Primärtumor: MZK	14
15	+	Primärtumor: MZK	15
16	-	Primärtumor: MZK	16
17	+	Primärtumor: MZK	17

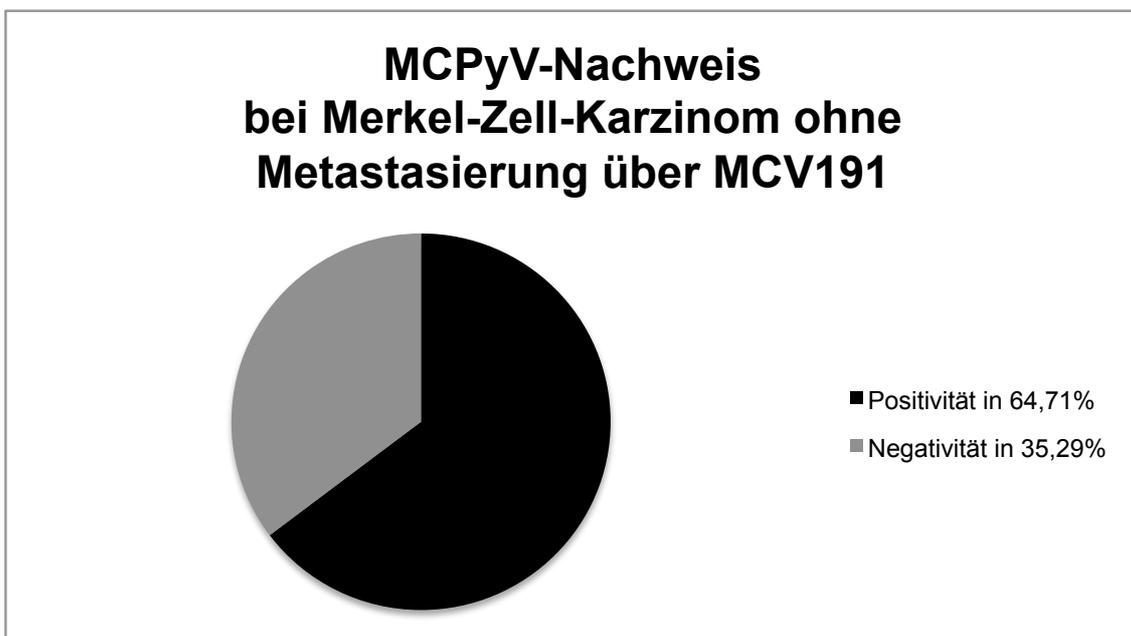


Abbildung 13: MCPyV-Nachweis bei Merkel-Zell-Karzinom ohne Metastasierung über MCV191

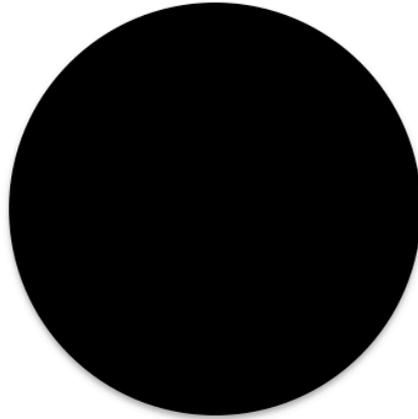
Bei 11/17 (64,71%) Patienten in der Gruppe mit Merkel-Zell-Karzinom ohne Metastasenabsiedlung konnte MCPyV-DNA detektiert werden. Nur in 6/17 (35,29%) MZKs wurde kein PCR-Produkt für MCV191 amplifiziert (Abbildung 13). Die Spuren 1, 2, 3, 4, 6, 7, 11, 13, 14, 15 und 17 zeigen in der Agarose-Gelelektrophorese eine spezifische Bande im Bereich 191bp. Die Spuren 5, 8, 9, 10, 12 und 16 verblieben negativ (Abbildung 12 und Tabelle 8).

4. 5 Übersicht: Prävalenznachweis des MCPyV in Primärtumorgewebe

Tabelle 9: Übersicht: MCPyV-Status nicht-metastasierter Merkel-Zell-Karzinome. m: männlich; w: weiblich; +: positiv für MCPyV; -: negativ für MCPyV

Patient	(m/w)	Alter	PCR (MCV138)	PCR (MCV191)	Art des Tumorgewebes
1	w	84	+	+	Primärtumor: MZK
2	m	90	+	+	Primärtumor: MZK
3	w	93	+	+	Primärtumor: MZK
4	w	76	+	+	Primärtumor: MZK
5	w	97	+	-	Primärtumor: MZK
6	w	76	+	+	Primärtumor: MZK
7	w	74	+	+	Primärtumor: MZK
8	m	76	+	-	Primärtumor: MZK
9	m	73	+	-	Primärtumor: MZK
10	w	85	+	-	Primärtumor: MZK
11	m	70	+	+	Primärtumor: MZK
12	m	90	+	-	Primärtumor: MZK
13	m	76	+	+	Primärtumor: MZK
14	m	70	+	+	Primärtumor: MZK
15	w	65	+	+	Primärtumor: MZK
16	m	80	+	-	Primärtumor: MZK
17	m	83	-	+	Primärtumor: MZK
Gesamt		79,88	16/17	11/17	
%			94,12%	64,71%	

**MCPyV-Nachweis bei Merkel-Zell-Karzinom ohne
Metastasierung über
mindestens ein Primerset (MCV138 oder MCV191)**



■ Positivität in 100% für
mindestens ein Primerset

Abbildung 14: MCPyV-Nachweis bei Merkel-Zell-Karzinom ohne Metastasierung über mindestens ein Primerset (MCV138 oder MCV191)

MCPyV-DNA konnte mit mindestens einer der verwendeten Primerkombinationen im gesamten Kollektiv der Patienten mit Merkel-Zell-Karzinom ohne Metastasen nachgewiesen werden (Abbildung 14). Auch Patient 17, als einziger negativ für MCV138, zeigte Positivität für MCV191. Bei 16/17 (94,12%) Patienten gelang der Prävalenznachweis des MCPyV in Primärtumorgewebe über MCV138, jedoch lediglich bei 11/17 (64,71%) Patienten über MCV191 (Tabelle 9).

MCPyV-Nachweis bei Merkel-Zell-Karzinom ohne Metastasierung über beide Primersets (MCV138 und MCV191)

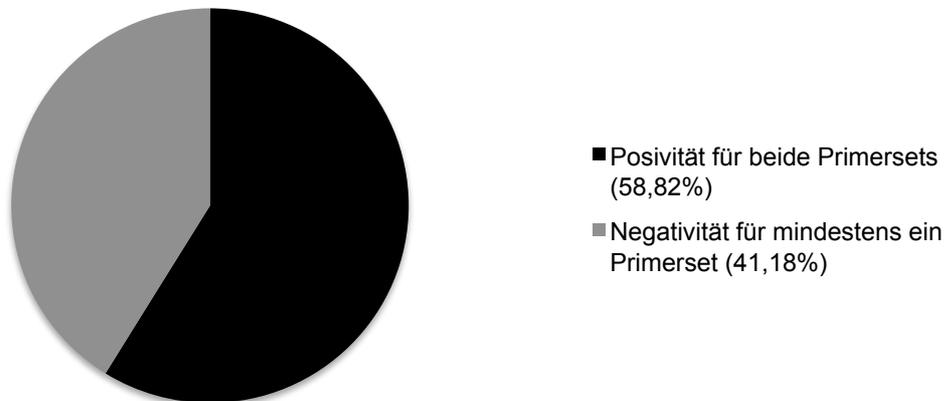


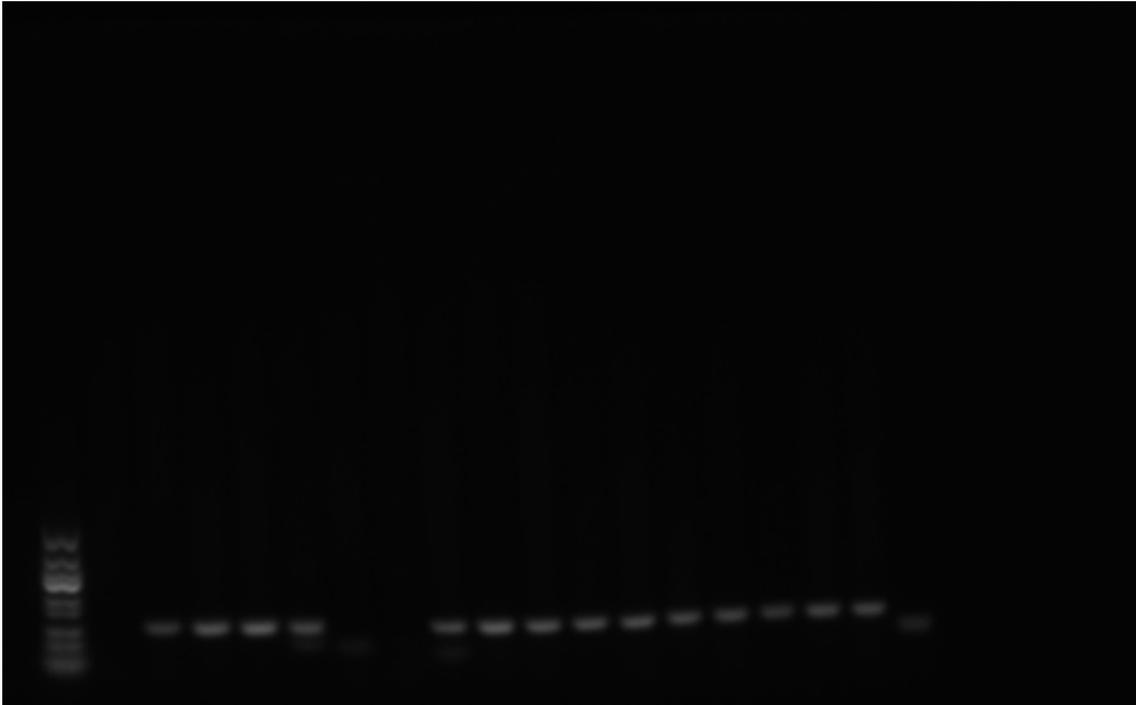
Abbildung 15: MCPyV-Nachweis bei Merkel-Zell-Karzinom ohne Metastasierung über beide Primersets (MCV138 und MCV191)

Ein Amplifikat für beide Primersets wiesen 10/17 (58,82%) Patienten auf (Abbildung 15). 6/10 (60%) dieser Patienten waren weiblich und hatten ein Durchschnittsalter von 78 Jahren, 4/10 (40%) waren männlich mit einem Durchschnittsalter von 76, 5 Jahren.

4. 6 Prävalenznachweis des MCPyV in Primärtumorgewebe und Metastase über MCV138

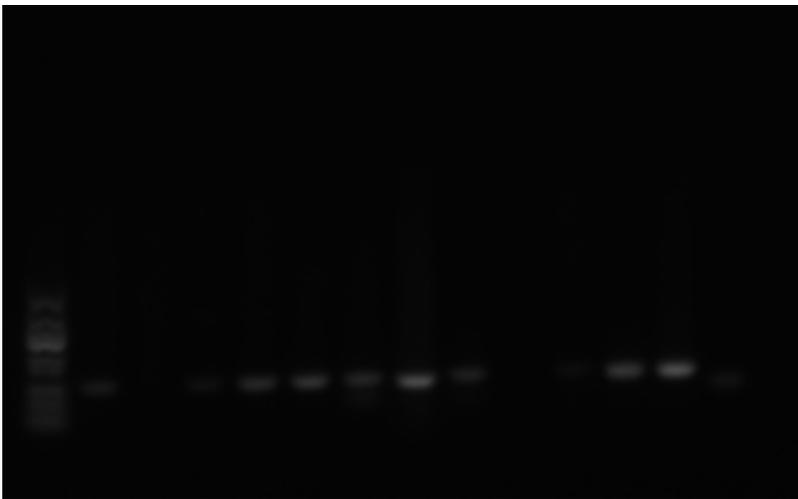
In der Gruppe der Patienten mit metastasiertem Merkel-Zell-Karzinom wurde die Prävalenz der MCPyV-DNA sowohl im Primärtumor als auch in der korrespondierenden Metastase desselben Patienten untersucht und vergleichend gegenübergestellt. Dazu wurden in benachbarte Spuren jeweils das PCR-Produkt des Primärtumors eines MZK und die DNA der korrespondierenden Metastase geladen. Der Nachweis erfolgte zunächst über das MCV138-Primerset (Abbildung 16 a, b).

a)



L 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 H₂O

b)



L 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 H₂O

Abbildung 16 a), b): Agarose-Gelelektrophorese zum Nachweis des 138bp-Produktes des MCPyV bei Patienten mit Merkel-Zell-Karzinom und korrespondierender Metastase
L: Längenstandard; H₂O: Wasserkontrolle ohne DNA; Zahl: Spur

Tabelle 10: MCPyV-Nachweis bei metastasiertem MZK über MCV138. +: positiv für MCPyV; -: negativ für MCPyV

Patient	Primärtumor: MZK PCR (MCV138)	Metastase PCR (MCV138)	Spur
18	-		1
		+	2
19	+		3
		+	4
20	+		5
		-	6
21	-		7
		+	8
22	+		9
		+	10
23	+		11
		+	12
24	+		13
		+	14
		+	15
		+	16
		+	17
25	+		18
		-	19
26	+		20
		+	21
27	+		22
	+		23
		+	24
		+	25
28	-		26
		+	27
29	+		28
		+	29

MCPyV-positive/-negative Primärtumor-Proben (MCV138)

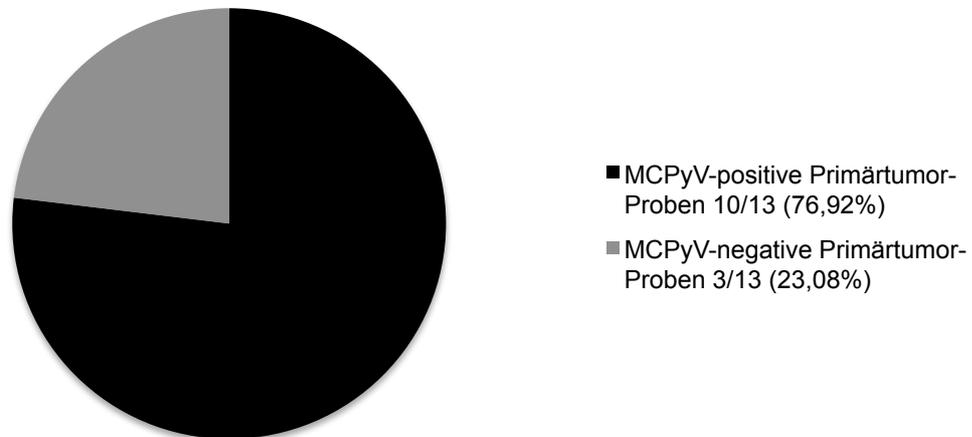


Abbildung 17: MCPyV-positive/-negative Primärtumor-Proben (MCV138)

MCPyV-positive/-negative Primärtumor-Patienten mit Metastase (MCV138)

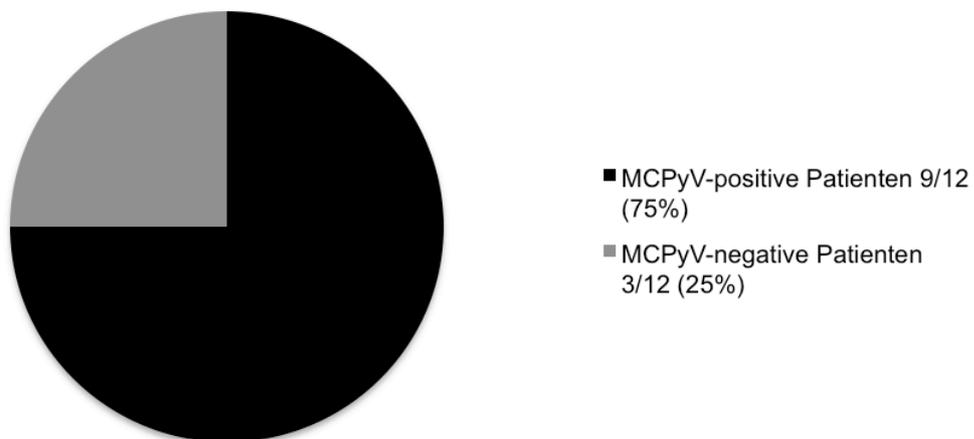


Abbildung 18: MCPyV-positive/-negative Primärtumor-Patienten mit Metastase (MCV138)

Von den 12 Patienten mit Merkel-Zell-Karzinom und Metastasenabsiedlung waren 10/13 (76,92%) Primärtumor-Proben mit MCPyV-DNA infiziert. Lediglich 3/13 (23,08%) Primärtumor-Proben waren dies nicht (Abbildung 17). Dabei wies Patient 27 sowohl einen Primärtumor im Jahr 2003 (Spur 22) als auch ein Lokalrezidiv im Jahr 2008 (Spur 23) auf. Sowohl die Primärtumor-Probe als auch die Probe des Lokalrezidivs fünf Jahre später zeigten Positivität für MCPyV-DNA. Zusammenfassend konnte insgesamt somit bei 9/12 (75%)

Patienten DNA des MCPyV detektiert werden, wobei nur 3/12 (25%) Patienten ohne MCPyV Nachweis verblieben (Abbildung 18). Die Spuren 3, 5, 9, 11, 13, 18, 20, 22, 23, 28 zeigen in der Agarose-Gelelektrophorese eine spezifische Bande im Bereich 138bp. Lediglich die Spuren 1, 7 und 26 waren negativ (Tabelle 10).

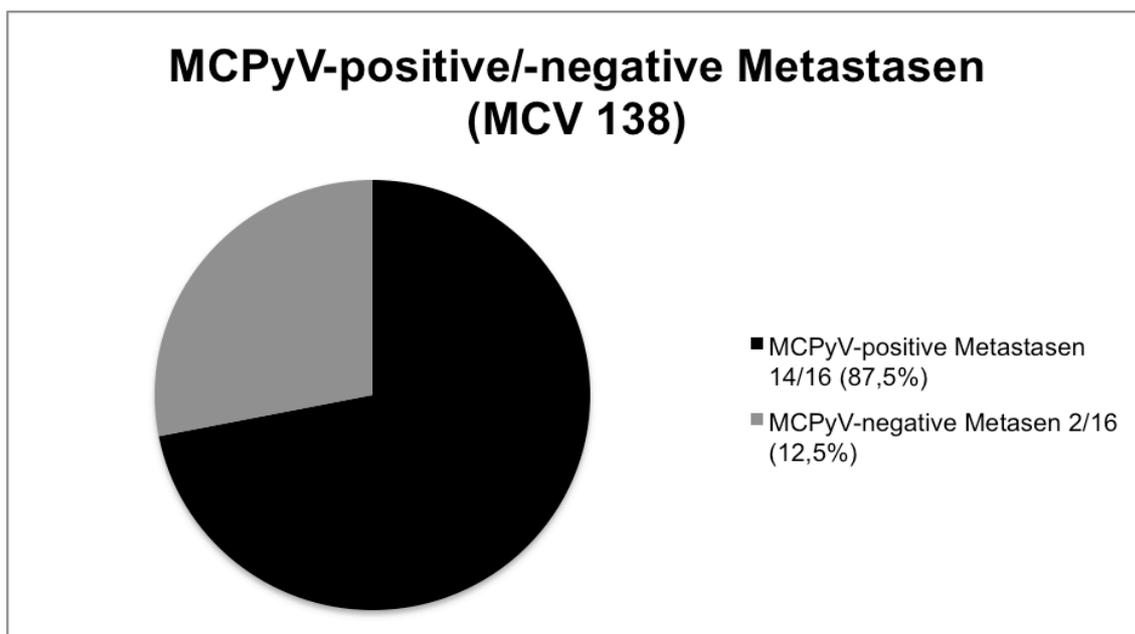


Abbildung 19: MCPyV-positive/-negative Metastasen (MCV138)

Korrespondierend zu den Primärtumor-Proben wurden bei 12 Patienten insgesamt 16 Metastasen untersucht. Davon waren 13 Lymphknotenmetastasen (81,25%) und mit jeweils 6,25% eine Intransit-, eine Knochen- und eine Hautmetastase vertreten. Insgesamt konnte bei 14/16 (87,5%) Metastasen MCPyV-DNA amplifiziert werden, nur bei 2/16 (12,5%) Metastasen gelang dies nicht (Abbildung 19). Bei Patient 24 und 27 lagen insgesamt 6 Proben für Metastasengewebe vor, die durchgehend Positivität (100%) für MCPyV-DNA zeigten.

Ein spezifisches PCR-Produkt war in den Spuren 2, 4, 8, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 21, 24, 25, 27 und 29 möglich, ertraglos waren Spur 6 und 19.

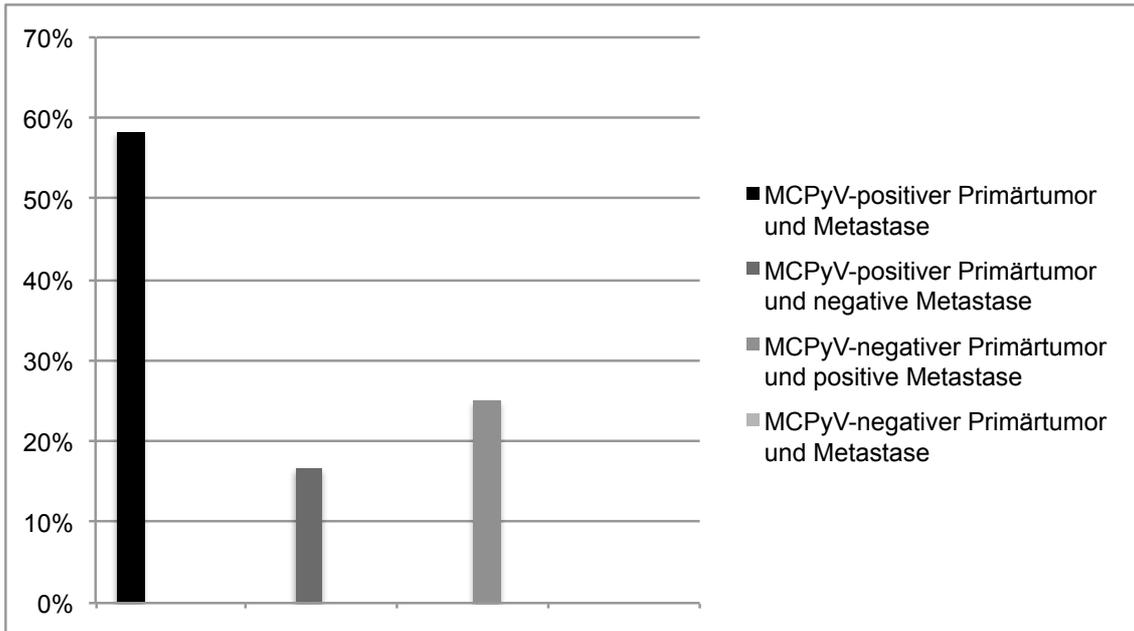


Abbildung 20: Verhältnis von Primärtumor zu korrespondierender Metastase hinsichtlich der MCPyV-Prävalenz (MCV138).

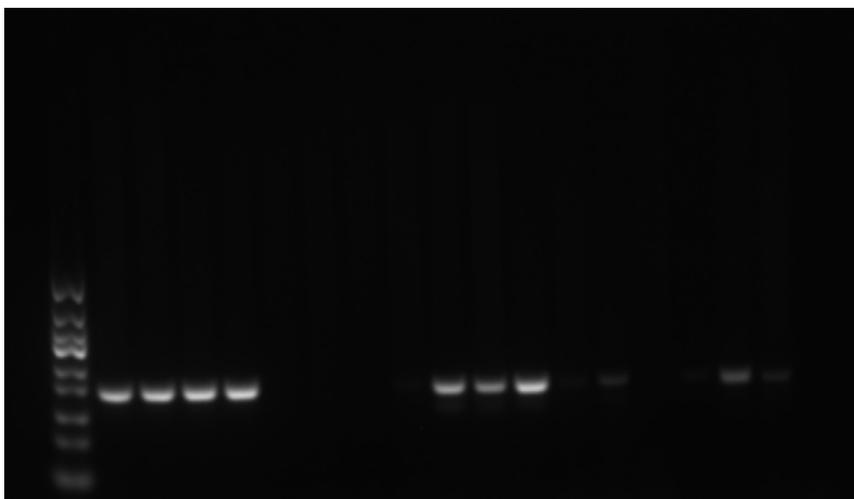
Ein Amplifikat für MCPyV-DNA sowohl für den Primärtumor als auch für die zugehörige Metastase wiesen 7/12 (58,33%) Patienten auf (Patient 19, 22, 23, 24, 26, 27 und 29). Bei 3/12 (25%) Patienten konnte keine MCPyV-DNA für den Primärtumor, allerdings für die korrespondierende Metastase (Patient 18, 21, 28), nachgewiesen werden. 2/12 (16,67%) Patienten hatten einen MCPyV-besetzten Primärtumor, jedoch eine nicht-infizierte Metastase (Patient 20, 25). Kein Patient in dieser Gruppe zeigte Negativität sowohl bei Primärtumor als auch bei zugehöriger Metastase (Abbildung 20).

4. 7. Prävalenz des MCPyV in Primärtumorgewebe und Metastasen über MCV191

Der Prävalenz-Nachweis der MCPyV-DNA sowohl im Primärtumor als auch in der korrespondierenden Metastase desselben Patienten wurde ebenfalls über das MCV191-Primerset geführt (Tabelle 11).

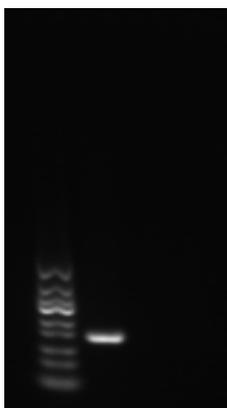
Anzumerken ist, dass der Nachweis des MCPyV in einer Metastase auf Spur 14 auf einem separatem Agarosegel stattfand, da das gewonnene PCR-Produkt zunächst nicht in ausreichender Menge zur Verfügung stand (Abbildung 21 a, b, c).

a)



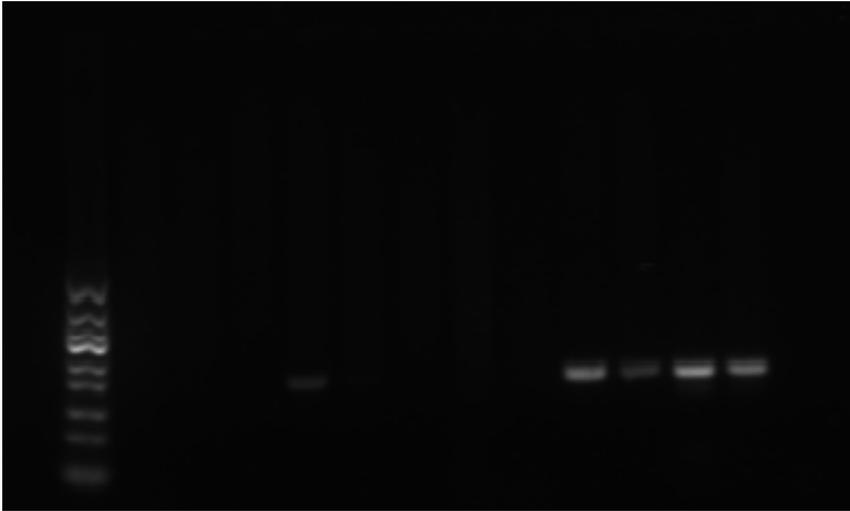
L 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 H₂O

b)



L 14 H₂O

c)



L 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 H₂O

Abbildung 21 a), b), c): Agarose-Gelelektrophorese zum Nachweis des 191bp-Produktes des MCPyV bei Patienten mit Merkel-Zell-Karzinom und korrespondierender Metastase.
L: Längenstandard; H₂O: Wasserkontrolle ohne DNA; Zahl: Spur

Tabelle 11: MCPyV-Nachweis bei metastasiertem MZK über MCV191. +: positiv für MCPyV; -: negativ für MCPyV

Patient	Primärtumor: MZK PCR (MCV191)	Metastase PCR (MCV191)	Spur
18	+		1
		+	2
19	+		3
		+	4
20	-		5
		-	6
21	-		7
		+	8
22	+		9
		+	10
23	+		11
		+	12
24	+		13
		+	14
		+	15
		+	16
		+	17
25	-		18
		-	19

26	-		20
		+	21
27	-		22
	-		23
		-	24
		-	25
28	+		26
		+	27
29	+		28
		+	29

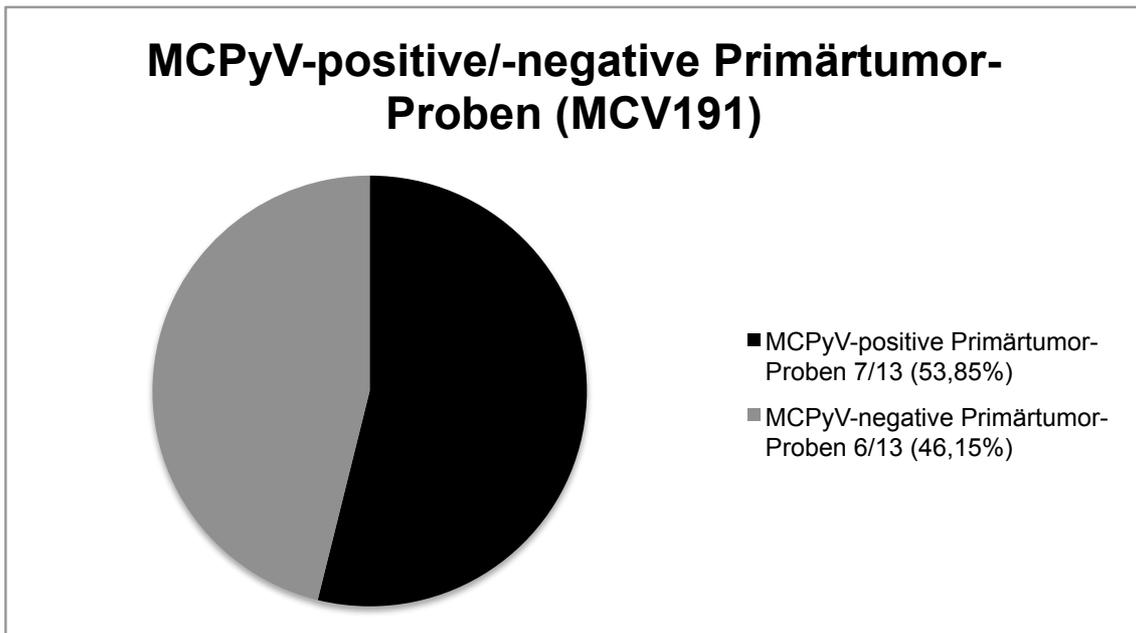


Abbildung 22: MCPyV-positive/ -negative Primärtumor-Proben (MCV191)

MCPyV-positive/-negative Primärtumor-Patienten mit Metastase (MCV191)

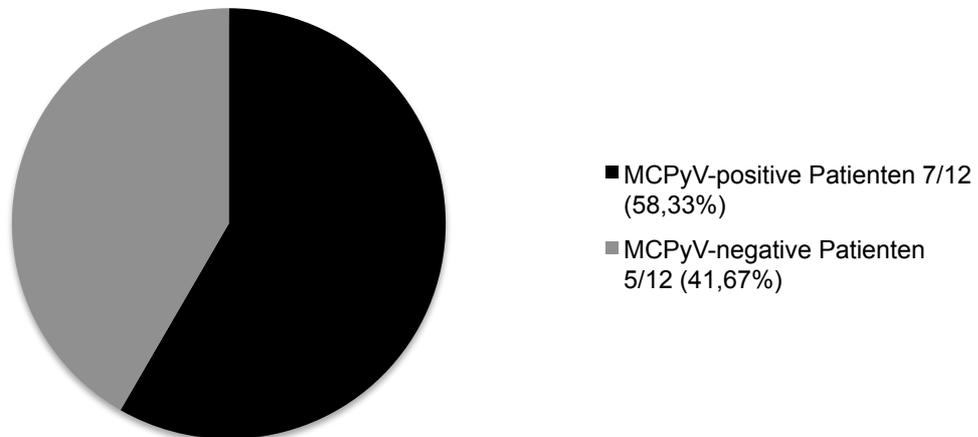


Abbildung 23: MCPyV-positive/ -negative Primärtumor-Patienten mit Metastase (MCV191)

Über das Primerset MCV191 präsentierten sich von den 12 Patienten in der Gruppe mit Merkel-Zell-Karzinom mit Metastasenabsiedlung 7/13 (53,85%) der Primärtumor-Proben positiv für MCPyV-DNA und somit weniger, als über das Primerset MCV138 (Abbildung 22). Negativ waren 6/13 (46,15%). Im Gegensatz zum erfolgreichen Nachweis des MCPyV über MCV138, war der Nachweis über MCV191 bei Patient 27 für seinen Primärtumor im Jahr 2003 (Spur 22), sein Lokalrezidiv im Jahr 2008 (Spur 23) und seine zwei Metastasen ertraglos.

Somit konnte bei 7/12 (58,33%) Patienten DNA des MCPyV detektiert werden. Bei 5/12 (41,67%) Patienten gelang dies nicht (Abbildung 23). In der Agarose-Gelelektrophorese waren in den Spuren 1, 3, 9, 11, 13, 26 und 29 spezifische Banden zu erkennen, nicht jedoch in den Spuren 5, 7, 18, 20, 22 und 23.

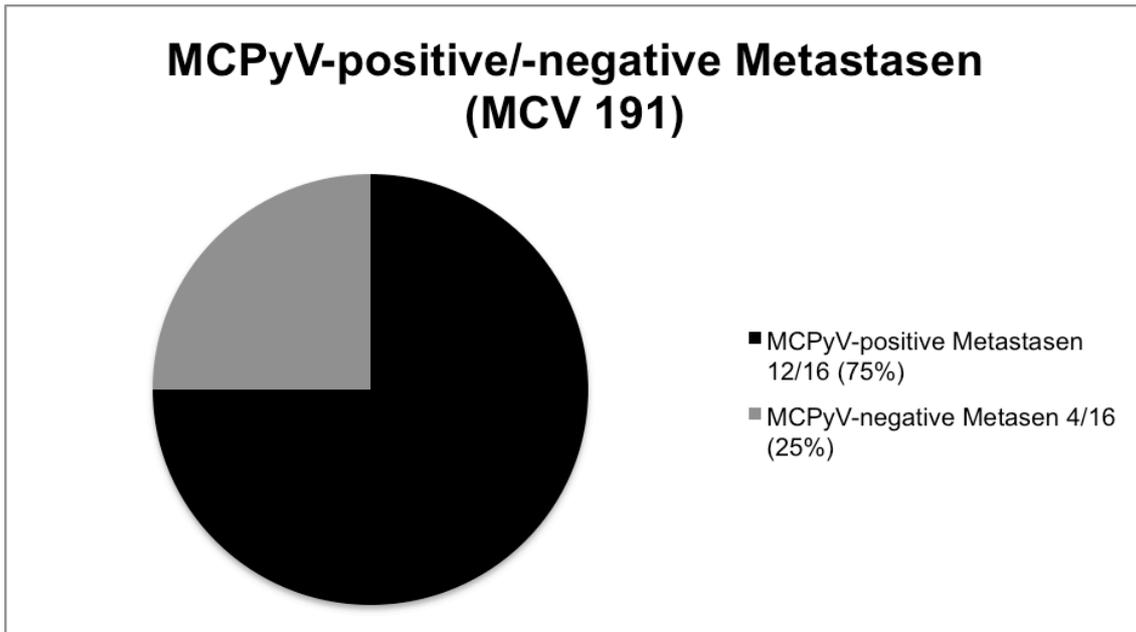


Abbildung 24: MCPyV-positive/-negative Metastasen (MCV191)

Ferner wurden 16 Metastasen der 12 Patienten aus der Gruppe der metastasierten MZKs untersucht. 12/16 (75%) dieser Exzisionen waren positiv, nur 4/16 (25%) negativ (Abbildung 24).

In Patient 24 mit 4 Metastasen unterschiedlicher Lokalisation konnte, wie auch schon bei dem Nachweis über MCV138, sowohl für den Primärtumor als auch für alle Metastasen MCPyV-DNA bestätigt werden. Lediglich Patient 27 zeigte sich komplett negativ für MCPyV-DNA über das Primerset MCV191, mit MCV138 konnte aber ein PCR-Produkt amplifiziert werden.

Der Nachweis suffizienter MCPyV-DNA gelang über die Spuren 2, 4, 8, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 21, 27 und 29. Ein Nachweis über die Spuren 6, 19, 24 und 25 gelang nicht.

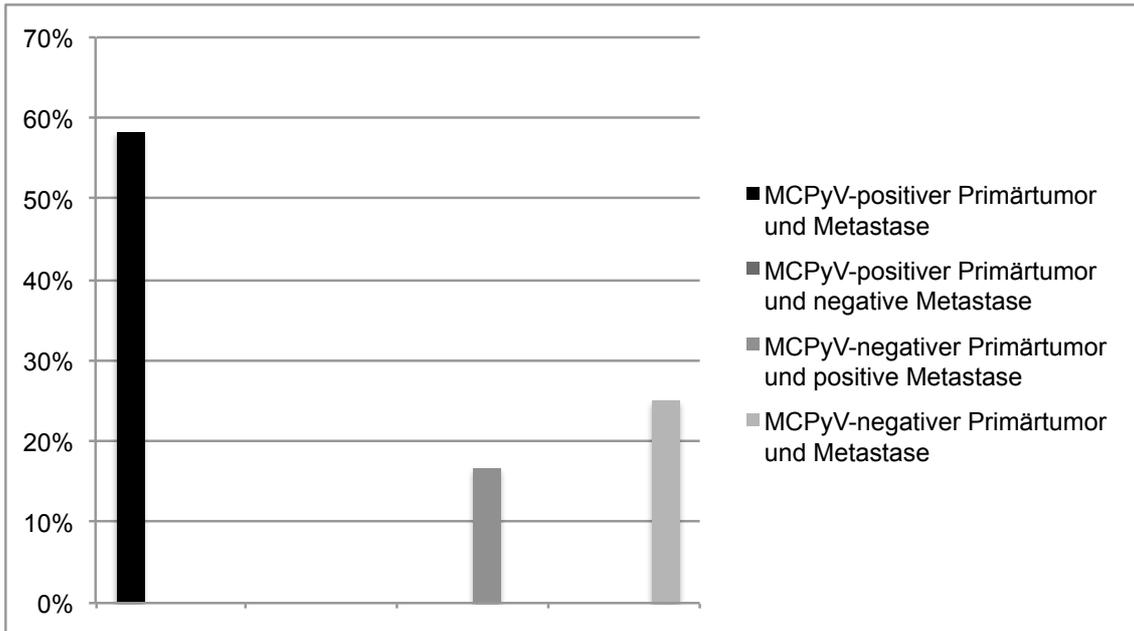


Abbildung 25: Verhältnis von Primärtumor zu korrespondierender Metastase hinsichtlich der MCPyV-Prävalenz (MCPyV191).

Sowohl für den Primärtumor als auch für die zugehörige Metastase wiesen 7/12 (58, 33%) Patienten Amplifikate für MCPyV-DNA auf (Patient 18, 19, 22, 23, 24, 28, 29). Somit besteht vollständige Konkordanz in dieser Vergleichsgruppe, denn jeder Patient mit einem MCPyV-DNA-tragenden Primärtumor zeigte auch in den Metastasen MCPyV-DNA. Bei 3/12 (25%) Patienten wurde Polyomavirus-DNA weder in Primärtumor noch in Metastase nachgewiesen (Patient 20, 25, 27).

Interessanterweise waren bei 2/12 (16,67%) Patienten exklusiv die Metastasen durch MCPyV-DNA infiziert, während sich in den Primärtumoren keine Sequenzen nachweisen ließen (Patient 21, 26), (Abbildung 25).

4. 8 Übersicht: Prävalenznachweis des MCPyV in Primärtumor und Metastasen

Tabelle 12: Übersicht: Prävalenznachweis des MCPyV in Primärtumor und Metastasen. +: positiv für MCPyV; -: negativ für MCPyV

Patient	MZK PCR (MCV138)	MZK PCR (MCV191)	Metastase PCR (MCV138)	Metastase PCR (MCV191)	Spur
18	-	+			1
			+	+	2
19	+	+			3
			+	+	4
20	+	-			5
			-	-	6
21	-	-			7
			+	+	8
22	+	+			9
			+	+	10
23	+	+			11
			+	+	12
24	+	+			13
			+	+	14
			+	+	15
			+	+	16
			+	+	17
25	+	-			18
			-	-	19
26	+	-			20
			+	+	21
27	+	-			22
	+	-			23
			+	-	24
			+	-	25
28	-	+			26
			+	+	27
29	+	+			28
			+	+	29

MCPyV-positive/-negative Primärtumor-Patienten mit Metastase (MCV138 und/oder MCV191)

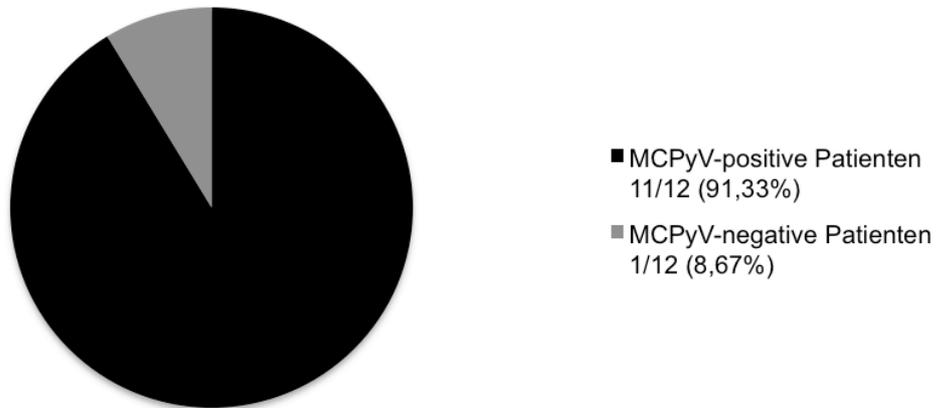


Abbildung 26: MCPyV-positive/ -negative Primärtumor-Patienten mit Metastase (MCV138 und/oder MCV191)

MCPyV-positive/-negative Primärtumor-Proben (MCV138 und/oder MCV191)

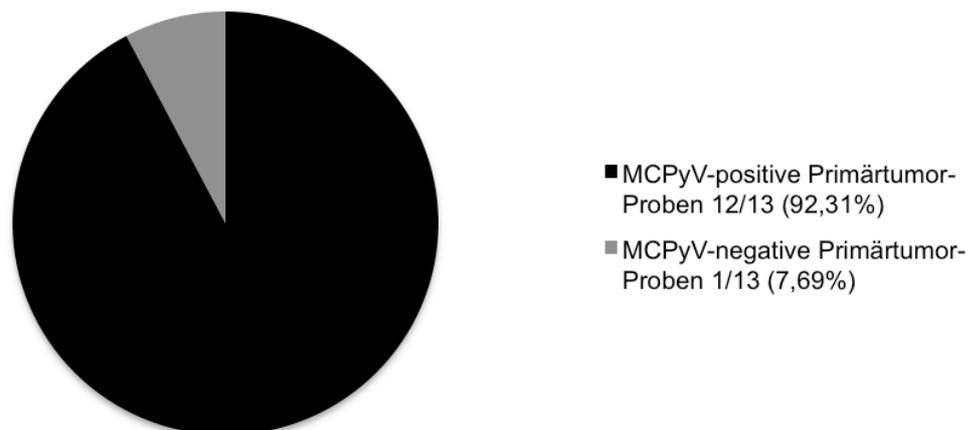


Abbildung 27: MCPyV-positive/negative Primärtumor-Proben (MCV138 und/oder MCV191)

Im Gesamtkollektiv (Tabelle 12) der Patienten mit Merkel-Zell-Karzinom und verfügbarer Metastase präsentierten sich insgesamt 11/12 (91,33%) Patienten (Abbildung 26) über mindestens eine der beiden Primerkombinationen (MCV138 und/oder MCV191) in 12/13 (92,31%) Primärtumor-Proben positiv für den MCPyV-Nachweis (Abbildung 27). Nur bei Patient 21 konnte MCPyV-DNA ausschließlich in der Metastase, nicht aber im Primärtumor amplifiziert werden.

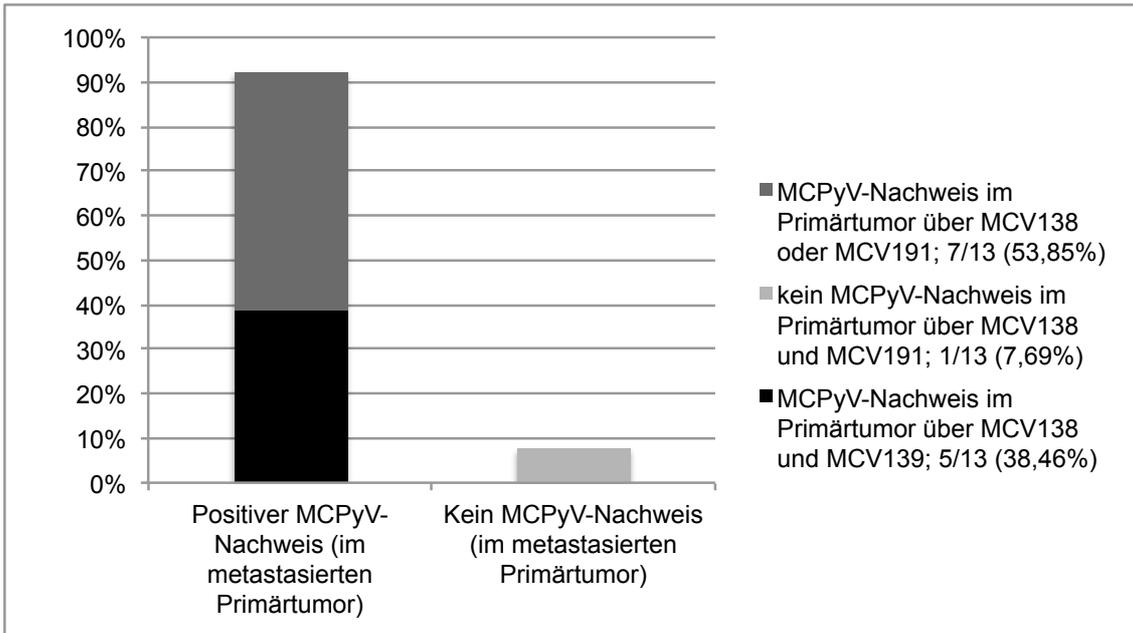


Abbildung 28: Prävalenz von MCPyV (MCV138 und MCV191) bei metastasierten Primärtumoren. x-Achse: Positiver/ Kein MCPyV-Nachweis im metastasiertem Primärtumor; y-Achse: Anteil in Prozent

Von insgesamt 13 Primärtumor-Proben der 12 Patienten ließen sich in 5/13 (38,46%) sowohl über das Primerset MCV138 als auch über das Primerset MCV191 MCPyV-DNA amplifizieren. Dies gelang in 7/13 (53,85%) Primärtumor-Proben nur über eines der beiden eingesetzten Primersets (Abbildung 28).

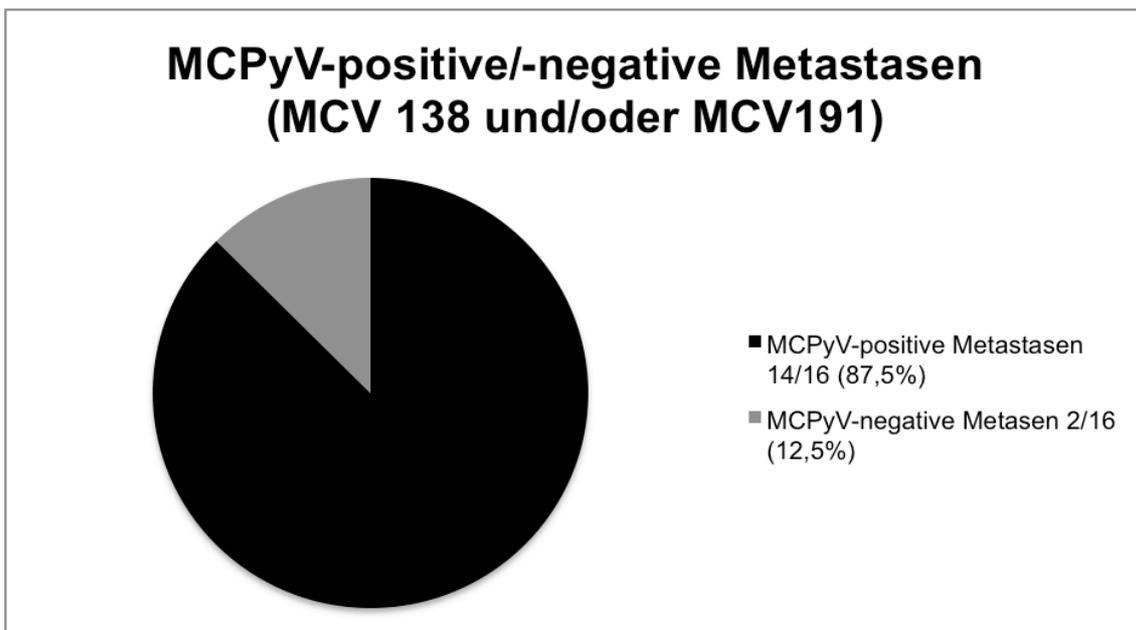


Abbildung 29: MCPyV-positive/ -negative Metastasen (MCV138 und/oder MCV191)

Die 12 Patienten mit metastasiertem Merkel-Zell-Karzinom wiesen insgesamt 16 Metastasen auf. Über mindestens eine der beiden Primerkombinationen (MCV138 und/oder MCV191) fanden sich in der Agarose-Gelelektrophorese bei 14/16 (87,5%) Metastasen spezifische Banden (Abbildung 29).

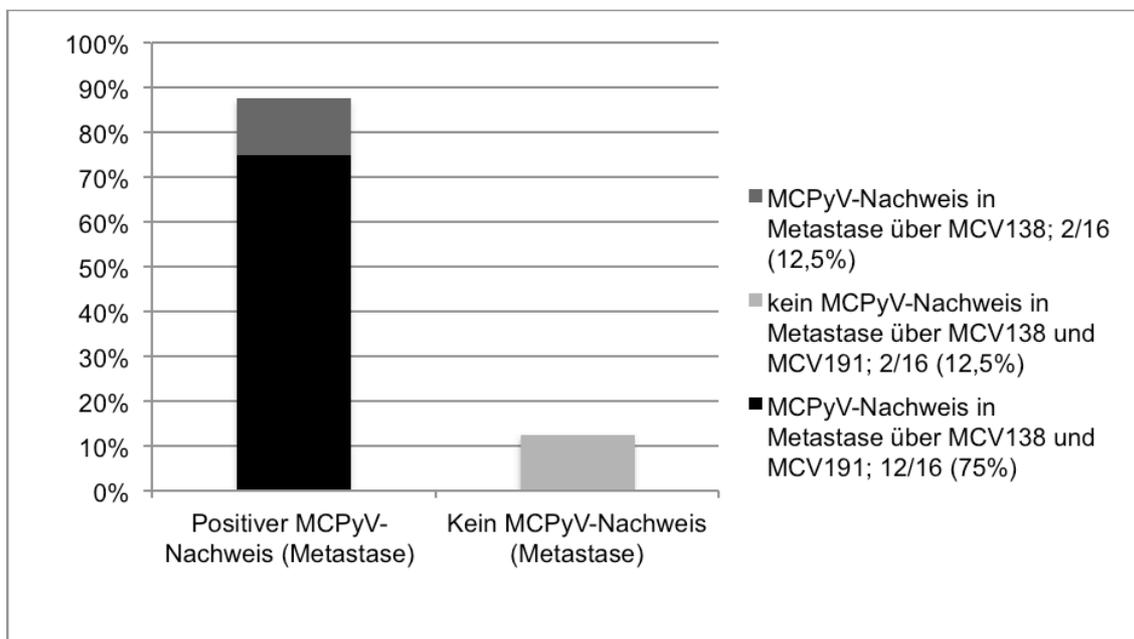


Abbildung 30: Prävalenz von MCPyV (MCV138 und MCV191) bei Metastasen. x-Achse: Positiver/ Kein MCPyV-Nachweis im metastasiertem Primärtumor; y-Achse: Anteil in Prozent

12/16 (75%) Metastasen waren sowohl für den Nachweis über MCV138 als auch über den mit MCV191 positiv. Alle Metastasen, die ein Amplifikat für MCV191 präsentierten, zeigten stets ein Amplifikat für MCV138. In 2/16 (12,5%) Metastasen (Patient 27) konnte MCPyV-DNA nur über das Primersset MCV 138 nachgewiesen werden.

Bei den restlichen 2/16 (12,5%) Proben konnte kein Nachweis für MCPyV-DNA erbracht werden (Abbildung 30).

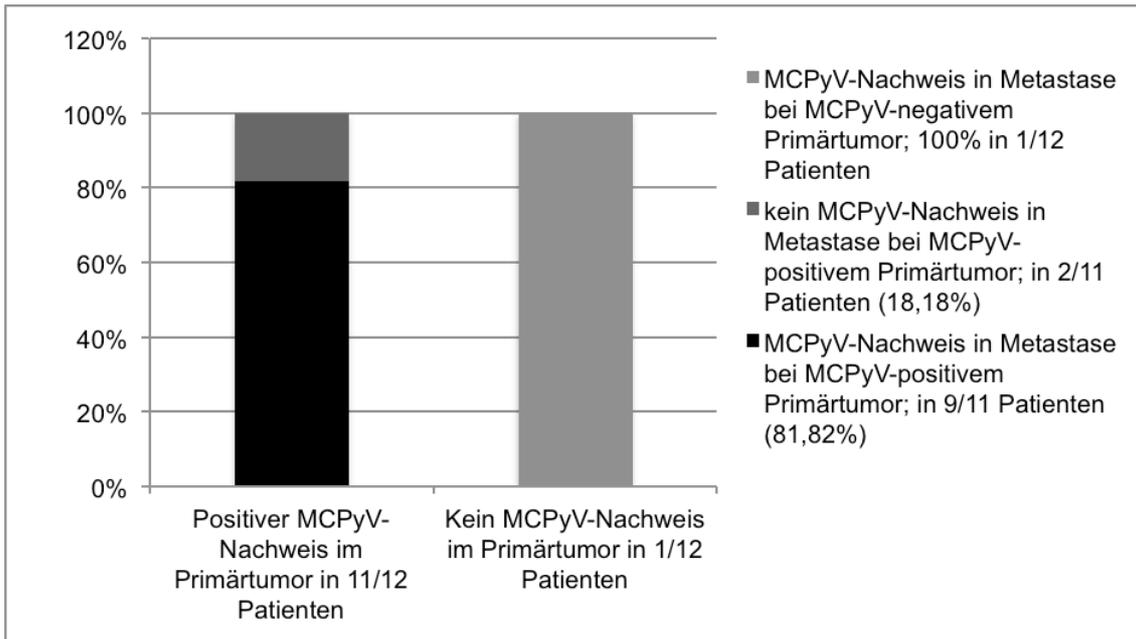


Abbildung 31: Vergleich des MCPyV-Status in Primärtumor und in korrespondierender Metastase. x-Achse: Positiver/ kein MCPyV-Nachweis im Primärtumor; y-Achse: Positiver/ kein MCPyV-Nachweis in der Metastase mit Angabe des Anteils in Prozent

Den Patienten mit MCPyV-Nachweis im Primärtumor konnte in 9/11 (81,82%) Fällen eine MCPyV-tragende Metastase zugeordnet werden. Patient 21, ohne MCPyV-Nachweis im Primärtumor, fiel mit spezifischen Banden in der Agarose-Gelelektrophorese der DNA der Metastase über beide Primerkombinationen auf (Abbildung 31).

4. 9 Gesamtübersicht: Primärtumore unabhängig vom Metastasierungsgrad

Tabelle 13: Gesamtübersicht: Primärtumore unabhängig vom Metastasierungsgrad. +: positiv für MCPyV; -: negativ für MCPyV

Patient	Primärtumor (MCV 138)	Primärtumor (MCV 191)	Primärtumor verfügt über Metastase (ja/nein)
1	+	+	nein
2	+	+	nein
3	+	+	nein
4	+	+	nein
5	+	-	nein
6	+	+	nein
7	+	+	nein
8	+	-	nein
9	+	-	nein
10	+	-	nein
11	+	+	nein
12	+	-	nein
13	+	+	nein
14	+	+	nein
15	+	+	nein
16	-	-	nein
17	+	+	nein
18	-	+	ja
19	+	+	ja
20	+	-	ja
21	-	-	ja
22	+	+	ja
23	+	+	ja
24	+	+	ja
25	+	-	ja
26	+	-	ja
27	+	-	ja
	+	-	ja
28	-	+	ja
29	+	+	ja

Gesamtübersicht MCPyV-positive/-negative Primärtumor-Proben unabhängig vom Metastasierungsgrad (MCV138)

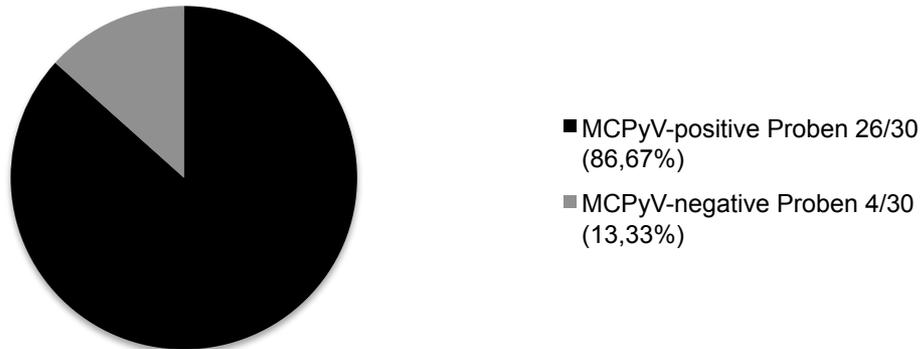


Abbildung 32: MCPyV-positive/ -negative Primärtumor-Proben unabhängig vom Metastasierungsgrad (MCV138)

Gesamtübersicht MCPyV-positive/-negative Primärtumor-Patienten unabhängig vom Metastasierungsgrad (MCV138)

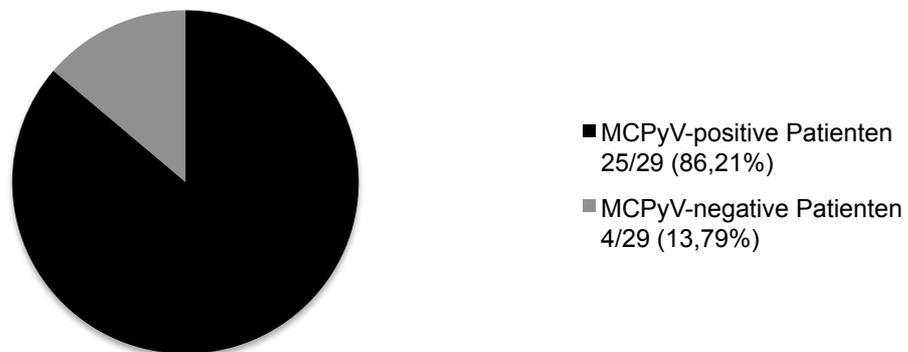


Abbildung 33: MCPyV-positive/ -negative Primärtumor-Patienten unabhängig vom Metastasierungsgrad (MCV138)

In Zusammenschau von nicht-metastasierten MZKs und metastasierten MZKs der insgesamt 29 Patienten (Tabelle 13) konnte in 26/30 (86,67%) Primärtumor-Proben unabhängig vom Metastasierungsgrad über MCV138 MCPyV-DNA amplifiziert werden (Abbildung 32).

Untersucht wurde für Patient 27 neben einem Primärtumor aus dem Jahr 2003 auch dessen Lokalrezidiv aus dem Jahr 2008.

Folglich trugen 25/29 (86,21%) Patienten das MCPyV in Primärtumorgewebe (Abbildung 33).

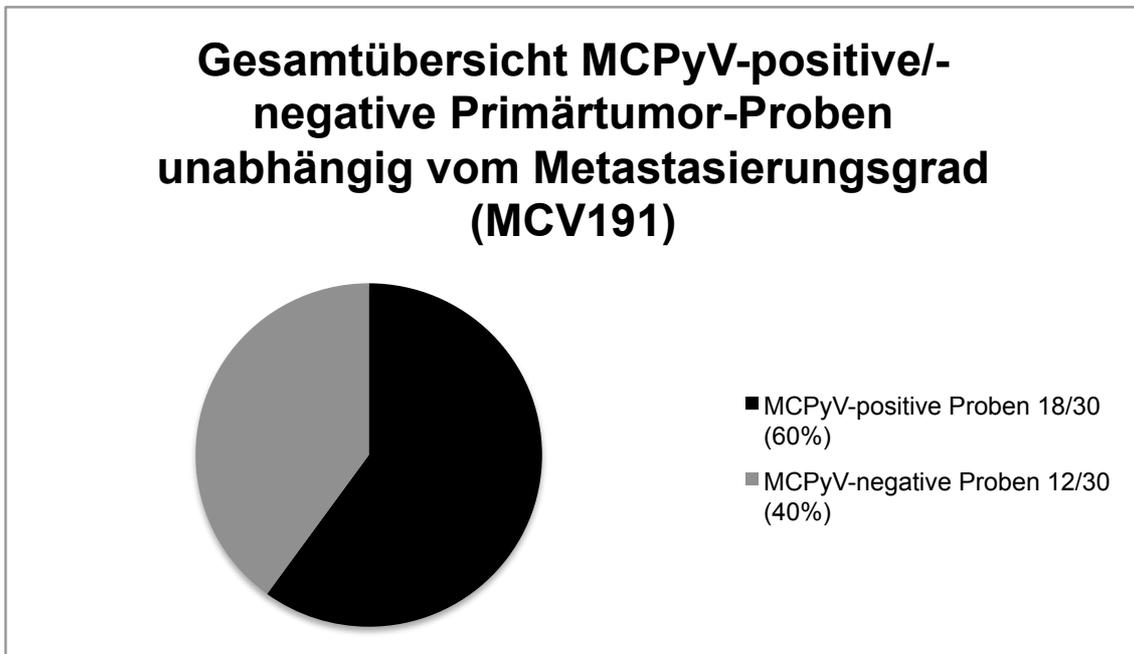


Abbildung 34: MCPyV-positive/-negative Primärtumor-Proben unabhängig vom Metastasierungsgrad (MCV191)

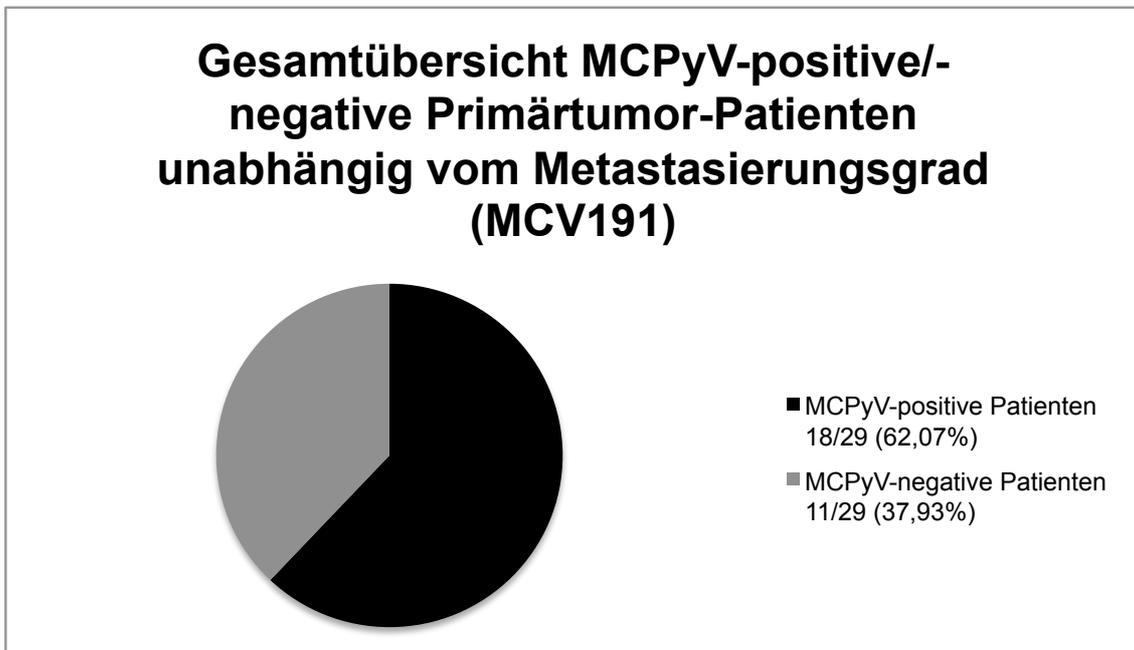


Abbildung 35: MCPyV-positive/-negative Primärtumor-Patienten unabhängig vom Metastasierungsgrad (MCV191)

Über das Primerset MCV191 hingegen konnten wir nur für 18/30 (60%) Primärtumor-Proben MCPyV-DNA amplifizieren (Abbildung 34).

Somit waren auch nur 18/29 (62.07%) MCPyV-positive Primärtumor-Patienten nachweisbar, da für Patient 27 zwei Primärtumore untersucht wurden, die beide kein MCPyV aufweisen konnten (Abbildung 35).

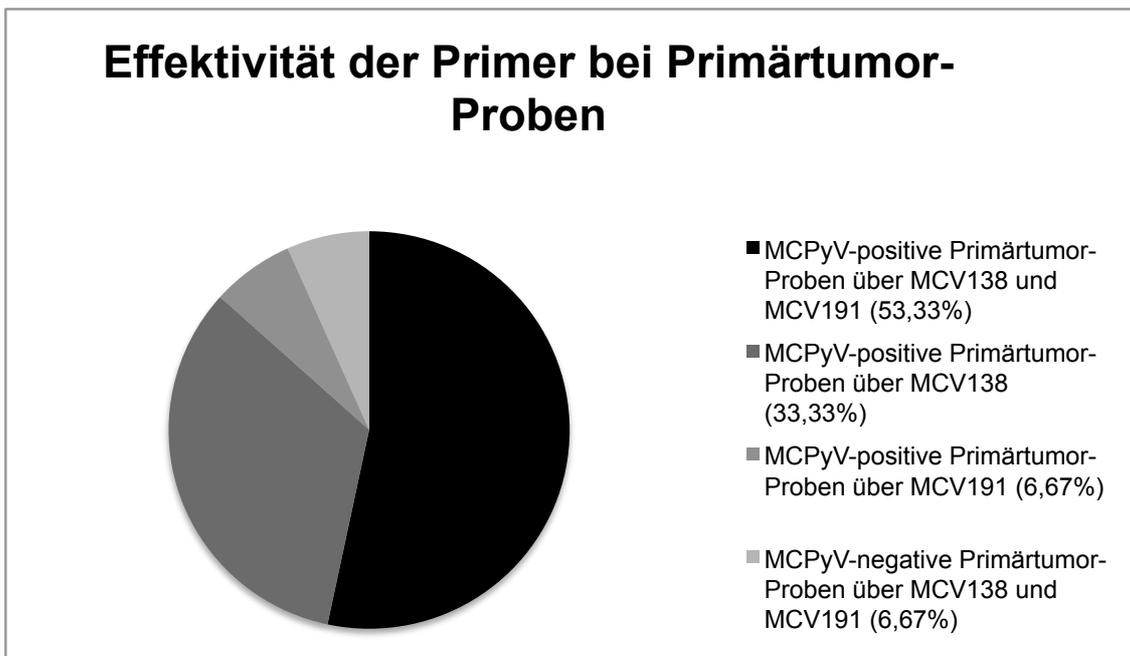


Abbildung 36: Effektivität der Primer (MCV138 und/oder MCV191) bei Primärtumor-Proben (Gesamtkollektiv).

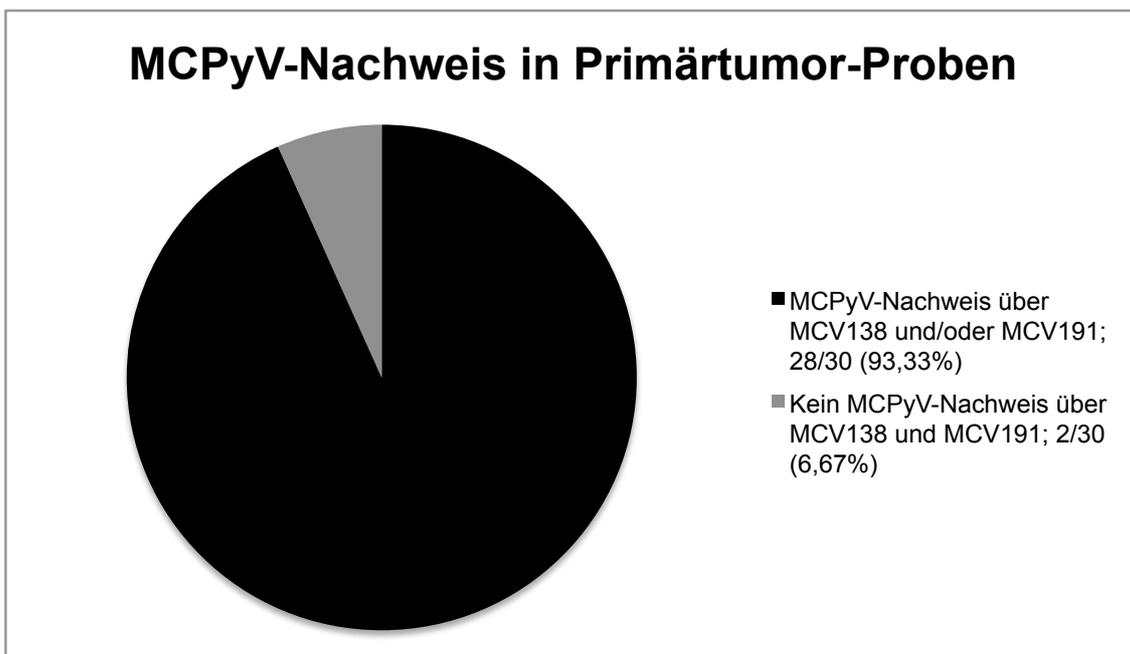


Abbildung 37 : Positiver oder kein MCPyV-Nachweis in Primärtumor-Proben (Gesamtkollektiv) über MCV138 und/oder MCV191.

Im Gesamtkollektiv der 29 Patienten waren von den insgesamt 30 Primärtumor-Proben 16/30 (53,33%) positiv für das MCPyV sowohl über das Primerset MCV138 als auch über das Primerset MCV191.

Über MCV138, nicht aber über MCV191, waren 10/30 (33,33%) Tumore infiziert. Nur positiv für MCV191 waren 2/30 (6,67%) Exzisionen. Für 2/30 (6,67%) Proben ließ sich über kein Primerpaar DNA amplifizieren (Abbildung 36).

MCPyV-tragend waren somit insgesamt 28/30 (93,33%) Primärtumorproben für mindestens eines der beiden Primersets (Abbildung 37).

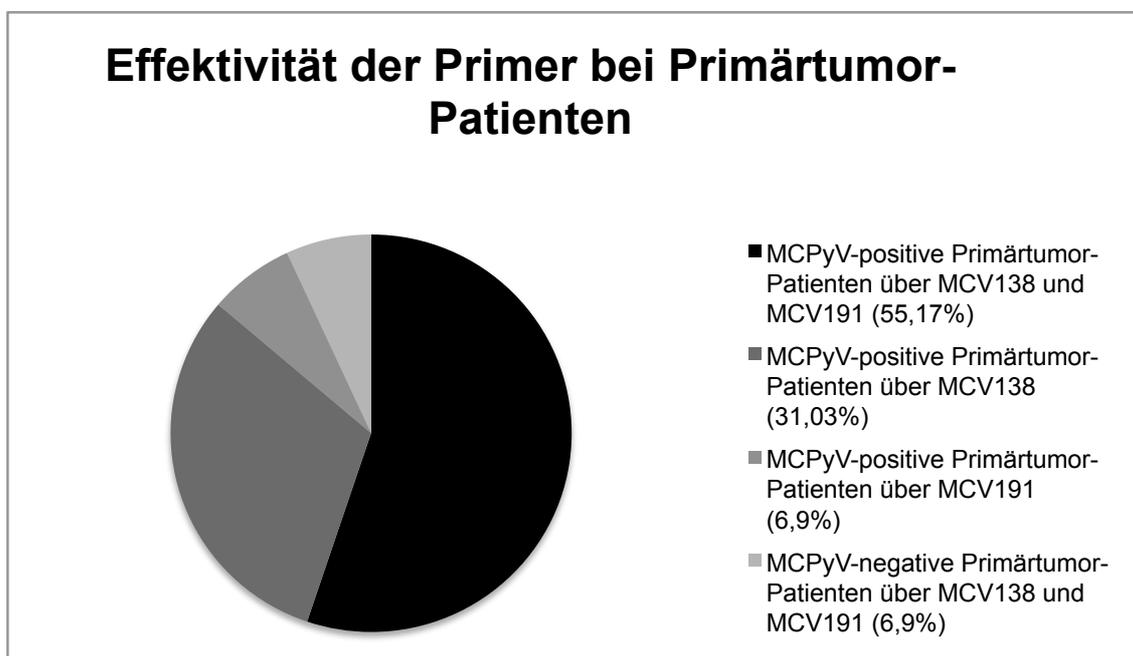


Abbildung 38: Effektivität der Primer (MCV138 und/oder MCV191) bei Primärtumor-Patienten (Gesamtkollektiv).

MCPyV-Nachweis in Primärtumor-Patienten

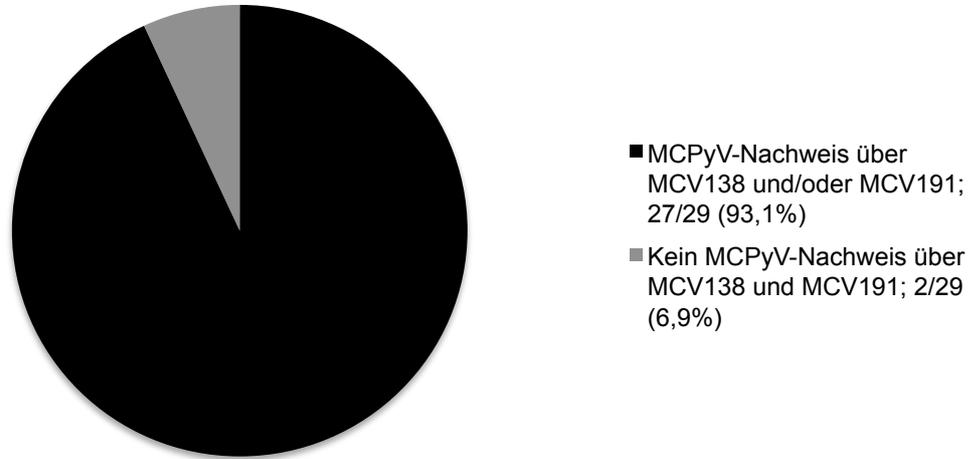


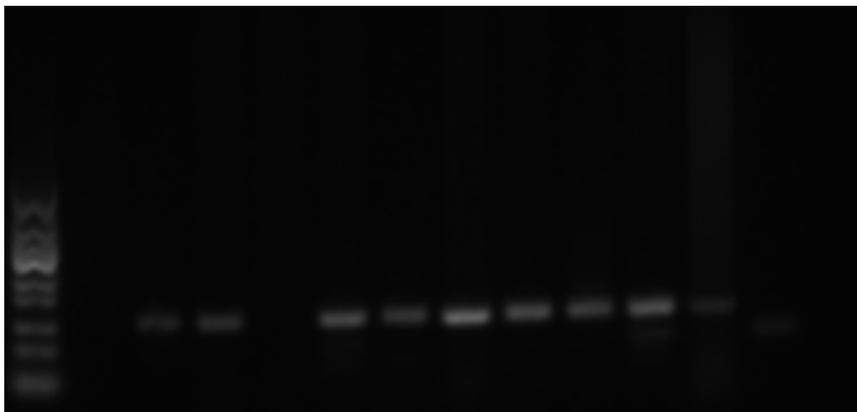
Abbildung 39: Positiver oder kein MCPyV-Nachweis in Primärtumor-Patienten (Gesamtkollektiv) über MCV138 und/oder MCV191.

Folglich waren unter Berücksichtigung der zwei Primärtumor-Proben von Patient 27 im Gesamtkollektiv 27/29 (93,1%) Patienten MCPyV-tragend (über MCV138 und/oder MCV191), (Abbildung 39). Positiv für beide Primersets waren 16/29 (55,17%) Patienten, nur für MCV138 9/29 (31,03%) und nur für MCV191 2/29 (6,9%) Patienten (Abbildung 38).

4. 10 Prävalenz des MCPyV in nicht-MZK Hauttumoren über MCV138

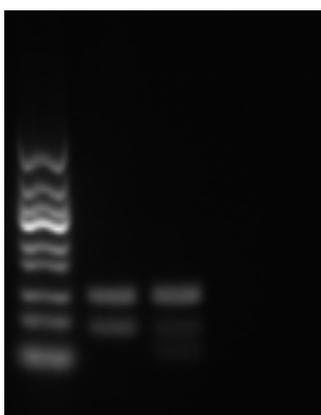
Nicht nur in Primärtumorgewebe und Metastasen, sondern auch in anderen, nicht-MZK Tumoren der Haut, konnte MCPyV-DNA nachgewiesen werden. Insgesamt war es möglich 5 Patienten mit MZK und einem oder mehreren weiteren nicht-MZK-Hauttumoren in die Untersuchung einzubeziehen. Dabei stammten 3 der Patienten aus der Gruppe MZK ohne Filiae zum Zeitpunkt der Erfassung und 2 Patienten aus der Gruppe der metastasierten MZKs (Abbildung 40 a, b und Tabelle 14).

a)



L 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 H₂O

b)



L 12 13 H₂O

Abbildung 40 a), b): Agarose-Gelelektrophorese zum Nachweis des 138bp-Produktes des MCPyV bei Patienten mit Merkel-Zell-Karzinom und korrespondierendem Sekundärtumor.

L: Längenstandard; H₂O: Wasserkontrolle ohne DNA; Zahl: Spur

Tabelle 14: MCPyV-Nachweis bei MZK mit Sekundärtumor über MCV138. +: positiv für MCPyV; -: negativ für MCPyV

Patient	MZK PCR (MCV138)	Sekundärtumor PCR (MCV138)	Bezeichnung des Sekundärtumors	Spur
18		-	Primär kutanes Marginalzonen-B-Zell-Lymphom	1
		+	Primär kutanes Marginalzonen-B-Zell-Lymphom	2
		+	Primär kutanes Marginalzonen-B-Zell-Lymphom	3
	-			4
2		+	Basalzellkarzinom	5
		+	Basalzellkarzinom	6
	+			7
24		+	Dysplastischer Nävus vom Junktionstyp	8
	+			9
5		+	M. Bowen	10
	+			11
9		+	Basalzellkarzinom	12
	+			13

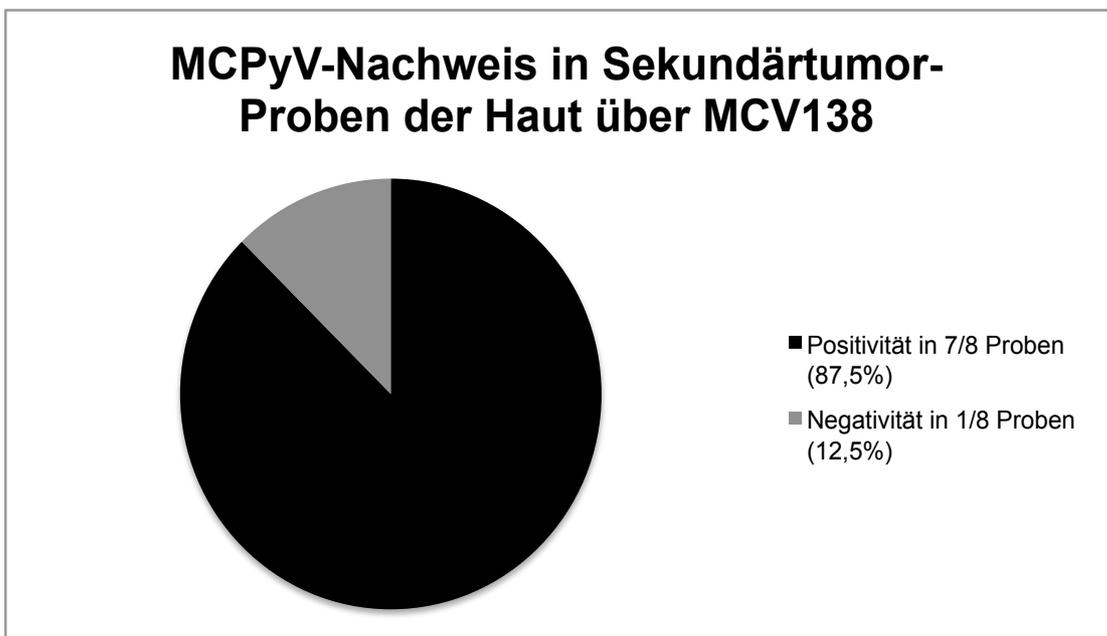


Abbildung 41: MCPyV-Nachweis in Sekundärtumor-Proben der Haut über MCV138

Positivität für MCPyV in allen Sekundärtumoren der Haut über MCV138

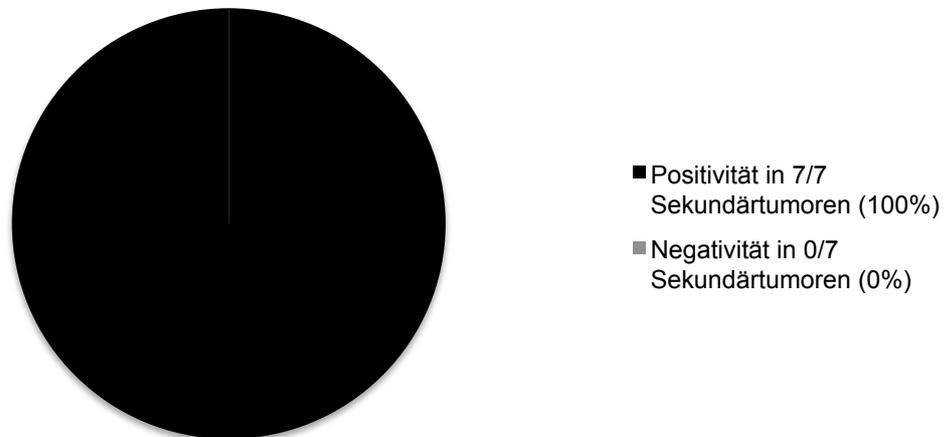


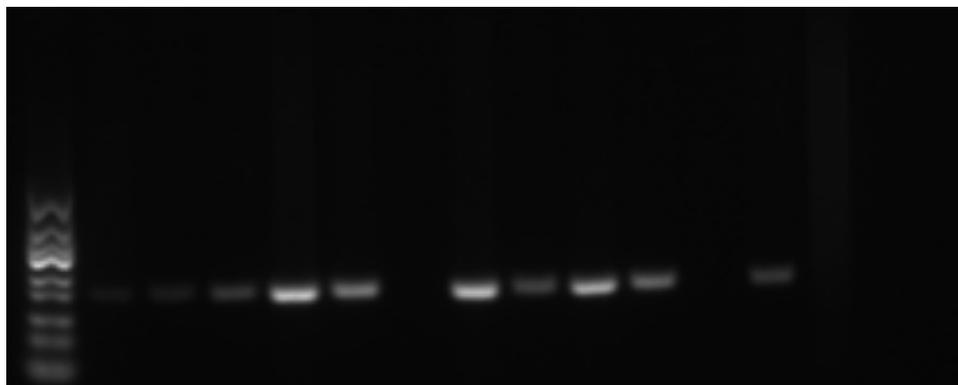
Abbildung 42: MCPyV-Nachweis in allen Sekundärtumoren der Haut über MCV138

Insgesamt wurden 8 Sekundärtumor-Proben der Haut, die sich nicht als MZK präsentierten, untersucht. Von Patient 18 wurden insgesamt drei Exzisionen primär kutaner Marginalzonen-B-Zell-Lymphome in die Untersuchung miteinbezogen.

Bei 7/8 (87,5%) Proben konnte ein positiver Nachweis für MCPyV-DNA geführt werden. Lediglich eine früher entnommene Probe (12,5%) des Marginalzonen-B-Zell-Lymphoms von Patient 18 war negativ (Abbildung 41). Allerdings konnte über eine zeitlich später gewonnene Zweitprobe derselben Tumorentität ein positiver Nachweis für das MCPyV erbracht werden, sodass in allen untersuchten Sekundärtumoren ein positiver Virus-Nachweis erfolgen konnte (Abbildung 42). 4/5 (80%) der Sekundärtumor-tragenden Patienten wiesen ebenfalls MCPyV-DNA im korrespondierenden Primärtumor auf.

4. 11 Prävalenz des MCPyV in Sekundärtumorgewebe über MCV191

Neben dem Primerset für ein 138bp langes Produkt wurde MCV191 eingesetzt, um MCPyV in Sekundärtumoren nachzuweisen (Abbildung 43 und Tabelle 15).



L 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 H2O

Abbildung 43: Agarose-Gelelektrophorese zum Nachweis des 191bp-Produktes des MCPyV bei Patienten mit Merkel-Zell-Karzinom und korrespondierendem Sekundärtumor.

L: Längenstandard; H₂O: Wasserkontrolle ohne DNA; Zahl: Spur

Tabelle 15: MCPyV-Nachweis bei MZK mit Sekundärtumor über MCV191. +: positiv für MCPyV; -: negativ für MCPyV

Patient	Primärtumor: MZK PCR (MCV191)	Sekundärtumor: PCR (MCV191)	Bezeichnung des Sekundärtumors	Spur
18		+	Primär kutanes Marginalzonen-B-Zell-Lymphom	1
		+	Primär kutanes Marginalzonen-B-Zell-Lymphom	2
		+	Primär kutanes Marginalzonen-B-Zell-Lymphom	3
	+			4
2		+	Basalzellkarzinom	5
		-	Basalzellkarzinom	6
	+			7
24		+	Dysplastischer Nävus vom Junktionstyp	8
	+			9
9		+	Basalzellkarzinom	10
	-			11
5		+	M. Bowen	12
	-			13

MCPyV-Nachweis in Sekundärtumor- Proben der Haut über MCV191

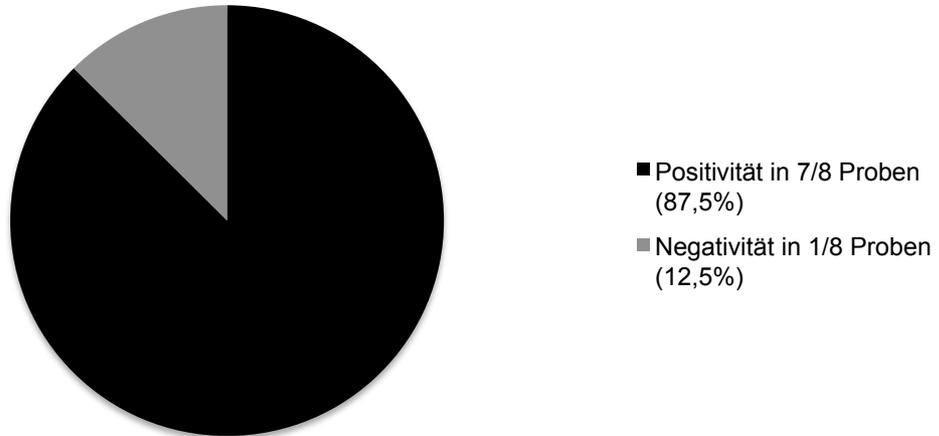


Abbildung 44 : MCPyV-Nachweis in Sekundärtumor-Proben der Haut über MCV191

Positivität für MCPyV in Sekundärtumoren der Haut über MCV191

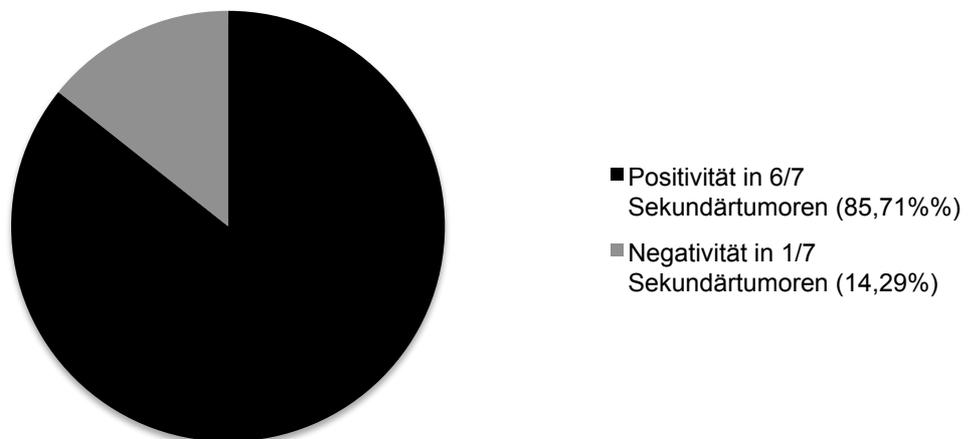


Abbildung 45: MCPyV-Nachweis in Sekundärtumoren der Haut über MCV191

Über das Primersset MCV191 konnte in 7/8 (87,5%) Proben das MCPyV in nicht-MZK Hauttumoren bei Patienten mit bekanntem MZK nachgewiesen werden (Abbildung 44). So auch für die Probe des Marginalzonen-B-Zell-Lymphoms (Patient 18, Spur 1) für die es, im Gegensatz zum Nachweis über MCV138, ein Amplifikat gab. Jedoch präsentierte sich in dieser Gruppe ebenfalls 1/8 (12,5%)

Proben ohne Nachweis für MCPyV-DNA. Bei Patient 2 war eines der beiden Basalzellkarzinome (Spur 6) MCPyV-negativ.

Somit waren über MCV191 6/7 (85,71%) der Sekundärtumore positiv und 1/7 (14,29%) negativ für den Virusnachweis (Abbildung 45).

3/5 (60%) der zu den nicht-MZK Tumoren korrespondierenden Primärtumorproben zeigten spezifische Banden bei 191bp.

4. 12 Prävalenznachweis des MCPyV in Sekundärtumorgewebe

Tabelle 16: Prävalenznachweis des MCPyV in Sekundärtumorgewebe. +: positiv für MCPyV; -: negativ für MCPyV

Patient	Sekundärtumor PCR (MCV138)	Sekundärtumor PCR (MCV191)	Bezeichnung des Sekundärtumors
18	-	+	Primär kutanes Marginalzonen-B-Zell-Lymphom
	+	+	Primär kutanes Marginalzonen-B-Zell-Lymphom
	+	+	Primär kutanes Marginalzonen-B-Zell-Lymphom
2	+	+	Basalzellkarzinom
	+	-	Basalzellkarzinom
24	+	+	Dysplastischer Nävus vom Junktionstyp
9	+	+	Basalzellkarzinom
5	+	+	M. Bowen
Gesamt	7/8	7/8	
%	87,5%	87,5%	

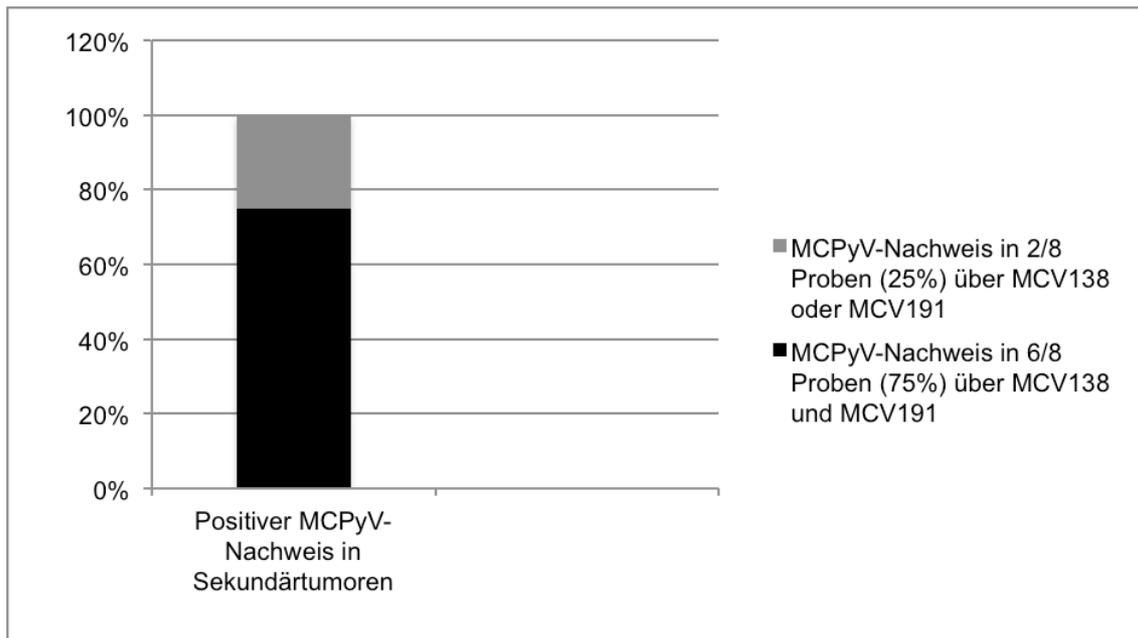


Abbildung 46: MCPyV-Nachweis in Sekundärtumor-Proben über MCV138 und/oder MCV191. X-Achse: MCPyV-Nachweis in Sekundärtumor-Proben; y-Achse: Anteil in Prozent

In allen nicht-MZK Hauttumoren konnte MCPyV-DNA über mindestens eine der beiden Primerkombinationen nachgewiesen werden (Tabelle 16).

Nur 2 Proben waren hinsichtlich des MCPyV-Nachweises ertraglos. So konnten wir in 6/8 (75%) Fällen über beide Primerkombinationen MCPyV-DNA amplifizieren.

Gleiches traf auf die mit den nicht-MZK Hauttumoren assoziierten MZK-Primärtumore zu. Alle zeigten über mindestens eine Primerkombination ein Amplifikat für MCPyV-DNA (Abbildung 46).

4. 13 Ergebnisse der DNA-Sequenzanalyse von MCV191

Von den über MCV191 positiv auf das MCPyV getesteten Proben ließen sich, bis auf eine Metastase von Patient 24, sämtliche PCR-Produkte erfolgreich sequenzieren.

In den MZK-Primärtumoren der Patienten 1, 2, 3, 4, 6, 7, 11, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 22, 28 und 29 war der Wildtyp des MCPyV präsent. Damit war der Wildtyp in 16/18 (88, 88%) MCPyV-tragenden MZK Tumoren vertreten.

Bei den Patienten 23 und 24 hingegen fanden sich jeweils zwei unterschiedliche Punktmutationen, bei denen jeweils Guanin gegen Adenin substituiert wurde.

Patient 23 zeigt eine Punktmutation im MZK-Primärtumor und die identische Mutation in der zugehörigen Metastase. Auch in den Sequenzen von Patient 24 fanden wir Punktmutationen, die sowohl im Primärtumor als auch in zwei korrespondierenden Metastasen identisch waren. Ein ebenfalls diesem Patienten zugehöriger dysplastischer melanozytärer Nävus wies wiederum den Wildtyp des MCPyV auf.

Bei den übrigen Fällen war durchgehend die Wildtyp-Sequenz in MZK und korrespondierender Metastase zu finden, ein Beweis für die Spezifität der PCR, da stets MCV191 Sequenzen generiert wurden.

Auch in der Gruppe der nicht-MZK-Tumore präsentierten, bis auf eine Ausnahme, alle PCR-Produkte den Wildtyp des MCPyV. Lediglich Patient 9 mit einem Basalzellkarzinom verfügte über eine Punktmutation bei der Cytosin gegen Thymin substituiert wurde.

5. Diskussion

2008 konnten Feng et. al über DTS (digital transcriptome subtraction) zwischen dem humanen PTPRG-Gen (human protein tyrosine phosphatase, receptor type G gene) und dem viralen T-Antigen ein Fusionstranskript auf Chromosom 3p14.2 nachweisen. Sie identifizierten schließlich das bisher unbekannte Merkel cell polyomavirus (MCPyV oder MCV) und entschlüsselten dessen komplett zirkulär geschlossenes Genom. Um die Beziehung zwischen MZK und MCPyV genauer zu analysieren, wurden 10 MZK-Patienten mittels PCR untersucht. Eingesetzt wurden auf den T-Antigen-Lokus (LT1 und LT3) und auf das VP1-Gen (VP1) gerichtete Primer. Zur Sensitivitätserhöhung wurde ein Southern-Blot der PCR-Produkte durchgeführt. In 8/10 (80%) MZK-Patienten konnten MCPyV-Sequenzen nachgewiesen werden. Auch eine in das Untersuchungskollektiv eingeschlossene Metastase, assoziiert mit einem positiven Primärtumor, präsentierte Positivität (Feng, Shuda et al. 2008).

In Anlehnung an diese und weitere Studienergebnisse war es Ziel dieser Arbeit, den MCPyV-Prävalenzstatus in metastasierten und nicht-metastasierten MZK mit dem zu den Primärtumoren assoziierten MZK-Metastasen und nicht-MZK-Tumoren der Haut zu vergleichen. So sollte herausgearbeitet werden, ob eine Infektion mit MCPyV eine generelle Infektion darstellt, in der sämtliche Hauttumore Virusträger sind, oder ob MZKs exklusiv infiziert sind. Methodisch wurde ein PCR-Verfahren eingesetzt, unter Verwendung der Primer MCV138, zum Nachweis der Large-T-Antigen-Region, und MCV191 zum Nachweis der Small-T-Antigen-Region (Andres, Belloni et al. 2010). Zur Validierung der Ergebnisse und da Mutationen in der LT- und ST-Region beschrieben wurden, wurde die DNA aller MCPyV-positiven PCR-Produkte sequenziert.

Wie bereits in der Literatur beschrieben, erwarteten wir in unserer Arbeit ebenfalls eine hohe Prävalenz des MCPyV sowohl in primären MZK als auch MZK-Metastasen. Wir vermuteten diesbezüglich einen identischen MCPyV-Status in Primärtumor und zugehöriger Metastase, bei der die virustragende Tumorzelle das Genom einschließlich der integrierten MCPyV-DNA an die Tochterzellen weitergibt.

Tatsächlich konnte in unserer Arbeit in allen 17 (100%) Primärtumor-Proben aus der Gruppe der Patienten mit MZK ohne Metastase MCPyV-DNA detektiert werden [16/17 (94,12%) für MCV138 und 11/17 (64,71%) für MCV191; positiv für beide Primersets 10/17 (58,82%)].

Im Vergleich dazu waren 12/13 (92,31%) Primärtumor-Proben der 12 Patienten mit MZK und Metastase mit MCPyV infiziert [10/13 (76,92%) für MCV138 und 7/13 (53,85%) für MCV191; positiv für beide Primersets 5/13 (38,46%)]. 11/12 (91,67%) dieser Patienten trugen MCPyV im Primärtumor.

Im Gesamtkollektiv der 29 Patienten waren damit 28/30 (93,33%) Primärtumor-Einzelproben für das Virus positiv [26/30 (86,67%) für MCV138 und 18/30 (60%) für MCV191; positiv für beide Primersets 16/30 (53,33%)].

Von den insgesamt 16 Metastasen-Einzelproben der 12 Patienten mit metastasiertem MZK waren 14/16 (87,50%) mit MCPyV infiziert [14/16 (87,50%) für MCV138 und 12/16 (75%) für MCV191; positiv für beide Primersets 12/16 (75%)].

Hervorzuheben ist, dass bei Patient 24 und 27 insgesamt 6 Proben für Metastasengewebe vorlagen, die durchgehend Positivität (100%) über beide Primerkombinationen für MCPyV-DNA zeigten. Dies zeigt eine deutliche Virus-Penetranz in vorliegendem Tumorgewebe.

Darüber hinaus verglichen wir die Primärtumore mit den ihnen zugehörigen Metastasen. Wir konnten 9/11 (81,82%) Patienten mit MCPyV-positivem Primärtumor auch eine MCPyV-infizierte Metastase zuordnen. Insgesamt lag ein identischer MCPyV-Status in Primärtumor und assoziierter Metastase bei 9/12 (75%) Patienten vor. Diese hohe Konkordanz-Rate impliziert, dass MCPyV-Integration in Tumorzellen zu Proliferation und möglicherweise zu erhöhter Metastasenbildung führen könnte. Interessanterweise fiel 1/12 (8,33%) Patienten mit einem nicht-infizierten Primärtumor, dafür aber positiven Metastasen, über beide Primerkombinationen auf. Dies ist möglicherweise durch einen Verdünnungseffekt im Primärtumor bedingt, da gegebenenfalls nicht alle MZK-Tumorzellen im Primärtumor infiziert sind. Bei den Metastasen, die vermutlich aus einer virustragenden Tumorzelle abstammen, die

gegebenenfalls einen Wachstumsvorteil besitzt, ist das Virus dann in den Tumorzellen nachweisbar.

Zusätzlich zu Primärtumorgewebe und Metastasen wurden auch nicht-MZK Hauttumore in die Untersuchung einbezogen, um eine unspezifische Infektion durch MCPyV auszuschließen. Interessanterweise, und nicht unserer Arbeitshypothese entsprechend, konnte in allen sieben (100%) nicht-MZK Hauttumoren DNA des MCPyV amplifiziert werden. Untersucht wurden 8 Proben 7 eigenständiger Hauttumore bei 5 MZK-Patienten, von denen alle über mindestens eine der beiden Primerkombinationen ein Amplifikat für MCPyV-DNA zeigten [7/8 (87,5%) für MCV138 und 7/8 (87,5%) für MCV191; positiv für beide Primersets 6/8 (75%)]. 3 Basalzellkarzinome, 3 Exzisionen kutaner B-Zell-Lymphome, 1 Morbus Bowen und ein dysplastischer melanozytärer Nävus befanden sich im untersuchten Kollektiv. Man kann vermuten, dass eine Infektion mit MCPyV allgemein in Patienten mit kutanen Tumoren auftritt und nicht exklusiv und spezifisch in MZK vorkommt, sondern vielmehr MCPyV generell in proliferierendem Gewebe vorliegen könnte.

Mittels Sequenzierung der MCPyV-positiven PCR-Produkte (über MCV191) konnten wir bis auf eine Metastase, bei der aus technischen Gründen die Sequenzierung nicht möglich war, alle unsere Ergebnisse validieren. In 16/18 (88,88%) MZK-Primärtumoren dominierte die Wildtyp-Sequenz des MCPyV. Lediglich bei zwei Patienten konnte eine Punktmutation festgestellt werden, bei der ein Guanin gegen Adenin substituiert wurde. Dieselbe Punktmutation, wie in den MZK-Primärtumoren, wiesen die Sequenzen der zugehörigen Metastasen auf. Dies zeigt, dass es zu einer Weitergabe des Genoms, inklusive der integrierten MCPyV-DNA, vom MZK-Primärtumor an die Tochterzellen der Metastase kommt. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass erst durch eine Mutation der Primärtumor befähigt wird, Tochterzellen zu streuen. Diese Hypothese kann durch fünf Patienten widerlegt werden, die sowohl in Primärtumor als auch in korrespondierender Metastase Wildtyp-Sequenzen präsentieren. Hier könnte aber auch die Mutation in nicht untersuchten Exons vorliegen. Ähnlich zu Patient 23 hat auch Patient 24 eine Punktmutation im Primärtumor, die in identischer Form in zwei korrespondierenden Metastasen zu finden ist.

Allerdings verfügt eine weitere Metastase über zwei Deletionen (Verlust eines Adenin und Guanin), ohne die im Primärtumor beschriebene Punktmutation. Ein mögliches Indiz für ein vom Primärtumor unabhängiges und gegebenenfalls verzögertes Mutationsgeschehen. Diesbezüglich auch interessant ist der in der Wildtyp-Form vorliegende nicht-MZK Tumor, der im Kontrast zu den primären und sekundären MZKs nicht mutiert scheint.

Die Frage inwiefern sich Mutationen auf den Krankheitsverlauf, die Progression und die Aggressivität des Tumors auswirken, kann durch diese Arbeit nicht beantwortet werden.

Bei zwei Patienten (Patient 21, 26) konnte exklusiv in den Metastasen der Wildtyp des MCPyV gefunden werden. Der assoziierte Primärtumor war allerdings nur bei Patient 21 über beide Primer (MCV138 und MCV191) negativ für das MCPyV.

Auch hier gehen wir, wie weiter oben schon erwähnt, von einem möglichen Verdünnungseffekt im Primärtumor aus, durch den eine Infektion in der Metastase erklärbar wird.

Wildtyp-Sequenzen dominierten auch die nicht-MZK Tumore der Haut mit Ausnahme eines Basalzellkarzinoms (Patient 9) mit einer Punktmutation, bei der Cytosin gegen Thymin substituiert wurde. Dies liefert möglicherweise doch einen Hinweis auf eine potentielle Rolle des MCPyV in der Tumorgenese von nicht-MZK Hauttumoren und spricht gegen das ubiquitäre Vorkommen des MCPyV ohne pathogene Bedeutung. Diese Punktmutation könnte aber auch durch UV-Exposition bedingt sein, denn sowohl BZK als auch MZK sind durch UV-Strahlung induzierte Karzinome.

Über die eigenen Ergebnisse hinaus wird in folgender Tabelle (Tabelle 17) eine Zusammenstellung von Studienergebnissen anderer Forschungsgruppen geliefert, die sich ebenfalls mit der MCPyV-Prävalenz in MZK, ihren Metastasen und nicht-MZK Tumoren beschäftigten. Die Studien erstreckten sich über einen Zeitraum von 2008, in dem auch die ersten Ergebnisse um Feng et al. publiziert wurden, bis gegenwärtig 2013.

Tabelle 17: Übersicht über Studienergebnisse weiterer Forschungsgruppen.

N	Studie	Proben/ Material	Prävalenz (%)	Methoden
1	(Kassem, Schopflin et al. 2008) (Freiburg-Baden-Württemberg)	39 MZK (FFPE-Gewebe)	30/ 39 (77%)	PCR (LT1 (440bp), LT3 (308bp), VP1 (351bp) und M1/2 (178bp)); Sequenzierung (98% Übereinstimmung mit den Sequenzen von Feng et. al)
2	(Kassem, Technau et al. 2009) (Freiburg-Baden-Württemberg)	203 NMSC-Proben immunsupprimierter (is) und immunkompetenter (ik) Patienten (FFPE-Gewebe)	BZK (is),(ik): 13/18 (72,2%), 36/96 (37,5%); Plattenepithel-CA (is),(ik): 13/25 (52%), 7/28 (25%); Morbus Bowen (is), (ik): 9/13 (69%), 4/23 (17,4%)	PCR (LT3, VP1)
3	(Becker, Houben et al. 2009) (Deutschland)	53 MZK (darunter 28 MZK mit Metastasen) (FFPE-Gewebe)	45/53 (84,9%), mit 100% identischen MCPyV-Status in Primärtumor und Metastase	Quantitative real-time PCR
		24 BZK	3/24 (12,5%)	
4	(Garneski, Warcola et al. 2009)	37 MZK inklusive 16 Metastasen (16 aus Nord-Amerika und 21 aus Australien)	Gesamt: 16/37(43%) Nord-Amerika: 11/16 (69%); Australien: 5/21 (24%); Metastasen: 8/16 (50%)	Quantitative real-time PCR
		Plattenepithel-CA	2/15 (13%)	

5	(Schrama, Peitsch et al. 2011)	174 MZK (136 aus Deutschland, 38 aus Australien)	Gesamt: 85,6% Europa: 116/136 (85,3%) Australien: 33/38 (86,8%)	
6	(Bhatia, Goedert et al. 2010) (USA)	23 MZK	74%	qPCR
7	(Handschel, Muller et al. 2010) (Finnland)	59 MZK (inklusive Metastasen)	58%	PCR (LT1, LT3, VP1)
8	(Sihto, Kukko et al. 2009)	114 MZK (FFPE-Gewebe)	91/114 (79,8%)	PCR (LT3, LT1, VP1), qPCR (LT3), Sequenzierung
	(Finnland)	Glioblastome, Melanome, histologisch normales Gewebe)	0%	
9	(Andres, Belloni et al. 2010) (München, Hamburg)	33 MZK (FFPE-Gewebe) und diesen zugeordnet (alters-/geschlechts-spezifisch)	21/33 (64%) jeweils 18/33 (55%) für MCV138 und 191; positiv für beide Sets 15/33 (46%)	PCR (MCV138, MCV191) Southern-Blot
		12 Seborrhoische Keratosen (SK), 11 BZK, 10 Lentigo maligna Melanome	Seborrhoische Keratosen: 2/33 (6%)	
10	(Chun, Yun et al. 2013) (Südkorea)	7 MZK (FFPE-Gewebe)	PCR: 6/7 (85,7%) CM2B4: 5/7 (71%)	quantitative real-time PCR (MCV138, MCV191); monoklonaler Antikörper (CM2B4)
		je 8 BZK, Plattenepithel-CA, Aktinische Keratosen (AK), SK; 1 SCLC	0/33 (0%)	

11	(Varga, Kiss et al. 2009) (Ungarn)	8 MZK	7/8 (87,%)	PCR (VP1, LT1 und LT3)
		29 nicht-MZK (Plattenepithel-CA, BZK, maligne Melanome)	0/29 (0%)	
12	(Reisinger, Shiffer et al. 2010) (USA)	20 MZK und assoziiert mit diesen	15/20 (75%)	monoklonaler Antikörper (CM2B4)
		11 BZK und Plattenepithel-CA	0/11 (0%)	
13	(Hattori, Takeuchi et al. 2013) (Japan)	26 MZK (FFPE-/gefrorenes Gewebe)	PCR: 23/26 (88,5%) CM2B4: 20/26 (76,9%)	PCR, monoklonaler Antikörper (CM2B4)
		Plattenepithel-CA, BZK	PCR: 0% CM2B4: 100%	
14	(Iwasaki, Kodama et al. 2013) (Japan)	Fallstudie: kombinierter Tumor mit MZK- und BZK-Komponente	qPCR: MCPyV in MZK und BZK; Mutationsanalyse: verschiedene Mutationen des Large-T-Antigens	qPCR, Mutationsanalyse
15	(Foulongne, Kluger et al. 2008), Frankreich	MZK (FFPE-Gewebe)	8/9 (88,89%)	PCR (LT1, LT3 und VP1)
16	(Touze, Gaitan et al. 2009), Frankreich	MZK (FFPE-, gefrorenes Gewebe)	gefrorenes Gewebe: 12/12 (100%) FFPE: 9/20 (45%)	Nested-PCR (VP1, VP1n und LT1, LT1n), Sequenzierung

17	(Martel-Jantin, Filippone et al. 2012), Frankreich	97 MZK-Patienten mit 113 Proben (FFPE-, gefrorenes Gewebe)	gefrorenes Gewebe 94% FFPE: 47%	PCR (MerkT oder LT3) qPCR Sequenzierung DIPS-PCR
18	(Martel-Jantin, Pedergnan a et al. 2013) (Kamerun)	1000 Probanden aus Kamerun (Serum)	Kinder: (59%) ; Erwachsene: (94%) ; mit familiärer Häufung	Seroepidemiologisch: anti-VP1 Antikörper gegen MCPyV
19	(Imajoh, Hashida et al. 2012) (Japan)	Adeno- und Plattenepithel-CA (Cervix uteri) (FFPE-Gewebe)	Plattenepithel-CA: 9/48 (19%) , Adeno-CA: 4/16 (25%)	PCR (LTsh, VP1) Koexistenz zu: HPV 16, 18, 31 und 58
20	(Murakami, Imajoh et al. 2011) (Japan)	kutane Plattenepithel-CA/ BZK	Plattenepithel-CA: 4/30 (13%) , BZK: 0/10 (0%)	PCR
21	(Dworkin, Tseng et al. 2009) (USA)	nicht-MZK Tumore	Plattenepithel-CA: 26/177(15%) Haut: 11/63 (17%) , Blut: (0/57) , Speichel: (1/12)	PCR Koexistenz zu HPV in: 20/30 (66%) Proben
22	(Rodig, Cheng et al. 2012) (USA)	MZK	Ab3: 56/58 (97%) , qPCR: 60/60 (100%)	neuer monoklonaler Antikörper Ab3 gegen das Large-T-Antigen; qPCR mit 5 eigenen Primern (50-150bp)
23	(Duncavage, Zehnbaue et al. 2009) (USA)	41 FFPE-Gewebe-Proben von 29 Patienten (20 MZK, 4 Rezidive, 17 Metastasen)	Gesamt (Patienten): 22/29 (76%) Metastasen (Proben): 13/17 (76,47%)	PCR (LT1, LT3, MCVPS1) Sequenzierung

24	(Ota, Ishikawa et al. 2012) (Japan)	9 MZK und assoziiert multiple Metastasen	MZK: 9/9 (100%) ; Metastasen: 100% mit identischem MCPyV-Status in Primärtumor und Metastase	konventionelle PCR (ST, LT1, LT2, VP1-3); digitale PCR (STF576, STF550)
		46 BZK, 52 AK, 34 M. Bowen, 5 SK, 5 kutane anaplastische großzellige Lymphome, 5 maligne Melanome, 6 melanozytäre Nävi	BZK: 1/46 (2,2%) ; aktinische Keratosen (AK): 3/52 (5,8%) ; übrige : 0%	
25	(Loyo, Schussel et al. 2012) (USA)	25 Sentinel-Lymphknoten (SLN)	Histologie: 5/25 (20%) < qPCR: 11/25 (44%)	Vergleich histopathologischer Befunde mit MCPyV-Präsenz mittels qPCR (LT3, VP1) in 25 SLN; qPCR für 17 MZK
		17 mit den SLN assoziierten MZK	16/17 (94%)	

Damit entsprechen die Ergebnisse unserer Arbeit weitestgehend denen der aktuellen Studienlage hinsichtlich der MCPyV-Prävalenz in Primärtumoren des MZK, unabhängig davon, ob eine Assoziation mit Metastasen vorlag oder nicht. Die Beobachtung von Becker et al., dass eine höhere MCPyV-Prävalenz in metastasierten im Gegensatz zu nicht-metastasierten MZK besteht (Becker, Houben et al. 2009), können wir nicht bestätigen und präsentieren tendenziell gegensätzliche Ergebnisse. Diese Abweichung könnte aufgrund des kleinen Kollektivs der seltenen Tumorentität bedingt sein.

Interessant bezüglich der MCPyV-Prävalenz in MZK sind auch die Studien von Andres et al. und Chun et al., die wie wir die Primer MCV138 und MCV191 einsetzten. Trotz zusätzlichem Southern-Blot der PCR-Produkte lag die Detektionsrate für MCPyV bei Andres et al. (64%) deutlich unter unserer (93,33%). Vergleichbare Daten (85,7%) lieferten jedoch Chun et al. in Südkorea (Andres, Belloni et al. 2010, Chun, Yun et al. 2013).

Auch in der allgemeinen Studienliteratur präsentierten Metastasen, vergleichbar mit unseren Studienergebnissen, eine hohe Prävalenz für das MCPyV.

Ebenso konform damit ist der hohe identische MCPyV-Status in Primärtumor und assoziierter Metastase. Bei Becker et al. lag dieser in allen (100%) untersuchten Proben vor (Becker, Houben et al. 2009). Interessant ist deshalb ein Patient aus unserer Studie, bei dem zwar eine MCPyV-tragende Metastase gefunden wurde, allerdings kein MCPyV im Primärtumor. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass aus dem eigentlichen primären Tumorgewebe zwar kein MCPyV isoliert werden konnte, trotzdem aber ein streuender Herd vorhanden war, der kausal für die MCPyV-Prävalenz in der assoziierten Metastase gewesen sein könnte. Eine andere Möglichkeit wäre eine spätere Infektion oder klonale Integration des Virus in das Wirtsgenom im Primärtumor. Dann wäre allerdings eine virale Ursache in der Tumorgenese fraglich.

Die interessantesten Daten lieferte überraschenderweise die Untersuchung der nicht-MZK Tumore. Im deutlichen Gegensatz zur Literatur präsentieren diese alle ein Amplifikat für MCPyV-DNA. Anzumerken ist allerdings, dass jeder dieser Tumore stets mit einem MCPyV-positiven MZK vergesellschaftet war, sodass dadurch ein möglicher Erklärungsansatz geliefert werden könnte, in dem die Patienten generelle Träger von MCPyV sein könnten. Betrachtet man den zeitlichen Kontext zwischen Auftreten des nicht-MZK Tumors und dem des MZK, ließ sich tatsächlich bei zwei Patienten (Patient 9, 24) das MZK vor Manifestation des Zweitumors diagnostizieren, bei zwei Patienten (Patient 2, 5) zeitgleich mit dem MZK und nur bei einem Patienten (Patient 18) deutlich vor der Diagnose des MZK. Ein definitiver Zusammenhang zwischen Auftreten des MZK und nicht-MZK Tumors kann dennoch nicht verifiziert werden und bedürfte weiterer Untersuchungen aus einem größeren Patientenkollektiv. Auch ein ubiquitäres Vorkommen des MCPyV in Tumorgewebe jeglicher Organe oder spezifisch der Haut könnte möglich sein. Zugang zu Gewebe von anderen Organen als der Haut bestand für uns leider nicht.

Um die Beziehung zwischen nicht-MZK und MZK näher zu betrachten, führten Koljonen et al. eine nationale Kohortenstudie in einem 172 MZK-Patienten umfassenden finnischen Kollektiv durch, die die Frequenz mit der sekundäre

nicht-MZK Tumore den MZK Tumoren nach Diagnosestellung folgen, untersuchte. Sie konnten zeigen, dass ein signifikant erhöhtes Risiko für MZK-Patienten besteht sekundäre Tumore, wie Basalzellkarzinome der Haut und chronisch lymphatische Leukämien, zu entwickeln. Als Ursache hierfür wurden gemeinsame ätiologische Faktoren, wie zum Beispiel Immunsuppression oder eine Infektion mit MCPyV, vermutet (Koljonen, Kukko et al. 2010).

Schrama et al. hingegen beobachteten tendenziell ein höheres Vorkommen anderer Hauttumore in der Vorgeschichte MCPyV-negativer MZK-Patienten (Schrama, Peitsch et al. 2011).

Beachtenswert ist auch eine potentielle Rolle des Immunstatus des Patienten. Kassem et al. fanden eine deutlich höhere Prävalenz von MCPyV-Sequenzen in NMSC (non-melanoma skin cancer) von Immunsupprimierten als von Immunkompetenten (Kassem, Technau et al. 2009).

Im Gegensatz zu vielen anderen Forschungsgruppen untersuchten wir jedoch nicht isoliert, sondern zu MZK assoziierte nicht-MZK Tumore. Vermutlich kommen MCPyV-Infektionen nicht exklusiv in MZK vor, sondern auch in anderen kutanen Tumorentitäten. Dabei scheint der prozentuale Anteil in zu MZK assoziierten Sekundärtumoren weitaus höher zu liegen als in isoliert betrachteten nicht-MZK Tumoren.

Wie Iwasaki et al. in ihrer Fallstudie eines 92-jährigen, japanischen Patienten mit einem kombinierten Tumor, der sowohl aus einer MZK- als auch aus einer Basalzellkarzinom-Komponente bestand und in welchem erstmalig eine Infektion durch das MCPyV in beiden Tumorentitäten beschrieben wurde, können auch wir einen Patienten (Patient 5) mit einem kombinierten Tumor aus einem Morbus Bowen und MZK vorstellen, der in beiden Komponenten positiv für das MCPyV ist (Iwasaki, Kodama et al. 2013). Dies liefert ein weiteres Indiz für eine pathogene Bedeutung des MCPyV in nicht-MZK Tumoren.

Da die Patienten in unserem untersuchten Kollektiv europäischen Ursprungs sind und vorwiegend aus Baden-Württemberg (Deutschland) stammen, war es uns nicht möglich regionale Unterschiede der MCPyV-Prävalenz zu untersuchen. Erwähnenswert ist in diesem Kontext die Studie von Ganeski et al., die Differenzen zwischen australischen und nord-amerikanischen Patienten

feststellen konnten. Diskutiert wurde eine mögliche kausale Bedeutung von UV-Strahlung, ein andersartiger MCPyV-Stamm, der mit den verwendeten Methoden nicht abgedeckt ist, oder gar ein anderer Virus, der ursächlich für das australische MZK ist (Garneski, Warcola et al. 2009). Widersprüchliche Ergebnisse lieferten Schrama et al. mit ihrer Arbeit, die in ihrem australischen Kollektiv eine mit der europäischen Population vergleichbar hohe Prävalenz des MCPyV nachweisen konnten (Schrama, Peitsch et al. 2011).

Die Unterschiede zwischen weiteren Studien zur MCPyV-Prävalenz in MZK aus Europa (Frankreich, Finnland, Ungarn, Deutschland), Amerika (USA), Asien (Japan, Südkorea) sind nur marginal.

Für den Nachweis des MCPyV setzten wir zwei verschiedene Primersets (MCV138 und MCV191) in der konventionellen PCR ein. Auch in anderen Studien war dies unter Verwendung diverser Primer die Methode der Wahl. Allerdings lässt sich durch dieses Verfahren nicht die virale Last in Tumorgewebe bestimmen. Hierfür müsste ein quantifizierendes PCR-Verfahren, wie die quantitative real-time PCR oder digitale PCR, eingesetzt werden. Eine quantitative Untersuchung der Viruslast in allen Tumorgeweben unterblieb in unserer Arbeit, wäre aber insbesondere in Hinblick auf die Bedeutung von MCPyV in nicht-MZK Tumore interessant gewesen. So konnten Becker et al. beispielsweise zwar nur in 3/24 (12,5%) der Basalzellkarzinome das MCPyV nachweisen, aber in diesen eine deutlich niedrigere Viruslast messen als in MZKs (Becker, Houben et al. 2009). Oder wie Bhatia et al., die hinter einer höheren Viruslast pro Zelle ein besseres Gesamtüberleben im Patientenkollektiv vermuteten (Bhatia, Goedert et al. 2010). Diese Annahme wurde durch Sihto et al. bestätigt, die anhand finnischer MZK-Patienten zeigen konnten, dass eine Infektion mit MCPyV mit einem besseren Gesamtüberleben einhergeht (Sihto, Kukko et al. 2009). Widerspruch erhielten sie durch Schrama et al., die zeigten, dass der MCPyV-Status weder die Rezidiv-Freiheit, das Gesamtüberleben noch das spezifische MZK-Überleben signifikant beeinflussen konnte. Prognose und klinischer Verlauf MCPyV-tragender und -freier Patienten waren ebenfalls analog (Schrama, Peitsch et al. 2011). Keinen Zusammenhang zwischen MCPyV-Status und Gesamtüberleben stellten auch

Handschele et al. fest (Handschele, Müller et al. 2010). Becker et al. hingegen vermuteten eine mit dem MCPyV assoziierte höhere Aggressivität des Tumors (Becker, Houben et al. 2009).

Letztlich bleibt die Frage bestehen, ob aus einer höheren MCPyV-Last beziehungsweise dem Vorkommen von MCPyV in einer Zelle eine frühere Metastasierung oder ein aggressiveres Verhalten des MZK resultiert. Ein quantitativer Virusnachweis ist aus dem uns vorliegenden Formalin-fixierten Gewebe nicht möglich, so dass wir diesen relevanten Nachweis aus technischen Gründen nicht erbringen konnten.

Neben den quantitativen Verfahren versuchte man auch durch nested-PCR, einer abgewandelten Methode der konventionellen PCR, die Vorgehensweise zu optimieren. Dabei wurden zwei Primersets in zwei aufeinanderfolgenden PCR-Durchläufen eingesetzt. Das PCR-Produkt des ersten Durchlaufs wurde daraufhin in eine weitere PCR-Schleife gegeben (Touze, Gaitan et al. 2009).

Mittels DIPS-PCR (detection of integrated papilloma sequences by ligation-mediated PCR), die eine Amplifikation einer Kontaktstelle zwischen viralem und humanem Genom erlaubt, konnten Martel-Jantin et al. keine spezifische Integrationsstelle des MCPyV in das menschliche Genom finden (Martel-Jantin, Filippone et al. 2012).

Erfolgreich zum Einsatz kamen auch monoklonale Antikörper. Dabei war der neu entwickelte Antikörper Ab3 seinem Kontrahenten CM2B4 - beide gegen das Large-T-Antigen gerichtet - deutlich überlegen (Reisinger, Shiffer et al. 2010, Rodig, Cheng et al. 2012, Chun, Yun et al. 2013, Hattori, Takeuchi et al. 2013). Essentielle Bedeutung für die erfolgreiche Detektion des MCPyV in Tumorgewebe scheint auch die Qualität des untersuchten Materials und die der für die Detektion eingesetzten Primer zu haben.

Wie in unserer Arbeit, wurde in anderen Studien überwiegend FFPE-Gewebe (Formalin fixed paraffin embedded tissue) verwendet. Es ist allerdings bekannt, dass Formalin Nukleinsäuren in kleine Fragmente zerlegen kann und so möglicherweise eine Detektion unmöglich macht. Um die Detektionsrate speziell in FFPE-Gewebe zu erhöhen, wählten wir bewusst Primer die kurze Produkte (138bp und 191bp) erzeugen (Srinivasan, Sedmak et al. 2002,

Kassem, Schopflin et al. 2008, Andres, Belloni et al. 2010). So konnten insbesondere zwei französische Studien die Ineffektivität ihrer Primer speziell in FFPE-Gewebe darlegen, wohingegen der Nachweis in frisch gefrorenem Gewebe erfolgreich verlief. Anzumerken ist allerdings, dass die jeweiligen Arbeitsgruppen Primer wählten, die vergleichsweise große Produkte (MerkT: 404bp, LT3: 308bp, VP1: 351bp, LT1: 440bp) erzeugen (Touze, Gaitan et al. 2009, Martel-Jantin, Filippone et al. 2012), so dass die DNA für diese Produktgröße durch Formalin bereits zu stark fragmentiert wurde.

Ferner wurden unsere PCR-Produkte durch DNA-Sequenzierung verifiziert, so dass die Spezifität der Produkte bewiesen wurde.

6. Zusammenfassung

Das Merkel-Zell-Karzinom (MZK) ist eine seltene, hochgradig aggressive, maligne kutane Neoplasie (Calder and Smoller 2010). Schon früh wurde eine infektiöse Genese des Tumors vermutet. Feng et al. beschrieben 2008 erstmals ein neuartiges Polyomavirus, das Merkel cell polyomavirus (MCV/MCPyV), welches sich in 80% aller MZKs fand und klonal in das Wirtsgenom integriert wird (Feng, Shuda et al. 2008; Becker 2010). Seither wurden diverse Studien zur Erhebung des MCPyV-Prävalenzstatus sowohl in MZK-Tumorgewebe, als auch in nicht-MZK Tumoren der Haut veröffentlicht. Allerdings wurde bisher nie vergleichend die Penetranz des MCPyV in metastasierten und nicht-metastasierten MZK mit der zu Primärtumoren assoziierten MZK-Metastasen und nicht-MZK-Tumoren der Haut verglichen. Ziel dieser Arbeit war, ob eine Infektion mit MCPyV eine generelle oder für MZKs exklusive Infektion darstellt. Zusätzlich erhofften wir uns durch Analyse der Konkordanz zwischen MZK-Primärtumor und Metastase eine Aussage machen zu können, inwiefern MCPyV-Integration in Tumorzellen möglicherweise zu einer Proliferation und erhöhter Metastasenabsiedlung führen könnte.

Zur Probengewinnung wurden Paraffinschnitte erstellt, entparaffiniert und reines Tumorgewebe gewonnen. Dieses wurde enzymatisch verdaut und anschließend DNA isoliert. Mittels PCR, unter Verwendung der Primer MCV138 und MCV191, wurde MCPyV-DNA amplifiziert. Die Amplifikationsprodukte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch UV-Licht visualisiert. Die DNA wurde purifiziert und extern sequenziert. Untersucht wurden MZK, Metastasen und nicht-MZK Hauttumore von 29 Patienten. Bei 17 Patienten lag das MZK ohne, bei 12 Patienten mit 16 Metastasen vor. Bei 5 Patienten lagen zusätzlich 7 nicht-MZK Tumore der Haut vor.

In allen 17 Primärtumor-Proben der Patienten mit MZK ohne Metastase konnte MCPyV-DNA detektiert werden (16/17 für MCV138 und 11/17 für MCV191; positiv für beide Primersets 10/17).

Im Vergleich dazu waren 12/13 Primärtumor-Proben der 12 Patienten mit MZK und Metastase infiziert (10/13 für MCV138 und 7/13 für MCV191; positiv für

beide Primersets 5/13). Im Gesamtkollektiv der 29 Patienten waren 28/30 Primärtumor-Einzelproben positiv für MCPyV (26/30 für MCV138 und 18/30 für MCV191; positiv für beide Primersets 16/30).

14/16 zu den Primärtumoren korrespondierende Metastasen waren mit MCPyV infiziert (14/16 für MCV138 und 12/16 für MCV191; positiv für beide Primersets 12/16). 9/11 Patienten mit MCPyV im Primärtumor zeigten eine MCPyV-infizierte Metastase. Ein identischer MCPyV-Status in Primärtumor und assoziierter Metastase lag somit bei 75% der Patienten vor. Diese hohe Konkordanz-Rate impliziert, dass MCPyV-Integration in Tumorzellen zu Proliferation und möglicherweise zu erhöhter Metastasenbildung führen könnte. Zum Ausschluss unspezifischer MCPyV-Infektionen, wurden auch nicht-MZK Hauttumore untersucht. Interessanterweise, und nicht unserer Arbeitshypothese entsprechend, konnte in allen sieben nicht MZK-Hauttumoren DNA des MCPyV amplifiziert werden. Untersucht wurden 8 Proben 7 eigenständiger Hauttumore, von denen alle über mindestens einen der beiden Primer ein Amplifikat für MCPyV-DNA zeigten (7/8 für MCV138 und MCV191; positiv für beide Primersets 6/8). Man kann vermuten, dass eine Infektion mit MCPyV allgemein in Hauttumoren auftreten kann und nicht spezifisch für MZK ist.

Unsere PCR-Ergebnisse wurden durch DNA-Sequenzierung verifiziert. Über MCV191 konnten in 16/18 MCPyV-infizierten Primärtumoren Wildtyp-Sequenzen nachgewiesen werden, die auch die nicht-MZK Hauttumore dominierten. Zwei Patienten trugen allerdings identische Punktmutationen sowohl im Primärtumor als auch in korrespondierender Metastase. Dies ist ein mögliches Indiz für eine Weitergabe des Genoms, inklusive integrierter MCPyV-DNA vom Primärtumor zur Metastase.

7. Literaturverzeichnis

Andres C, Belloni B, Puchta U, Sander C. A, Flaig M. J (2010) Prevalence of MCPyV in Merkel cell carcinoma and non-MCC tumors. *J Cutan Pathol* 37(1): 28-34.

Arron S. T, Jennings L, Nindl I, Rosl F, Bouwes Bavinck J. N, Seckin D, Trakatelli M, Murphy G. M (2011) Viral oncogenesis and its role in nonmelanoma skin cancer. *Br J Dermatol* 164(6): 1201-1213.

Becker J. C (2010) Merkel cell carcinoma. *Ann Oncol* 21 Suppl 7: vii81-85.

Becker J. C, 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(1): 248-250.

Bhatia K, Goedert J. J, Modali R, Preiss L, Ayers L. W (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): 1493-1496.

Bichakjian C. K, Lowe L, Lao C. D, Sandler H. M, Bradford C. R, Johnson T. M, Wong S. L (2007) Merkel cell carcinoma: critical review with guidelines for multidisciplinary management. *Cancer* 110(1): 1-12.

Calder K. B and Smoller B. R (2010) New insights into merkel cell carcinoma. *Adv Anat Pathol* 17, 155-161.

Chun S. M, Yun S. J, Lee S. C, Won Y. H, Lee J. B (2013) Merkel cell polyomavirus is frequently detected in korean patients with merkel cell carcinoma. *Ann Dermatol* 25(2): 203-207.

Duncavage E. J, Zehnbaue B. A, Pfeifer J. D (2009) Prevalence of Merkel cell polyomavirus in Merkel cell carcinoma. *Mod Pathol* 22(4): 516-521.

Duprat J. P, Landman G, Salvajoli J. V, Brechtbuhl E. R (2011) A review of the epidemiology and treatment of Merkel cell carcinoma. *Clinics (Sao Paulo)* 66(10): 1817-1823.

Dworkin A. M, Tseng S. Y, Allain D. C, Iwenofu O. H, Peters S. B, Toland A. E (2009) Merkel cell polyomavirus in cutaneous squamous cell carcinoma of immunocompetent individuals. *J Invest Dermatol* 129(12): 2868-2874.

Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore P. S (2008) Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science* 319(5866): 1096-1100.

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(9): 1491-1493.

Garneski K. M, Warcola A. H, Feng Q, Kiviat N. B, Leonard J. H, Nghiem P (2009) Merkel cell polyomavirus is more frequently present in North American than Australian Merkel cell carcinoma tumors. *J Invest Dermatol* 129(1): 246-248.

Gupta S. G, Wang L. C, Penas P. F, Gellenthin M, Lee S. J, Nghiem P (2006) Sentinel lymph node biopsy for evaluation and treatment of patients with Merkel cell carcinoma: The Dana-Farber experience and meta-analysis of the literature. *Arch Dermatol* 142(6): 685-690.

Halata Z, Grim M, Bauman K. I (2003) Friedrich Sigmund Merkel and his "Merkel cell", morphology, development, and physiology: review and new results. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 271(1): 225-239.

Handschel J, Muller D, Depprich R. A, Ommerborn M. A, Kubler N. R, Naujoks C, Reifenberger J, Schafer K. L, Braunstein S (2010) The new polyomavirus (MCPyV) does not affect the clinical course in MCCs. *Int J Oral Maxillofac Surg* 39(11): 1086-1090.

Harrison S. C and Bergfeld W. F (2009) Ultraviolet light and skin cancer in athletes. *Sports Health* 1(4): 335-340.

Hattori T, Takeuchi Y, Takenouchi T, Hirofuji 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(2): 99-107.

http://www.krebsgesellschaft.de/download/leitlinie_merkel_ado_2005.pdf
[Zugriff: 30.06.2014]

Heath M, Jaimes N, Lemos B, Mostaghimi A, Wang L. C, Penas P. F, Nghiem P (2008) Clinical characteristics of Merkel cell carcinoma at diagnosis in 195 patients: the AEIOU features. *J Am Acad Dermatol* 58(3): 375-381.

Imajoh M, Hashida Y, Nemoto Y, Oguri H, Maeda N, Furihata M, Fukaya T, Daibata M (2012) Detection of Merkel cell polyomavirus in cervical squamous cell carcinomas and adenocarcinomas from Japanese patients. *Virology* 539: 154.

Iwasaki T, Kodama H, Matsushita M, Kuroda N, Yamasaki Y, Murakami I, Yamamoto O, Hayashi K (2013) Merkel cell polyomavirus infection in both components of a combined Merkel cell carcinoma and basal cell carcinoma with ductal differentiation; each component had a similar but different novel Merkel cell polyomavirus large T antigen truncating mutation. *Hum Pathol* 44(3): 442-447.

Jaeger T, Ring J, Andres C (2012) Histological, immunohistological, and clinical features of merkel cell carcinoma in correlation to merkel cell polyomavirus status. *J Skin Cancer* 2012: 983421.

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(13): 5009-5013.

Kassem A, Technau K, Kurz A. K, Pantulu D, Loning M, Kayser G, Stickeler E, Weyers W, Diaz C, Werner M, Nashan D, Zur Hausen A (2009) Merkel cell polyomavirus sequences are frequently detected in nonmelanoma skin cancer of immunosuppressed patients. *Int J Cancer* 125(2): 356-361.

Kempf W, Hantschke M, Kutzner H, Burgdorf W. H. C: *Dermatopathologie*, 2. Auflage. Germany, Steinkopff Verlag Darmstadt: 262., 2007

Koljonen V, Kukko H, Tukiainen E, Bohling T, Sankila R, Joensuu H, Pukkala E (2010) Second cancers following the diagnosis of Merkel cell carcinoma: a nationwide cohort study. *Cancer Epidemiol* 34(1): 62-65.

Lemos B. D, Storer B. E, Iyer J. G, Phillips J. L, Bichakjian C. K, Fang L. C, Johnson T. M, Liegeois-Kwon N. J, Otley C. C, Paulson K. G, Ross M. I, Yu S. S, Zeitouni N. C, Byrd D. R, Sondak V. K, Gershenwald J. E, Sober A. J, Nghiem P (2010) Pathologic nodal evaluation improves prognostic accuracy in Merkel cell carcinoma: analysis of 5823 cases as the basis of the first consensus staging system. *J Am Acad Dermatol* 63(5): 751-761.

Loyo M, Schussel J, Colantuoni E, Califano J, Brait M, Kang S, Koch W. M, Sidransky D, Westra W. H, Taube J. M (2012) Detection of Merkel cell virus and correlation with histologic presence of Merkel cell carcinoma in sentinel lymph nodes. *Br J Cancer* 106(7): 1314-1319.

Majewska H and W. Biernat W (2010) Merkel cell carcinoma. Pathological and molecular aspects of diagnosis and clinical features. *Pol J Pathol* 61(3): 117-123.

Martel-Jantin C, Filippone C, Cassar O, Peter M, Tomasic G, Vielh P, Briere J, Petrella T, Aubriot-Lorton M. H, Mortier L, Jouvion G, Sastre-Garau X, Robert C, Gessain A (2012) Genetic variability and integration of Merkel cell polyomavirus in Merkel cell carcinoma. *Virology* 426(2): 134-142.

Martel-Jantin C, Pedergrana V, Nicol J. T, Leblond V, Tregouet D. A, Tortevoye, P, Plancoulaine S, Coursaget P, Touze A, Abel L, Gessain A (2013) Merkel cell polyomavirus infection occurs during early childhood and is transmitted between siblings. *J Clin Virol*. 2013 Sep; 58(1): 288-91.

Moll I, Roessler M, Brandner J. M, Eispert A. C, Houdek P, Moll R (2005) Human Merkel cells--aspects of cell biology, distribution and functions. *Eur J Cell Biol* 84(2-3): 259-271.

Murakami M, Imajoh M, Ikawa T, Nakajima H, Kamioka M, Nemoto Y, Ujihara T, Uchiyama J, Matsuzaki S, Sano S, Daibata M (2011) Presence of Merkel cell polyomavirus in Japanese cutaneous squamous cell carcinoma. *J Clin Virol* 50(1): 37-41.

Nicolaidou E, Mikrova A, Antoniou C, Katsambas A. D (2012) 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.

Ota S, Ishikawa S, Takazawa Y, Goto A, Fujii T, Ohashi K, Fukayama M (2012) Quantitative analysis of viral load per haploid genome revealed the different biological features of Merkel cell polyomavirus infection in skin tumor. *PLoS One* 7(6): e39954.

Ralston J, Chiriboga L, Nonaka D (2008) MASH1: a useful marker in differentiating pulmonary small cell carcinoma from Merkel cell carcinoma. *Mod Pathol* 21(11): 1357-1362.

Reisinger D. M, Shiffer J. D, Cognetta A. B, Jr. Chang Y, Moore P. S (2010) Lack of evidence for basal or squamous cell carcinoma infection with Merkel cell polyomavirus in immunocompetent patients with Merkel cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* 63(3): 400-403.

Rodig S. J, Cheng J, Wardzala J, DoRosario A, Scanlon J. J, Laga A. C, Martinez-Fernandez A, Barletta J. A, Bellizzi A. M, Sadasivam S, Holloway D. T, Cooper D. J, Kupper T. S, Wang, L. C, DeCaprio J. A (2012) Improved detection suggests all Merkel cell carcinomas harbor Merkel polyomavirus. *J Clin Invest* 122(12): 4645-4653.

Schrama D, Peitsch W. K, Zapatka M, Kneitz H, Houben R, Eib S, Haferkamp S, Moore P. S, Shuda M, Thompson J. F, Trefzer U, Pfohler C, Scolyer R. A, Becker J. C (2011) Merkel cell polyomavirus status is not associated with clinical course of Merkel cell carcinoma. *J Invest Dermatol* 131(8): 1631-1638.

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(13): 938-945.

Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S (2002) Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol* 161(6): 1961-1971.

Toberer F, Werchau S, Bischof M, Buchler M, Enk A, Helmbold P (2011) Merkel cell carcinoma: a highly aggressive tumor with possible viral etiology. *Chirurg* 82(8): 653-660.

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(6): 960-962.

Van Keymeulen A, Mascre G, Youseff K. K, Harel I, Michaux C, De Geest N, Szpalski C, Achouri Y, Bloch W, Hassan B. A, Blanpain C (2009) Epidermal progenitors give rise to Merkel cells during embryonic development and adult homeostasis. *J Cell Biol* 187(1): 91-100.

Varga E, Kiss M, Szabo K, Kemeny L (2009) Detection of Merkel cell polyomavirus DNA in Merkel cell carcinomas. *Br J Dermatol* 161(4): 930-932.

Wong H. H and Wang J (2010) Merkel cell carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 134(11): 1711-1716.

8. Erklärung zum Eigenanteil

Erklärung zum Eigenanteil an der Dissertationsschrift von:

Herrn Johannes Hackmann,
geb. am 05. 09. 1986 in Ahlen/Westf.,
zum Thema: Prävalenz und Penetranz des Merkel-Zell-Polyomavirus bei
Merkel-Zell-Karzinomen, deren Metastasen und diversen Hauttumoren,
aus der Universitäts-Hautklinik Tübingen.

Herr PD Dr. med. Amir Yazdi hat die Studie konzipiert, er hat die Arbeit betreut
und das Manuskript korrigiert.

Die Daten und das histologische Gewebe wurden überwiegend von der
Universitäts-Hautklinik Tübingen zur Verfügung gestellt, einzelne Proben von
der Dermatopathologischen Gemeinschaftspraxis, Friedrichshafen und dem
Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Tübingen.

Die Daten-Recherche und die Archivarbeit leistete Herr Johannes Hackmann.

Die Sequenzierung der Proben wurde extern durch die Firma Eurofins
Genomics durchgeführt. Die Interpretation der Sequenzen erfolgte durch Herrn
PD Dr. med. Amir Yazdi und Herrn Johannes Hackmann.

Tumorgewebe auf den (HE-)-Serienschnittstufen wurde von Herrn PD Dr. med.
Amir Yazdi identifiziert und markiert.

Alle weiteren Versuche dieser Arbeit wurden von Herrn Johannes Hackmann
eigenständig durchgeführt und ausgewertet.

Herr Johannes Hackmann hat das Manuskript selbstständig verfasst.

Datum und Unterschrift des Antragsstellers:

9. Danksagung:

Allen, die am Zustandekommen dieser Arbeit beteiligt waren, möchte ich ganz herzlich danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater und Betreuer Herrn PD Dr. med. Amir Yazdi, der sich von Beginn meiner Arbeit an Zeit für mich genommen hat, mir sowohl bei der experimentellen Laborarbeit als auch der Auswertung und späteren Niederschrift jederzeit mit Herz, Rat und Tat zur Seite gestanden hat.

Mein Dank gilt auch Frau Dr. Franziska Eberle von der Universitäts-Hautklinik Tübingen für ihre fachliche Hilfe.

Für ihre kompetente und freundliche Unterstützung im Labor möchte ich Frau Ingrid Kumbier danken.

An die medizinisch-technischen Assistentinnen der Universitäts-Hautklinik Tübingen geht mein Dank für ihre Hilfsbereitschaft und tatkräftige Unterstützung.

Frau Prof. Dr. med. Leticia Quintanilla-Fend vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Tübingen sowie Herrn PD Dr. Kutzner, Dermatopathologische Gemeinschaftspraxis Friedrichshafen, möchte ich für die Bereitstellung zusätzlichen Gewebes danken.

Johannes Hackmann

Adresse:

Telefon:

Email:

Geburtstag/-ort: 05. 09. 1986 in Ahlen/Westf.

Akademische Ausbildung

04. 2010 – 05. 2014 **Eberhard Karls Universität Tübingen**
Abschluss: Zweites Staatsexamen
(bestanden am 16. Mai 2014)
Studienfach: Humanmedizin
05. 2008 – 04. 2010 **Eberhard Karls Universität Tübingen**
Abschluss: Erstes Staatsexamen
Studienfach: Humanmedizin

Praktisches Jahr

10. 2013 – 01. 2014 **Eberhard Karls Universität Tübingen**
Universitätsklinikum Tübingen
Department: Chirurgie
06. 2013 – 10. 2013 **Victoria University of Wellington, Neuseeland**
Wairarapa Hospital Masterton
Department: Orthopädie
02. 2013 – 06. 2013 **Universität Zürich, Schweiz**
Kantonsspital Graubünden
Department: Innere Medizin

Famulaturen Universitätsklinikum Tübingen

08. 2012 – 09. 2012 Department: Dermatologie
08. 2012 Department: Orthopädie
02. 2012 – 03. 2012 Department: Dermatologie
08. 2011 Department: Intensivmedizin
02. 2011 – 03. 2011 Department: Nephrologie
-

Berufliche Ausbildung

11. 2007 – 05. 2008 **Bayerisches Rotes Kreuz**
Kreisverband Aschaffenburg
Anerkennungsjahr
08. 2006 – 10. 2007 **Deutsches Rotes Kreuz Frankfurt a. Main**
Zentrale Ausbildungsstätte
Abschluss: Rettungsassistent

Schulische Ausbildung

08. 2001 – 06. 2006 **Franziskanergymnasium Kreuzburg**
Großkrotzenburg
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
09. 1997 – 07. 2001 **Spessart-Gymnasium Alzenau**

Sprachen	Deutsch:	Muttersprache
	Englisch:	Verhandlungssicher
	Spanisch:	Grundkenntnisse
	Latein:	Latinum

Interessen, Hobbys Mountainbiking, Basketball, Fitness, Lesen

Stuttgart, den 07. 07. 2014

Johannes Hackmann