

Új vírusok azonosítása és vizsgálata tumoros eredetű bőrelváltozásokban

Doktori (Ph.D.) értekezés

dr. Horváth-Szógyi Katalin Barbara

Témavezető: Prof. Dr. Reuter Gábor^{1,2}

Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Reglődi Dóra

Programvezető: Dr. Kerényi Mónika



¹Baranya Megyei Kormányhivatal, Népegészségügyi Szakigazgatási Szerve, Regionális Virologiai Laboratórium, Gastroenterális Vírusok Nemzeti Referencia Laboratóriuma

²Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar,
Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet

Pécs, 2022

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
BEVEZETÉS	7
Onkogén vírusok	7
Retrovírusok és szerepük az onkogenezisben	9
<i>Az egér emlődaganat vírus (MMTV)</i>	11
Hörcsögökben előforduló tumoros megbetegedésekről röviden	12
A polyomavírusokról röviden	13
A Merkel-sejtes (MC) polyomavírus	15
<i>Felfedezés</i>	15
<i>Morfológia, genomszerkezet</i>	15
Patogenezis: a Merkel-sejtes polyomavírus szerepe	
az MCC kialakulásában	16
A Merkel-sejtes karcinóma (MCC)	18
<i>A Merkel-sejtes karcinómáról röviden</i>	18
<i>A Merkel-sejtes karcinóma epidemiológiája</i>	19
<i>A Merkel-sejtes karcinóma klinikuma</i>	20
<i>A Merkel-sejtes karcinóma laboratóriumi és szövettani diagnosztikája</i> ..	25
Az MC polyomavírus elleni ellenanyagok, immunitás	27
<i>Humorális immunitás</i>	27
<i>Sejtes immunitás</i>	28
A Merkel-sejtes karcinóma kezelése	29
<i>Primer tumor</i>	29
<i>Őrszemnyirokcsomó és regionális nyirokcsomók</i>	29
<i>Lokális recidívák, in tranzit metasztázisok és távoli áttétek</i>	30
<i>Sugárkezelés</i>	30
<i>Adjuváns sugárkezelés</i>	30
<i>Terápiás célzatú sugárkezelés</i>	31
<i>Kemoterápia</i>	31
<i>Immunterápia</i>	32
CÉLKITŰZÉSEK	34

I. Az MC polyomavírus vizsgálata MCC daganatokban	34
II. Új endogén retrovírus kimutatása hörcsög bőrdaganatából.....	34
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	35
I. MERKEL-SEJTES KARCINÓMA ÉS POLYOMAVÍRUS	35
Vizsgálati anyagok.....	35
Epidemiológiai és klinikai adatok.....	35
A paraffinba ágyazott szövetminták deparaffinálása	35
DNS-izolálás	36
Diagnosztikus MC polyomavírus PCR-primerek	37
Polimeráz láncreakció (PCR).....	37
Primerek a teljes MC polyomavírus genom meghatározásához.....	38
Agaróz gélelektroforézis	40
PCR-termék tisztítása	40
Szekvenálás	41
Szekvencia- és filogenetikai elemzés	42
II. HÖRCSÖG BŐRTUMOR ÉS VIZSGÁLATA.....	42
Vizsgálati anyagok.....	42
Szekvencia-független, random nukleinsav amplifikáció és virális metagenomika	43
Teljes virális genom meghatározás	43
Szekvencia- és filogenetikai elemzés	46
Szövettan	46
<i>In situ</i> hibridizáció.....	47
Minta előkészítése	47
Az FFPE szakaszok kromogén <i>in situ</i> hibridizációja	47
Az integrált BSHRV bétaretrovírus genom kópiaszámának meghatározása qPCR-módszerrel.....	48
EREDMÉNYEK	50
I. MERKEL-SEJTES KARCINÓMA ÉS MC POLYOMAVÍRUS	50
A vizsgálat menete	50
A Merkel-sejtes karcinóma esetek epidemiológiai, kliniko-patológiai és virológiai jellegzetességei.....	51
Az esetek kórtörténetének részletes bemutatása	56

A Merkel-sejtes polyomavírus teljes genomjának meghatározása	58
II. HÖRCSÖG BŐRTUMOR ÉS VIZSGÁLATA.....	60
Esettanulmány és klinko-patológia.....	60
Virális szekvencia azonosítása metagenomikai módszerekkel.....	61
Retrovirális szekvencia meghatározása	62
Long terminal repeats (LTRs) elemzése.....	64
Kódoló régió elemzése.....	65
Filogenetikai analízis.....	66
Szövetteni lelet.....	66
<i>In situ</i> hibridizáció.....	66
A BSHRV keresése további hörcsögök bevonásával.....	69
A BSHRV bétaretrovírus genom kópiaszámának meghatározása qPCR-módszerrel	70
MEGBESZÉLÉS	71
Merkel-sejtes polyomavírus és Merkel-sejtes karcinóma	71
Black Syrian hamster retrovírus (BSHRV) és hörcsög bőrtumor	76
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	79
PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK	80
IRODALOMJEGYZÉK	82
AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK.....	103

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

A	adenin
aa	aminosav (amino acid)
AIDS	szerzett immunhiányos tünetegyüttes (acquired immunodeficiency syndrome)
AKT	szerin/treonin fehérjekináz
ÁNTSZ	Állami Népegészségügyi és Tisztiorvosi Szolgálat
AS	antiszensz (antisense)
BCC	bazalióma (basal cell carcinoma)
BKV	BK polyomavírus (BK: a beteg monogramja)
bp	bázispár (base pair)
BSHRV	fekete szíriai hörcsög retrovírus (black Syrian hamster retrovirus)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
cc.	karcinóma (carcinoma)
C	citozin
°C	Celsius-fok
CCL19	kemokin C-C motívum ligand 19 (chemokine C-C motif ligand 19)
CD	differenciálódási marker (cluster of differentiation)
CDDP	ciszplatin kezelés (cis-diammine-chloroplatinum)
cDNS	komplementer dezoxiribonukleinsav (complement deoxynucleic acid)
CK	citokeratin
CLL	krónikus limfoid leukémia (chronic lymphocytic leukemia)
COPD	krónikus obstruktív tüdőbetegség (chronic obstructive pulmonary disease)
DNS	dezoxiribonukleinsav (deoxynucleic acid)
dUTPase	dezoxiuridin-5'-trifoszfát-nukleotidohidroláz (deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase)
dNTP	dezoxinukleotid-trifoszfát (deoxynucleotid triphosphate)
EBV	Epstein-Barr vírus
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
ELISA	enzimhez kapcsolt immunesszé (enzyme-linked immunosorbent assay)
EMA	Európai Gyógyszerügynökség (European Medicines Agency)
env	burokfehérjéket kódoló retrovirális régió (envelope proteins)
EPI	epirubicin
ERV	endogén retrovírus (endogen retroviruses)
EtBr	etídium-bromid
FBS	magzati szarvasmarha szérum (fetal bovine serum)
FDA	Élelmiszer- és Gyógyszerfelügyelet (Food and Drug Administration)
FTAB	finomtű aspirációs biopszia
g	gramm
G	guanin
gag	csoportspecifikus retrovirális antigén (group-specific antigen)
Gy	gray
HaPV	hörcsög polyomavírus (hamster polyomavirus)
HaSV	hörcsög szarkóma vírus (hamster sarcoma virus)
HaLV	hörcsög leukémia vírus (hamster leukemia virus)
HBV	hepatitis B vírus
HCV	hepatitis C vírus
HCl	hidrogén-klorid
HTLV	humán T-sejtes leukémiavírus
HIV	humán immundeficiencia vírus

HMTV	humán emlőtumor vírus
HPV	humán papillomavírus
HPyV6	humán polyomavírus 6
HPyV7	humán polyomavírus 7
HPyV9	humán polyomavírus 9
HTLV-1	humán T-sejtes leukémiavírus-1
ICTV	Nemzetközi Vírustaxonómiai Bizottság (International Committee on Taxonomy of Viruses)
IgG	immunglobulin G
IL	interleukin
JCV	JC (John Cunningham) polyomavírus
KA	keratoakantóma
KCl	kálium-klorid
kDa	kilodalton
KIV	Karolinska Institute polyomavírus
KSHV	Kaposi-szarkóma herpeszvírus
LIPV	Lyon IARC polyomavírus
LT	nagy T fehérje (large T protein)
LTR	retrovírus terminális végein elhelyezkedő ismétlődéseket tartalmazó szakasz (long terminal repeat)
MCV	Merkel-sejtes polyomavírus
MCC	Merkel-sejtes karcinóma (Merkel-cell carcinoma)
MgCl ₂	magnézium-klorid
M	mól (mol)
min	perc (minutum)
ml	milliliter (millilitre)
mM	millimol
MMTV	egér emlőtumor vírus (mouse mammary tumorvirus)
MPyV	egér polyomavírus (murine polyomavirus)
mTor	mammalian target of rapamycin
mtsai.	munkatársai
MUR	Merkel-sejtes polyomavírus egyedi régiója (MCV unique region)
MWPyV	Malawi polyomavírus
NaCl	nátrium-klorid
NBT/BCIP	nitro-kék tetrazolium klorid/5-bróm-4-klór-indolifoszfát p-toluidin só (nitro blue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate p-toluidine salt)
NJPV	New Jersey polyomavírus vagy humán polyomavírus 13
NK	természetes ölősejt (natural killer)
nt	nukleotid
PBS	elsődleges kötőhely, tRNS kötőhelye a retrovirális genomban (primer-binding site)
PBS-T	foszfáttal pufferolt sóoldat (phosphate buffered saline) és Triton X-100
PCR	polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)
PD-1	programozott sejthalál fehérje-1 (programmed cell death protein-1)
PD-L1	programozott sejthalál ligand-1 (programmed death ligand-1)
PPT	polipurin traktus (polypurine tract)
pol	polimeráz (polymerase)
PI3K	foszfatidilinozitol 3-kináz (phosphatidylinositol 3-kinase)
PTE ÁOK	Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar
PUVA	psoralen és UV-A fényterápiás kezelés
RNS	ribonukleinsav

R	retrovirális RNS mindkét végén elhelyezkedő, ismétlődéseket tartalmazó szekvencia (terminal repeat)
RB	retinoblasztóma fehérje (retinoblastoma protein)
RT	reverz transzkripció (reverse transcription)
RT-PCR	reverz transzkripció-polimeráz láncreakció (reverse transcription-polymerase chain reaction)
S	szensz (sense)
sag	szuperantigén (superantigen)
SCC	laphámsejtes karcinóma vagy spinalióma (squamous cell carcinoma)
sec	másodperc (secundum)
SIV	majom immundeficiencia vírus (Simian immunodeficiency virus)
st	kis t fehérje (small t protein)
SSC	nátrium-citrát só (saline sodium citrate)
STLV	Saint Louis polyomavírus vagy humán polyomavírus 11
SV40	majomvírus 40 (simian virus 40)
T	timin
TAIL-PCR	speciális PCR-technika: termikus, aszimmetrikusan átkötött polimeráz láncreakció (thermal asymmetric interlaced polymerase chain reaction)
TATA box	TATA nukleotidokat tartalmazó jellegzetes retrovirális motívum
TGF	transzformáló növekedési faktor (transforming growth factor)
Treg	regulátoros T sejt
TSV	trichodysplasia spinulosa-asszociált polyomavírus (Trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus)
TTF-1	pajzsmirigy transzkripció faktor-1 (thyroid transcription factor-1)
U	unit (egység)
U3'	egyedi, jellegzetes nem kódoló retrovirális szekvencia az 3' régióban (unique 3' region)
U5'	egyedi, jellegzetes nem kódoló retrovirális szekvencia az 5' régióban (unique 5' region)
UH	ultrahang
UTR	nem kódoló szakasz (untranslated region)
UV	ultraviola sugárzás (ultraviolet light)
ún.	úgynevezett
VEGFR-2	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor receptor-2 (vascular endothelial growth factor receptor-2)
WXXW	triptofán (W)-X-X-triptofán (W) aminosav motívum
WUV	Washington University polyomavírus
µg	mikrogramm (microgram)
µl	mikroliter (microliter)
µM	mikromól (micromol)
YMDD	tirozin (Y)-metionin (M)-aszparaginsav (D)-aszparaginsav (D) aminosav motívum

BEVEZETÉS

Onkogén vírusok

A rosszindulatú daganatok kialakulásáért különböző endogén (szervezetben belüli) és exogén (környezeti) tényezők tehetők felelőssé. Az exogén tényezők között a karcinogén kémiai anyagok és a fizikai sugárzás mellett jelentős szerep jut a daganatkeltő mikroorganizmusoknak, elsősorban a vírusoknak. Emberben átfogó tanulmányok igazolják, hogy minden hatodik daganat hátterében bizonyítható fertőző ágens kóroki szerepe világszerte (Parkin, 2006; Plummer et al., 2016). Noha ez a gyakoriság csak egy átlag, és valószínűleg alulbecsült is, jelentős földrajzi különbségeket is láthatunk. Különösen a fejlődő országokat érintik súlyosabb mértékben a fertőző eredetű daganatos megbetegedések, ahol akár minden második daganatos megbetegedésben is szerepet játszhatnak és egyben a fiatalabb népességet is érintik (Wabinga et al., 2012).

A ma ismert emberi daganatot okozó ún. onkogén vírusok között DNS és RNS genomú vírusok egyaránt megtalálhatóak (1. táblázat). Az emberi onkogén DNS vírusok közé tartoznak az Epstein-Barr vírus (EBV, azaz a humán herpesvírus 4, HHV-4) (Epstein et al., 1964), a hepatitis B vírus (HBV) (Blumberg et al., 1965), a humán papillomavírus (HPV) (Durst et al., 1983), a Kaposi-szarkómához kapcsolt herpeszvírus (KSHV; azaz a humán herpeszvírus 8, HHV-8) (Chang et al., 1994), valamint a 2008-ban felfedezett Merkel-sejtes polyomavírus (Feng et al., 2008). Az emberi onkogén RNS genomú vírusokhoz a retrovírus család egyik tagja, a humán T-sejtes lymphotróf vírus-1 (HTLV-1) (Poiesz et al., 1980), valamint a hepatitis C vírus (HCV) (Choo et al., 1989) tartozik.

Vírus besorolása			Jellegetességei		
Család	Nemzetség	Vírus neve (rövidítés)	Felfedezés éve	A daganat típusa	Bővebb irodalom
<i>Herpesviridae</i>	<i>Lymphocryptovirus</i>	EBV=HHV4	1964	Burkitt-limfóma, Hodgkin-limfóma, nasofaringeális karcinóma, gyomor karcinóma, NK/T-sejtes limfóma	Smatti, et al., 2018
<i>Hepadnaviridae</i>	<i>Orthohepadnavirus</i>	HBV	1965	hepatocelluláris karcinóma	Shih, et al., 2018
<i>Retroviridae</i>	<i>Deltaretrovirus</i>	HTLV-1	1980	felölttkori T-sejtes limfóma/ leukémia, primer effúziós limfóma	Phillips, et al., 2018
<i>Papillomaviridae</i>	<i>Alpha- és Betapapillomavirus</i>	HPV > 130 féle	1983	méhnyak-, végbélnyílás-, szájüreg-garat-, gége-, hüvely-, pénisz tumor	Szymonowicz, et al., 2020
<i>Flaviviridae</i>	<i>Hepacivirus</i>	HCV	1989	hepatocelluláris karcinóma	Roger, et al., 2021
<i>Herpesviridae</i>	<i>Rhadinovirus</i>	KSHV=HHV8	1994	Kaposi-szarkóma, Castelman-betegség, primer effúziós limfóma	Goncalves, et al., 2017
<i>Polyomaviridae</i>	<i>Polyomavirus</i>	MCV	2008	Merkel-sejtes karcinóma	Walsh, et al., 2021

1. táblázat. A ma ismert emberi tumorvírusok a felfedezés idejének sorrendjében.

Már 1908-ban Ellerman és Bang bizonyította, hogy sejtmentes szűrlettel a csirke leukémia egyik egyedről a másikra átvihető (Ellerman és Bang, 1908). 1911-ben pedig ugyanezt sikerült bebizonyítani a csirke szarkóma esetén, amely Peyton Rous nevéhez fűződik (Rous, 1911). Rous retrovírusokkal kapcsolatos felfedezései megalapozták a későbbi onkogén retrovírus kutatások alapjait, ezért méltán nevezik a tumor vírusok atyjának (Van Epps HL, 2005). Számos onkogén vírus került leírásra különböző állatokból, így macskákból, tehenekből, patkányokból, egerekből, juhokból, kecskékből, főemlősökből, de még néhány halfajból is (Rosenberg és Jolicoeur 1997, Jaquelin Dudley, 2010). Bittner és Gross felfedezései rámutattak arra is, hogy a retrovírusok összefüggésbe hozhatóak egerekben epiteliális eredetű emlőtumorról és tímusz limfómával (Bittner, 1936). A vírusok daganatkeltő szerepének valódi jelentőségét azonban évtizedekig nem ismerték el. Rous felfedezését csak 55 évvel később, 1966-ban ismerték el Nobel-díjjal és ezzel a hosszú várakozási idővel világelső lett (<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1966/summary/>). Jelenleg is több a nyitott, mint a megválaszolt kérdés az emberi onkogén vírusokkal, köztük a retrovírusokkal kapcsolatban.

A daganatkeltő vírusok közül a továbbiakban a jelen munkával kapcsolatos két, daganatos megbetegedésben szerepet játszó víruscsoporttal, a retrovírusokkal és a polyomavírusokkal foglalkozunk részletesebben.

Retrovírusok és szerepük az onkogenezisben

A *Retroviridae* víruscsaládba tartozó retrovírusok kísérletes tumort indukáló képessége tehát már a 20. század fordulója óta ismert (Ellerman és Bang, 1908; Rous, 1911). E vírusok tanulmányozása alapozta meg a daganatok indukációjában részt vevő molekuláris mechanizmusok vizsgálatát (Bishop, 1991). A retrovírusok burokkal rendelkező, két azonos, pozitív, egyszálú szálú RNS genomot tartalmazó vírusok, amelyek egy sokszínű családot képviselnek (Varmus, 1988). A virionok átmérője körülbelül 80-130 nm. Az átlagosan 7-10 kilobázis hosszúságú genom kódoló (*gag-pol-env*), valamint az 5' és 3' terminális végeken elhelyezkedő, hosszú, nem kódoló régió (5'LTR és 3'LTR) részekből áll. A különböző retrovírusok közül a bétaretrovírusokban megtalálható LTR-ek a leghosszabbak. Hosszúságuk meghaladja az 1000 nt-et is. Az LTR-ek szabályozó szekvenciákat tartalmaznak, így például promótereket, enhanszereket és poliadenilációs szignálszekvenciákat, amelyek befolyásolhatják mind a retrovirális, mind a nem-retrovirális szekvenciák RNS-expresszióját (Leib-Mösch et al., 2004). Az 5'LTR

részben konzervatív elemek találhatók meg, mint a TATA box, az AATAAA-motívum, C/T-gazdag szakaszok, U5' (unique 5' region= egyedi szekvencia az 5' régióban), a terminális ismétlés (R), az U3 'régió, valamint a sejtes tRNS-t (tRNALys3) kötő konzervált primerkötő hely (primer-binding site, PBS). A 3'LTR rész általában egy 18 nt hosszúságú polypurine traktussal kezdődik (PPT), amely részt vesz a pozitív szálú DNS szintézisében (Bowman et al., 1996). E szakaszon megtalálhatók az U5', R és az U3' régiók, valamint itt is fellelhetők a konzervatív elemek, mint például a TATA box és az AATAAA-motívum.

A genom kódoló része több részre tagolódik: *gag* (group-specific-antigen=csoport-specifikus antigén), *pol* (polimeráz) és *env* (envelope=boríték), de egyes vírusoknál további járulékos gének is jelen lehetnek. A nukleokapszid a genom mellett reverz transzkriptázt, integrázt és proteázt, valamint a t-RNS primerjét tartalmazza (Levy, 1992). Szaporodási ciklusukat a reverz transzkriptáz (RNS-függő DNS polimeráz) teszi különlegessé és egyedivé a többi RNS vírushoz képest, ugyanis itt az RNS-ről komplementer DNS-intermedier (cDNS) szintetizálódik, mely kettőszálú DNS formájában a gazdasejt genetikai állományába is integrálódhat (Baltimore, 1970).

Biológiai viselkedésük alapján az onkogén retrovírusokat két nagy csoportba osztjuk: gyenge és erős onkogenitású retrovírusok (Varmus, 1988). Az úgynevezett gyenge onkogenitású vírusok tumorkeltő mechanizmusára jellemzője az inszerciós mutagenézis, amelynek lényege, hogy a provírus gazdasejt genomában történő integrációja következtében malignus transzformáció megy végbe a sejtben. A provírus olyan szabályozó elemeket tartalmaz, amelyek nemcsak a vírúsgénekre, hanem a gazdaszervezet genomjára is kifejthetik hatásukat (Coffin et al., 1997). Bizonyos egér törzsekben kimutatták, hogy egyes, szemmel is látható, megváltozott fenotípust eredményező mutációkat a retrovírusok általi inszerciós mutagenézis okoz (Jenkins et al., 1981; Stoye et al., 1988). Az erős onkogenitású retrovírusok celluláris onkogének vírushomológjait (ún. *v-onc* gének) tartalmazó retrovírusok. A celluláris onkogének felvétele a vírusgenomba rekombinációs események révén történik. A vírusgenom közben úgy módosul, hogy a rekombináns vírusok már nem replikálódnak. Más sejtek fertőzéséhez ún. helpervírusokra van szükség (Scarpa et al., 1991; Miller et al., 1996). A *v-onc* gének között szerepelnek a növekedést szabályozó fehérjéket kódoló gének különféle csoportjai (növekedési faktorok és receptoraik, szignál-transzdukáló molekulák, G-fehérjék és transzkripció faktorok). A *v-onc* gének klasszikus példája a Rous szarkóma vírus *v-src* onkogénje (Rous, 1911, Payne et al., 1992).

A humán genomban található endogén retrovirális elemek a genom 8%-át teszik ki (Lander et al., 2001). A mai exogén retrovírusok, valamint a genomban kódolt endogén retrovírusok (ERV) fertőző elődei bizonyítottan onkogén potenciállal is rendelkeznek. Az emberi rosszindulatú daganatos megbetegedésekre a humán ERV transzkripció aktiválása jellemző. Ezek a megfigyelések arra engednek következtetni, hogy az emberi daganatok fontos kóroki tényezői lehetnek a humán endogén retrovírusok (Kassiotis és Stoye, 2017).

Feller és Copra 1969-ben ún. bétaretrovírus partikulumokat találtak emlődaganatban szenvedő nők tejében (Feller et al., 1969). Ezzel megalapozták a humán onkogén retrovírus kutatások alapjait. Az első emberi retrovírust, a humán T-sejtes lymphotróf vírus 1-t (HTLV-1), 1980-ben Robert Gallo és munkatársai írták le. Sikerült bebizonyítaniuk, hogy az általuk felfedezett vírus a felnőttkori T-sejtes leukémia és limfóma kialakulásáért felelős (Gallo et al., 1980).

Az egér emlődaganat vírus (MMTV)

A korábban Bittner vírusnak nevezett egér emlődaganat vírus (mouse mammary tumorvirus: MMTV) az onkogén retrovírusok prototípusa. Mind az exogén, mind az endogén MMTV az emlődaganat kialakulásának egyik fő etiológiai tényezője a vadon élő és a kísérleti egerekben is (Ross, 2008). Az MMTV egyben a *Retroviridae* víruscsalád, *Betaretrovirus* nemzetség prototípusa is (https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/reverse-transcribing-dna-and-rna-viruses-2011/w/rt_viruses/161/retroviridae). A vírus terjedhet vertikálisan (endogén vírus) vagy horizontálisan (exogén vírus). Számos MMTV DNS-kópia található meg a leggyakrabban használt laboratóriumi egerek kromoszómális DNS-ében integrált formában, endogén provírusként (Coffin, 1992). Vertikális terjedésnél a provírus-integráció a csírasejt vonal sejtjeit is érinti (Cohen et al., 1979). Ilyenkor a provírus az utódokra is öröklődhet. A másik és egyben gyakoribb lehetőség a horizontális terjedés. Ezeket „tejből terjedő” azaz exogén vírusnak nevezzük Bittner alapján (Bittner, 1936). Az MMTV által indukált emlődaganat tumorigenezisének fontos eleme a provírus integráció, mely a közeli celluláris onkogének közvetített aktiválását idézi elő (Callahan és Smith, 2008; Ross, 2010). Egyes kutatások az MMTV *env* fehérje szerepét is szóba hozzák az emlőtumor képződéssel (Katz et al., 2005; Callahan és Smith, 2008; Ross, 2010).

Az egerekben emlőrákot okozó retrovírus azonosítása nagy érdeklődést váltott ki. Jogosan merült fel sokakban a kérdés, hogy vajon vannak-e hasonló vírusok más

fajokban, különös tekintettel az emberben. Számos tanulmány kimutatta, hogy az emberi mellrákos sejtek és szövetek olyan fehérjéket tartalmaznak, amelyek keresztreakcióba lépnek az MMTV elleni antiszérummal. Ezek a vizsgálatok azt is kimutatták, hogy MMTV-szerű RNS-ek és vírus partikulák vannak a daganatokban és az emlődaganatos betegek anyatejében (Axel et al., 1972; Keydar et al., 1984; Mesa-Tejada et al., 1982; Spiegelman et al., 1970). A közelmúltban számos kutatócsoport MMTV-szerű szekvenciákat azonosított emberi emlőrákból származó mintákból, amelyek a kontrollnak használt egészséges emlőszövetekből nem voltak kimutathatóak nested-PCR-technikákat alkalmazva (Wang et al., 1995; Liu et al., 2001; Lawson et al., 2010). Az egér emlődaganat vírussal (MMTV) 90–98%-ban homológ humán emlőtumor vírust (HMTV) egy amerikai tanulmányban PCR vizsgálattal az emlődaganatok 40%-ánál mutatták ki (Holland et al., 2016). Az etiológiai kapcsolat a HMTV és az emberi emlődaganat között azonban továbbra is nyitott kérdés.

Hörcsögökben előforduló tumoros megbetegedésekről röviden

A hörcsögök népszerű háziállatok az emberi környezetben. A leggyakrabban tartott fajok a szíriai (*Mesocricetus auratus*) és a dzsungáriai (*Phodopus sungarus*) hörcsögök (Jelinek et al., 2013). A házi hörcsögök spontán előforduló daganatairól ez idáig nagyon kevés közlemény született és a legtöbbjük is csak néhány egyedi esetről számol be (Kondo et al., 2008). A daganatok előfordulása e két fajban meglehetősen eltérő. Míg a szíriai hörcsögöknél a melanóma és bőr limfómák gyakoribbak, addig a dzsungáriai hörcsögöknél ötször gyakrabban fordulnak elő fibrómák, illetve az emlőtumorok gyakorisága is nagyobb (Brown et al., 2012; Jelinek et al., 2013).

Az 1960-as és '70-es években számos közlemény jelent meg az úgynevezett C-típusú retrovírusokról, amelyeket hörcsög sejtekből izoláltak. Ezek a hörcsög leukémia vírus (HaLV), a hörcsög szarkóma vírus (HaSV) és a D-9-es vírus (Bassin et al., 1968; Kelloff et al., 1970; Somerset et al., 1973) voltak. Ezeknek a vírusoknak egy része alacsony endogén reverz transzkriptáz aktivitással rendelkezik, másik részük pedig egyáltalán nem rendelkezik reverz transzkriptáz aktivitással (Kelloff et al., 1970; Verma et al., 1974). 1979-ben egy tipikus C-típusú hörcsög retrovírus került leírásra egy természetes hörcsög melanóma sejtvonalban (Y-22). Ez a vírus lényegesen különbözik az addig leírtaktól, hiszen képes egér, patkány és más hörcsögsejteket transzformálni (Russel et al., 1979). A hörcsögök retrovírusaival kapcsolatban csak e korlátozott és régi ismeretek állnak rendelkezésre.

A polyomavírusokról röviden

A polyoma görög eredetű elnevezés, a „poly” jelentése sok, az „oma” jelentése daganat. A *Polyomaviridae* víruscsalád első tagját Gross 1953-ban írta le, mint filtrálható fertőző ágenszt, amely a fültőmirigy-tumor kiváltására képes egerekben (Gross, 1953). Már ekkor felmerült a gyanú, hogy létezhetnek emberi daganatokban is szerepet játszó polyomavírusok. Az 1953-as felfedezést követő 36 évben mindössze két emberi polyomavírus volt ismert, viszont 2007 és 2017 között további 12 új humán polyomavírust fedeztek fel.

A *Polyomaviridae* család külön kiemelésre méltó, nem emberi, de állatokban daganatkeltő tagja az SV40 (simian virus 40) majom polyomavírus (Sweet et al., 1960). Az SV40 polyomavírus ugyancsak prototípus a vírusok okozta daganatkeltés tanulmányozásában. Ezért nagy riadalmat okozott, miután kiderült, hogy 1955-1961 között (egyres kelet-európai országokban 1980-ig), az emberi poliovírus oltóanyagok (Sabin és Salk) előállításánál során használt majom sejtvonalak SV40 fertőzöttek voltak.

A *Polyomaviridae* családnak jelenleg összesen 14 típusa ismert emberben. Az első felfedezett emberi polyomavírus a BK vírus volt, melyet 1971-ben azonosítottak veseátültetésen átesett beteg vizeletéből, aki a monogramjával a vírus névadójává is vált (Gardner et al., 1971). Ezt követte a JC (John Cunningham) polyomavírus, amelyet szintén 1971-ben izoláltak progresszív multifokális leukoencephalopátiás beteg agyszövetéből, és egyben igazolták a vírus kóroki szerepét is (Padgett et al., 1971). Ezt követően 36 év telt el a következő emberi polyomavírusok felfedezéséig. Ezek a KIV (Karolinska Institute) és a WUV (Washington University) polyomavírusok voltak (Allander et al., 2007; Gaynor et al., 2007). Az első igazolhatóan emberi daganatot okozó polyomavírus - a Merkel-sejtes polyomavírus - leírásáig 2008-ig kellett várni (Feng et al., 2008). 2008 óta további 9 új emberi polyomavírust fedeztek fel. Ezek a HPyV6 és a HPyV7 (humán polyomavírus 6 és 7) (Schowalter et al., 2010), a TSV (trichodysplasia spinulosa-asszociált polyomavírus) (van der Meijden et al., 2010), a HPyV9 (humán polyomavírus 9) és a MWPyV (Malawi polyomavírus) (Scuda et al., 2011), a STLV (Saint Louis polyomavírus vagy humán polyomavírus 11) (Lim et al., 2013), a HPyV12 (Kroup), a NJPV (New Jersey polyomavírus vagy humán polyomavírus 13) (Mishra et al., 2014) és a LIPV (Lyon IARC polyomavírus) (Gheit et al., 2017). A jelenleg ismert emberi polyomavírusokat a 2. táblázat foglalja össze.

Vírus neve (rövidítés)	Felfedezés éve	Minta, melyből a vírust kimutatták	Okozott betegség	Irodalom
BKV	1971	légtúti váladék, vizelet	légtúti fertőzés, húgyhólyag- és vesegyulladás (veseátültetésen átesett betegekben)	Ambalathingal et al., 2017
JCV	1971	légtúti váladék, vizelet, agyszövet, vastagbél-daganat	progresszív multifokális leukoencephalopátia, vastagbél-daganat	Bohra et al., 2017 Shavaleh et al., 2020
KIV	2007	légtúti váladék, széklet	légtúti fertőzés	Falcone et al., 2012
WUV	2007	légtúti váladék, széklet	légtúti fertőzés	Essa et al., 2017
MCV	2008	Kaposi-szarkóma, CLL, Merkel-sejtes karcinóma, szájüreg- és légzőhám	Merkel-sejtes karcinóma	Liu et al., 2016
HPyV6	2010	bőr, szérum, SCC, BCC, MCC, KA	még nem ismert	Beckervordersandforth et al., 2016
HPyV7	2010	bőr, thymoma	még nem ismert	Schowalter et al., 2010 Rennspiess et al., 2015
TSV	2010	trichodysplasia spinulosa, bőr	trichodysplasia spinulosa	Bagasi et al., 2018
HPyV9	2011	szérum és csont	még nem ismert	Scuda et al., 2011
MWPyV	2012	széklet	még nem ismert	Siebrasse et al., 2012
STLV	2013	széklet	még nem ismert	Lim et al., 2013
HPyV12	2013	széklet	még nem ismert	Korup et al., 2013
NJPV	2014	izom	még nem ismert	Mishra et al., 2014
LIPV	2017	bőr	még nem ismert	Gheit et al., 2017

2. táblázat. A jelenleg ismert emberi polyomavírusok és jellegzetességei

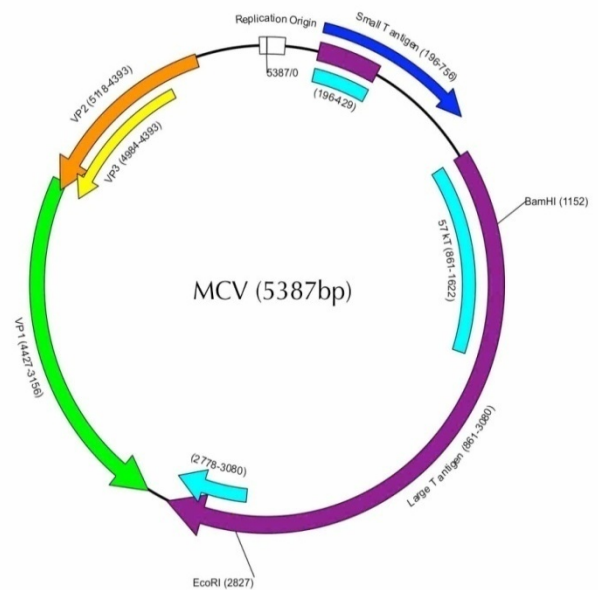
A Merkel-sejtes (MC) polyomavírus

Felfedezés

Feng és munkatársai 2008-ban 10 Merkel-sejtes karcinóma mintából 8 esetben molekuláris módszerekkel korábban ismeretlen polyomavírust azonosítottak, amelyet Merkel-sejtes (MC) polyomavírusnak neveztek el. Nyolcból hat esetben sikerült igazolni, hogy a virális DNS integrálódott a tumorsejtek genomjába is. Ebből arra következtettek, hogy az MC polyomavírus fertőzés megelőzi a tumorsejtek klonális növekedését (Feng et al., 2008). Ezt követően a világ minden táján megindult kutatások - az alkalmazott molekuláris módszertanok különbözősége ellenére is - azt mutatták, hogy az MC polyomavírus Merkel-sejtes karcinómák 71-94%-ban kimutatható (Varga et al., 2009; Martel-Jantin et al., 2012; Horvath et al., 2016; Becker et al., 2017).

Morfológia, genomszerkezet

A polyomavírus 45 nm átmérőjű, ikozahedrális kapszid szimmetriájú, kerek, burok nélküli, kettős szálú DNS-vírus. A kapszidot a VP1, VP2 és VP3 vírus fehérjék alkotják. A VP1 molekulák spontán vírusszerű partikulákká is rendeződhetnek üres kapszidot alkotva (Houben et al., 2009; Samimi et al., 2016). A vírusgenom kovalensen zárt, a prototípus 5387 bázispár hosszúságú, cirkuláris, kettősszálú DNS-t tartalmaz (1. ábra), 3 régióra osztható: korai, késői és regulátor régiók. A korai régió nem strukturális onkoproteineket, a kis t (st) és nagy T (LT) fehérjéket kódolja. Ezek közül az LT nem csak a virális replikáció elindulását idézi elő a DNS-hez való kötődésével és celluláris osztódási faktorok aktiválásával, hanem kapcsolatba lép számos sejtosztódásban kulcsfontosságú fehérjével, melynek eredményeként a fertőzött sejt az S fázisba lép át. Ez a mozzanat fontos szerepet tölt be a sejt rosszindulatú daganatos átalakulásában (Neumann et al.,



1. ábra. A Merkel-sejtes polyomavírusgenom szerveződése (Feng, 2008)

2011). Az st onkoprotein nélkülözhetetlen a tumorsejtek növekedéséhez (Shuda et al., 2011). A késői régió a strukturális fehérjéket (VP) kódolja. A VP1 a gazdasejt receptorhoz való kötődésben játszik szerepet. A virális genom replikációjának helye a sejtmag (Neumann et al., 2011).

Hasonlóan a többi humán polyomavírushoz, az MCV LT-fehérje számos motívumot és domént tartalmaz, amelyek kulcsszerepe bizonyított a vírusgenom replikációjában és transzkripciójában, valamint a tumorgenezisben. Az N-terminális része magában foglalja a DnaJ domént, amely a CR1 motívumot tartalmazza (13–17 aminosav), majd ezt követi a HPDKGG. Ez a szekvencia felelős a Hsc70 kötéséért (Shuda et al., 2008; An et al., 2012). Érdekes módon a más polyomavírusok LT-régióiban (JCV, BKV, WUV, KIV, TSV, HPyV6, HPyV7 és HPyV9) megtalálható a WXXW aminosav szekvencia, amely megköti a Bub1 mitotikus checkpoint szerin/treonin fehérjékinázt, nincs jelen az MCV LT-ben (Cotsiki et al., 2004). Ebben a pozícióban megtalálható viszont az MCV LT-antigén egyedi, 171-218 nukleotidból álló régiója (MUR), mely tartalmazza a Vam6P-kötő domént. Ehhez kapcsolódik a konzervált LXCXE retinoblastoma (RB) kötő motívum. Az LT-antigén interakciója a Vam6P-vel úgy tűnik fontos szabályozó szerepet tölt be, mivel vesztesége fokozza a vírus replikációját; következésképpen a tartós fertőzés létrejöttének fontos mechanizmusának tekinthetjük (Cheng et al., 2013; Wendzicki et al., 2015).

Patogenezis: a Merkel-sejtes polyomavírus szerepe az MCC kialakulásában

Ugyan az MC polyomavírus jelenléte és a genomjának integrációja az MCC sejtek kromoszómájában igazolni látszik szerepét a daganat kialakulásában, ennek pontos patomechanizmusa még több kérdést felvet. Feltehetőleg összetett, több lépcsős, a gazdaszervezettől is függő folyamatról lehet szó, hiszen a vírus kimutatható MCC-s vagy egyéb bőrdaganatban szenvedő betegeknél az egészségesnek tűnő bőrterületekről, de a szájüreg- és a légzőhamból is (Foulongne et al., 2010; Babakir-Mina et al., 2010; Bergallo et al., 2010). Továbbá, az MCV - más polyomavírusokhoz hasonlóan - az egészséges populációban is megtalálható (Schowalter et al., 2010). Ugyanakkor, az MCC-k együtödében nem mutatható ki az MC polyomavírus, amely esetek talán önálló kliniko-patológiai entitást jelenthetnek, melyek szövettani képükben hasonlóak, de lefolyásukban elkülöníthetőek a vírust hordozó változattól (Feng et al., 2008).

Az MCC kialakulásának fontos kezdő lépése lehet a virális DNS klonális integrációja, mely véletlenszerűen (random módon) számos helyen történhet a sejtek

genetikai állományában (Martel-Jantin et al., 2012; Starrett et al. 2017). Martel-Jantin és munkatársai átfogó vizsgálata alapján leggyakrabban (21%-ban) az 5. kromoszóma érintett, de további nyolc különböző kromoszómán (1., 3., 4., 6., 11., 14., 18. és 9.) is találtak integrációt 5-16%-os gyakorisággal, de a kromoszómán belül minden esetben egyedi helyen (Martel-Jantin et al., 2012). Megjegyzendő, hogy az integráció kimutathatóságát technikai okok is zavarhatják. (Itt nagy jelentősége van a kiindulási minta minőségének: friss fagyasztott mintából nagyobb eséllyel mutatható ki az integráció, mint a formalin fixált mintákból.) Az MC polyomavírus kettőszálú cirkuláris DNS-ének az integrációhoz szükséges felszakadásának sincs kitüntetett helye, bár ez leggyakrabban (~70%) az LT-régióban következik be (Martel-Jantin et al., 2012). Schrama és munkatársai tanulmánya szerint az LT-régióban bekövetkező csonkoló mutációk az integráció előtt vagy alatt következnek be (Schrama et al., 2019). Mivel az LT-régió teszi ki a teljes virális genom több, mint felét, a fenti megfigyelés részben ezzel is magyarázható. A legfontosabb szerep a daganatképződésben azonban a virális LT-fehérje tumorbeli kifejeződés mértékének és módjának van. Ez az onkoprotein ugyanis konzervált szakaszokat hordoz (például a DnaJ, „pocket” fehérje-kötő LXCXE és pp2A-kötő domének), melyek onkogén hatása egyéb polyomavírusokban (pl.: SV40) már bizonyított (Feng et al., 2008). A tumorsejtek genomjába integrált vírus LT-antigén helikáz régiója jellemzően károsodást szenved (valószínűleg külső hatásra, pl. UV-sugárzás, kóros mutációk keletkeznek), hisz a tumormentes alanyok MC polyomavírussal integrált hámsejtjeiben (még) nem találunk ilyet. A daganatos sejtekben a vírus replikációra jellemző LT-fehérje helikáz aktivitása eltűnik (a „vírus” ilyenkor már nem fertőző), ugyanakkor a károsodott LT-fehérje a tumor kialakulása felé tereli a folyamatokat (Becker et al., 2009; Schowalter et al., 2010; Martel-Jantin et al., 2012). Az LT-fehérje többek között a sejtek tumorszupresszor fehérjéire hatva gátolja azok funkcióját, e mellett a celluláris survivin (= baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5: BIRC5a) onkoprotein is megjelenik és expressziója a többszörösére emelkedik a sejtekben. Ennek az apoptózist gátló fehérjének a megjelenése a daganat fenntartásában játszik szerepet, a magi lokalizációja pedig rossz prognózissal társul (Kim, 2008).

További jellegzetesség a szövettani mintákban a daganat érhálózata, amelyek háttérében a VEGFR-2 (vaszkuláris endoteliális növekedési faktor receptor-2) állhat (Gaudin et al., 1995). A faktor expressziója összefüggést mutat a daganat méretével és áttétképző hajlamával (Kukko et al., 2007). Az MCC kialakulásában továbbá szerepe

lehet az mTor (mammalian target of rapamycin) receptoroknak, az AKT/PI3K és a Ras jelátviteli útvonalaknak (O'Reilly et al., 2006).

A vírussal fertőzött személyek közül csak nagyon kevesekben alakul ki Merkel-sejtes karcinóma, illetve a daganatok egy részéből nem igazolható az MCV jelenléte. Ez arra enged következtetni, hogy az MC polyomavírus fertőzésen kívül más tényezők is fontos szerepet tölthetnek be a patogenezisben. Az UV-sugárzás segítheti elő a virális genom integrációját, és LT-régiót csonkoló mutációt, melyek együttesen megszüntetik a vírus replikációját. Minden esetre az elváltozás immár valószínű fertőző - virális - kóreredete szemléletváltást eredményez az etiológia mellett, a patogenezis, a diagnosztika és reményeink szerint a jövőben a kezelés területén is.

A Merkel-sejtes karcinóma (MCC)

A Merkel-sejtes karcinómáról röviden

A Merkel-sejtes karcinóma (MCC) ritka, agresszív, bizonytalan eredetű, vélhetően a hám stratum basale rétegéből kiinduló daganat (Van Keymeulen et al., 2009; Woo et al., 2010; zur Hausen et al., 2013). A bőr bazális sejtrétegében egyesével elszórtan elhelyezkedő neuroendokrin tulajdonságokkal rendelkező sejtféleség első leírója (1875), egyben későbbi névadója Friedrich Sigmund Merkel (1845-1919) német anatómus, hisztopatológus volt, míg a bőr, eredetileg „trabeculáris” karcinóma néven megnevezett daganatának első leírója Cyril Toker volt 1972-ben. A Merkel-sejtek posztmitotikus sejtek, amelyek az epidermisz teljes sejtpopulációjának <5% -át teszik ki (McGrath et al., 2010). A Merkel-sejtek eredete a mai napig vitatott, hogy vajon epidermális keratinocita-szerű sejtekből vagy idegrendszeri eredetű migrált őssejtekből vagy pre/pro B-sejtekből származnak (Szedler et al., 2003; McGrath et al., 2010, zur Hausen et al., 2013; Sauer et al., 2017). A funkciójuk is bizonytalan, de úgy tűnik, hogy részt vesznek a finom tapintási ingerek érzékelésében.

A Merkel-sejtes karcinóma az eddig ismert legagresszívabb bőrdaganat, 46%-os összességű mortalitási aránnyal (Lemos et al., 2010). A daganat elsősorban az időseket és az immunszuppresszált személyeket érinti és többnyire a napfénynek (UV) kitett bőrterületeken, különösen a fej-nyaki régióban jelentkezik. Évről-évre - feltehetően az immunszuppresszív kezelések terjedése és a diagnosztika fejlődése miatt - rohamosan növekszik a felfedezett esetek száma. Mivel már kisméretű daganatként adhat áttétet, ezért különös jelentősége van a gyors felismerésének és egyéb bőrdaganatoktól (pl.

piogén granulóma, bazalióma, laphám karcinóma) való elkülönítésnek, valamint a szakszerű kezelésnek.

A Merkel-sejtes karcinóma epidemiológiája

A Merkel-sejtes karcinóma világszerte előfordul (Torres, 2018), de az 1970-1980-as években csak nagyon ritkán diagnosztizáltak. Az 1990-es évek elején az immunhisztokémiai vizsgálatok fejlődésének és a citokeratin-20 (CK-20) antitest bevezetésének köszönhetően már könnyebbé vált a patológiai diagnózis felállítása és gyorsan növekedett a jelentett esetek száma (Moll et al., 1992; Hodgson, 2005; Heath et al., 2008). Jelenleg a betegség incidenciája 0,13/100.000fő/évente Európában és 1,6/100.000fő/évente Ausztráliában (Stang et al., 2018). Az MCC elsősorban a világosabb bőrű és idősebb egyéneket érinti, az átlag életkor 70 év a diagnózis felállításakor. Az eseteknek csak a 10%-ában fordul elő az 50 évnél fiatalabb korosztályban. Az MCC valamivel gyakrabban érinti a férfiakat (61,3%), mint a nőket (Lemos et al., 2010). Az Egyesült Államokban az elmúlt 20 évben megháromszorozódott (jelenleg évente 1500 új esetet fedeznek fel) (Agelli et al., 2004, Hodgson, 2005), Hollandiában 1993-2007 közötti időszakban megduplázódott a regisztrált MCC betegek száma (Reichgelt et al., 2011), továbbá svéd (Zaar et al., 2016), spanyol (Prieto et al., 2012), olasz (Ascoli et al., 2011), osztrák (Schrama et al., 2012), dán (Kaae et al., 2010), finn (Kukko et al., 2012), ausztrál tanulmányok (Girschik et al., 2011) és a hazai tapasztalatok is az MCC növekvő előfordulásáról számolnak be. Egy nagy átfogó epidemiológiai tanulmány 21 ország adatait tanulmányozva szintén erre a következtetésre jutott (Stang et al., 2018). Ez részben a javuló diagnosztikus lehetőségekkel, az idősek és az immunszuppresszált betegek (pl.: szerv transzplantáció, szteroid kezelés, HIV, krónikus limfoid leukémia stb.) növekvő számával és a napsugárzás növekvő expozíciójával (napozás) magyarázható. Valószínűleg az MCC esetek száma továbbra is emelkedni fog a veszélyeztetett populáció növekedése következtében. A prognózis jelentőségének súlyát növeli az, hogy az MCC letalitása több mint 3-szor nagyobb (46%), mint a melanómának (12%) az összes diagnózisra vetítve (Lemos et al., 2010). Hazánkban Varga és mtsai. számoltak be először az MC polyomavírus kimutatásáról (Varga et al., 2009).

A Merkel-sejtes karcinóma klinikuma

A Merkel-sejtes karcinóma a bőrön, gyorsan növő, típusos kezdeti fázisában 1-2 cm nagyságú, tömör tapintatú, fájdalomtalan, általában pirosas-rózsaszínű, de lehet akár kékes-lilás vagy bőrszínű tumor, mely leggyakrabban a fej-nyaki régióban jelenik meg (Becker et al., 2017a). Többnyire jéghegyszerűen a mélybe terjed, a léziót fedő felhám az esetek többségében ép, ráfeszül a tumorra és fénylik, rajta ritkán ulceráció vagy megvastagodott szaruréteg látható (2. ábra). A karcinóma rendkívül agresszív, a kialakulását követően, néhány héten vagy hónapon belül ad áttétet először a környező nyirokcsomókba, majd később távoli nyirokszövetekbe, távoli bőrterületekre és a zsigeri szervek bármelyikébe, főként a májba és a tüdőbe (Voog et al., 1999). Mivel a klinikai megjelenés bár hordoz jellegzetességeket, de mégsem specifikus, a Merkel-sejtes karcinóma gyanúja az első orvosi vizsgálat során sajnos ma még csak ritkán merül fel (2. ábra). A következő kórképek viszont gyakran szerepelnek – tévesen - az elváltozás első klinikai diagnózisaként: bazalióma, spinalióma, piogén granulóma, keratoakantóma, amelanotikus melanóma, benignus ciszta, bőrfüggelék-tumor, bőrlimfóma és egyéb metasztatikus neoplázia (Smith et al., 2001). Mivel ezek között a kórképek között jóindulatú, illetve mérsékelt agresszivitású elváltozások is vannak, előfordul, hogy a vizsgálatot végző orvos az elváltozást nem tartja veszélyesnek. Hazánkban is gyakori, hogy a fizikális, illetve dermatoszkópos vizsgálattal bazaliómának vagy piogén granulómának tűnő elváltozás miatt a beteg hónapokkal később kerül műtétre, de ekkor már a Merkel-sejtes karcinóma gyors metasztatikus képessége miatt a beteg menthetetlen stádiumba kerül. A diagnózis helyes felállításához ezért a mielőbbi szövettani vizsgálat nélkülözhetetlen.



2. ábra. Merkel-sejtes karcinóma típusos korai megjelenései, különböző lokalizációkban: (A) fejtetőn; (B) jobb arcfélen; (C) bal felkaron; (D) homlok bal oldalán (a szerző saját felvételei).

Ritkán előfordulhat spontán, a Merkel-sejtes karcinóma teljes regressziója (Walsh, 2016). A primer tumor komplett regressziója azokat az eseteket is részben megmagyarázná, amelyeknél az első diagnózis felállításakor csak nyirokcsomó vagy akár ritkán csak kizárólag távoli áttétet találnak. Azoknál a betegeknél, akiknél a primer tumor kiindulási helye ismeretlen, gyakran lágyéki nyirokcsomóáttét kerül először felismerésre (Tarantola et al., 2013). Vannak arra vonatkozó adatok, hogy azoknál a IIIA stádiumban lévő betegeknél, akiknél ismeretlen a primer tumor, jobb prognózisú az MCC (Vandeven et al., 2018).

Bonyolítja a képet, hogy az MCC más bőrelváltozások és bőrdaganatok szomszédságában is kialakulhat, mint például a laphámrák, bazalióma és aktinikus keratózis (Cerroni et al., 1997). E daganatok kialakulásának folyamata eltérhet az önállóan megjelenő Merkel-sejtes karcinómákétól. Ez különösen fontos azoknak kutatási eredmények fényében, miszerint a Merkel-sejtek epidermális (és nem crista neuralis) eredetűek, azaz elvben az epidermális premalignus progenitor sejtek hám vagy neuroendokrin irányba is fejlődhetnek (Van Keymeulen et al., 2009; Woo et al., 2010). Az eddigiek során vizsgált spinalióma szomszédságában elhelyezkedő Merkel-sejtes karcinómákból MC polyomavírust sosem sikerül kimutatni (Busam et al., 2009).

Több körülményt ismerünk, amelyek befolyásolhatják az MCC kialakulását, lefolyását, valamint a betegség prognózisát. Az életkor (>55 év) mellett legfontosabbnak az immunrendszert érintő alapbetegségek tekinthetők. A Merkel-sejtes karcinóma kockázata kifejezetten emelkedett AIDS-ben vagy egyéb szerzett immunhiányos szindrómákban (13-szoros), szervátültetésen átesett betegekben a krónikus immunszuppresszív kezelések következtében (10-szeres) és krónikus limfoid leukémiában (30-50-szeres) (Lanoy et al., 2010; Brewer et al., 2012; Clarke et al., 2015). Egyúttal az immunszupprimált betegeknek MCC-vel különösen rossz a prognózisa (Harmans et al., 2016). Ez alapján feltételezhető, hogy a károsodott T-sejtes immunválasznak fontos a szerepe a Merkel-sejtes karcinóma kialakulásában. Az UV-sugárzásnak való tartós kitettség ugyancsak fontos kockázati tényezője a Merkel-sejtes karcinómának. Érdekes megfigyelést végeztek az Egyesült Államokban, miszerint az UVB-index és az MCC incidenciája 1986-1994 és 1986-1999 között összefüggést mutat (Angelli et al., 2003).

Azoknál a betegeknél, akik több ízben PUVA (Psoralen UV-A) kezelésben részesültek (pl. pikkelysömör miatt), hozzávetőlegesen százszorosára növekedik az MCC esélye (Lunder et al., 1998). Annak ellenére, hogy az UV-sugárzás fontos körülmény, az esetek 5%-ban a fénytől elzárt területeken (pl. szeméremtest, far) és

hozzávetőlegesen 15%-ban fénytől védett bőrterületeken (például has, comb) is megjelenhet a daganat (Heath et al., 2008). A fekete bőrűeknél alacsonyabb az MCC aránya a fejen és lényegesen magasabb az anogenitális tájékon (Stang et al., 2018).

Kórelőzményként gyakran szerepel, hogy a Merkel-sejtes karcinómás beteg korábban más daganatos megbetegedésben is szenvedett (Kaae et al., 2010).

Érdekes megfigyelés, hogy azok a Merkel-sejtes karcinómák, melyekből az MC polyomavírust sikerül kimutatni, szignifikánsan jobb kimenetelűek (Sihto et al., 2009; Waltari et al., 2011; Nardi et al., 2012; Higaki-Mori 2012). Emellett két tanulmány is alátámasztja azt a véleményt, hogy az erős immunválasz készség, a VP1 fehérje ellen termelt specifikus antitest magas szintje és a CD8+ sejtek beszűrődése a tumorban összefüggésben van a Merkel-sejtes karcinóma jobb kimenetelével (Paulson et al., 2011; Touze et al., 2011). A tumor noduláris növekedése és a limfovaszkuláris invázió hiánya szignifikáns összefüggésben van a hosszabb túléléssel (Andea et al., 2008).

Az MCC prognózisa nagyban függ a betegség stádiumától. Ugyanakkor nagy különbségek mutatkoznak az egyes epidemiológiai vizsgálatok eredményei között, valamint a regionális különbségek is jelentősek. A klinikai stádium meghatározásánál jelentős szerepet játszik a tumor mérete, nyirokcsomó- vagy a távoli áttét megléte (3. táblázat). Már 2 cm-nél kisebb átmérőjű primer tumor esetében is 66-75%-ra csökken az 5 éves túlélés. Amennyiben a primer tumor nagyobb, mint 2 cm 50-60% az ötéves túlélési ráta, nyirokcsomóáttétek jelenléte esetében pedig 42-52%. Távoli áttéttel rendelkező betegeknél 17-18% (Frohm et al., 2016; Sridharan et al., 2016; Becker et al., 2017a; Vandeven et al., 2018; Fondain et al., 2018). Az előrehaladott MCC-ben szenvedő betegek 50%-nak a túlélése kevesebb, mint 9 hónap (Lemos et al., 2010). A recidívák leggyakrabban az első két évben jelennek meg (Frohm et al., 2016). Úgy tűnik, hogy a legjelentősebb prognosztikai marker az őrszemnyirokcsomó érintettsége. Az aktuális AJCC ajánlás szerint ennek tisztázása a staging nélkülözhetetlen eleme (Harms et al., 2016).

A

T	N	M
Tx elsődleges tumor nem ítéhető meg	Nx regionális nyirokcsomó érintettség nem ítéhető meg	Mx távoli áttét jelenléte nem ítéhető meg
T0 nincs elsődleges tumor	N0 nincs regionális nyirokcsomóáttét*	M0 nincs távoli áttét
Tis elsődleges tumor in situ	cN0 klinikailag nem detektálható nyirokcsomóáttét*	M1 távoli áttét jelenléte igazolt
T1 elsődleges tumor ≤ 2 cm	cN1 klinikailag detektálható nyirokcsomóáttét*	M1 a távoli bőr, bőr alatti szövet vagy nyirokcsomóáttét
T2 elsődleges tumor > 2cm és ≤ 5 cm	pN0 nyirokcsomó patológiai vizsgálata negatív	M1 b tüdőáttét
T3 elsődleges tumor > 5 cm	N1 a mikrometasztázis ¹	M1 c bármilyen zsigeri áttét
T4 elsődleges tumor mely beszűri a csontot, izomot vagy porcot	N1 b makrometasztázis ²	
	N2 in tranzit metasztázis ³	

*Negatív a nyirokcsomó klinikai, patológiai vagy mindkét vizsgálattal. Klinikailag metasztatikus nyirokcsomó vizsgálata megtekintés, tapintás és/vagy képkalkító eljárások segítségével történhet. cN0 csak azoknál a betegeknél használatos, akiknél nem történt nyirokcsomó patológiai vizsgálat.

¹ Mikrometasztázis diagnosztizálható őrszemnyirokcsomó eltávolítása vagy elektív nyirokcsomó eltávolítás után.

² Makrometasztázis állapítható meg, amikor klinikailag bizonyítható nyirokcsomóáttét és megerősítik patológiai vizsgálatokkal biopsziából vagy terápiás nyirokcsomó eltávolításból származó mintákból.

³ In tranzit metasztázis olyan tumor, ami az elsődleges tumor és a drenáló regionális nyirokcsomók között helyezkedik el.

B

Stádium csoportok				1 éves várható túlélés	2 éves várható túlélés	3 éves várható túlélés	4 éves várható túlélés	5 éves várható túlélés
0	Tis	N0	M0	NA*	NA*	NA*	NA*	NA*
IA	T1	pN0	M0	100	92	86	84	79
IB	T1	cN0	M0	90	79	70	64	60
IIA	T2/T3	cN0/pN0	M0	90	77	64	62	58
IIB	T4	cN0/pN0	M0	81	68	58	54	49
IIIA	bármely T	N1a	M0	76	57	50	45	42
	T0	N1b	M0	NA*	NA*	NA*	NA*	NA*
IIIB	bármely T	N1b/N2	M0	70	47	34	30	26
IV	bármely T	bármely N	M1	40	26	20	18	18

*NA: Nincs pontos adat, a várható túlélés magas

3. táblázat. TNM kritériumok (A) és stádium beosztások (B) az American Joint Committee of Clinical Oncology legutóbbi ajánlása alapján (Harms et al., 2016).

Merkel-sejtes karcinóma diagnózisa nagyon ritkán történik a klinikai kép alapján. Rendszerint mikroszkópos vizsgálattal erősödik a gyanú az MCC-re és immunhisztokémiai vizsgálatokkal lehet megalapozott diagnózist felállítani. Ezt követően javasolt a drenáló nyirokcsomó régió képalkotó vizsgálata (lehetőség szerint ultrahanggal vagy adott esetben CT, MR vizsgálattal). Ha képalkotó vizsgálattal nem merül fel a nyirokcsomó érintettség gyanúja, az okkult nyirokcsomóáttét magas száma miatt javasolt az őrszemnyirokcsomó eltávolítása prognózisbecslés, valamint az egyéb szükséges terápiás lehetőségek mérlegelése és a helyes kiválasztása érdekében (Harms et al., 2016; Gunaratne et al., 2016; Ricard et al., 2015).

A sebészi kimetszést követően a minták patológiai feldolgozása során célszerű a formalin fixált és paraffinba ágyazott minta mellett natív mintát is biztosítani (ez utóbbit lásd később). A szövettani vizsgálat az MCC-t általában tömör, göbös bőrelváltozásként mutatja be, mely gyakran beterjed a retikuláris dermiszbe, valamint a szubkutiszba, viszont az epidermisz, a papilláris dermisz és az adnexek többnyire érintetlenek maradnak (D'Agostino et al., 2010; Jour et al., 2017). A tumor tömör fészkekbe vagy gerendákba szerveződő rosszul differenciált, egyforma sejtekből épül fel, ezért az úgynevezett kis kerek, kék sejtes tumorok csoportjába tartozik (Fried et al., 2014). A sejtek bazofil magjai viszonylag monoton megjelenésűek, a kerektől az oválisig, a kromatin jellegzetesen só-bors mintázatú. A sejtmagvacska rendszerint alig látható. A citoplazma kevés és bizonytalan szélű. Néhány esetben szabálytalan alakú magok láthatóak. A daganatban számos mitotikus alak és apoptotikus test, valamint helyenként nekrozis is látható. Az apoptotikus index magas. Rosetta kialakulása ritka (Jour et al., 2017).

A daganat tok nélkül növekszik, beszűri a környező állományt, gyakran az ér- és nyirokképleteket is. A borító felhám azonban általában jól elkülönül a tumor határzónától, ritkán érintett (McCardle et al., 2010). A Merkel-sejtes karcinómáknak kizárólagosan a felhámra korlátozott variánsa nagyon ritka, azonban az ilyen esetek felvethetik, hogy az MCC intraepidermális neopláziaként kezdheti az inváziót, melyet MCC *in situ*-nak neveznek (Al-Ahmadie et al., 2004).

Három szövettani típust lehet megkülönböztetni, amelyek részben egymás mellett, egyazon tumorban is előfordulhatnak: a ritka trabekuláris, a kissejtes és a gyakori intermedier típust. A legfrissebb adatok szerint a trabekuláris forma a legjobban differenciált, jobb prognózissal, míg a kissejtes a legdifferenciálatlanabb, rosszabb

prognózissal társul. Ez azonban az átfogó adatok hiányában és a kevert és átmeneti formák gyakorisága következtében nem tekinthető egyértelmű hisztopatológiai összefüggésnek (Jaeger et al., 2012).

Mivel az MCC más malignus, illetve semimalignus bőrdaganatokkal együtt is kialakulhat, mint például Bowen-kór, bazalióma, leggyakrabban laphámrák, ezért ezek jellegzetességei is színezhetik a szövettani képet. A laphámrák többnyire aktinikus keratózist vagy Bowen-kórt fedő elrendezésben tűnik fel vagy *in situ* formájában elhatárolódva a dermális MCC komponenstől. Átmenet a két sejttípus között általában nem látható (Walsh, 2001; Al-Ahmadie et al., 2004). Feltételezhetően e társ-malignitás patomechanizmusa eltér a többi Merkel-sejtes karcinómáétól.

Bár az MCC kellően jellegzetes, tipikus a szövettani képe hematoxilín-eozinnal, további immunhisztokémiai vizsgálatok szükségesek a diagnózis megerősítéséhez. Az MCC neuroendokrin és epiteliális markereket is kifejez, valamint ezen túlmenően jellegzetes, hogy az esetek 97%-ban paranukleárisan ponszerű CK-20-pozitivitást (citokeratin-20) mutat. A CK-20 marker nagy jelentőséggel bír más kicsi, kerek, kék sejtes daganatoktól való elkülönítésben, melyek CK-20 markerrel negatívak, például a bazálselijtes karcinóma, a melanóma, a non-Hodgkin limfóma, a metasztatikus kis sejtes karcinóma (Moll et al., 1986; Moll et al., 1992; Dancey et al., 2006).

Neuroendokrin immunhisztokémiai markerekkel pozitívítást mutat minden esetben pl. chromogranin A-val és synaptophysinnel, viszont TTF-1 (thyroid transkripció faktor-1) negatívak, szemben a metasztatikus kissejtes karcinómával. A CK-7 (citokeratin-7) negatívítás is ezt a diagnózist erősíti (Sidiropoulos et al., 2011).

Proliferációs aktivitás vizsgálatára használt Ki-67-tel az MCC daganatos sejtek sejtmagjai 15-95%-ban pozitívak (átlag 50,6 %, medián 50%) (Llombart et al., 2005). A Ki-67 alkalmas prognosztikai markernek is, hiszen a magasabb Ki-67 kifejeződés szignifikáns összefüggésben áll az MCC rosszabb prognózisával (Asioli et al., 2007).

Az amelanotikus melanómától való elkülönítésben segít az S-100, mellyel az MCC negatív, a melanóma pozitív (Kontochristopoulos et al., 2000).

Megfigyelték, hogy a tumorsejtek p63 kifejezése rosszabb prognózissal társul. Ez a marker nagy jelentőségű a várható prognózis megítélésében is, azonban ezzel kapcsolatban a mai napig még nem egységes az ajánlás (Asioli et al., 2007).

A diagnosztika a szövettani vizsgálaton alapul. Nem gyakorlat még, de célszerű lenne az MC polyomavírus közvetlen molekuláris kimutatása is a sebészi kimetszést követően. Célszerű a mintát natívan küldeni a vizsgálatra, mert a natív mintából az MC polyomavírus DNS PCR-rel való kimutatásának jóval nagyobb az esélye: a Merkel-

sejtes karcinómák frissen fagyasztott mintáiból 94%-ban, a paraffinba ágyazott minták esetében csak 47%-ban volt sikeres a vírus nukleinsav kimutatás (Martel-Jantin et al., 2012). Ebből azonban nem lehet azt a következtetést levonni, hogy nem értékesek a paraffinba ágyazott mintákból készült PCR-vizsgálatok, hiszen nagyban függ a kimetszés és a fixálás közt eltelt idő hosszúságától, a fixálás minőségétől, a deparaffinálás technikájától és attól is, hogy a minta, mely részéből metszenek PCR-vizsgálatra. Az MC polyomavírus elleni IgG ellenanyag szintet a vérből ELISA módszerrel lehet kimutatni (mely nem gyakorlat még) (Tolstov et al., 2011).

A vérben cirkuláló tumorsejtek, valamint a virális onkoprotein elleni antitestek potenciális biomarkernek tűnnek a betegség rizikójának pontos becsléséhez, valamint a betegség lefolásának előrejelzéséhez (mely azonban ugyancsak nem gyakorlat még) (Paulson et al., 2016; Samimi et al., 2016).

Az MC polyomavírus elleni ellenanyagok, immunitás

Az MC polyomavírus szeroprevalenciáját több kutatócsoport is vizsgálta az egészséges népesség körében. Ennek alapján a felnőtt lakosság több mint 80%-a rendelkezik ellenanyaggal az MC polyomavírus VP1 kapszid fehérjéje ellen, tehát a népesség nagy része átesik a fertőzésen (Tolstov et al., 2009; Schowalter et al., 2010; Foulongne et al., 2012). Egy olasz emberek körében készült tanulmány szerint ez akár 96,2% is lehet (Nicol et al., 2013). A primer fertőzés ideje gyermekkorra tehető, feltehetően tünetmentesen zajlik, és beindítja humorális és sejtes immunválaszt is, de a vírus a bőrben élethosszig megmarad (Chen et al., 2011). E szempontból a Merkel-sejtes polyomavírus feltehetően a bőr mikrobiom része is lehet (Schowalter et al., 2010).

Specifikus – anyai eredetű - MCV elleni ellenanyagok kimutathatók újszülötteknél is, azonban ezek 16 hónapos korra rendszerint eltűnnek (Martel-Jantin et al., 2013). 18 hónapos és 5 éves életkor között a gyermekek növekvő hányada válik szeropozitívvá, mígnem 5 éves korra már a szeropozitivitás eléri a 80%-ot (van der Meijden et al., 2013).

Humorális immunitás

Bár a VP1 felszíni kapszid fehérje elleni antitestek előfordulása a teljes népességben magas, minden ezzel foglalkozó kutatócsoport azt találta, hogy az IgG antitestek a VP1 és VP2 fehérjék ellen egyértelműen magasabb szintet mutatnak az

MCC betegekben (Carter et al., 2009; Tolstov et al., 2009). Ennek oka jelenleg nem ismert, részben ellentmondásos, mindenesetre önmagában védelmet nem jelenthet. A nagy T-antigén elleni antitest azonban jobban kapcsolódik az MCC betegekhez és a betegség progressziójához. Míg a kontroll népszerűből kevesebb, mint 1%-ban, a Merkel-sejtes karcinómás betegek 40%-ból mutatható ki ez az ellenanyag; sőt, sikeres tumor eltávolítás esetén szintje rohamosan csökken, kiújulásakor – a már nyilvánvaló tünetek előtt – ismét emelkedik (Carter et al., 2009), azaz akár biomarkerként is szolgálhat.

Sejtes immunitás

A sejtes immunitás csökkenése mellett gyakrabban fordul elő MCC. Szöveti vizsgálatok tumort infiltráló T-limfociták jelenlétét mutatták ki, melyek egyben prognosztikai jelentőséggel bírnak (Andea et al., 2008). A tumoron belüli CD8+, valamint a CD3+ limfociták beszűrődése független jelzője az MCC jobb prognózisának (Paulson et al., 2011; Feldmeyer et al., 2016). Ez az immunválasz olyan géneket indukál, amelyek citotoxikus granulomokot valamint citokineket aktiválnak (Paulson et al., 2011). Nehezen értékelhető a természetes ölüsejtek (NK) infiltrációja a tumorban, hiszen az MCC sejtek több, mint 90%-a expresszálja az NK-sejtek fontos immunhisztokémiai markerét, a CD56-ot (Paulson et al., 2011). Vérből és Merkel-sejtes karcinómákból (amelyekben igazolható az MCC vírus jelenléte) azonosíthatóak immunogén MC polyomavírus specifikus CD8+ és CD4+ T-sejtek (Iyer et al., 2011). Ehhez kapcsolódó specifikus T-sejt válaszok lehetnek az MCC specifikus célzott terápiájának későbbi a célpontjai is.

Az is nyilvánvaló, hogy a tumorsejtek képesek megkerülni gazdaszervezet immunválaszát (Shuda et al., 2008). Valószínűsíthető, hogy az MCC tumorsejtek hozzájárulnak a mikrokörnyezet immunszuppressziójának előidézésében, daganatsejt szubklónokat létrehozva, immunszuppressziót előidéző citokinek, mint TGF- β , Fas-ligand, IL-10 vagy T-sejteket gátló galectin-1 és indoleamine 2,3-dioxigenáz termelése révén (Teicher, 2007; Bhatia et al., 2011; Khong et al., 2002). Továbbá a tumorsejtek képesek az immunszuppresszív sejtek, mint például a CD4+ CD25+ regulátoros T-sejtek (T-reg) és a mieloid-eredetű szupresszor sejtek termelését, aktiválását és funkcióját segítve hozzájárulni az immunrendszer toleranciájának kialakulásához is (Kusmartsev et al., 2005; Zou, 2006).

A Merkel-sejtes karcinóma kezelése

Primer tumor

A nemzetközi és a hazai gyakorlatban sincs standardizált, egységes kezelési protokoll az MCC kezelésére. E daganat növekvő előfordulásának következtében azonban esszenciális kérdés a kezelés modernizálása. Jelenleg az MC polyomavírus jelenléte vagy hiánya még nem befolyásolja az MCC kezelését. Amennyiben felmerül a Merkel-sejtes karcinóma gyanúja, nem javasolt biopszia elvégzése, hanem a teljes sebészi kimetszést javasolt elvégezni (Haymerle et al., 2015). Korai stádiumú MCC-k esetén tumormentes szélt biztosító sebészi eljárással jó gyógyulási eredmények érhetőek el (Duprat et al., 2011).

A jelenleg ajánlott eljárás primer tumor esetén, amennyiben a távoli metasztázis gyanúja nem merül fel, a teljes sebészi kimetszés, stádium I esetén 1 cm-es, stádium II esetén 2 cm-es sebészi széllal, mélyen az izombőnyéig (Schwartz et al., 2013; Lim et al., 2012; Haymerle et al., 2015; Wright et al., 2018). Számos tanulmány alátámasztja a posztoperatív adjuváns radioterápia hatékonyságát, mely szignifikánsan csökkenti a recidíva előfordulását, valamint a hosszú távú túlélési esélyeket jelentősen növeli (Boyer et al., 2002; Lewis et al., 2006; Mojica et al., 2007; Jouary et al., 2012; Sexton et al., 2014; Chen et al., 2015; Harrington et al., 2016; Bhatia et al., 2016). Inoperábilis primer lézió esetén megkísérelhető a radioterápia önmagában. Az ajánlott dózis 45-70 Gy (Rao et al., 2010).

Őrszemnyirokcsomó és regionális nyirokcsomók

A limfogén metasztázis előfordulásának gyakorisága, valamint a nyirokcsomó érintettség fontos prognosztikai jelentősége miatt javasolt az őrszemnyirokcsomó eltávolítása, amennyiben sem klinikailag, sem képalkotó eljárásokkal nem merül fel nyirokcsomóáttét (Kachare et al., 2014; Sadegi et al., 2014; Shibayama et al., 2015; Ricard et al., 2015; Gunaratne et al., 2016).

A fej-nyaki régióban előforduló igen magas limfogén metasztázis ráta (6,8-25%), valamint más lokalizációkkal összevetve nehezebben fellelhető és az egyéni variációk sokrétősége miatt nehezebben megítélhető őrszemnyirokcsomó(k) helyzete, illetve száma miatt megfontolandó a funkcionális nyaki disszekció (Tai, 2013; Fritsch et al., 2014; Timmer et al., 2016).

A nyirokcsomóáttét valószínűsége a tumor méretével nő. Egy nagy átfogó vizsgálat szerint, 8044 eset elemzése alapján 0,5 cm-es tumorátmérő esetén 14%, 1,7-2 cm-es tumorátmérő esetén pedig 25% volt a nyirokcsomóáttét valószínűsége (Iyer et al., 2014).

Annak eldöntésére, hogy az őrszemnyirokcsomóban igazolt mikrometasztázisok jelenléte esetén elvégzett terápiás limfadenektómia a várható túlélést javítja-e, prospektív kontrollált vizsgálatok során kell felülvizsgálni, ugyanis ez a mai napig még nem világos (Gunarantne et al., 2015; Servy et al., 2016; Sridharan et al., 2016).

Lokális recidívák, in tranzit metasztázisok és távoli áttétek

Lokális recidívák, *in tranzit* metasztázisok vagy klinikailag nyilvánvaló nyirokcsomóáttétek esetén a sebészi kimetszés és/vagy a sugárterápia mérlegelendő a műtéti megterhelés és a beteg általános állapotát figyelembe véve, kuratív szemléletmódot követve (Veness et al., 2014). Szoliter áttétek esetén sebészi intervenció, multiplex áttétek esetén pedig szisztémás kezelés ajánlott.

Sugárkezelés

Az MCC sugárérzékeny tumor, ennek ismeretében stádiumtól függetlenül célszerű mindig fontolóra venni. A radioterápia végezhető adjuvánsan, a tumor sebészi kimetszését követően, priméren kuratív céllal inoperabilitás esetén vagy palliatív céllal előrehaladott tumoros megbetegedések esetén (Veness et al., 2014; Harrington et al., 2016). Kiterjedt, de lokalizált lézióknál a radioterápia önmagában is jó megoldás lehet.

Adjuváns sugárkezelés

Számos tanulmány alátámasztja azt, hogy az adjuvánsan alkalmazott sugárterápiás kezelés magas recidíva rizikójú betegeknél - úgymint nagyobb primer tumor méret (> 2 cm), primer tumor elhelyezkedése a fej-nyaki régióban, agresszív primer tumor - negatív eredményű őrszemnyirokcsomó esetén is indokolt és szignifikánsan csökkenti a regionális recidíva valószínűségét és feltehetően a teljes túlélést növeli (Lok et al., 2012; Jouary et al., 2012; Hoeller et al., 2015; Servy et al., 2016; Strom et al., 2016). Klinikailag bizonyított nyirokcsomóáttét esetén, radikális limfadenektómiát követően egy nagy monocentrikus tanulmány, valamint egy kisebb

retrospektív tanulmány szerint is javítja a várható túlélést az adjuváns radioterápia (Fields et al., 2011; Strom et al., 2016).

Adjuváns célzattal adott sugárterápia esetén a teljes sebészi kimetszést követően 2 Gy egyszeri dózis hetente ötször, 50 Gy teljes dózis tekintendő szükségesnek. Ez idáig nincs alátámasztva, hogy a teljes dózis növelése javítaná a várható túlélést (Ghadjar et al., 2011; Jouary et al., 2012; Patel et al., 2016). A 45 Gy alatti teljes dózis viszont ineffektívnek tűnik (Hui et al., 2011). A tumorágyat egy biztonsági széllal - ami magában foglalja az *in tranzit* metasztázis lehetséges területét - javasolt a bőr szintjében besugározni. A klinikailag tünetmentes nyirokelfolyási terület primér sugárkezelésére is szintén az említett séma ajánlott (Jouary et al., 2011).

Terápiás célzatú sugárkezelés

Inoperábilis, klinikailag manifeszt metasztázisok kezelhetők priméren sugárterápiával (Fang et al., 2010; Bishop et al., 2015). Távoli áttétek esetén lehetőség van a sugárkezelésre multimodális terápiás szemléletek figyelembevételével, sebészi kimetszés és/vagy egy kemoterápia és/vagy immunterápia mellett. A pontos eljárás azonban minden esetben egyénileg mérlegelendő és általában palliatív célú (Hennessey et al., 2008).

A klinikailag manifeszt Merkel-sejtes karcinóma kezelésére 52-66 Gy teljes dózis, 2 Gy egyszeri dózis tűnik hatékonynak (Foote et al., 2010; Lok et al., 2012; Pape et al., 2011; Finnigan et al., 2013; Harrington et al., 2014).

Kemoterápia

Általában az MCC kemoterápiára érzékeny, de hajlamos a rezisztencia gyors kialakítására. Az alkalmazott terápiás séma a kissejtes bronchiális karcinómához való hisztomorfológiai hasonlóságán alapszik. Ennek hatékonysága azonban ez idáig nem volt kontrollált tanulmányok által vizsgálva. A terápiás fegyvertár része az anthraciklin, antimetabolitok, bleomycin, cyclophosphamid, etoposid, valamint platina alapú szerek, mint például ciszplatin vagy carboplatin. Alkalmazható monoterápiaként, vagy kettős, ritkán hármas kombináció elemeként. Csak 23-61%-ban elérhető a terápiás válasz, és csak rövid ideig (Iyer et al., 2016; Becker et al., 2017b; Nghiem et al., 2017). Ezen szerek toxicitásából adódó esetleges máj- és vesekárosodások lehetősége miatt

egyéniileg szükséges a terápia lehetséges kockázatait mérlegelni. A kiújuló betegségek kezelésének terén nem született még megegyezés.

Immunterápia

Az immunchekpointgátlók (Immune Checkpoint Inhibitor) metasztatizáló MCC-k esetében részben a vírus pozitív daganatokban a magas virális antigén expresszió, részben pedig a vírus negatív daganatoknál főként az UV-károsodás okozta magas mutációs rátán alapszik (Terheyden et al., 2017). Az első publikált fázis II tanulmányban anti-PD1 antitesttel (pembrolizumab) 26 korábban nem kezelt áttétes MCC beteg kezeléséről számoltak be (Nghiem et al., 2016). A betegek közül 25 volt értékelhető, melyek közül 14 betegnél volt pozitív válasz a kezelésre, ezek közül pedig négyenél teljes remisszió volt észlelhető (CR+PR: 56% [95% CI: 35-76]). Pembrolizumab olyan anti-PD1 antitest, mely antitumorális és immunmoduláló hatásokkal is bír, hiszen blokkolja a PD-L1 és PD-L2 ligand kötődését a T-sejtek PD-1-receptorán (programmed death receptor-1) (Kwok et al., 2016). Egy másik fázis I/II vizsgálatban 25, részben már kezelésen átesett beteget vizsgáltak, akiket egy másik anti-PD-1 antitesttel (nivolumab) kezeltek (Topalian et al., 2017). A 15 beteg közül, akik más kezelésen nem estek át, 73%-ban reagáltak a terápiára. A betegek másik csoportja, akik már korábban más kezeléseken is átestek csak 50%-ban adtak pozitív terápiás választ a nivolumab kezelésre. A nivolumab egy olyan anti-PD-1 monoklonális antitest, mely közvetlenül kötődik a T-sejtek PD-1 receptorához (Luke et al., 2015). Egy további fázis II vizsgálatban azon betegek válaszreakcióját tanulmányozták anti-PD-L1-antitest, avelumab kezelésre, akik már legalább egy citosztatikus kezelésen estek át (Kaufman, 2016). 88 beteg közül 4-nél volt komplett remisszió megfigyelhető és 20 betegnél pedig részleges remisszió (objektív válasz 31,8% [95 CI: 21,9-43,1]) (Kaufman et al., 2018). A válaszarány azon betegek esetében, akik csak egyfajta citosztatikus kezelésben részesültek szignifikánsan magasabb (40%-kal), mint azoknál a betegeknél, akiknél korábban kettő- vagy többféle kezelés történt (22%). A tanulmányt ezt követően kiegészítették olyan betegek vizsgálatával, akik már az első vonalban megkapták az avelumabot. Három hónapos utánkövetés alatt 62%-os volt a válaszarány (95% CI: 42-79). A 18 esetből 16-ot, akik reagáltak a terápiára, a következő staging vizsgálatig követték (D'Angelo et al., 2017). Ezen adatok alapján az avelumabot jóváhagyta hivatalosan is az FDA és az EMA az előrehaladott MCC kezelésére (Pfizer

és Merck KGaA, <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-treatment-rare-form-skin-cancer>).

Jelenleg is zajlanak további vizsgálatok immuncheckpointgátlók adjuváns (ipilimumab, nivolumab és avelumab), valamint neoadjuváns (nivolumab) terápiás alkalmazásaiként. Az első beszámolók az ipilimumab (Becker et al., 2018a) terápiás hatását kritikusan, ugyanakkor a nivolumab (Topalian et al., 2020) alkalmazását kedvezően ítélték meg. Messzemenő következtetések levonásához azonban nélkülözhetetlenek a randomizált vizsgálatok eredményeinek értékelése, amelyekre még várnunk kell.

CÉLKITŰZÉSEK

Kutatásunk célja volt virális genomiális szekvenciák keresése egy-egy bőrre lokalizálódó humán és állati daganattípusban különböző molekuláris virológiai (PCR, gélelektroforézis, szekvenálás, virális szekvencia azonosítása metagenomikai, *in situ* hibridizáció) és patológiai (minta fixálása, festése, metszetkészítés, immunhisztokémia) módszerek segítségével. A vizsgálataink két részre bonthatóak: az MC polyomavírus vizsgálatára MCC daganatokból emberben, illetve egy új endogén retrovírus kimutatására hörcsög bőrdaganatból.

I. Az MC polyomavírus vizsgálata MCC daganatokban

Cél volt a 2008-ban felfedezett Merkel-sejtes polyomavírus (MC) keresése és molekuláris biológiai kimutatása dél-dunántúli betegek 2007 és 2012 között archivált szövettanilag Merkel-sejtes karcinómának diagnosztizált mintáiból.

Cél volt az MC polyomavírus jelenléte (vagy hiánya) és az esetek klinikopatológiai jellemzői közötti összefüggések feltárása, elemzése.

Cél volt a kimutatott MC polyomavírus vírusgenom meghatározása és tanulmányozása.

Cél volt további, új polyomavírusok (HPyV6, HPyV7, TSV, HPyV9) keresése ugyanezen betegek bőrszövetmintáiban.

II. Új endogén retrovírus kimutatása hörcsög bőrdaganatából

Cél volt egy ismeretlen etiológiájú hörcsög bőrdaganat virális metagenomikai vizsgálata.

Cél volt a virális metagenomikai eredmények és a potenciális virális szekvenciák elemzése.

Cél volt a mintából azonosított retrovírus teljes genomjának meghatározása molekuláris biológiai módszerekkel, a vírusgenom elemzése és filogenetikai összehasonlítása már ismert rokon retrovírus referencia szekvenciákkal.

Cél volt a retrovírus genom (DNS és RNS) jelenlétének vizsgálata *in situ* hibridizációs módszer segítségével a daganatos szövetmintában.

Cél volt az új retrovirális genomszekvencia keresése kvalitatív és kvantitatív PCR-módszerek segítségével további hörcsög egyedek különböző mintáiból.

I. MERKEL-SEJTES KARCINÓMA ÉS MC POLYOMAVÍRUS

Vizsgálati anyagok

Vizsgálataink során a Pécsi Tudományegyetem (PTE), Pathologiai Intézetében 2007-2012 között szövettani módszerekkel diagnosztizált MCC-ben szenvedő betegek archivált szövetszövetmintáit vizsgáltuk, retrospektíven. A szövettani diagnózis a hematoxilín-eozinnal festett metszet morfológiáján és immunfenotípusán alapult, monoklonális antitestek (CK20, CD56, Synaptophysin, Chromogranin A és TTF1) felhasználásával. A metszeteket szövettanilag újra elemeztük. Nem csak a primer MCC-t, hanem ezek bőr- és nyirokcsomóáttéteit, valamint ezek szomszédságában előforduló bazalióma és laphámrák mintákat is tanulmányoztunk. A minták részben paraffinba ágyazott, részben natív minták voltak.

Epidemiológiai és klinikai adatok

A Pécsi Tudományegyetem Klinikai központjának etikai engedélyével (iktatószám: KK/718-1/2020) a betegek epidemiológiai és klinikai adatai, valamint a patológiai leletek kigyűjtése és újraértékelése az eMedSolution (MedSol) medikai rendszer segítségével történt. Külön figyelmet fordítottam az anamnézis elemzése során a kórelőzmények, a társbetegségek, az esetleges immunszuppressziót okozó tényezők, az MCC megjelenési helyének, a tünetek jelentkezése és a diagnózis között eltelt időnek az összegyűjtésére.

A paraffinba ágyazott szövetszövetminták deparaffinálása

Lehetőség szerint nekrozismentes, tiszta tumor szövetet tartalmazó paraffinos blokkból készített 5-6 db 10-20 µm vastag metszetet, melyeket xylene és etil-alkohol segítségével deparaffináltam (Bagasra et al., 2007). Az 1,5 ml-es Eppendorf csövekbe tett, paraffinba ágyazott szövetszövetminta metszetekhez egyenként 500µl 100%-os xylene-t (Ksylen P.P.H. Polskie Odoczy NNKI Chemiczne Gliwice, Krakkó, Lengyelország) adtam lamináris fülke (Bioair Instruments Aura 2000 MAC, Siziano, Olaszország) alatt.

A csöveket 1 percig vortexeltem (Combispin FVL-2400 N, Biosan, Riga, Lettország), majd 15 percig 65°C-on inkubáltam (Alpha Laboratories DB1010, Eastleigh, UK). Ezt követően 8000 rpm-el 2 percig centrifugáltam (MPW-65R, Med. instruments, Warsó, Lengyelország). A xylene-t pipettával óvatosan eltávolítottam, majd újra megismételtem az előző eljárás menetét, de ekkor már 10000 rpm-en centrifugáltam 2 percig.

Ezt követően a mintákat leszálló alkoholsorban rehidráltam. Először 1 ml 96%-os etil-alkoholt (Ethanol absolute, Merck KGaA, Darmstadt, Németország) adtam a mintákhoz, melyet 10 másodpercig vortexeltem és 10 percig inkubáltam szobahőmérsékleten. Majd az Eppendorf csöveket 8000 rpm-en 2 percig 20°C-on centrifugáltam és a felülúszót, az alkoholt pipettával eltávolítottam. Másodszor is 1 ml 96%-os etil-alkoholt adtam a mintákhoz, de ekkor a 10 másodperces vortexelést követően 30 percig inkubáltam szobahőmérsékleten és 10000 rpm-en 3 percig centrifugáltam. Harmadszorra már 90% etil-alkoholt használtam a folyamat elvégzéséhez és az inkubációs idő 20 perc volt. Negyedszerre 70%-os, ötödszörre 50%-os etil-alkoholt használtam, a többi művelet a harmadik lépéssel megegyező volt. A rehidráltást követően 40°C-on szárítottam meg a mintákat (Alpha Laboratories DB1010 Eastleigh, UK), majd mintánként 500µl foszfáttal pufferált sóoldatot adtam, mellyel 10 másodpercig vortexeltem.

Az eljárás minden fázisában nukleázmentes eszközöket, pipettahegyeket, centrifugacsöveket és vegyszereket használtam.

DNS-izolálás

A natív, illetve a deparaffinált mintákat homogenizáltam, majd a DNS-izolálása a BK polyomavírus real-time PCR-kithez (BKV Real-time PCR-kit, Shanghai Biotech, Shanghai, Kína) mellékelt extrakciós pufferrel történt a gyártó ajánlása szerint a következő módon: 50µl mintát pipettáztam steril 0,5 ml-es Eppendorf csőbe, melyhez 50µl DNS extrakciós puffert adtam. Tíz másodperc vortexelés (Labinco L46, Breda, Hollandia) után 10 percig 10000 rpm-en centrifugáltam (MPW-65R Med. Instruments, Warszawa, Lengyelország), majd szintén 10 percig 99°C-on inkubáltam a mintákat PCR-készülékben (Eppendorf Mastercycler Gradient, Eppendorf AG., Hamburg, Németország). Végül 10 percig 13000 rpm-en ismételt centrifugáltam (MPW-65R Med. Instruments, Warsó, Lengyelország) a mintákat. A felülúszó tartalmazta a DNS-t, melyet a PCR-reakciókban templátként használtam.

Diagnosztikus MC polyomavírus PCR-primerek

Az MC polyomavírus kimutatása az MC polyomavírus nagy T-fehérje régiójára tervezett primer-párral (4. táblázat) történt (Feng et al., 2008). A termék mérete 308 bp.

Primer név	Primer szekvencia
LT3-F	5'- TTG TCT CGC CAG CAT TGT AG-3'
LT3-R	5'- ATA TAG GGG CCT CGT CAA CC-3'

4. táblázat. Az MC polyomavírus kimutatására alkalmazott primerek.

Az MC polyomavírus mellett további négy polyomavírus (HPyV6, HPyV7, TSV, HPyV9) jelenlétét is kerestem PCR-módszerrel a vírus kapszidra (VP1) tervezett alábbi primerpár-kombinációkkal (5. táblázat) (Schowalter et al., 2010; van der Meijden et al., 2010; Scuda et al., 2011).

Primer név	Primer szekvencia
Hpolyoma 6,7 VP1 F	5'- TTA ATT TGC CTG AAA TTC CTG -3'
Hpolyoma 6,7 VP1 R	5'- TGT CTA AAC ATC ATA TCC AC -3'
Hpolyoma TSV,9 VP1 F	5'- TTA ATT TGC CTG AAA TTC CTG -3'
Hpolyoma TSV,9 VP1 R	5'- TGT CTA AAC ATC ATA TCC AC -3'

5. táblázat. A humán polyomavírus 6, 7 (Schowalter et al., 2010), TSV és humán polyomavírus 9 (van der Meijden et al., 2010) keresésére alkalmazott primerek.

Polimeráz láncreakció (PCR)

A reakcióelegyet minden esetben PCR-fülke alatt állítottam össze, ügyelve a kontamináció elkerülésére. A 0,5 ml-es Eppendorf csövek a 6. táblázatban felsorolt összetevőket tartalmazták mintánként (6. táblázat). Negatív és pozitív kontrollt minden reakciónál alkalmaztam.

A PCR-keverék összeállítása után az elegyet vortexeltem (Combispin FVL-2400 N, Biosan, Riga, Lettország), 2,5µl DNS mintát mértem hozzá csövenként, majd 10 másodpercig 10000 rpm-en centrifugáltam (Eppendorf Centrifuge 5415D, Eppendorf AG., Hamburg, Németország). A polimeráz láncreakciókat PCR-készülékkel (Eppendorf Mastercycler Gradient, Eppendorf AG., Hamburg, Németország) végeztem,

a következő beállítások mellett: 4 perc kezdeti denaturáció 94°C-on, majd 40 cikluson keresztül 30 másodperc denaturáció 94°C-on, 30 másodperc „annealing” 57°C-on, 60 másodperc elongáció 72°C-on, majd az utolsó ciklus után további 5 perc 72°C-on.

Anyagok	Kiindulási koncentráció	Gyártó	Kimért térfogat
RNázmentes víz	-	Promega, Madison, USA	37,5 µl
10xPCR-puffer	10 mM Trizma-HCl 50 mM KCl 1,5 mM MgCl ₂ 0,001% gelatin	Sigma, Saint Louis, USA	5 µl
MgCl ₂	25 mM	Zenon Bio Kft., Szeged, Magyarország	1 µl
dNTP	10 mM	Promega, Madison, USA	1 µl
Primer (reverz)	100µM	Integrated DNA	1 µl
Primer (forward)	100µM	Technologies, Leuven, Belgium	1 µl
Dupla-Taq (DNS) polimeráz	5 U/µl	Zenon Bio Kft., Szeged, Magyarország	1 µl
DNS minta			2,5 µl
Összesen			50 µl

6. táblázat. A PCR-keverék összetétele mintánként.

Primerek a teljes MC polyomavírus genom meghatározásához

Egy nyirokcsomóáttét natív mintájából az MC polyomavírus teljes genomjának „primer-walking” módszerrel történő meghatározása érdekében összesen 13 primerpárt terveztünk. A forward primert mindig a már meghatározott saját MC polyomavírus szekvenciájára, a reverz primert pedig a GenBankban található MC polyomavírusok (GenBank azonosító számok: EU375803, NC_010277, JN383841, JF813002) konzervatív szakaszaira terveztük.

Primer név	Primer szekvencia
MCpoly-1244-F	5-TGG CAC CTG GGA GGA TCT CTT
MCpoly-1507-F	5-CAA GTT TTA CAA GCA CTC CAC
MCpoly-1885-F	5-TGC AAG AGA ATA AGC CAC TGC
MCpoly-1969-R	5-CGT CTA GCT CAT ATT CAC AAC
MCpoly-2304-F	5-TGG TAC TGC TGC TTA TTT GAA
MCpoly-2452-R	5-AAA TCT ATT AAG GCT GCA GCA
MCpoly-2622-F	5-GAT CAT CTA GAT GGT GCT GTA
MCpoly-3196-R	5-CAA GGC GCC ACT GAA AGG ACC
MCpoly-4338-F	5-TGA GGC AAC ATT AGG GCA
MCpoly-4787-F	5-ACA AGT GAC ACT TGC TCG CGT
MCpoly-4899-R	5-GCT TCT TTG GTT AAC CAA GGT
MCpoly-LT3-1-F	5-ATG GAT TTA GTC CTA AAT AG
MCpoly-LT3-1-R	5-ACT GAG ATG ACG AGG CCT
MCpoly-LT3-R2	5-GTG ATG CTT TAA GCA GCT TCT
MCpolyoma-LT3-F	5-TTG TCT CGC CAG CAT TGT AG
MCpolyoma-LT3-R	5-ATA TAG GGG CCT CGT CAA CC
MCpolyoma-VP1-F	5-TGG ATC TAG GCC CTG ATT TTT
MCpolyoma-VP1-R	5-TTT GCC AGC TTA CAG TGT GG
MCpoly-VP1-1-F	5-GCA ACA GAG GGC TTT GGG TA
MCpoly-VP1-1-F2	5-TCT AAG AGA TTC CCT GGA TCA
MCpoly-VP1-1-R	5-CTC TAG GCT GCA GAT ACA ATC
MCpoly-VP1-1-R2	5-ATT CTC CAA ACT GTT AGT GGT
MCpoly-VP1-1-R3	5-CTG GAG AGG CGG AGT TTG ACT
MCpoly-VP1-F2	5-TGG AAC TGA GGC AAC ATT AG
MCpoly-VP1-F3	5-TTC ACC AAT ATT GGC CAG CA
MCpoly-VP1-R2	5-AAA GTG TCA GGC CAA CCT

7. táblázat. Az MC polyomavírus teljes genomjának „primer-walking” módszerrel történő meghatározására alkalmazott primerek.

Agaróz gélelektroforézis

A PCR-termékeket agaróz gélben választottam el. A gélelektroforézis során használt puffer 35 ml 5xTBE puffert (Tris-Borát EDTA puffer pH=8,) és 315 ml tri-desztillált vizet (Lab-Ex Laborkereskedelmi Kft. Budapest, Magyarország) tartalmazott. Egy 100 ml-es Erlenmeyer-lombikba az elkészített puffer 60 ml-ét átöntöttem és ebben 825 mg agarózt (NuSieve 3:1 Agarose, Cambrex, Cambrex Bio Science, Rockland, USA) oldottam fel mikrohullámú sütőben (MIK 4750, Elin) 2 perc alatt, maximális fokozaton. Ezt követően a folyékony gél kb. 50°C-ra lehűtöttem és 1µl EtBr-ot kevertem el benne (Ethidium Bromide Solution 10 mg/ml, Promega, Madison, USA). Formába öntve a gél szobahőmérsékleten 50 percig, majd 4°C-on 10 percig dermedtettem. Az elektroforézis során (Minicell EC 370M, E-C Apparatus Corporation, St. Petersburg, Florida, USA) mintánként 15µl PCR-terméket és 5µl futtató oldatot (Gel Loading Solution, 6xBlue/Orange Loading Dye, Promega, Madison, USA) használtam. Minden futtatásnál DNS-markert (100 bp, DNA Ladder, Promega, Madison, USA) is alkalmaztam. A futtatás 120V feszültségen (Power Pack P25T, Biometra, Göttingen, Németország) 40 percig zajlott. UV-átvilágítást követően (Variable Intensity Transilluminator, Model TVR-312A, Spectroline, Westbury, New York, USA) a kapott eredményt digitális kamerával (Canon Power Shot G6 7.1 MegaPixel, Canon, Japán) rögzítettem.

PCR-termék tisztítása

A PCR-termék tisztítása az alábbiak szerint történt: 20µl 4M ammónium-acetáthoz (Reanal, Budapest, Magyarország) 20µl PCR-terméket és 120µl 96%-os etil-alkoholt (Ethanol absolute, Merck KGaA, Darmstadt, Németország) adtam. Ezt követően vortexeltem (Labinco L46, Breda, Hollandia) és 13000 rpm-mel 15 percig centrifugáltam (MPW-65R Med. Instruments, Warsó, Lengyelország), majd a felülúszót dekantáltam. A mosást 200µl 96%-os etil-alkohollal folytattam, majd ismét vortexeltem és 13000 rpm-en 10 percig centrifugáltam. A centrifugálást követően a felülúszót kvantitatívan eltávolítottam, a pelletet 10 percig szobahőmérsékleten szárítottam. A száradást követően a pelletet 35µl, RNázmentes vízben (Promega, Madison, USA) oldottam fel.

Szekvenálás

A teljes genom meghatározáshoz a tisztított PCR-termékeket direkt módon – a polimeráz láncreakcióknál használt primerekkel - szekvenáltuk mindkét oldalról. A reakció elegyet (8. táblázat) minden esetben PCR-fülke alatt készítettem össze 0,5 ml-es Eppendorf csövekben.

Anyagok	Kiindulási Koncentráció	Gyártó	Kimért térfogat
RNázmentes víz	-	Promega, Madison, USA	2,3 µl
Primer reverz	100µM	Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgium	0,7 µl
Primer forward	100µM		0,7 µl
Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (version 1.1)	-	Applied Biosystems, Warrington, Egyesült Királyság	2 µl
PCR-termék	-	-	5 µl
Összesen			10,7 µl

8. táblázat. A szekvenálási reakció összetétele mintánként.

A szekvenálási reakció PCR-készülékben (Eppendorf Mastercycler Gradient, Hamburg, Németország) történt: 1 perc kezdeti denaturáció 96°C-on, majd 25 cikluson keresztül 15 másodperc denaturáció 96°C-on, 5 másodperc „annealing” 57°C-on, 4 perc elongáció 60°C-on, végül az utolsó ciklus után további 5 perc 72°C-on.

A szekvenálási reakció tisztítása egy új 0,5ml-es Eppendorf csőben történt, melybe 5µl 136g/mol nátrium-acetátot és 100µl 96%-os etil-alkoholt (Ethanol absolute, Merck KGaA, Darmstadt, Németország) mértem (1. oldat). A szekvenálási reakció termékéhez 40 µl H₂O-t adtam (2. oldat). Ezt követően a 2. oldatot az 1. oldathoz mértem, majd vortexeltem (Labinco L46, Breda, Hollandia) és 30 percig 13000 rpm-en centrifugáltam (MPW-65R Med. Instruments, Warsó, Lengyelország). A felülúszót dekantáltam, majd 300µl 70%-os etil-alkohollal mostam, melyet 10 másodperc vortexelés és centrifugálás (13000 rpm, 15 perc, 15°C) követett. A felülúszót kvantitatívan eltávolítottam, majd a pelletet 50°C-on 3 percig szárítottam (Alpha

Laboratories DB1010, Eastleigh, UK). A szárítás után 20µl Hi-Di (highly deionized) formamide-ban (Applied Biosystems, Warrington, UK) oldottam fel. Ezt követte a hevítés 95°C-on 2 percig (Eppendorf Mastercycler Gradient, Hamburg, Németország), majd a mintát 20 percig jégbe tettem. A minták szekvenálása a laboratóriumunk automata kapilláris szekvenátorával (ABI PRISM 310 Genetic Analyser, Applied Biosystems, Stafford, USA) történt a gyártó előírásai szerint.

Szekvencia- és filogenetikai elemzés

A nyers szekvencia adatok javítása után a kromatogramot Chromas Lite v. 2.33 szoftverrel jelenítettem meg, majd a szekvenciákat GeneDoc programmal (version 2.6, DNASTAR) illesztettem és elemeztem a prototípus MC polyomavírus szekvenciájával (GenBank: EU375803) összehasonlítva. MEGA program (Molecular Evolutionary Genetic Analysis, MEGA version 5.2) segítségével filogenetikai ágrajzot készítettem neighbour-joining módszerrel (bootstrap N=1000), Jukes-Cantor korrekciós ráta figyelembevételével, az MC polyomavírusok és az eddig ismert prototípus polyomavírusok teljes szekvenciáinak felhasználásával.

II. HÖRCSÖG BŐRTUMOR ÉS VIZSGÁLATA

Vizsgálati anyagok

Fekete szíriai hím hörcsög (*Mesocricetus auratus*) ismeretlen eredetű tumoros bőrelváltozásából származó mintát, valamint ugyanezen állat nem tumoros natív szövetmintáit (bőr, farok, máj és tüdő) vizsgáltunk molekuláris, kórszövettani, valamint immunpatológiai módszerekkel. Az állatot 2013 januárjában néhány napos korában vásárolták egy szlovákiai kisállat-kereskedésben, majd ezt követően háziállatként tartották Pécssett.

A kontroll vizsgálatokhoz mintákat gyűjtöttünk noninvazív módon további fekete szíriai hörcsög egyedektől. Ennek érdekében 2018 májusában és júniusában három különböző tulajdonostól (orvostanhallgatók) további három, a mintavétel időpontjában klinikailag egészséges, háziállatként tartott, 12-21 hónapos fekete szíriai hörcsögből (n = 2 nőstény és n = 1 hím) friss bélsármintákat gyűjtöttünk Pécssett.

Szekvencia-független, random nukleinsav amplifikáció és virális metagenomika

Az index hörcsög arcának területéről vett, natív bőrtumor szövetmintát virális metagenomikai módszerekkel vizsgáltuk (Victoria, 2009). Röviden, a szövetmintát foszfáttal pufferált sóoldatban (PBS) homogenizáltuk, 0,45 µm-es pórusnagyságú steril szűrőn (Ultrafree-MC HV 0.45 µm, Millipore) átszűrtük, majd centrifugáltuk (6000X g, 5 min) (Phan et al., 2013). A filtrátumot nukleázok keverékével (TurboDNase, Appl. Biosystems; BaselineZero DNase, Epicentre Biotechnologies; Benzonase nuclease, Novagen; RNase A, Fermentas) kezeltük, hogy a kapsziddal védett virális nukleinsavakon kívül a mintában lévő minden egyéb nukleinsavtól lehetőleg megszabaduljunk és így a virális nukleinsav koncentrációját relatíve növeljük a mintában (Victoria et al., 2009). A virális nukleinsavat QIAamp Viral RNA Mini Kittel (QIAGEN, Hilden, Germany) izoláltuk a gyártó leírás szerint. A virális RNS és DNS könyvtárakat szekvencia-független random primerekkel (képlete: 5'vég - 20 ismert nukleotid+N₈-3'vég, ahol az N random nukleotid) párhuzamosan RT-PCR és PCR-amplifikációkkal készítettük (Victoria et al., 2009). A cDNS könyvtárat az extrahált RNS-ből a ScriptSeq™ v2 RNA-Seq Library Preparation Kit (Epicenter) segítségével készítettük. A cDNS könyvtárból származó véletlenszerű PCR/RT-PCR-amplikonokat és az extrahált DNS-t, új generációs MiSeq Illumina platformon szekvenáltuk a gyártó utasításai szerint és a korábban leírtak szerint (Phan et al., 2013). A metagenomikai leolvasásokat rendeztük, *de novo* összeillesztettük (Deng et al., 2015), majd nagy áteresztő képességű bioinformatikai módszerekkel (Phan et al., 2013) a read és contig szekvenciákat összehasonlítottuk a GenBank (Benson et al., 2013) fehérje-adatbázisával, BLASTx (2.2.7 verzió) segítségével (Altschul et al., 1997), a cut-off 0,01 E-érték alkalmazásával. Az új generációs szekvenálás és a bioinformatikai adatfeldolgozás a Blood Systems Research Institute (ma Vitalant Research Institute, San Francisco, USA) közreműködésével készült Eric Delwart Ph.D. laboratórium-vezető irányításával.

Teljes virális genom meghatározás

A friss daganatmintát, valamint a farokból, a bőrből, a májból és a tüdőből származó daganatmentes szöveti mintákat Potter-Elvehjem őrlővel (Sigma-Aldrich Co., München, Németország) külön-külön homogenizáltuk a keresztkontamináció elkerülése érdekében.

Az RNS-t és a DNS-t külön extraháltuk a mintákból. Az RNS-t TRI reagens (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA) alkalmazásával izoláltuk 50-50 mg frissen homogenizált szövetmintákból, valamint 150-150 µl mennyiségű 40 tömeg/térfogat% széklet-szuspenziókból (0,1 M foszfáttal pufferált sóoldatban). A DNS-izolálását innuPREP DNA Mini Kit segítségével (Analytik Jena, Németország) végeztük a gyártó utasításai szerint.

A genomiális DNS eltávolításához az extrahált RNS mintákat DNáz I-gyel (Thermo Scientific USA Waltham, MA) emésztettük, Mg^{2+} jelenlétében egy órán át 37 °C-on. A DNáz kezelés hatékonyságát reverz transzkriptáz enzimmentes RT-PCR-el ellenőriztük. Az RT-nested PCR-hez az 5' LTR és P10 genomiális régiókhöz specifikus, külső és belső primer párokat használtuk (9. táblázat).

Primer felhasználási helye	Primer név	5'-3' primer szekvenciák	PCR-termék mérete (bp)
1. PCR-kör	HamREV-972-F-out	CTGCAGTCCC GCCAGTGAAGATAG	672
1. PCR-kör	HamREV-1643-R-out	CTCTGCCAATGCC CCTTGAA	
2. PCR-kör (nested)	HamREV-1036-F-in	ACTCGGGCTCAAAGGGACAGAAAA	587
2. PCR-kör (nested)	HamREV-1622-R-in	GCCTATGGGTGGCAGGTATTC	
ISH AS próba előállítás	HamREV-2847-F-ISH	GCTCTTGGGAAAGAGCTCCA	191
ISH AS próba előállítás	HamREV-3038-R-T7-ISH	taatacgactactataggG CCTGTAGCTCAGGATTGGG	
ISH S próba előállítás	HamREV-6242-F-T7-ISH	taatacgactactataggTTACATCCGGTGGTTTGGGG	193
ISH S próba előállítás	HamREV-6435-R-ISH	CTGACAGGCAACAACCAGC	
qPCR standard	HamREV-2540-R	TTTACATCTTGGGCAAAATGCCA	428
qPCR standard	HamREV-2113-F	CAGGGATTTCARCAAGGCAATGA	
qPCR	HamREV-2310-F	GTATGTGCAGATGCC TCACC	104
qPCR	HamREV-2413-R	CCTCCCCCATA TGCTGTTC	

9. táblázat. A kísérletben használt oligonukleotid primerek felsorolása. Rövidítések: ISH: *in situ* hibridizáció; AS: antiszensz próba; S: szensz próba; kisbetűk az 5'-3' primer szekvenciákban; RNS polimeráz felismerési helyek.

A fekete szíriai hörcsögből azonosított retrovirális szekvencia teljes genomját (BSHRV/2013/HUN, GenBank azonosító: MK304634) „primer-walking” technikával határoztuk meg a tumorszövetből kinyert DNS-ből PCR-módszerrel. A szekvencia-specifikus oligonukleotid primereket a virális metagenomika segítségével meghatározott retrovirális read-ek és contig-ok felhasználásával terveztük. A genom két végét, valamint a provírus szomszédos kromoszómális régióit Thermal Asymmetric Interlaced PCR-(TAIL-PCR) módszerrel vizsgáltuk (Liu és Whittier, 1995). A TAIL-PCR-módszerrel és a virális metagenomika segítségével meghatározott szekvenciát konvencionális PCR-el és „long range” polimeráz láncreakcióval (Boros et al., 2012) ellenőriztük. A PCR-termékeket mindkét irányban megszekvenáltuk BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (version 1.1, Applied Biosystems, Warrington, Egyesült Királyság) segítségével, majd automata kapilláris szekvenátoron (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Stafford, USA) futtattuk.

Szekvencia- és filogenetikai elemzés

Az azonosított retrovirális szekvenciát és a GenBankban található más retrovírusok szekvenciáival ClustalX (version 2.1) (Thomson et al., 1997) program segítségével illesztettük és GeneDoc (<http://www.psc.edu/biomed/genedoc>, Multiple Sequence Alignment Editor and Shading Utility v.2.7.000, 2006) (Nicholas et al., 1997) programmal értékeltük. A filogenetikai vizsgálatok a *pol* és az *env* génrégiók által kódolt fehérjék aminosav szekvenciái alapján készültek MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 6) programmal (Tamura et al., 2013). A filogenetikai ágrajz megrajzolásához neighbor-joining modelleket alkalmaztunk 1000-szeres ismétlés (bootstrap) mellett.

Szövettan

A kórszövetteni vizsgálatra szánt mintákat 10%-os formalinnal fixáltuk, majd paraffinba ágyaztuk. Ezt követően mikrotómmal 5 µm vastag szeleteket készítettünk, melyeket hematoxilinnel és eozinnal megfestettünk.

***In situ* hibridizáció**

Minta előkészítése

Két, egyenként 191/193nt hosszú, egyszálú, szensz és antiszensz Digoxigenin-11-UTP-vel (DIG, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI, USA) jelölt RNS próbák (9. táblázat) előállításához először a vírus dUTP régiójához (szensz próbához), illetve a retrovírus burokfehérjét kódoló régiójához (antiszensz próbához) kötődő specifikus oligonukleotid primereket terveztünk (13. ábra, 9. táblázat). PCR-reakciónként az egyik primer 5' vége egy T7 RNS polimeráz promóterszekvenciát (taatacgactcactataGgg, ahol a nagybetűvel szedett guanozin [G] bázisról kezdődik az RNS átírás) tartalmazott (9. táblázat). Az így kapott PCR-termékeket horizontális gélelektroforézis után az agaróz gélből kivágtuk, majd szilika-oszlopos módszerrel (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Németország) a gyártói protokollnak megfelelően tisztítottuk. A tisztított PCR-termékek mennyiségét NanoDrop (ThermoScientific, Waltham, MA, USA) mikrospektrofotométerrel ellenőriztük. A tisztított, T7-promótert tartalmazó PCR-termékekről TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit (ThermoScientific Waltham, MA, USA) segítségével *in vitro* Digoxigenin-tartalmú (DIG-11-UTP, Roche) RNS-t szintetizáltunk a gyártói protokollnak megfelelően. Az előállított DIG-jelölt RNS próbákat RNeasy Mini Kit (Qiagen, Németország) alkalmazásával tisztítottuk. Az RNS extraktumok integritásának, hosszának és hozamának értékeléséhez a tisztított mintákat 1%-os agaróz gélben futtattuk etídium-bromiddal és a RiboRuler™ RNS hosszmarkerrel (ThermoScientific Waltham, MA, USA). Az előállított DIG-jelölt specifikus szensz és antiszensz RNS-próbákat retrovirális DNS és/vagy RNS kimutatására használtuk a formalinnal fixált paraffinba ágyazott szövetmintákon *in situ* hibridizációs módszer alkalmazásával.

Az FFPE szakaszok kromogén in situ hibridizációja

A 10 μ m vastagságú, formalinnal fixált paraffinba ágyazott tumorpreparátumokat deparaffináltuk és rehidráltuk xilol és csökkenő etanol-koncentrációk felhasználásával (100-50%). Az 50%-os alkoholos mosást követően a preparátumokat 1xNaCl-tartalmú foszfát pufferrel (pH 7,4, 1xPBS) mostuk. A rehidrált metszeteket Proteinase K-val (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI, USA) emésztettük

37°C-on 10 percig, majd 1xPBS végzett alapos mosás után a mintákat frissen készített 4%-os paraformaldehiddel 5 percig szobahőmérsékleten (RT) utófixáltuk.

1xPBS-ben történő mosás után a lemezeket acetiláltuk 0,25% ecetsavanhidridet tartalmazó 0,1 M trietanol-amin-pufferrel (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI, USA) (pH 8,0). Az előhibridizációt 42°C-on, 2 órán át végeztük egy előhibridizációs pufferben, amely 50% deionizáltformamidot, 4x nátrium-citrát-sóoldatot (SSC), 2,5x Denhardt-oldatot és 0,25% élesztő RNS-t tartalmazott. Az előhibridizáció után a lemezeket 80°C-on inkubáltuk 5 percig (DNS denaturálás), majd 42°C-on egy éjszakán át a hibridizációs pufferben, amely 50% deionizáltformamidot, 4x SSC, 2,5x Denhardt's oldatot, 0,5% élesztő RNS-t, 10% Dextran szulfátot és 1,4 µg/ml szensz vagy antiszensz DIG-gel jelölt próbákat tartalmazott. A lemezeket 2xSSC-vel mostuk 42°C-on 2x15 percig, majd ezt követően 1xSSC-vel 42°C-on 2x30 percig mostuk rázógépből. Ezután a metszeteket 0,1v/v% Triton X-100-at tartalmazó 1xPBS-ben (1xPBS-T) mostuk, és 10% FBS-t tartalmazó 1xPBS-T-ben inkubáltuk (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI, USA) egy órán át szobahőmérsékleten. Ezt követően a metszeteket egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk 1% FBS-t és 1:1000-ban hígított alkalikus foszfátáz konjugált anti-DIG Fab (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI, USA) antitestet tartalmazó 1xPBS-T-ben. Miután négyszer mostuk 1xPBS-T-vel 15 percig, és 100 mM Tris-sel (pH 9,5), 100 mM NaCl-oldattal 3x5 percig, a metszeteket nitro-kék tetrazolium klorid/5-bróm-4-klór-indolifoszfat p-toluidin sóval (NBT/BCIP) hívtuk elő, 100 mM-os Tris (pH 9,5), 100 mM nátrium-klorid és 1 mM levamisol eleggyel hígítva három órán keresztül. A kromogén reakciót 1xPBS és dH₂O-ban végzett alapos mosással állítottuk le. Végül a metszeteket 87%-os glicerinnel fedtük be.

Az integrált BSHRV bétaretrovírus genom kópiaszámának meghatározása qPCR-módszerrel

Az integrált vírus kópiaszám abszolút számszerűsítéséhez daganat, farok, máj és tüdő szövetmintákat használtunk (10 ng DNS/minta), a SYBR Green alapú qPCR-módszert alkalmazva, a gyártó utasításai szerint (Maxima SYBR Green qPCR Master Mix; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). A qPCR-reakcióelegy 12,5 µl 2 × Maxima SYBR Green/ROX qPCR mastermixet és 0,3–0,3 µl 20 µM HamREV-2310-F és HamREV-2413-R oligonukleotid primereket (*gag* gén, 9. táblázat), valamint 10–10 ng izolált templát DNS-t tartalmazott 25 µl végtérfogatban. A qPCR termikus program egy előinkubációs lépéssel kezdődött (95°C, 10 perc), majd 39 ciklusból álló

lánreakciót végeztünk 95°C-os 15 másodperces, 57°C-os 15 másodperces, és 72°C-os 33 másodperces lépésekkel. Ezt követte a disszociációs assay és a futtatás ABI 7500 qPCR thermal cycleren. A standard görbe előállításához 10-szeres hígítású tisztított sorozatot ($2,26 \times 10^6$ – $2,26 \times 10^3$) (GeneJet Gel Extraction Kit, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) és spektrofotometriásan (NanoDrop ND-1000) mennyiségileg meghatározott 428 bp hosszú PCR-t *gag* gén termékeket használtuk. A standard görbéhez használt PCR-termék tartalmazta a HamREV-2310-F és a HamREV-2413-R qPCR-ek oligonukleotid-primereit. A standard görbe meredeksége $-3,398550$ volt és a számított PCR-hatékonysága 99,92% volt.

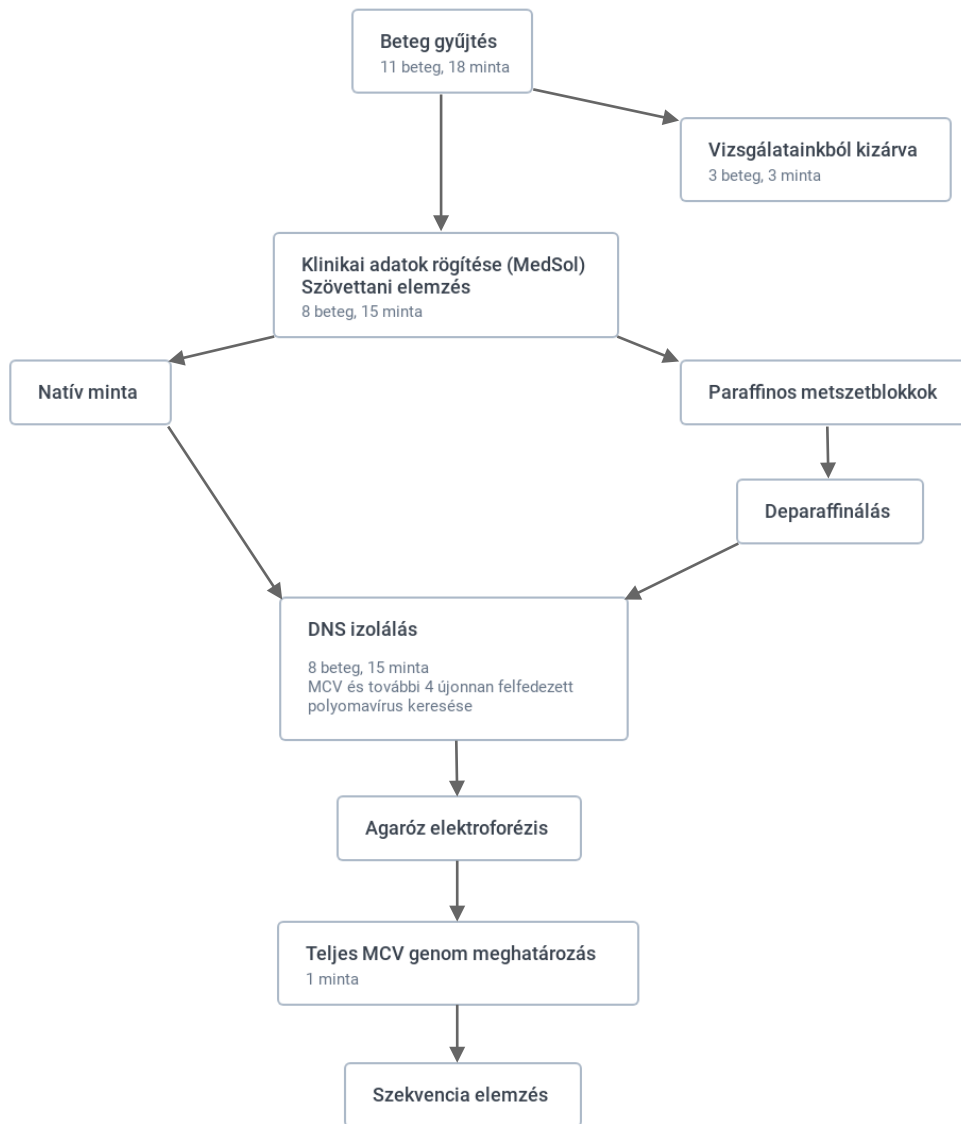
EREDMÉNYEK

I. MERKEL-SEJTES KARCINÓMA ÉS MC POLYOMAVÍRUS

A Pécsi Tudományegyetem (PTE), Pathológiai Intézetében 2007-2012 között összesen 11 beteg esetében diagnosztizáltak Merkel-sejtes karcinómát szövettani (sejtmorfológia hematoxilin-eozin festés mellett, CK-20 pozitivitás és TTF-1 negativitás) módszerekkel. A 11 betegnek összesen 18 archivált szövettani mintája volt elérhető (3. ábra). Három beteget és a hozzájuk tartozó paraffinba ágyazott három szövettani mintát a rossz fixáltságuk miatt kizártuk a további vizsgálatokból és elemzésekből.

A vizsgálat menete

A 8 beválogatott beteg klinikai adatait összegyűjtöttük, majd a betegekhez tartozó 15 szövetmintából - 10 paraffinba ágyazott mintából deparaffinálást követően, az 5 natív mintából közvetlenül - DNS-t izoláltuk. Az MC polyomavírus mellett további négy új (HPyV6, HPyV7, TSV, HPyV9) polyomavírus jelenlétét is kerestük PCR-módszerrel a 15 mintában. Vizsgáltuk a PCR-módszerrel MCV pozitív (MC+) és MCV negatív (MC-) esetek kliniko-patológiai (életkor, szövettani kép és limfovaszkuláris invázió, társbetegség) jellegzetességeit és összefüggéseit. Egy esetben pedig az MC polyomavírus teljes genomját is meghatároztuk és elemeztük.

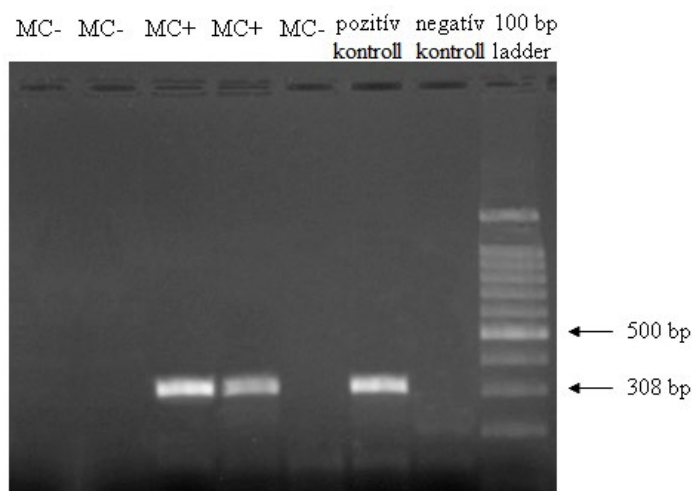


3. ábra. A vizsgálat menete

A Merkel-sejtes karcinóma esetek epidemiológiai, kliniko-patológiai és virológiai jellegzetességei

A 8 betegből 2 betegnek 3-3 mintája, 3 betegnek 2-2 mintája, míg 3 betegnek 1-1 különböző helyről vett szövettani mintáját vizsgáltuk (10. táblázat). A 8 beteg közül három (37,5%) beteg primer tumorából (2 minta), bőr (1 minta) és nyirokcsomóáttéteiből (2 minta) sikerült MC polyomavírust PCR-módszerrel kimutatni (10. táblázat). Összességében a 15 szövetminta közül 5-ből (33%) lehetett MC polyomavírus nukleinsavat azonosítani. Egy beteg esetén a primer bőrtumorban, a nyirokcsomóáttétben és a bőrmetasztázisban is jelen volt a vírus. Az MC polyomavírusra jellemző PCR-termékek reprezentatív gélelektroforézis képét az 4. ábra szemlélteti (4. ábra). A további négy, újonnan felfedezett polyomavírus (HPyV6,

HPyV7, TSV, HPyV9) jelenlétét a 15 minta egyikéből sem sikerült kimutatnunk PCR-módszerrel.



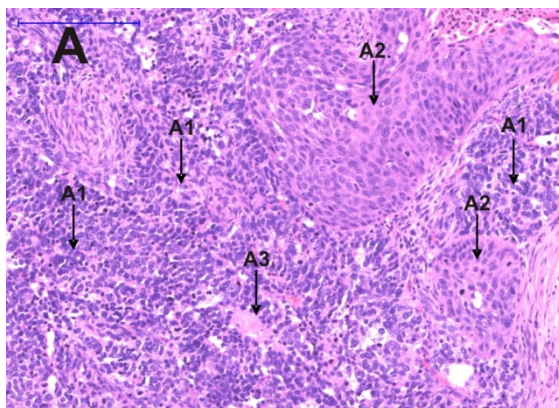
4. ábra. Merkel-sejtes polyomavírusra specifikus méretű PCR-termékek (308bp) gélelektroforetikus képe. MC polyomavírus pozitív: 3. és 4. minták; MC polyomavírus negatív: 1., 2. és 5. minták. (jobb szélén: 100bp molekuláris marker, Promega)

A 10. táblázat összefoglalja a vizsgált 8 Merkel-sejtes karcinóma diagnózissal kezelt beteg epidemiológiai, kliniko-patológiai és virológiai jellegzetességeit. A 8 beteg közül 6 (75%) férfit és 2 (25%) nőt találunk, az MC polyomavírus PCR-pozitív betegeknél ez az arány 66% nő és 33% férfi. Évek szerint a szövettani diagnózis 1-1 esetben 2007-ben, 2008-ban és 2012-ben, 2 esetben 2010-ben és 3 esetben 2011-ben történt. A legfiatalabb beteg 55 éves, a legidősebb 86 éves, a betegek átlag életkora 73,8 év volt (az MC polyomavírus PCR-pozitív betegeknél az átlagéletkor 64,3 év volt). A daganat lokalizációját tekintve nem találtunk különbséget az MC+ és MC- eseteink között. Egy, a legfiatalabb beteg kivételével (akinél a lábszárán jelentkezett az MC+ primer daganat!), mindegyik esetben a tumor a fej-nyaki régióban (arc, homlok, orrszárny, nyak) helyezkedett el. Mindegyik betegnél találtunk az MCC-re hajlamosító tényezőket, mint az immunszuppresszió (például: tartós orális szteroid kezelés, krónikus limfoid leukémia, krónikus obstruktív tüdőbetegség) és/vagy az idős kor (10. táblázat).

Epidemiológiai adatok			Klinikai adatok			Virologiai eredmények		Kórszövettani eredmények	
Betegek (nem)	Életkor	A (szövettani) diagnózis időpontja, († elhalálozás)	Minta típusa	Lokalizáció	Társbetegség	MC	Primer MCC limfovaskuláris invázió	Szövettani mintázat	
1 ♂	minta 1	2011.06.02. († 2013.05.17.)	MCC	lábszár	COPD, pszoriázis (PUVA kezelés)	+	-	kerek vagy ovális alakú sejtek, vezikuláris magokkal és egészséges citoplazmával	
	minta 2		lábszár	+					
	minta 3		lágycsőhajtlat	+					
2 ♀	68	2011.05.25.	MCC	orrszárny	pemphigus vulgaris (szteroid kezelés)	+	-		
3 ♀	70	2010.12.06.	nyirokcsomó	nyak	iszkémiás szívbetegség	+	-		
			nyirokcsomó (szövettanilag nem áttétes)	nyak		-			
4 ♂	86	2012.11.10.	MCC	arc	agyvérzés, bazalióma	-	+	irregularis, változatos, polygonális magvú sejtek, változatos citoplazmával	
5 ♂	77	2010.11.13. († 2011.01. hó)	MCC	homlok	CLL	-	+		
6 ♂	80	2011.07.18. († 2012.04. hó)	MCC	arc	COPD, cukorbetegség, bazalióma, hipertónia	-	+		
			nyirokcsomó	arc		-			
			bazalióma	arc		-			
7 ♂	77	2007.10.26. († 2010.06.hó)	MCC	arc	COPD, cukorbetegség, bazalióma	-	+		
			nyirokcsomó	nyak		-			
8 ♂	78	2008.11.18. († 2009.01.hó)	MCC	nyak	SCC, prosztata karcinóma	-	+		
			<i>in situ</i> SCC	nyak		-			

10. táblázat. Merkel-sejtes karcinóma eseteink epidemiológiai, kliniko-patológiai és virológiai jellemzői.

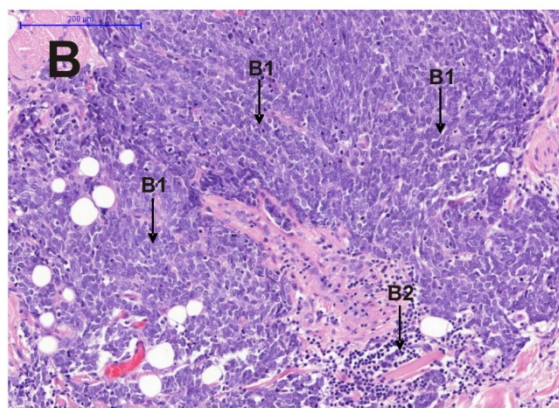
A szövettani mintázatban morfológiai különbségeket találtunk a két csoport között, melyek az 5. ábrán figyelhetőek meg (5. ábra). Míg az MC polyomavírus pozitív esetekben sokkal rendezettebb összbenyomást mutatott a hematoxilin-eozin festésű szövettani kép, kerek vagy ovális alakú sejtekkel, vezikuláris magokkal és egységes citoplazmával találkoztunk, addig az MC polyomavírus negatív esetekben sokkal irregulárisabb összbenyomást mutatott a kép, változatos, polygonális magvú daganatsejtekkel, eltérő citoplazmával (6. ábra).



A1. változatos citoplazmájú és magvú, nagy mitotikus és apoptotikus aktivitású MCC daganatsejt mezők

A2. laphámrák sejtcsoportok

A3. nekrotikus terület

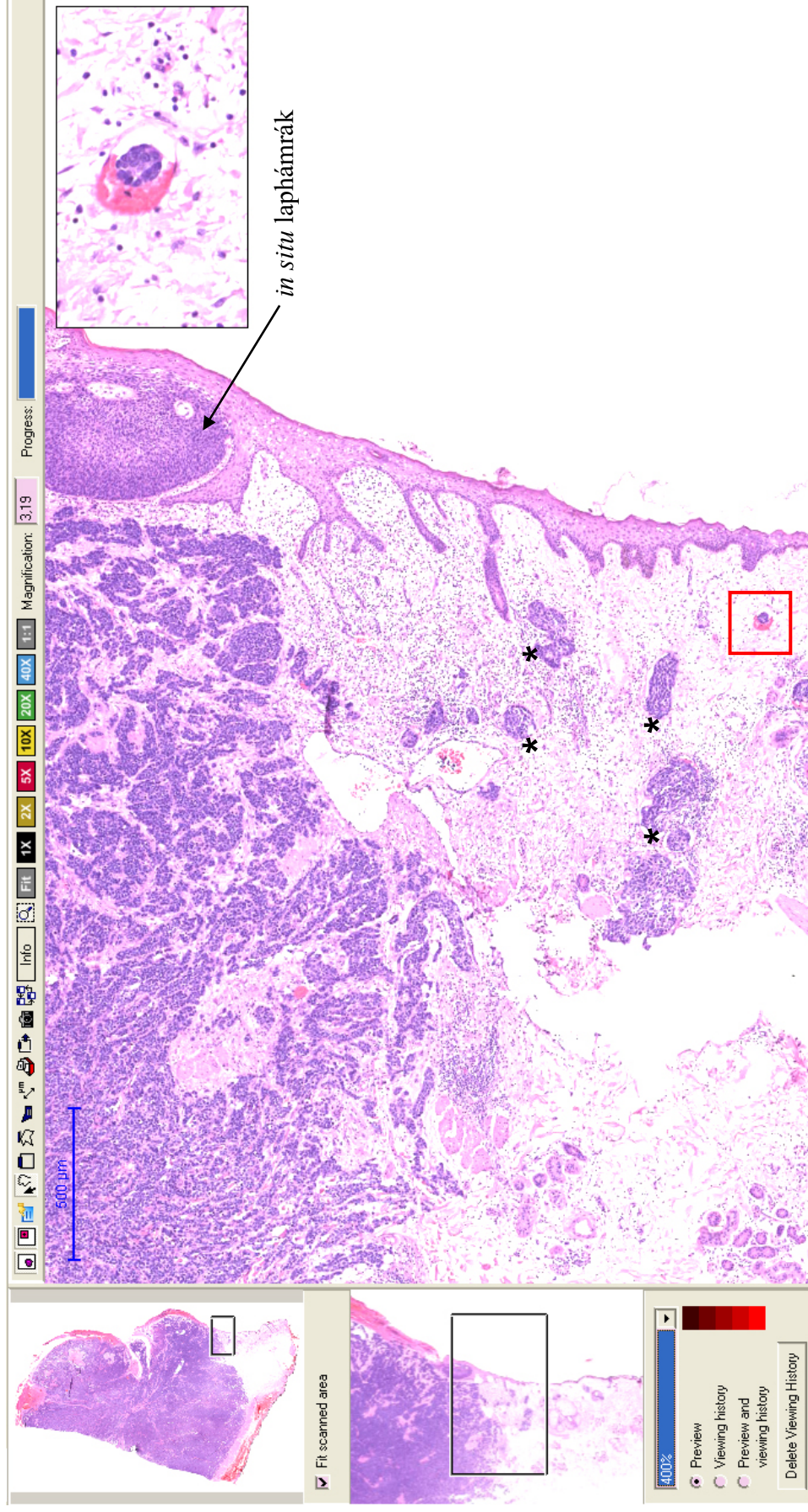


B1. ovális alakú, vezikuláris magvú MCC daganatsejt mezők

B2. kötőszövetes sötét szélénél limfocitákkal

5. ábra. Merkel-sejtes karcinóma primer bőrtumorok jellegzetességei szövettani metszetekben (hematoxilin-eozin; 14x nagyítás). (A) Merkel-sejtes polyomavírus nukleinsav nem mutatható ki; (B) Merkel-sejtes polyomavírus nukleinsav kimutatható a mintában PCR-módszerrel. Az (A) ábrán laphámrák sejtcsoportok is láthatóak (a szerző saját felvételei).

Ezenkívül a primer daganat limfovaskuláris inváziójának jelenléte között is különbségeket találtunk. Míg a vírussal nem társuló esetekben már a primer daganat megjelenésekor megfigyelhető volt a daganat széli részein a sejtek ér- és nyirokképletekbe való betörése (6. ábra), addig az MC pozitív esetek egyikében sem volt ez megfigyelhető.

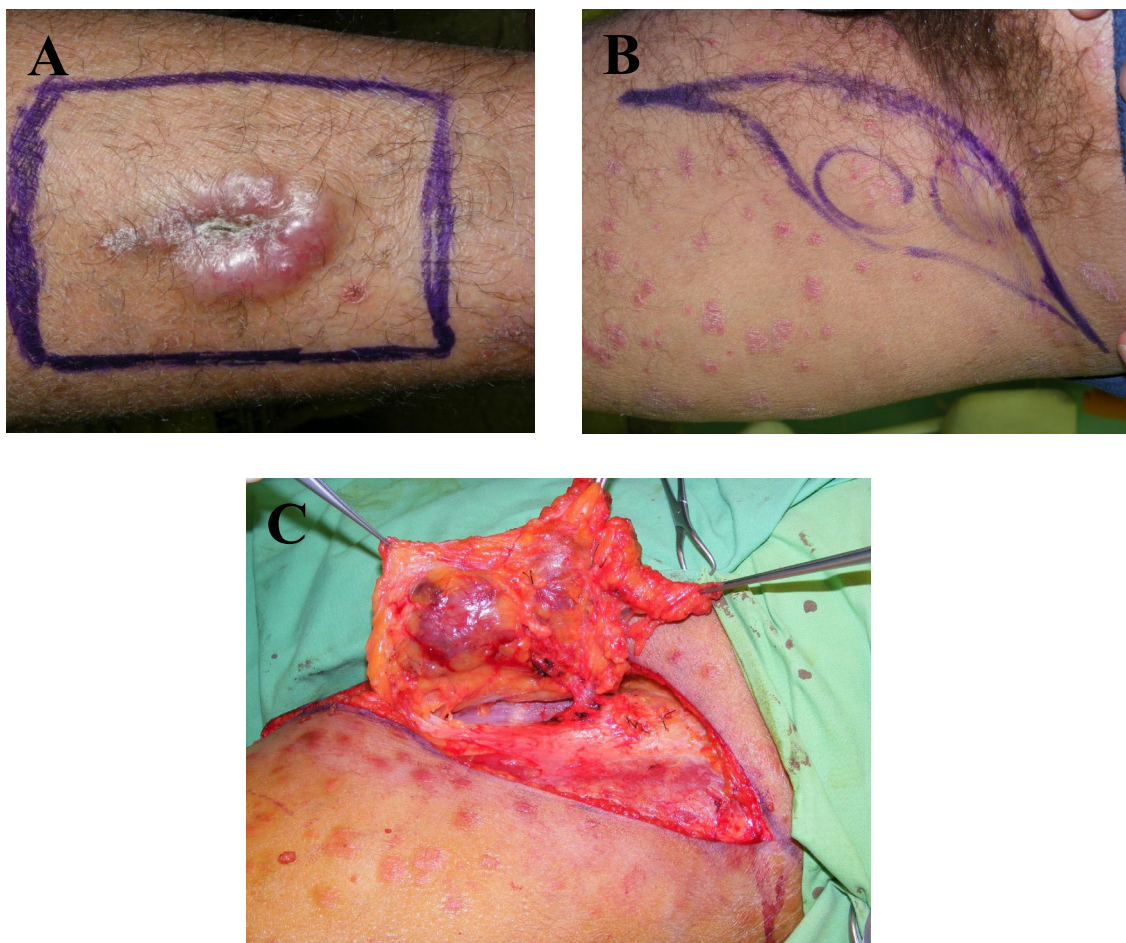


6. ábra. MCV negatív Merkel-sejtes karcinóma (hematoxinilín-eozin, 3,19x nagyítás).

* -al jelölt területeken látható a dagamatsejtek nyirok- és érképletekbe való betörése; a piros kis négyzetben kinagyítva (12,76x a jobb felső sarokban) megfigyelhető egy kis érképletbe történő invázió; nyíl: a felvételen egy *in situ* laphamrák is látható (a szerző saját felvételei)

Az esetek kórtörténetének részletes bemutatása

A legfiatalabb beteg (1. beteg) anamnézisében IV-es stádiumú COPD és pszoriázis szerepelt (10. táblázat), utóbbi miatt évekig PUVA kezelésben részesült. Elsődleges daganat a lábszáron jelentkezett, melyet 2011. június 2-án sebészileg részlegesen eltávolítottak a megjelenését követő 2 hónap múlva. Az MCC szövettani diagnózisát követően a beteget újra operálták és széles sebészi kimetszést végeztek. 2011 novemberében a beteg combján bőr, a lágyékhajlatában nyirokcsomóáttét került felismerésre, melyeket széles sebészi kimetszésben eltávolítottak (7. ábra), majd CDDP+EPI séma szerinti kemoterápiás kezelést kezdtek 2013. január 14-én. A 4. ciklust követő kontroll progressziót igazolt. A kezelés 6. ciklusát kapta meg utoljára. A beteg 2013. május 17-én a Merkel-sejtes karcinóma miatt elhunyt. Primer tumorának paraffinba ágyazott mintájából, valamint bőr és nyirokcsomó áttéteinek natív mintáiból MC polyomavírust mutattunk ki PCR-módszerrel.



7. ábra. 1. beteg (A) bőr- és (B) lágyéki nyirokcsomóáttétei és utóbbi sebészi eltávolítása. A képeken megfigyelhetők a típusos erythroscamosus pszoriázis plakkok (alapbetegség) is. (Dr. Kádár Zsolt bőrgyógyász szakorvos felvételei)

A 2. nőbeteg 68 éves volt a Merkel-sejtes karcinóma diagnózisának időpontjában, 2011-ben. 2004 óta ismert pemphigus vulgaris betegsége, amely miatt naponta 16 mg Methylprednisolont és 25 mg Azathioprint szedett. 2011. március 19-én jelentkezett bőrgyógyásznál bal orrszárnyán 1 hónapja növekvő elváltozás miatt, amelyet klinikai megjelenése alapján pyogén granulomának feltételeztek. Eltávolítására 2011. június 6-ra kapott időpontot. A képlet gyors növekedése miatt ismét orvoshoz fordult, így műtétére előbb, 2011. május 24-én került sor, melynek paraffinba ágyazott mintájából MC polyomavírust mutattunk ki. A beteg az operáció óta szoros obszervációban részesül és már több mint 11 éve tünetmentes.

A 3. nőbeteg ismert iszkémiás szívbeteg, 1994-ben miokardiális infarktusa volt, 2002-óta ismert paroxizmális pitvarfibrillációja. 2004 decemberében hármaskoszorúérműtéten, 2011 júniusában pacemaker beültetésen esett át. 2010. december 6-án egy vidéki kórházban az orrbemeneti nyílásáról egy 10 mm átmérőjű, tömött tapintatú nodulus eltávolítása történt meg, mely a beteg elmondása szerint ekkor már 3 hónapja növekedett. A szövettan Merkel-sejtes karcinómát igazolt. 2011. március 30-án nyaki UH és UH vezérelte finomtű aspirációs biopszia (FTAB) történt, melynek során jobb oldalon submandibulárisan nyirokcsomóáttétre derült fény. Teljes nyaki blokkdisszekcióra 2011. május 9-én került sor. A betegtől a műtét során eltávolított nyirokcsomók közül szövettanilag igazoltan metasztatikusnak és nem metasztatikusnak diagnosztizált natív mintákat vizsgáltunk. A primér daganat nem állt a rendelkezésünkre, csak az írásos szövettani lelet. Csak a szövettanilag is áttétesnek bizonyult nyirokcsomóból sikerült PCR segítségével MC polyomavírust kimutatni. A beteg az operáció óta szoros obszervációban részesül és már több mint 11 éve tünetmentes.

Az 5. férfibeteg az MCC diagnózisának időpontjában, 2010. november 13-án 77 éves volt. 2005 óta ismert krónikus limfoid leukémiája, 2007 óta pedig 2-es típusú cukorbetegsége. A beteg homlokán, a fejtető irányába húzódoan hirtelen növvő képletként jelent meg az MCC 2010 őszén, amely az eltávolításkor 3x3x2cm-es vérző felszínű és ulcerált volt (8. ábra). Az MCC-től balra kaudálisan 5x5mm-es pigmentált retikuláris típusú seborrhoeás keratosist távolítottak el az MCC-vel egy időben, 2010. október 28-án. E paraffinba ágyazott Merkel-sejtes karcinóma mintából MC polyomavírust nem tudtunk kimutatni PCR-módszerrel. A beteg a műtétet követően 1 hónap múlva elhunyt.

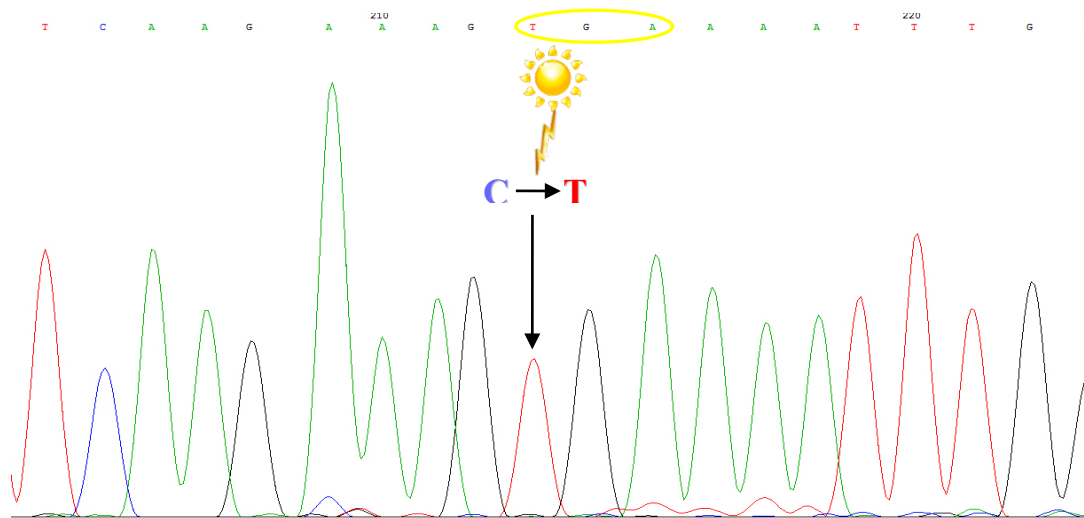


8. ábra. Merkel-sejtes karcinóma a megjelenését követő 1 hónap múlva. A bal oldali képen, a tumor jobb felső sarkában seborrhoeás keratosis is megfigyelhető (dr. Kádár Zsolt bőrgyógyász szakorvos felvételei).

A 8. betegnél az MCC szomszédságában *in situ* laphám karcinóma, 4. 6. és 7. betegek esetében bazalióma volt megfigyelhető. Ezekben az esetekben egyik alkalommal sem sikerült kimutatnunk MC polyomavírust PCR-módszerrel sem az MCC, sem a társuló daganatokból, sem az áttétes nyirokcsomókból (1 natív és 8 paraffinba ágyazott minta). A négy beteg közül három elhunyt (10. táblázat).

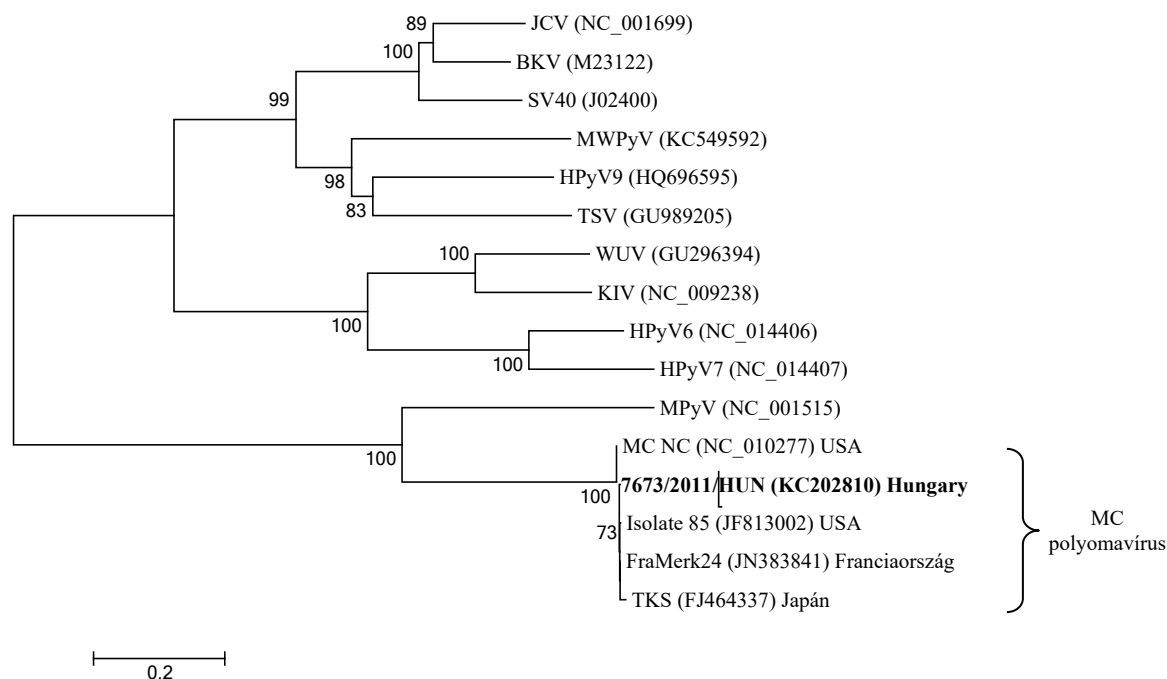
A Merkel-sejtes polyomavírus teljes genomjának meghatározása

A 70 éves 3. nőbeteg nyirokcsomóáttétének natív szövetmintájából meghatároztuk az MC polyomavírus teljes, 5392 nukleotid hosszúságú genomját (GenBank: KC202810). A polyomavírus 10 nukleotidban (0,19%) tér el a prototípus MC polyomavírustól (EU375803). Megtaláltuk a virális onkogenezisben kiemelt szereppel bíró, a sejt kóros proliferációját előidéző, a vírus replikációját felfüggesztő stop kodont eredményező, csonkoló pontmutációt (citozinból→timin) a vírusgenom nagy T (LT)-fehérjét kódoló részében, az 1461. nukleotid pozícióban (9. ábra).



9. ábra. Az MC polyomavírus nagy T (LT)-fehérjét kódoló genomrészében stop kodont (TGA) eredményező, csonkoló pontmutáció [citozinból (C) → timin (T)] szekvencia képe.

A prototípus humán polyomavírusok teljes genomja alapján készített filogenetikai elemzés a 10. ábrán látható. Az MC polyomavírus filogenetikailag elkülönül az eddig ismert emberi polyomavírusoktól és leginkább az elsőként felfedezett, egér fültömirigy-daganat kiváltására képes polyomavírussal (MPyV) van rokonságban. Az ábra azt is jól szemlélteti, hogy a különböző földrajzi térségekből származó MC polyomavírusok genomjaiban egymáshoz képest csak igen kevés nukleotid eltérés van.



10. ábra. Egyes prototípus polyomavírusok és az MC polyomavírusok filogenetikai elemzése a teljes genom nukleotid sorrendje alapján (neighbor-joining módszer, Jukes-Cantor korrekciós ráta, 1000X-es ismétlés, MEGA 5.2).

II. HÖRCSÖG BŐRTUMOR ÉS VIZSGÁLATA

Esettanulmány és kliniko-patológia

Egy hobbiállatként tartott hörcsög (*Mesocricetus auratus*) arca és a nyaka területén tumoros bőrelváltozásra lettek figyelmesek a gondozói a vásárlást követő három hónappal később. Az első elváltozás megjelenését követően 3 hét leforgása alatt 25 mm átmérőjűre nőtt és bőrátétnek imponáló elváltozás jelent meg az állat mellkasán is (11. ábra). A kisállat általános állapota gyorsan romlott. Komoly táplálkozási nehézségeket jelentett számára az arcán elhelyezkedő, kifeléelyesedett tumor. A hörcsög összesen 6 hónapig élt. Az állat szenvedése és a kedvezőtlen prognózis miatt állatorvosnál eutanáziát végeztek el.



11. ábra. Fekete szíriai hörcsög *post mortem*, arc és a nyak területén megfigyelhető tumoros bőrelváltozásokkal.

A *post mortem* – patológus által elvégzett - boncolás során a fekete szíriai hörcsög testtömege 40 g volt. A tumor kemény, tömör tapintatú, körülírt, fehér és bőr színű volt. A vágott felületen homogén, szürkés szövetek által körülírt nagy központi nekrozis volt látható (12. ábra). A mellkason, több, jól körülírt, 0,7 cm átmérőjű,

kemény tapintatú áttétek voltak megfigyelhetőek, vágott felületen fehér színnel. A test más részein nem észleltünk szemmel látható áttéteket.



12. ábra: A mellkason a tumor vágott felületén homogén, szürkés szövetek által körülírt nagy központi nekrozis, valamint az arc területén kifehélyesedett tumor látható.

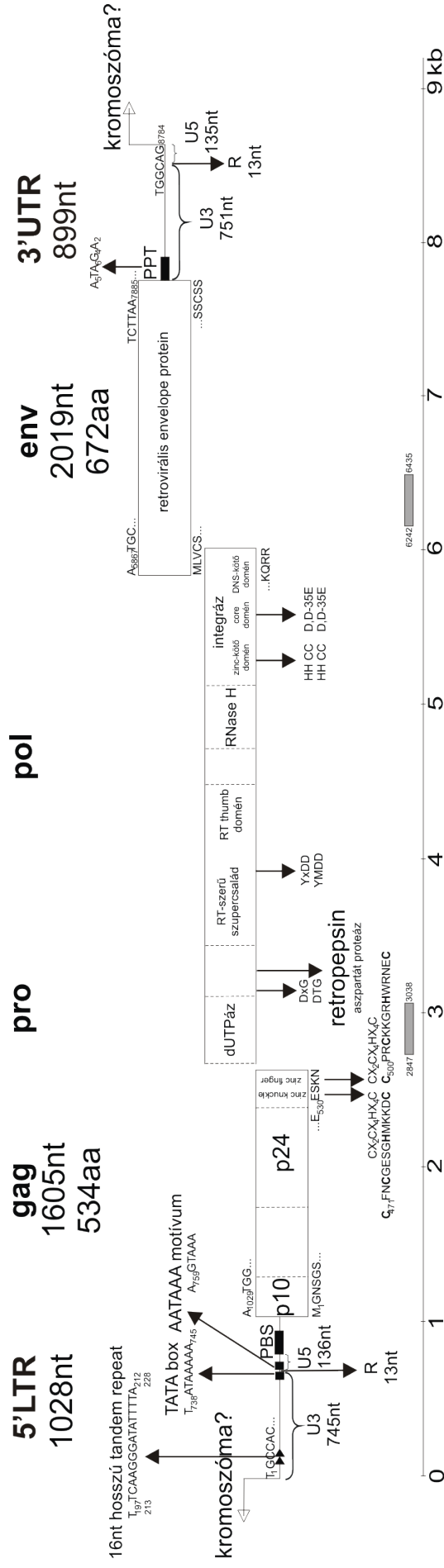
Virális szekvencia azonosítása metagenomikai módszerekkel

Az állat arcáról származó primer daganatos szövetet virális metagenomikai módszerrel vizsgáltuk. *In silico* és *de novo* analízist követően kevés, összesen 5593 szekvencia leolvasást kaptunk, amelyek vírusokkal mutattak hasonlóságot (BLASTx cut-off E-érték $\leq 10^{-10}$). Ezek közül 2284 leolvasás a *Retroviridae* víruscsaládhoz, 613 a humán endogén retrovírus elemekhez, 1622 egyéb, illetve 1074 nem osztályozott vírusokkal mutattak hasonlóságot. A *Retroviridae* víruscsaládhoz tartozó leolvasásokat kiválasztottuk és elemeztük.

Retrovirális szekvencia meghatározása

A metagenomikai módszerekkel azonosított retrovirális szekvenciák alapján tervezett szekvencia-specifikus primerpárok felhasználásával a retrovirális DNS szekvenciát kimutattuk a tumoros szövet DNS-éből, valamint a máj, tüdő, farok szövetmintáiból is PCR-módszerrel. Ezek az eredmények azt sugallták, hogy a retrovirális szekvencia integrált formában lehet jelen a gazdaszervezet genomjában, mint endogén retrovírus. Megjegyzendő, hogy a virális RNS csak a „nested” PCR-vizsgálat második PCR-körében volt kimutatható a daganat DNáz-zal kezelt RNS-mintájában, a tumor nélküli szervek többi RNS-mintájából azonban nem.

A tumorszövet DNS mintájából „primer walking” módszerrel, TAIL-PCR-módszerrel és többszörös kontroll PCR-reakciók segítségével meghatároztuk a teljes retrovirális genomot, amelyet fekete szíriai hörcsög retrovírusnak (BSHRV=black Syrian hamster retrovirus, GenBank: MK304634.1) neveztünk el. A BSHRV genom teljes hossza 8784 nt. A genomszerkezet tipikus retrovirális genomszerveződést mutat: 5'LTR-*gag-pro-pol-env*-3'LTR (13. ábra). A BSHRV kódolja a kapszid/nukleokapszid (*gag*) fehérjéket, a genom replikációjához szükséges reverz transzkriptáz és integráz enzimeket (*pro/pol*) és a burokfehérjét (*env*). Mivel a BSHRV genom az eddig ismert összes alapvető retrovírus genom elemet és fehérjét kódolja (13. ábra), ezért a genomja alapján teljes bétaretrovírusnak tekinthetjük.



13. ábra. A fekete szíriai hőrcsög retrovírus genomjának sematikus szerveződése (BSHRV/2013/HUN, GenBank: MK304634.1). A provírus teljes hossza 8784 nt. Az ábrát méretarányosan rajzoltuk. A szensz és antiszensz ISH próbák, a feltételezett dUTPáz (szensz) és a retrovírus burokfehérjét kódoló (antiszensz) régiókban (a skála feletti szürke vonalak) helyezkedtek el. A fekete nyílak a jellegzetes retrovirális nukleotid, illetve aminosav motívumokat jelölik. Rövidítések: dUTPáz = dezoxiuridin-5'-trifoszfát-nukleotidhidroláz domén (deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase); LTR = terminális végén elhelyezkedő ismétlődéseket tartalmazó szakasz (long terminal repeat); PBS = elsődleges primer kötőhely (primer-binding site); PPT = polipurin traktus (polypurine tract); U'3 = egyedi, jellegzetes retrovirális szekvencia az 3' régióban (unique 3' region); R = terminális ismétlődés (terminal repeat); U'5 = egyedi, jellegzetes retrovirális szekvencia az 5' régióban (unique 5' region)

Long terminal repeats (LTRs) elemzése

A BSHRV genom 5' és 3' végein 1028 nt és 899 nt hosszú LTR szekvenciák vannak. A vírus LTR szekvenciái a T₁GCCAC szekvenciával kezdődnek és TGGCAG₈₇₈₄-el fejeződnek be. A BSHRV 5' és 3' LTR-jeinek 80%-os a nukleotid sorrend szekvencia-azonossága.

A BSHRV 5'LTR elején, 16 nt hosszú tandem ismétlést (T_{197/213}TCAAGGGATATTTTA_{212/228}) találtunk magas T-tartalommal (44%) (13. ábra). Konzervált elemek, mint a TATA box (TATAAAAA) a 738-745 nukleotid pozíciókban, az AATAAA-motívum (AGTAAA) a 759-764 nukleotid pozíciókban található és C/T-gazdag szakaszok is megtalálhatóak a BSHRV 5'LTR-ben (13. ábra). Az U5' (unique 5' region = egyedi szekvencia az 5' régióban), a terminális ismétlés (R) és az U3 'régiók becsült hossza 745 nts, 13 nts és 270 nts az 5' LTR-en belül (13. ábra).

A sejtes tRNS-t (tRNA^{Lys3}) kötő 18 nt hosszúságú konzervált primerkötő hely (primer-binding site, PBS) a BSHRV 5'LTR terminális részén található (TGGCGCCCGAACGGGGGAC a 895–912 nt között). Ez a PBS (PBS (Lys3)) összehasonlítva a HIV, SIV és MMTV PBS-ével 1 nukleotiddal tér el egymástól, a 907 helyzetben (A→G) (Das, 1995). A PBS és a gag régió start kodonja közötti szekvenciahossz 116 nt; a T-tartalom 27% (A + T = 55%), és nem tartalmaz ismétlődéseket.

A prototípus MMTV (GenBank: X97044) 5'LTR-hez képest a BSHRV 5'LTR 293 nt-dal rövidebb és egymással csak 39,1% nt hasonlóságúak. A BSHRV 5'LTR, a *Phodopus sungorus* (dzsungáriai hörcsög) endogén retrovírus MRS-Ps 5'LTR (GenBank: M63643), valamint a BSHRV 5'LTR és az 5'LTR törpe hörcsög endogén retrovírus MRS-X3 (S77169) között viszont a nukleotid hasonlóság magas (96% és 94%). E két 5'LTR szekvencia (elérhető kódoló régiók nélkül) 1991-ben (Tikhonenko et al., 1991) és 1994-ben (Vasetskii, 1994) került a GenBank adatbázisába.

A 3'LTR hosszúsága 899nt, és egy 18 nt hosszú polypurine traktussal kezdődik (PPT, A5TA6G4A2 a 7885-7902 nt pozíciók között) (13. ábra), amely részt vesz a pozitív szálú DNS szintézisben (Bowman, 1996). Az U5', R és az U3' régió becsült hossza a 3'LTR-en belül 751 nt, 13 nt és 135 nt (13. ábra). Az 5'LTR-nek megfelelően a BSHRV 3'LTR-ben felismerhetők a konzervatív 3'LTR-elemek, mint például a TATA box (TATAAAAA) a 8629-8636 nt között és az AATAAA-motívum (AGTAAA) a 8650-8655 nt pozícióknál. A BSHRV 3'LTR-je nem tartalmaz ismétlődéseket. A

BSHRV 3'LTR és a törpe hörcsög endogén retrovírus (GenBank: S77150) 3'LTR közötti nukleotid hasonlóság 93%.

Kódoló régió elemzése

A *gag* régió kezdő kodonja (A₁₀₂₉UGG) az 1029-1031 nt pozíciók között van. A *gag*, a *pro/pol* és az *env* három különböző leolvasási keretben vannak kódolva (13. ábra). A *gag* 534 aminosav hosszúságú és tartalmazza a p10 és p24 strukturális bétaretrovírus fehérjéket, az ún. „zinc knuckle”-t és az ún. “zinc-finger” proteineket (13. ábra). A BSHRV *gag* protein 57 aa-val rövidebb, mint a MMTV *gag* proteinje, és csak 56% aa hasonlóságot mutat az MMTV megfelelő *gag* proteinjéhez (GenBank: AF228552). A *pro* tartalmazza a dezoxiuridin 5'-trifoszfát nukleotidhidroláz (dUTPáz, trimeric dUTP diszfoszfátáz) domént. Mivel a *gag-pro/pol* gén transzlációja riboszómális keretsúzással („frameshifting”) történik, a proteinek pontos N- és C-terminális végeit nehéz megnevezni. A *pro/pol* szakasz a retropepszint (aszpartát proteázt), az alapvető retrovírus enzimeket, így a reverz transzkriptázt (RT), az RNáz H-t és az integráz enzimeket kódolja. A *pol* gén a 3,370 nt-től a 6,036 nt-ig helyezkedik el a genomban. Az erősen konzervált YMDD aminosav motívum szekvenciája (tirozin (Y), metionin (M), aszparaginsav (D) és aszparaginsav (D)) a virális RT katalitikus C doménjében található (Tipples, 1996). A BSHRV *pro/pol* poliproteinek (~1,099aa) csak 63%-ban hasonlók a MMTV megfelelő fehérjéjével (GenBank: AF228551). Az *env* gén a felszíni és a transzmembrán glikoproteineket kódolja, beleértve a vírusburok glikoproteinjét is és az 5867 nt és az 7885 nt (672 aa) közötti pozíciókban helyezkedik el. A BSHRV *env* polyprotein csak 50%-os aa hasonlóságot mutat a MMTV megfelelő proteinjével (GenBank: AF228552). Az *env* géntől 3' irányban nem találtunk leolvasási keretet, amelyet start kodon előz meg, ami arra utal, hogy a BSHRV nem kódolja az MMTV-szerű szuperantigént (*sag*) a 3'LTR-ben.

A BSHRV LTR terminális régióinak nukleotid sorrendjének meghatározásakor feltehetően a gazdaszervezet genomjába is beleszekvenáltunk, de a provirális BSHRV lehetséges integrációs helyét (vagy helyeit) a gazdaszervezetben nem lehetett meghatározni, mivel a szíriai hörcsög (*Mesocricetus auratus*) teljes gazdagenom-szekvenciája ez idáig ismeretlen.

Filogenetikai analízis

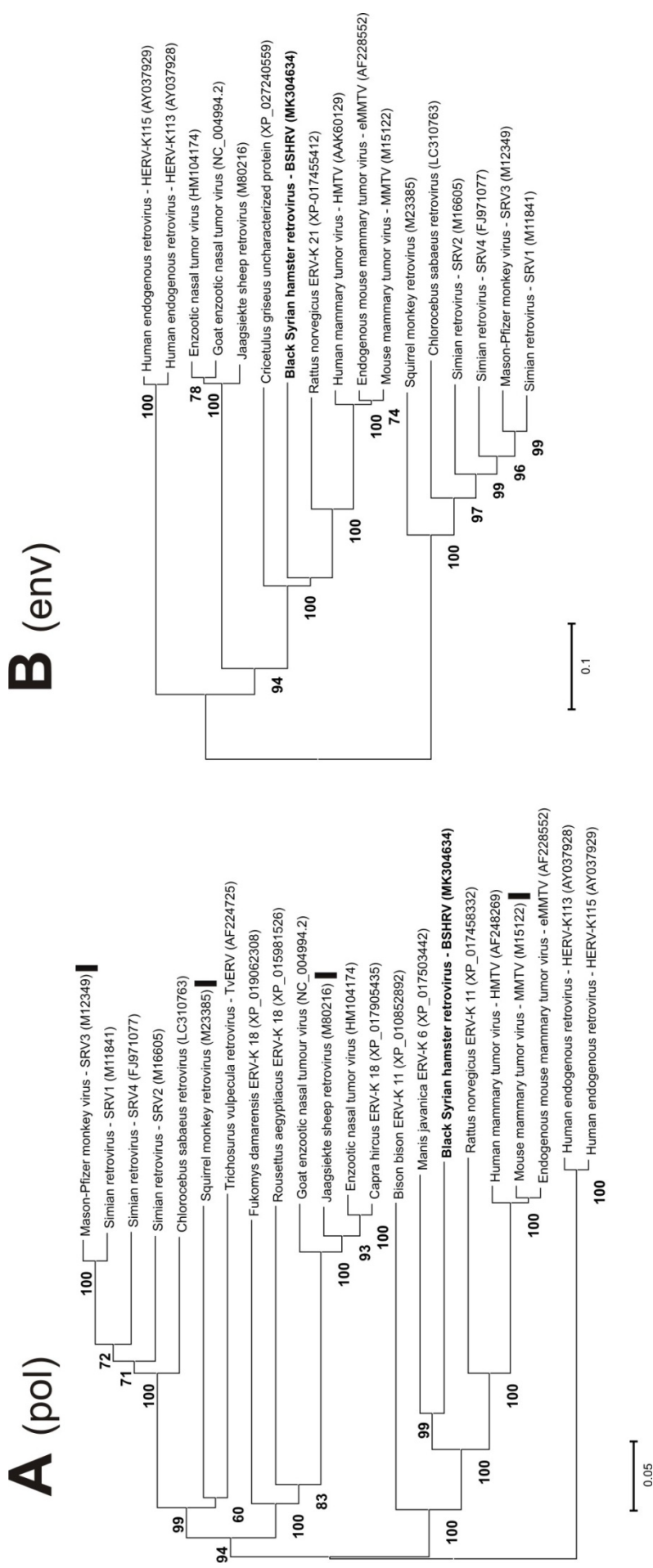
A BSHRV *pol* és *env* fehérjéken alapuló filogenetikai elemzéseket a MEGA6 program neighbor-joining módszerével és a bétaretrovírusok referencia szekvenciáinak felhasználásával végeztük el (14. ábra). Filogenetikai szempontból a BSHRV a MMTV bétaretrovírussal egy ágon helyezkedik el, a MMTV bétaretrovírushoz áll legközelebb, ugyanakkor a BSHRV új bétaretrovírus fajt képviselhet, más ismert bétaretrovírus fajok rokonsági kapcsolataival összehasonlítva (14. ábra).

Szövetteni lelet

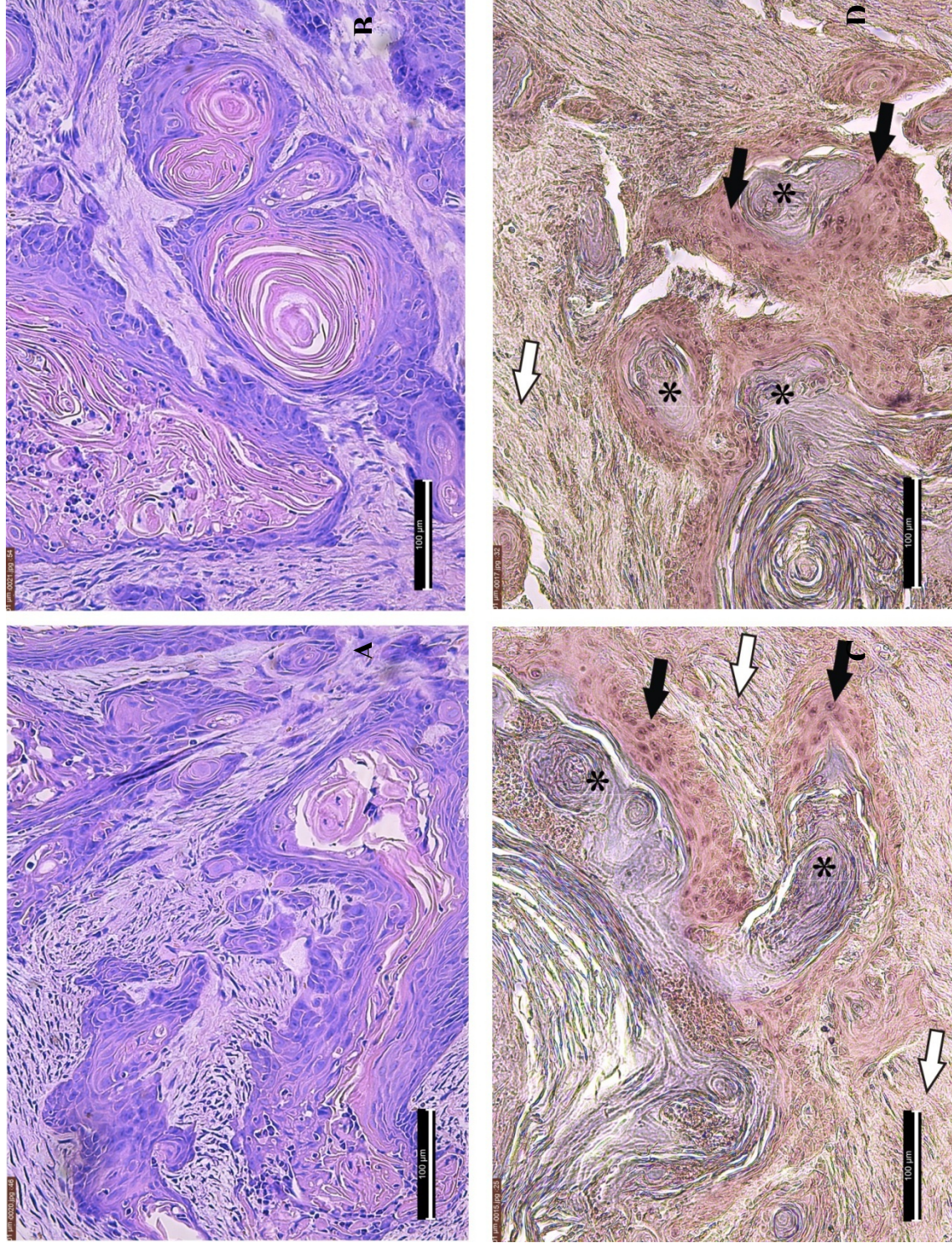
A primer és a metasztatikus daganat hematoxin-eozinnal festett szövettani metszete jól differenciált laphámsejtes karcinómát mutatott. A szövettani metszeteken a fibroblasztikus neostróma lánghelyszerű infiltrációja figyelhető meg, centrálisan keratinizált tumorsejt fészkekkel (15A és 15B ábra).

***In situ* hibridizáció**

A BSHRV-specifikus hibridizáció elsősorban a laphám proliferáló daganatsejtjeire korlátozódott, amelyek számos koncentrikus keratin csomót képeztek (15. ábra). A hibridizációkat a tumorsejtek magjában lehetett megfigyelni, mind szekvenciális, mind antiszensz próbával hibridizált metszetekben (15C és 15D ábra). Ezenkívül a hibridizációs szignálok lokalizációja lényegében azonos volt a szensz és az antiszensz próbákkal jelölt metszetekben (15C és 15D ábra). Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a próbák a BSHRV integrált provirális DNS-ét mutatták ki, nem pedig a virális RNS-t.



14. ábra: A BSHRV (A) *pol* és (B) *env* proteinjei alapján készült filogenetikai elemzés, MEGA6 program és neighbor-joining módszer segítségével. A függőleges fekete vonalak az (A) ábrán az ismert és nevezéktanilag besorolt béta-retrovírus fajok tagjait jelölik.

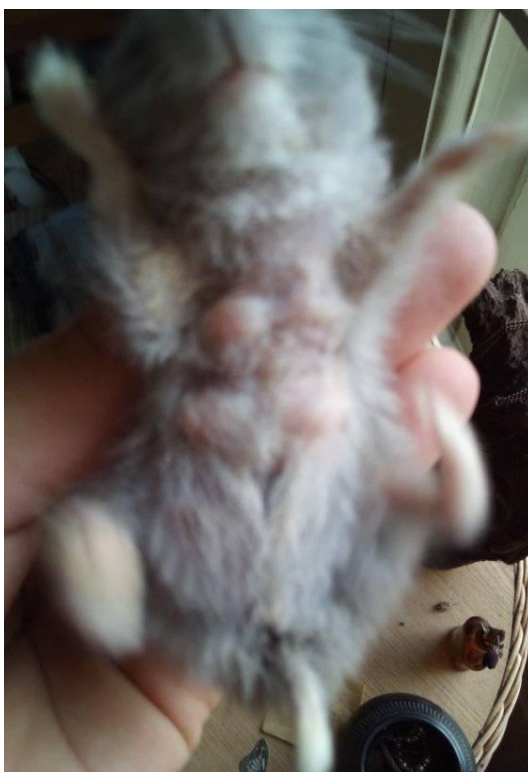


15. ábra: Fekete szíriai hörcsög (*Mesocricetus auratus*) laphámsejtes karcinóma (A, B) hematoxinin-eozinnal festve, valamint (C) kromogén ISH-val festett, szensz, illetve (D) antiszensz próbákkal. A fekete nyílak a koncentrikus keratincsomókat (csillagok) körülvevő BSHRV-positív festett tumorsejteket mutatják. A fehér nyílak a BSHRV-negatív, potenciálisan tumormentes sejteket jelzik.

A BSHRV keresése további hörcsögök bevonásával

A BSHRV szekvencia hörcsögökben való elterjedtségének vizsgálatára további háziállatként tartott egyedektől vettünk mintát non-invazív módon. A mintavétel időpontjában klinikailag egészséges, 12-21 hónapos fekete szíriai hörcsögtől (n=2 nőstény és n=1 hím) egy-egy friss bélsármintát gyűjtöttünk. A három állattól összegyűjtött székletminták egyikének DNS extraktumából a BSHRV bétaretrovírus szekvencia nested-PCR és szekvenálás módszereivel kimutatható volt. A felsokszorozott 538nt hosszú *gag* génszekvencia 99,4%-os nukleotid hasonlóságot mutatott a BSHRV/2013/HUN megfelelő régiójával.

A BSHRV-pozitív bélsárral rendelkező nőstény állatot nyomon követtük. Az állatnál 1,5 éves korában először a hasán, majd a mellkasán tumoros bőrelváltozások (szövettanilag igazolt, többszörös fibrómák) jelentek meg (16. ábra). A hörcsög természetes pusztulását (2018. november 22.) követően a *post mortem* fibróma, tüdő és máj szövetmintákból a BSHRV genomszekvencia ugyancsak kimutatható volt PCR és szekvenálás módszereivel.



16. ábra: A 1,5 éves nőstény szíriai hörcsög hasán és a mellkasán látható tumoros bőrelváltozások.

A BSHRV bétaretrovírus genom kópiaszámának meghatározása qPCR-módszerrel

A qPCR-vizsgálat eredményei alapján a laphámsejtes bőrdaganatos fekete szíriai hörcsög (1. állat) tumor, máj és tüdő mintái hasonló mennyiségű (integrált) vírus kópiát tartalmaztak ($\sim 1,18 \times 10^4$ /ng DNS, 11. táblázat), míg a farok mintában majdnem kétszer akkora volt a vírusgenom kópiaszáma ($2,03 \times 10^4$ /ng DNS, 11. táblázat). Érdekes módon a vírusgenom kópiaszáma a 2. nőstény állat szövetmintáiban egy nagyságrenddel magasabb ($1,11 \times 10^5$ /ng és $1,76 \times 10^5$ /ng DNS között) volt, mint a laphámsejtes bőrdaganattal rendelkező állatnál (1. állat) (11. táblázat).

Vizsgált állat	Minta típusa	Átlagos Ct	SD	Átlagos kópiaszám / ng DNS
Hörcsög 1 (laphámsejtes bőrdaganatos)	bőrtumor	20,38	0,078	$1,18 \times 10^4$
	máj	20,43	0,349	$1,17 \times 10^4$
	tüdő	20,37	0,064	$1,20 \times 10^4$
	farok	19,59	0,039	$2,03 \times 10^4$
Hörcsög 2 (fibrómás)	fibróma	16,40	0,057	$1,76 \times 10^5$
	máj	17,71	0,052	$1,11 \times 10^5$
	tüdő	16,45	0,026	$1,70 \times 10^5$

11. táblázat. A BSHRV bétaretrovírus genom abszolút kópiaszámait két szíriai hörcsög különböző szöveti mintáiban SYBR-Green alapú qPCR alkalmazásával. Ct: ciklus küszöbérték (Cycle threshold), SD: szórás, ng: nanogramm.

Az onkogén vírusok a daganatos megbetegedések egyik kóroki tényezőiként szerepelhetnek. Becslések alapján az emberi daganatos megbetegedések 15–20%-át mikroorganizmusok, ezen belül vírusok okozzák. A jelenleg ismert onkogén vírusok között DNS (EBV, HPV, HBV, HHV-8 és MCV) és RNS (HCV és HTLV-1) genomú vírusok egyaránt vannak. Feltehetően az ismert emberi onkogén tumor vírusok sora még nem teljes. Jelenleg is számos kutatás foglalkozik már ismert, potenciálisan daganatkeltő vírusok, illetve eddig még ismeretlen daganatkeltő vírusok vizsgálatával és leírásával, emberi és állati eredetű tumoros megbetegedésekben (Plummer et al., 2016). Jelentősen nehezíti a virális fertőzés és az adott daganat közötti ok-okozat összefüggés bizonyítását, hogy sok esetben hosszabb idő is eltelhet az események között, a daganatkeltő hatás az események előrehaladtával többfaktorossá válhat, még ha a daganatos folyamatok megindításában az adott feltételezett vírusnak szerepe is lehetett. Külön színesíti, izgalmasság teszi, egyben meg is nehezíti a helyzet tisztán látását, hogy az adott virális genom sok esetben exogén vírusként és endogén, a gazdasejt genetikai állományába integrálódott genomszekvenciaként is jelen lehet, illetve funkcionálhat.

Munkánkban egy emberi és egy állati daganatos bőrbetegség virális etiológiai hátterét kerestük különböző, korszerű szekvenciafüggetlen és szekvenciafüggő molekuláris biológiai módszerek segítségével. Az emberi Merkel-sejtes karcinóma esetében egy frissen leírt daganatkeltő vírus, az MC polyomavírus klinikó-patológiai szerepét vizsgáltuk bőrdaganatos humán beteganyagunkban; a szíriai hörcsög ismeretlen eredetű bőrdaganata esetében pedig a szekvenciafüggetlen virális metagenomika eszközével igyekeztünk - a lehetőségekhez képest – az esetleges virális eredetű etiológiát feltárni.

Merkel-sejtes polyomavírus és Merkel-sejtes karcinóma

A Merkel-sejtes karcinóma ötven éve ismert, ritka emberi daganatos megbetegedés (Toker, 1972). Ebben az esetben is a megszorított, szerzett immunszuppresszív állapotok vezettek előbb a kórkép számának megnövekedéséhez, majd ezt észlelve, a kórkép fertőző eredetének bizonyításához (Feng et al., 2008).

A Merkel-sejtes karcinóma szövettani diagnózisát követően, tumoros szövetből vett mintáiból MC polyomavírust tudtunk kimutatni molekuláris módszerekkel és egy

esetben meghatároztuk a daganatkezelésben kulcsszereppel bíró csonkoló pontmutáció helyét is.

Eseteinket tanulmányozva megállapítottuk, hogy klinikailag egyik esetünkben sem merült fel az MCC gyanúja a kórszövettani vizsgálatot megelőzően, azaz az elváltozás a klinikai gyakorlatban differenciáldiagnosztikai problémát okoz. Téves vagy nem teljes iránydiagnózisként leggyakrabban pyogén granulóma, bazalióma, laphámrák és keratoakantóma szerepeltek. Ezen elváltozások közül azonban több olyan is megtalálható, amelyek nem igényelnek sürgős, széles sebészi kimetszést, szemben a gyorsan progrediáló Merkel-sejtes karcinómával. E daganat esetében különösen fontos a korai felismerés és az adekvát kezelés, hiszen amennyiben a primer tumor kisebb, mint 2 cm a várható 5 éves túlélés 60-79%, amennyiben nagyobb, mint 2 cm 50-60%, azon betegeknél, akiknél kimutathatók nyirokcsomóáttétek 42-52%, addig az első távoli áttét megjelenésekor (IV. stádium) ez csak 17-18% (Lemos, 2010; Sridharan et al., 2016; Frohm et al., 2016; Becker et al., 2017a; Fondain et al., 2018; Vandeven et al., 2018).

Munkánk egyik legfontosabb célkitűzésének éppen azt tartjuk, hogy az MCC kórképpel kapcsolatos új ismeretek, eredmények és terápiás lehetőségek a hazai klinikai gyakorlatba mielőbb átkerüljenek. Úgy a kockázati tényezők ismerete és lehetőség szerinti csökkentése, mind az elváltozás korai felismerési és kezelési bizonytalanságainak csökkentése hozzájárul – véleményünk szerint már most is – az érintett betegek túlélésének növekedéséhez. Különösen tanulságosnak tartjuk a fiatal, 55 éves férfi betegünk történetét. Hiszen egy alapvetően nem halálos alapbetegség (pszoriázis) minden bizonnyal orvosi (PUVA) kezelése (az MCC rizikót közel 100X-ára növeli!) vezethetett az MCC kialakulásához, majd a beteg (korai) halálához. Ez felhívja a figyelmet, egyrészt arra, hogy pszoriázisos betegeknél amennyiben lehetőség van rá éljünk a számos új, modern szisztémás terápiás lehetőségek egyikével, másrészt hogy ezt az erős rizikófaktort ismerni (és lehetőség szerint kerülni) kell, valamint az ezzel a módszerrel kezelt betegeket követni szükséges és gyanús bőrelváltozás esetén mielőbb be kell avatkozni. Ez azt is jelenti, hogy más daganatos megbetegedéshez hasonlóan, az MCC esetén is fontos az egyes társszakmák közötti együttműködés („team munka”). Az észlelő orvoson kívül, elsődlegesen a bőrgyógyász, a patológus, az onkológus, a sugárterapeuta, a radiológus, a sebész és adott esetben a mikrobiológus tudására és összehangolt munkájára is szükség van.

A Nemzeti Rákregiszter adatai alapján 2015-ben 24, 2016-ban 33, 2017-ben 30, 2018-ban 33, 2019-ben pedig 25 MCC eset került bejelentésre a hazai adatbázisba (Dr. Kenessey István személyes közlés), amelyek feltehetően nem fedik a valós

esetszámokat (Varga et al., 2009). Bár vizsgálatunk kis mintaszámú és eredményei retrospektív adatokra és archivált szövettani mintákra támaszkodnak, de mégis levonhatók fontos következtetések. Az epidemiológiai jellegzetességek közül ki kell emelni, hogy az átlagéletkor a nemzetközi irodalmi adatoknak megfelelő (70 év) volt a betegeinknél (73,8 év) (Becker et al., 2017a). A nemi arány az általunk vizsgált betegek körében enyhe férfi dominanciát mutatott (66%) az irodalomban olvashatókhoz hasonlóan (59%). A daganat lokalizációját tekintve nem találtunk különbséget a vírussal társuló és nem társuló esetek között. Egy, a legfiatalabb beteg kivételével (12,5%) (akinél a természetes fénytől rendszerint védett bőrterületen, a lábszárán jelentkezett a primer daganat) mindegyik esetben a tumor a fej-nyaki régiókban (arc, homlok, orrszárny, nyak), napsugárzásnak erősen kitett bőrfelületeken helyezkedett el, szintén az irodalmi adatokhoz hasonlóan. Mindegyik betegnél találtunk az MCC-re hajlamosító tényezőket, mint az immunszuppresszió (például: tartós orális szteroid kezelés, krónikus limfoid leukémia) és/vagy az idős kor. Három betegünk anamnézisében is szerepelt a krónikus obstruktív tüdőbetegség. Az újonnan feltárt adatok arra utalnak, hogy a COPD patogenezisében döntő szerepet játszik az immunrendszer diszfunkciója, köztük a regulátoros T sejtek, effektor T sejtek, valamint mieloid eredetű szupresszor sejtek funkcionális zavara. Ezen sejtek által közvetített immunválaszok létfontosságúak nem csak a szervezet fertőzésekkel szembeni védelmében, hanem kulcsszerepet játszhatnak a tumor-immunitásban is (Bhat et al., 2015, Wilkinson et al., 2017). A metasztázisok leggyakoribb helyei az eseteinknél is a bőr és a nyirokcsomó voltak, azonban az irodalmi adatoktól eltérő gyakoriságban talákoztunk a nyirokcsomóáttétellel. Nyolcból hat (75%) esetben volt ez megfigyelhető. Ez részben azzal magyarázható, hogy a daganatok későn kerültek felismerésre, illetve a kezelések sem voltak kellően adekvátak.

Vizsgálataink eredményei közvetlenül hasznosíthatók a laboratóriumi diagnosztika területei mellett a klinikai betegellátásban is. Véleményünk szerint egy beteg(ség)csoport jól definiált elkülönítése az első lépés egy kórkép valódi megismeréséhez és ez vezethet el a korai felismeréshez, a hatékony kezeléséhez, megelőzéséhez. Az MCC diagnosztikája szövettani vizsgálaton alapul, az MC vírus kimutatása azonban még nem képezi a rutin diagnosztika részét. Tapasztalataink alapján, már a szövettani vizsgálattal gyanítani lehet, hogy a mintában jelen van-e az MC polyomavírus. A vírus negatív daganatok szövettani képén sokkal irregulárisabb, változatos, polygonális magvú daganatsejteket láthatunk, helyenként világos, kevésbé egységes citoplazmával. Az MC polyomavírus pozitív daganatok típusos morfológiát mutató kerek vagy ovális alakú, vezikuláris magokkal és egységesebb citoplazmával

rendelkező sejtekből állnak. Vizsgálataink támogatják azt az elképzelést is, miszerint az MC polyomavírus jelenléte a szövettanilag Merkel-sejtes karcinómák (egységesebb szövettani mintázat, limfovaszkuláris invázió hiánya) körében jobb prognózissal társul (Sihto et al., 2009; Waltari et al., 2011; Nardi et al., 2012; Higaki-Mori 2012). A halálozás az MCV pozitív és MCV negatív csoportunkban 33%, illetve 80% volt. Egyre biztosabban kijelenthető a külföldi és hazai tapasztalataink alapján, hogy a vírussal nem társuló esetek önálló kliniko-patológiai entitások lehetnek, amelyek klinikai megjelenésükben hasonlóak, de szövettani képükben és lefolyásukban elkülöníthetők a vírust hordozó változatoktól. Ez a jövőben meghatározó jelentőséggel bírhat, amennyiben célzott terápiás eszközök állnak a rendelkezésre. Az MC polyomavírus negatív esetekben gyakran találkozhatunk más bőrdaganatokkal is, melyek patogenezisének megértésében segíthet az a kutatási eredmény, miszerint a Merkel-sejtek epidermális (és nem crista neuralis) eredetűek, azaz elvben az epidermális premalignus progenitor sejtek hám vagy neuroendokrin irányba is fejlődhetnek (Van Keymeulen et al., 2009; Woo et al., 2010). Tehát ezen esetekben a daganat feltehetően éretlen sejtekből indulhat ki, ami már önmagában magyarázatul szolgálhat az MC polyomavírus negatív esetekben megfigyelhető kedvezőtlenebb prognózisra. Ugyan az MC polyomavírus jelenléte és a genomjának integrációja az MCC sejtek kromoszómájában igazolni látszik szerepét a daganat kialakulásában, ennek pontos patomechanizmusa még sok kérdést vet fel és további vizsgálatokat igényel.

Az MC polyomavírus genom közvetlen molekuláris kimutatására PCR módszer segítségével kerülhet sor a biopsziás mintavétel vagy a sebészi kimetszést követően. Amennyiben lehetőség van rá, célszerű natív mintát vizsgálni, mert így a virális nukleinsav kimutatásának sokkal nagyobb az esélye (Martel-Jantin et al., 2012). A paraffinba ágyazott mintákból készült PCR-vizsgálatok esetén a kimutatás esélye – a nukleinsav károsodások miatt – a nemzetközi adatok szerint mindenképpen kisebb, ezen belül nagymértékben függ a kimetszés és a fixálás közt eltelt idő hosszúságától, a fixálás minőségétől, a deparaffinálás technikájától és attól is, hogy a minta, mely részéből történik a kimetszés. Figyelmet érdemel az is, hogy önmagában az MC polyomavírus nukleinsav kimutatása nem jelent egyet a karcinóma diagnózisával. A jelen ismeretek szerint csak a gazdasejt genomjába integrálódott, majd mutációt szenvedett virális eredetű nukleinsav tehető felelőssé a daganatos elfajulásért. Ez hasonló, mint amit az MC polyomavírus legközelebbi rokon vírusainál, a humán papillomavírusoknál már jól ismerünk. A vírus „ártatlanul” jelen lehet (azaz

kimutatható) pl. a méhnyakon, de csak a megfertőzött gazdasejt genomjába integrálódott papillomavírus tehető felelőssé a méhnyakrákért (Crosbie et al., 2013).

Az MC polyomavírus kimutatására más – ritkábban alkalmazott - módszerekkel is lehetőség van, így például immunhisztokémiával, az MCV st fehérjére ellen termelt poliklonális antitest (st-1) vagy az LT fehérjére kifejlesztett (CM2B4) monoklonális antitest alkalmazásával, valamint *in situ* hibridizáció segítségével is (Matsushita et al., 2014). Ezek közül a módszerek közül a leginkább alkalmazott az MCV kimutatására a CM2B4 antitest alkalmazó immunhisztokémia (Iwasaki et al., 2013), azonban e módszer érzékenysége és specificitása jóval elmarad a PCR-étől (Kuwamoto et al. 2013). Egyes kutatók CM2B4-pszudonegatív vagy pszudopozitív MCC esetekről is beszámoltak, azaz immun negatívak voltak CM2B4-re annak ellenére, hogy az MCV DNS kimutatható volt PCR technikával (Busam et al., 2009, Shuda et al., 2009, Iwasaki et al., 2013), illetve immunpozitívak voltak CM2B4-re annak ellenére, hogy az MCV DNS-t nem volt kimutatható PCR módszerrel (Kuwamoto et al., 2013). Az egyelőre csak kísérletes stádiumban lévő st fehérje ellen kifejlesztett poliklonális antitest (st-1) szenzitivitása és specificitása is jobbnak tűnik a CM2B4 antitestnél, de ennek eldöntésére még további vizsgálatok szükségesek (Leitz et al., 2014; Matsushita et al., 2014). Az *in situ* hibridizáció érzékenysége és specificitása összemérhető a PCR módszerével. Alkalmazása különösen akkor javasolt, ha nem áll rendelkezésünkre natív tumor minta, csak formalin fixált. Amennyiben a jövőben terápiás konzekvenciája is lesz az MCV jelenlétének vagy hiányának az MCC-ben, akkor javasolt a két módszer együttes alkalmazása a diagnosztikai hibák csökkentése érdekében (Matsushita et al., 2014). Jelen tudásunk szerint a PD-1/PD-L1 terápiás útvonalon ható gyógyszerekre adott terápiás válasz az MCV pozitív és negatív esetekben megegyező (Becker et al., 2018b; Uchi, 2018; Harms et al., 2018).

Az eddig megismert, különböző földrajzi térségekből izolált MC polyomavírusok genomjaiban egymáshoz képest csak igen kevés nukleotid eltérés található. Betegünkből meghatározott MC polyomavírus is átlagosan csak minden 540. nukleotidja különbözik a prototípus vírustól (benne a csonkoló pontmutációval). Feltehetően e kettőszálú DNS genomú vírusok evolúciós mutációs rátája – a teljes genomra vonatkoztatva – alacsony lehet. Ez azt is jelentheti, hogy a molekuláris diagnosztikai kimutatásuknál a genom változatosságból következő nehézségekkel kevésbé kell számolni, mint a nagy mutációs rátával jellemezhető RNS vírusoknál. Bízunk benne, hogy a jövőben, a kidolgozott, megfelelő érzékenységű, differenciáló (akár mennyiségi és mutáció mérésen alapuló) molekuláris biológiai technikák, mind a

vírus kimutatása, mind pedig a biomarkerként szolgáló nagy T-antigén elleni antitest kimutatása esetén fontos diagnosztikai és prognosztikai jelentőséggel bírhatnak majd.

Az MC polyomavírus az első igazolt emberi daganatkeltő polyomavírus, melyet mai tudásunk szerint a Merkel-sejtes karcinóma kórokaaként tekintünk. Az agresszív karcinóma fertőző kóreredete szemléletváltást eredményez a patogenezis, a diagnosztika és reményeink szerint a jövőben a kezelés és a megelőzés területén is. Az MCC patomechanizmusának részletes feltárása elvezethet specifikus kezelési módszerek megalkotásához. A virális eredetből értelemszerűen az is következik, hogy ez a súlyos kimenetelű daganatos betegség – a hepatitis B vírus és a papillomavírus okozta daganatokhoz hasonlóan - a jövőben talán vakcinával megelőzhető vagy célzottan kezelhető lehet.

Black Syrian hamster retrovírus (BSHRV) és hörcsög bőrtumor

Szövetteni elemzés, virális metagenomikai/új generációs szekvenálás, *in situ* hibridizáció, PCR és RT-PCR módszerek felhasználásával egy fekete szíriai hörcsög (*Mesocricetus auratus*) bőrtumor mintáját vizsgáltuk a lehetséges virális etiológiai háttér felderítése érdekében. A fekete szíriai hörcsög ismeretlen eredetű bőrdaganata differenciált laphámsejtes bőrkarcinómának bizonyult szövetteni vizsgálatokkal. A virális metagenomikai/új generációs szekvenálás módszereivel vizsgálva a szövetmintából legnagyobb számban retrovirális szekvencia leolvasások keletkeztek. A retrovirális szekvencia leolvasások alapján, különböző molekuláris módszerek (pl. primer walking, TAIL PCR) használatával meghatározható volt a teljes retrovirális genom, amelyet long-range PCR-módszerrel ellenőriztünk és szekvenálást követően elemeztünk. A teljes retrovírus szekvencia, amelyet Black Syrian hamster retrovírusnak (BSHRV) nevezünk el, tipikus bétaretrovirális genomhosszal és genomszerkezettel (5'LTR-gag-pro-pol-env-3'LTR) jellemezhető. Mivel a BSHRV genom az eddig ismert összes alapvető retrovírus genom elemet és fehérjét kódolja (Hayward et al., 2013), ezért a genomja alapján teljes bétaretrovírusnak tekinthetjük. A prototípus MMTV bétaretrovírussal ellentétben azonban a *sag* (szuperantigén) gén (Ross, 2010) az 3'LTR-ben nem található meg. Hasonlóan a kódoló régiókhöz, a nem kódoló 5' és 3'LTR régiók is a bétaretrovírusok LTR régiójára jellemző hosszúsággal és motívumokkal jellemezhetőek. A BSHRV teljes és gyakorlatilag épnek tűnő LTR/kódoló genomrégiói a vírus replikációjának és potenciálisan életképes retrovírusok előállításának egyik előfeltétele.

A szekvencia- és filogenetikai elemzések azt mutatták, hogy a különböző BSHRV fehérjék csak 50-63%-ban hasonlítanak más, eddig ismert bétaretrovírusok adott fehérjéihez. Így a BSHRV távoli rokonságban áll az ismert bétaretrovírusokkal, de feltehetően egy új bétaretrovírus fajt képviselhet (https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/reverse-transcribing-dna-and-rna-viruses-2011/w/rt_viruses/161/retroviridae). A legközelebbi hasonlóságot a bétaretrovírusok között, az egér emlőtumor vírushoz (MMTV) találtunk. Ez azért tartható érdekesnek és fontosnak, mert az MMTV egerekben az onkogén bétaretrovírusok fontos prototípusát képviseli, és amelyet összefüggésbe hoztak az emberi emlőrakkal is (Ford et al., 2003). Egy új MMTV-szerű bétaretrovírus teljes szekvenciájának meghatározása, egy új emlős gazdafajban növeli az ismereteket a bétaretrovírusok genomdiverzitásáról, a lehetséges gazdafaj spektrumról, illetve a fertőzés lehetséges forrásáról is. Az új bétaretrovírus nukleotid szekvencia variáns ismeretében érdemes lenne az „MMTV” PCR-szűrővizsgálatokban alkalmazott primereket és próbákat újratervezni, és ezeket kipróbálni mind emberi, mind pedig a különböző állati prevalencia vizsgálatokban. Ez újabb adatokkal és eredményekkel szolgálna az MMTV-szerű vírusok és az emberi emlőtumorokkal kapcsolatos kérdéskörben.

A BSHRV bétaretrovírus DNS-szekvenciája kimutatható volt PCR és szekvenálás módszereivel a tumorszövet DNS-kivonataiból, valamint az ugyanazon fekete szíriai hörcsög összegyűjtött máj-, tüdő- és farok szövetmintáiból. Érdekes módon, a virális RNS csak a nested-PCR vizsgálat második PCR-körében volt kimutatható a daganat DNáz-zal kezelt RNS-mintájában, a tumor nélküli szervek többi RNS-mintájában azonban nem, amely alacsony szintű virális RNS-expresszióra utal a daganatos szövetben. A teljes virális genom, így a virális LTR genom végek meghatározásánál feltehetőleg a gazdasejt genom elemeit is meghatároztuk. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a BSHRV retrovirális szekvencia integrált formában van jelen a vizsgált szövetek gazdasejteinek genomjában, mint endogén retrovirális szekvencia, azaz provírus. Ezt támasztja alá az *in situ* hibridizációs módszer eredménye is, ahol a specifikus retrovirális célmolekulát csak az érintett sejtek sejtmagjában lehetett azonosítani. Az integráció helyét, illetve az esetleges többszörös genom integráció lehetőségét, a másolatok számát, e munka keretében nem vizsgáltuk.

A BSHRV bétaretrovírus jelenlétét és elterjedtségét három további hörcsög mintáinak bevonásával vizsgáltuk. A BSHRV retrovírus DNS-szekvenciáját sikerült kimutatni egy további hörcsög székletmintájában (valószínűleg a székletben lévő gazdasejtekből), majd ugyanennek az állatnak *post mortem* gyűjtött szövetmintáiból.

Érdekes módon ez az állat is daganatos elváltozásokat mutatott, ennek az állatnak a hasán és mellkasán alakultak ki többszörös fibrómák.

A BSHRV bétaretrovírus genom mennyiségi vizsgálati eredményei alapján a laphámsejtes bőrdaganatos és a nem tumoros szövetek között jelentős különbség nem volt kimutatható ugyanabban az állatban. Érdekes módon ugyanakkor a fibrómás állat különböző szövetmintáiban közel egy nagyságrenddel nagyobb virális kópiaszámokat kaptunk a laphámsejtes bőrdaganatos állat szövetmintáihoz képest. Az új, BSHRV bétaretrovirális szekvencia kimutatása, sejten belüli lokalizációja, a virális nukleinsav mennyiségi vizsgálata azonban önmagában még nem ad információt semmilyen kórképben, így daganatos megbetegedés patogenezisében betöltött szerepére sem. A BSHRV és a hörcsög bőrdaganata közötti ok-okozati kapcsolatot egyelőre még nem tisztáztak. Annak bizonyítására vagy kizárására, hogy a BSHRV, hasonlóan más onkogén retrovírusokhoz (Braoudaki et al., 2011), befolyásolja vagy hozzájárul az onkogén transzformációs folyamatok kialakulásához és így képes normál sejteket rosszindulatú sejtekké alakítani, további vizsgálatok szükségesek.

Vizsgálatainkig még nem számoltak be BSHRV vagy BSHRV-szerű bétaretrovírus-szekvenciák kimutatásáról hörcsögökben. A BSHRV azonosításával és teljes genomjának meghatározásával azonban számos további nyitott kérdés merül fel. A BSHRV potenciális exogén formáját (virion) és ha van, átvitelének módját/módjait nem határoztuk meg. További vizsgálatokra van szükség a BSHRV és a BSHRV-szerű bétaretrovírusok prevalenciájának, a gazdafajok sokféleségének, szerepének és biológiai jelentőségének meghatározásához hörcsögökben és ha vannak közvetlen virális rokanai, más emlősökben is.

A mikroorganizmusok szerepe és a fertőző betegségek jelentősége korántsem tekinthető lezárt kérdésnek. Szinte naponta szembesülünk a mikrobiális világ újabb és újabb, korábban nem ismert aspektusaival. A mikroorganizmusok és a daganatos megbetegedések kapcsolata ebből a szempontból mindig is bővelkedett az ellentmondásokban, az eredmények lassú elfogadásában vagy elfelejtésében, a dogmákban és a zsákutcákban is. Sokfaktoros, időben elnyúlt és összetett kórfolyamatok révén az ok-okozat bizonyítása nehéz. Vizsgálatainkban prekonceptiók nélkül igyekeztünk az ismereteket bővíteni egy frissen leírt emberi daganatot okozó vírussal kapcsolatban, illetve potenciálisan virális hátteret kerestünk egy hobbiállatként tartott hörcsög daganatos elváltozásából. A körülöttünk lévő világ tudományos igényű feltérképezése vezethet el minket a körülöttünk álló élővilág leírásához és megértéséhez.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet szeretnék mondani mindazoknak, akik a munkámat segítették és hozzájárultak ahhoz, hogy ez a dolgozat megszülethessen.

Legnagyobb hálával témavezetőmnek, Prof. Dr. Reuter Gábornak tartozom, aki szakmai tanácsain, ötletein túlmenően munkámhoz szükséges anyagi feltételeket is megteremtette. Köszönettel tartozom önzetlen segítségéért, töretlen támogatásáért, a szakmai elméleti és gyakorlati ismeretek átadásáért és a megelőlegezett, belém vetett bizalomért.

Szeretném megragadni az alkalmat, hogy kifejezzem köszönetemet a támogatásért, melyet munkám gyakorlati kivitelezésében Dr. Boros Ákostól és Dr. Pankovics Pétertől kaptam. Köszönettel tartozom a Baranya Megyei Kormányhivatal, Népegészségügyi Szakigazgatási Szerve, Regionális Virologiai Laboratórium, valamint a Pécsi Tudományegyetem (PTE), Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézetének valamennyi szakdolgozójának is.

Köszönettel tartozom Dr. Kálmán Endre patológus főorvos úrnak (PTE KK Pathologiai Intézet), aki mindkét témámat szakmai tanácsaival, észrevételeivel, ötleteivel segítette, és a boncolás és szövettani munkák elkészítésében nyújtott szakmai segítséget, valamint Horváth Eszternek, aki a Pathologiai Intézetben a háttérmunkák elvégzésében volt a segítségemre.

Köszönettel tartozom Dr. Kádár Zsolt főorvos úrnak és Prof. Dr. Battyányi Zita bőrgyógyász szakorvosoknak a betegminták, fényképek és a klinikai munkájuk tapasztalatainak megosztásáért.

Köszönet illeti Dr. Eric Delwart laboratóriumvezetőt (Vitalant Research Institute, San Francisco, USA), aki lehetőséget biztosított laboratóriumában a virális metagenomikai és az új generációs szekvenáláson alapuló vizsgálatok elvégzésére.

Végezetül pedig köszönöm szüleimnek, Szlukovinyi Ildikónak és Horváth Gyulának a támogatást, férjemnek Dr. Szógyi Donátnak a szerető gondoskodást, a sok támogatást és biztatást és gyermekünknek, Szógyi Viktóriának a megértést és türelmet.

PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

1. **Horváth KB**, Pankovics P, Battyáni Zita, Kálmán E, Reuter G. Merkel-sejtes polyomavírus, mint a Merkel-sejtes carcinoma valószínű kóroka.
Orvosi Hetilap 2013;154(3):102-112. doi: 10.1556/OH.2013.29525
(Impakt faktor: **0**)
2. **Horváth KB**, Pankovics P, Kálmán E, Kádár Z, Battyáni Z, Lengyel Z, Reuter G. Epidemiological, Clinicopathological and Virological Features of Merkel Cell Carcinomas in Medical Center of University of Pecs, Hungary (2007-2012).
Pathology and Oncology Research, 2016;22(1):71-77. doi: 10.1007/s12253-015-9974-z.
(Impakt faktor: **1,736**)
3. **Horváth KB**, Boros Á., Kálmán E, Pankovics P, Delwar E, Reuter G. Characterization of an integrated, endogenous mouse mammary tumor virus-like (MMTV) betaretrovirus genome in a black Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*).
Infection, Genetics and Evolution, 2019;75:103995. doi: 10.1016/j.meegid.2019.103995.
(Impakt faktor: **2,773**)

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ ABSZTRAKTOK, ELŐADÁSOK ÉS POSZTEREK

1. **Horváth KB**. A Merkel-sejtes polyomavírus, mint a Merkel-sejtes karcinóma valószínű kóroka – kliniko-patológiai és virológiai vizsgálataink tapasztalatai. Tudományos Diákköri Konferencia (TDK), Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, 2013. február 7-8, Pécs (bőrgyógyászat szekció: I. helyezés)
2. **Horváth KB**. A Merkel-sejtes polyomavírus, mint a Merkel-sejtes karcinóma valószínű kóroka – kliniko-patológiai és virológiai vizsgálataink tapasztalatai.

- XXXI. Országos Tudományos Diákköri Konferencia (OTDK), Szegedi Tudományegyetem, 2013. április 2-5, Szeged (mikrobiológia szekció: I. helyezés)
3. **Horváth KB.** A Merkel-sejtes polyomavírus, mint a Merkel-sejtes karcinóma valószínű kóroka – kliniko-patológiai és virológiai vizsgálataink tapasztalatai. V. Nemzetközi és XI. Országos Interdiszciplináris Grastyán Konferencia, 2013. április 17-19, Pécs (a legközérhetőbb előadás díja).
 4. **Horváth KB,** Pankovics P, Kálmán E, Reuter G. A Merkel-sejtes polyomavírus, mint a Merkel-sejtes karcinóma valószínű kóroka – kliniko-patológiai és virológiai vizsgálataink tapasztalatai. Magyar Infektológiai és Klinikai Mikrobiológiai Társaság, Fiatal Infektológusok Fóruma, 2013. június 6, Budapest (I. helyezés).
 5. **Horváth KB,** Pankovics P, Kálmán E, Reuter G. A Merkel-sejtes polyomavírus, mint a Merkel-sejtes karcinóma valószínű kóroka – kliniko-patológiai és virológiai vizsgálataink tapasztalatai, Amerikai Magyar Orvosszövetség (HMAA) Konferenciája, 2013. augusztus 17, Balatonfüred. (poszter)
 6. **Horváth KB,** Pankovics P, Kálmán E, Reuter G. A Merkel-sejtes polyomavírus, mint a Merkel-sejtes karcinóma valószínű kóroka – kliniko-patológiai és virológiai vizsgálataink tapasztalatai. Magyar Onkológusok Társasága XXX. Kongresszus, 2013. november 14-16, Pécs.
 7. **Horváth KB** A Merkel-sejtes karcinóma, kliniko-patológiai és virológiai vizsgálatainak tapasztalatai. Doktoranduszok Országos Szövetsége, Tavasz Szél Konferencia, 2014. március 22.

EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

1. Pankovics P, Boros Á, Bíró H, **Horváth KB,** Phan TG, Delwart E, Reuter G. Novel picornavirus in domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus var. domestica*). **Infection, Genetics and Evolution;** 2016;37:117-22. 10.1016/j.meegid.2015.11.012. (Impakt faktor: **2,885**)

IRODALOMJEGYZÉK

Agelli M, Clegg LX. Epidemiology of primary Merkel cell carcinoma in the United States. *J Am Acad Dermatol*, 2003;49(5):832-841.

Al-Ahmadie HA, Mutasim DF, Mutema GK. A case of intraepidermal Merkel cell carcinoma within squamous cell carcinoma in-situ: Merkel cell carcinoma in-situ? *Am J Dermatopathol*, 2004;26(3):230-233.

Allander T, Andreasson K, Gupta S, Bjerkner A, Bogdanovic G, Persson MA, Dalianis T, Ramqvist T, Andersson B. Identification of a third human polyomavirus. *J Virol*, 2007;81(8):4130-4136.

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 1997;25(17):3389-3402.

Ambalathingal GR, Francis RS, Smyth MJ, Smith C, Khanna R. BK Polyomavirus: Clinical Aspects, Immune Regulation, and Emerging Therapies. *Clin Microbiol Rev*, 2017;30(2):503-528.

An P, Sáenz Robles MT, Pipas JM. Large T antigens of polyomaviruses: amazing molecular machines. *Annu Rev Microbiol.*, 2012;66:213-236.

Andea AA, Coit DG, Amin B, Busam KJ. Merkel cell carcinoma: histologic features and prognosis. *Cancer*, 2008;113(9):2549-58.

Asioli S, Righi A, Volante M, Eusebi V, Bussolati G. p63 expression as a new prognostic marker in Merkel cell carcinoma. *Cancer*, 2007;110(3):640-647.

Ascoli V, Minelli G, Kanieff M, Frova L, Conti S. Merkel cell carcinoma: a population-based study on mortality and the association with other cancers. *Cancer Causes Control*, 2011;22(11):1521-1527.

Axel R, Schlom J, Spiegelman S. Presence in human breast cancer of RNA homologous to mouse mammary tumour virus RNA. *Nature*, 1972;235(5332):32-36.

Babakir-Mina M, Ciccozzi M, Lo Presti A, Greco F, Perno CF, Ciotti M. Identification of Merkel cell polyomavirus in the lower respiratory tract of Italian patients. *J Med Virol*, 2010; 82(3):505-9.

Bachmann J, Kleeff J, Bergmann F, Shrikhande SV, Hartschuh W, Büchler MW, Friess H. Pancreatic metastasis of Merkel cell carcinoma and concomitant insulinoma: case report and literature review. *World J Surg Oncol*, 2005;3:58.

Bagasi AA, Khandaker T, Clark G, Akagha T, Ball JK, Irving WL, McClure CP. Trichodysplasia Spinulosa Polyomavirus in Respiratory Tract of Immunocompromised Child. *Emerg Infect Dis*, 2018;24(9):1744-1746.

Bagasra O. Protocols for the in situ PCR-amplification and detection of mRNA and DNA sequences, South Carolina Center for Biotechnology, Department of Biology, Claflin University, JST 215, 400 Magnolia Street, Orangeburg, South Carolina 29115, USA. 2007.

Baltimore D. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumor viruses. *Nature*, 1970;226(5252):1209-1211.

Bassin RH, Simons PJ, Chesterman FC, Harvey JJ. Murine sarcoma virus (Harvey): characteristics of focus formation in mouse embryo cell cultures and virus production by hamster tumor cells. *Int J Cancer*, 1968;3(2):265-272.

Becker JC, Houben R, Ugurel S, Trefzer U, Pföhler C, Schrama D. MC polyomavirus is frequently present in Merkel cell carcinoma of European patients. *J Invest Dermatol*, 2009;129(1):248-250.

Becker JC, Stang A, DeCaprio JA, Cerroni L, Lebbé C, Veness M, Nghiem P. Merkel cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers*, 2017;3:17077.

Becker JC, Lorenz E, Ugurel S, Eigentler TK, Kiecker F, Pföhler C, Kellner I, Meier F, Kähler K, Mohr P, Berking C, Haas G, Helwig C, Oksen D, Schadendorf D, Mahnke L, Bharmal M. Evaluation of real-world treatment outcomes in patients with distant metastatic Merkel cell carcinoma following second-line chemotherapy in Europe. *Oncotarget*, 2017;8(45):79731-79741.

Becker JC, Hassel JC, Menzer C, Kähler KC., Eigentler TK, Meier FE, Berking C, Gutzmer R, Mohr P, Kiecker F, Kaatz M, Windemuth-Kieselbach C, Lorenz-Schlüter C, Zimmer L, Ugurel S, Schadendorf D. German Dermatocology Group (DeCOG/ADO). Adjuvant ipilimumab compared with observation in completely resected Merkel cell carcinoma (ADMEC): A randomized, multicenter DeCOG/ADO study. *Journal of Clinical Oncology*, 2018;36(15):9527-9527.

Becker JC, Stang A, Hausen AZ, Fischer N, DeCaprio JA, Tothill RW, Lyngaa R, Hansen UK, Ritter C, Nghiem P, Bichakjian CK, Ugurel S, Schrama D. Epidemiology, biology and therapy of Merkel cell carcinoma: conclusions from the EU project IMMOMEK. *Cancer Immunol Immunother*, 2018;67(3):341- 351.

Beckervordersandforth J, Pujari S, Rennspiess D, Speel EJ, Winnepenninckx V, Diaz C, Weyers W, Haugg AM, Kurz AK, Zur Hausen A. Frequent detection of human polyomavirus 6 in keratoacanthomas. *Diagn Pathol*, 2016;11(1):58.

Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW. 2013. GenBank. *Nucleic Acids Res*. 41, D36–D42.

Bergallo M, Costa C, Terlizzi ME, Astegiano S, Curtioni A, Solidoro P, Delsedime L, Cavallo R. Quantitative detection of the new polyomaviruses KI, WU and Merkel cell virus in transbronchial biopsies from lung transplant recipients. *J Clin Pathol*, 2010;63(8):722-725.

Bhat TA, Panzica L, Kalathil SG, Thanavala Y. Immune Dysfunction in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Annals of the American Thoracic Society*, 2015;12(2):169–175.

- Bhatia S, Storer BE, Iyer JG, et al. Adjuvant radiation therapy and chemotherapy in Merkel cell carcinoma: Survival analyses of 6908 cases from the National Cancer Data Base. *J Natl Cancer Inst*, 2016;108(9):djw042.
- Bhatia S, Afanasiev O, Nghiem P. Immunobiology of Merkel cell carcinoma: implications for immunotherapy of a polyomavirus-associated cancer. *Curr Oncol Rep*, 2011;13(6):488-497.
- Bishop JM. Molecular themes in oncogenesis. *Cell*, 1991;64(2):235-248.
- Bishop AJ, Garden AS, Gunn GB, et al. Merkel cell carcinoma of the head and neck: Favorable outcomes with radiotherapy. *Head Neck*, 2015;38:E452– 458.
- Bittner JJ. Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice. *Science*, 1936;84(2172):162.
- Bohra C, Sokol L, Dalia S. Progressive Multifocal Leukoencephalopathy and Monoclonal Antibodies: A Review. *Cancer Control*, 2017;24(4):1073274817729901.
- Boros Á, Pankovics P, Knowles NJ, Reuter G. Natural interspecies recombinant bovine/porcine enterovirus in sheep. *J Gen Virol*, 2012;93(9):1941-1951.
- Bowman EH, Pathak VK, Hu WS. Efficient initiation and strand transfer of polypurine tract-primed plus-strand DNA prevent strand transfer of internally initiated plus-strand DNA. *J Virol*, 1996;70(3):1687-1694.
- Brewer JD, Shanafelt TD, Otley CC, Roenigk RK, Cerhan JR, Kay NE, Weaver AL, Call TG. Chronic lymphocytic leukemia is associated with decreased survival of patients with malignant melanoma and merkel cell carcinoma in a SEER population-based study. *J Clin Oncol*, 2012;30(8):843-849.
- Brown C, Donnelly TM. Disease problems of small rodents. *Clinical Medicine and Surgery*, 2012;354-372.
- Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S. A 'new' antigen in leukemia sera. *JAMA*, 1965;191:541-546.
- Boyer JD, Zitelli JA, Brodland DG, D'Angelo G. Local control of primary Merkel cell carcinoma: review of 45 cases treated with Mohs micrographic surgery with and without adjuvant radiation. *J Am Acad Dermatol*, 2002;47(6):885-892.
- Busam, KJ, Jungbluth AA, Rekhman N, Coit D, Pulitzer M, Bini J, Arora R, Hanson NC, Tassello JA, Frosina D, Moore P, Chang Y. Merkel cell polyomavirus expression in merkel cell carcinomas and its absence in combined tumors and pulmonary neuroendocrine carcinomas. *Am J Surg Pathol*, 2009;33(9):1378-1385.
- Callahan R, Smith GH. Common integration sites for MMTV in viral induced mouse mammary tumors. *J Mammary Gland Biol Neopl*, 2008;13(3):309-321.

Carter JJ, Paulson KG, Wipf GC, Miranda D, Madeleine MM, Johnson LG, Lemos BD, Lee S, Warcola AH, Iyer JG, Nghiem P, Galloway DA. Association of Merkel cell polyomavirus-specific antibodies with Merkel cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 2009;101(21):1510-1522.

Cerroni L, Kerl H. Primary cutaneous neuroendocrine (Merkel cell) carcinoma in association with squamous- and basal-cell carcinoma. *Am J Dermatopathol*, 1997;19(6):610-613.

Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles DM, Moore PS. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science*, 1994;266(5192):1865-1869.

Chen MM, Roman SA, Sosa JA, Judson BL. The role of adjuvant therapy in the management of head and neck Merkel cell carcinoma. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*, 2015;141(2):137-141.

Chen T, Hedman L, Mattila PS, Jartti T, Ruuskanen O, Söderlund-Venermo M, Hedman K. Serological evidence of Merkel cell polyomavirus primary infections in childhood. *J Clin Virol*, 2011;50(2):125-129.

Cheng J, Rozenblatt-Rosen O, Paulson KG, Nghiem P, DeCaprio JA. Merkel cell polyomavirus large T antigen has growth-promoting and inhibitory activities. *J Virol*, 2013;87(11):6118-6126.

Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, 1989;244(4902):359-362.

Clarke CA, Robbins HA, Tatalovich Z, Lynch CF, Pawlish KS, Finch JL, Hernandez BY, Fraumeni JF Jr, Madeleine MM, Engels EA. Risk of merkel cell carcinoma after solid organ transplantation. *J Natl Cancer Inst*, 2015;107(2):dju382

Coffin JM. Genetic diversity and evolution of retroviruses. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1992;176:143-164.

Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE. The Interactions of Retroviruses and their Hosts. In: Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE, editors. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997.

Cohen JC, Varmus HE. Endogenous mammary tumour virus DNA varies among wild mice and segregates during inbreeding. *Nature*, 1979;278(5703):418-423.

Cotsiki M, Lock RL, Cheng Y, Williams GL, Zhao J, Perera D, Freire R, Entwistle A, Golemis EA, Roberts TM, Jat PS, Gjoerup OV. Simian virus 40 large T antigen targets the spindle assembly checkpoint protein Bub1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004;27;101(4):947-952.

Crosbie EJ, Einstein MH, Franceschi S, Kitchener HC. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*, 2013;382(9895):889-899.

- D'Agostino M, Cinelli C, Willard R, Hofmann J, Jellinek N, Robinson-Bostom L. Epidermotropic Merkel cell carcinoma: a case series with histopathologic examination. *J Am Acad Dermatol*, 2010;62(3):463-468.
- D'Angelo SP, Russell J, Lebbe C, Chmielowski B, Gambichler T, Grob JJ, Kiecker F, Rabinowits G, Terheyden P, Zwiener I, Bajars M, Hennessy M, Kaufman HL. Efficacy and safety of first-line avelumab treatment in patients with stage iv metastatic merkel cell carcinoma: a preplanned interim analysis of a clinical trial. *JAMA Oncol*, 2018;4(9):e180077.
- Das Atze T, Klaver B., Berkhout B. Reduced replication of human immunodeficiency virus type 1 mutants that use reverse transcription primers other than the natural tRNA³ Lys. *J Virol*, 1995;69(5):3090-3097.
- Dancey AL, Rayatt SS, Soon C, Ilchshyn A, Brown I, Srivastava S. Merkel cell carcinoma: a report of 34 cases and literature review. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 2006;59(12):1294-1299.
- Deng X, Naccache SN, Ng T, Federman S, Li L, Chiu CY, Delwart E. An ensemble strategy that significantly improves de novo assembly of microbial genomes from metagenomic next-generation sequencing data. *Nucleic Acids Research*, 2015;43(7):e46.
- Dudley J. *Retroviruses and insights into cancer*. Springer-Verlag New York, 2011.
- Duprat JP, Landman G, Salvajoli JV, Brechtbühl ER. A review of the epidemiology and treatment of Merkel cell carcinoma. *Clinics (Sao Paulo)*, 2011;66(10):1817-1823.
- Durst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H. 1983. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1983;80(12):3812-3815.
- Ellermann, V., Bang, O. Experimentelle Leukämie bei Hühnern. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. Orig.*, 1908;46:595–609.
- Epstein MA, Achong BG, Barr YM. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet*, 1964;1(7335):702-703.
- Essa SS, Chehadeh W, Al-Nakib W. Human Washington University Polyomavirus in Patients with Respiratory Tract Infection in Kuwait. *Med Princ Pract*, 2017;26(6):542-546.
- Falcone V, Panning M, Strahm B, Vraetz T, Bierbaum S, Neumann-Haefelin D, Huzly D. Prolonged KI polyomavirus infection in immunodeficient child. *Emerg Infect Dis*, 2012; 18(4):706-708.
- Fang LC, Lemos B, Douglas J, Iyer J, Nghiem P. Radiation monotherapy as regional treatment for 26 lymph node-positive Merkel cell carcinoma. *Cancer*, 2010;116(7):1783-1790.

Feldmeyer L, Hudgens CW, Ray-Lyons G, Nagarajan P, Aung PP, Curry JL, Torres-Cabala CA, Mino B, Rodriguez-Canales J, Reuben A, Chen PL, Ko JS, Billings SD, Bassett RL, Wistuba II, Cooper ZA, Prieto VG, Wargo JA, Tetzlaff MT. Density, Distribution, and Composition of Immune Infiltrates Correlate with Survival in Merkel Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2016;22(22):5553-5563.

Feller WF, Chopra HC. Studies of human milk in relation to the possible viral etiology of breast cancer. *Cancer*, 1969;24(6):1250-1254.

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

Fields RC, Busam KJ, Chou JF, Panageas KS, Pulitzer MP, Allen PJ, Kraus DH, Brady MS, Coit DG. Five hundred patients with merkel cell carcinoma evaluated at a single institution. *Ann Surg*, 2011;254(3):465-475.

Finnigan R, Hruby G, Wratten C, Keller J, Tripcony L, Dickie G, Rischin D, Poulsen M. The impact of preradiation residual disease volume on time to locoregional failure in cutaneous Merkel cell carcinoma--a TROG substudy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2013;86(1):91-95.

Fondain M, Dereure O, Uhry Z, Guizard AV, Woronoff AS, Colonna M, Molinie F, Bara S, Velten M, Marrer E, Grosclaude P, Lapôtre-Ledoux B, Tretarre B, Guillot B. Merkel cell carcinoma in France: a registries-based, comprehensive epidemiological survey. *J Eur Acad Dermatol*, 2018;32(8):1292-1296.

Foote M, Harvey J, Porceddu S, Dickie G, Hewitt S, Colquist S, Zarate D, Poulsen M. Effect of radiotherapy dose and volume on relapse in Merkel cell cancer of the skin. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2010;77(3):677-684.

Ford CE, Tran D, Deng Y, Ta VT, Rawlinson WD, Lawson JS. Mouse mammary tumor virus-like gene sequences in breast tumors of Australian and Vietnamese women. *Clin Cancer Res*, 2003;9(3):1118-1120.

Foulongne V, Dereure O, Kluger N, Molès JP, Guillot B, Segondy M. Merkel cell polyomavirus DNA detection in lesional and nonlesional skin from patients with Merkel cell carcinoma or other skin diseases. *Br J Dermatol*, 2010;162(1):59-63.

Foulongne V, Sauvage V, Hebert C, Dereure O, Cheval J, Gouilh MA, Pariente K, Segondy M, Burguière A, Manuguerra JC, Caro V, Eloit M. Human Skin Microbiota: High Diversity of DNA Viruses Identified on the Human Skin by High Throughput Sequencing. *PLoS One*, 2012;7(6):e38499.

Fried I, Cerroni L. Merkel cell carcinoma. *Pathologe*, 2014;35(5):467-475.

Fritsch VA, Camp ER, Lentsch EJ. Sentinel lymph node status in Merkel cell carcinoma of the head and neck: Not a predictor of survival. *Head Neck*, 2014;36(4):571-579.

Frohm ML, Griffith KA, Harms KL, Hayman JA, Fullen DR, Nelson CC, Wong SL, Schwartz JL, Bichakjian CK. Recurrence and survival in patients with Merkel cell carcinoma undergoing surgery without adjuvant radiation therapy to the primary site. *JAMA Dermatol*, 2016;152(9):1001-1007.

Gardner SD, Field AM, Coleman DV, Hulme B. New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet*, 1971;1(7712):1253-1257.

Gaudin PB, Rosai J. Florid vascular proliferation associated with neural and neuroendocrine neoplasms. A diagnostic clue and potential pitfall. *Am J Surg Pathol*, 1995;19(6):642-652.

Gaynor AM, Nissen MD, Whiley DM, Mackay IM, Lambert SB, Wu G, Brennan DC, Storch GA, Sloots TP, Wang D. Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PLoS Pathog*, 2007;3(5):e64.

Ghadjar P, Kaanders JH, Poortmans P, Zaucha R, Krenkli M, Lagrange JL, Özsoy O, Nguyen TD, Miralbell R, Baize A, Boujelbene N, Collen T, Scandolaro L, Untereiner M, Goldberg H, Pesce GA, Anacak Y, Friedrich EE, Aebersold DM, Beer KT. The essential role of radiotherapy in the treatment of Merkel cell carcinoma: A study from the Rare Cancer Network. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2011;81(4):e583-e591.

Gheit T, Dutta S, Oliver J, Robitaille A, Hampras S, Combes JD, McKay-Chopin S, Le Calvez-Kelm F, Fenske N, Cherpelis B, Giuliano AR, Franceschi S, McKay J, Rollison DE, Tommasino M. Isolation and characterization of a novel putative human polyomavirus. *Virology*, 2017;506:45–54.

Girschik J, Thorn K, Beer TW, Heenan PJ, Fritschi L. Merkel cell carcinoma in Western Australia: a population-based study of incidence and survival. *Br J Dermatol*, 2011; 165(5):1051-1057.

Goncalves PH, Ziegelbauer J, Uldrick TS, Yarchoan R. Kaposi sarcoma herpesvirus-associated cancers and related diseases. *Curr Opin HIV AIDS*, 2017;12(1):47-56.

Gross L. A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1953;83(2):414-421.

Gunaratne DA, Howle JR, Veness MJ. Sentinel lymph node biopsy in Merkel cell carcinoma: a 15-year institutional experience and statistical analysis of 721 reported cases. *Br J Dermatol*, 2016;174(2):273-281.

Harms KL, Healy MA, Nghiem P, Sober AJ, Johnson TM, Bichakjian CK, Wong SL. Analysis of prognostic factors from 9387 Merkel cell carcinoma cases forms the basis for the New 8th Edition AJCC staging system. *Ann Surg Oncol*, 2016;23(11):3564-3571.

Harrington C, Kwan W. Outcomes of Merkel Cell carcinoma treated with radiotherapy without radical surgical excision. *Ann Surg Oncol*, 2014;21(11):3401-3405.

Harrington C, Kwan W. Radiotherapy and Conservative surgery in the locoregional management of Merkel cell carcinoma: The British Columbia Cancer Agency experience. *Ann Surg Oncol*, 2016;23(2):573-578.

Haymerle G, Fochtman A, Kunstfeld R, Pammer J, Erovic BM. Merkel cell carcinoma: Overall survival after open biopsy versus wide local excision. *Head Neck*, 2015;38:E1014–E1018.

- Hayward J.A., Tachedjian M, Cui J, Field H, Holmes EC, Wang LF, Tachedjian G. Identification of diverse full-length endogenous betaretroviruses in megabats and microbats. *Retrovirology*, 2013;10:35.
- Heath M, Jaimes N, Lemos B, Mostaghimi A, Wang LC, Peñas PF, Nghiem P. Clinical characteristics of Merkel cell carcinoma at diagnosis in 195 patients: the AEIOU features. *J Am Acad Dermatol*, 2008;58(3):375-381.
- Henness S, Vereecken P. Management of Merkel tumours: An evidence-based review. *Curr Opin Oncol*, 2008;20(3):280-286.
- Higaki-Mori H, Kuwamoto S, Iwasaki T, Kato M, Murakami I, Nagata K, Sano H, Horie Y, Yoshida Y, Yamamoto O, Adachi K, Nanba E, Hayashi K. Association of Merkel cell polyomavirus infection with clinicopathological differences in Merkel cell carcinoma. *Hum Pathol*, 2012;43(12):2282-2291.
- Hodgson NC. Merkel cell carcinoma: changing incidence trends. *J Surg Oncol*, 2005;89(1):1-4.
- Holland JF, Melana S, Nartey T, Tripodi J, Jaffer S, Nayak A, Pogo BGT. Human mammary tumor virus (HMTV) is a breast cancer pathogen. *Cancer Research*, 2016;76(14):4062.
- Horváth KB, Pankovics P, Kálmán E, Kádár Z, Battyáni Z, Lengyel Z, Reuter G. Epidemiological, Clinicopathological and Virological Features of Merkel Cell Carcinomas in Medical Center of University of Pécs, Hungary (2007-2012). *Pathol Oncol Res*, 2016;22(1):71-77.
- Houben R, Schrama D, Becker MR. Molecular pathogenesis of Merkel cell carcinoma. *Exp Dermatol*, 2009;18(3):193-198.
- Hoeller U, Mueller T, Schubert T, et al. Regional nodal relapse in surgically staged Merkel cell carcinoma. *Strahlenther Onkol*, 2015;191(1):51-58.
- Hui AC, Stillie AL, Seel M, Ainslie J. Merkel Cell Carcinoma: 27-Year Experience at the Peter MacCallum Cancer Centre. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2011;80(5):1430-1435.
- Iwasaki T, Matsushita M, Kuwamoto S, Kato M, Murakami I, Higaki-Mori H, Nakajima H, Sano S, Hayashi K. Usefulness of significant morphological characteristics in distinguishing between merkel cell polyomavirus-positive and -negative Merkel cell carcinomas. *Hum Pathol*, 2013;44:1912-1917.
- Iyer JG, Afanasiev OK, McClurkan C, Paulson K, Nagase K, Jing L, Marshak JO, Dong L, Carter J, Lai I, Farrar E, Byrd D, Galloway D, Yee C, Koelle DM, Nghiem P. Merkel cell polyomavirus-specific CD8(+) and CD4(+) T-cell responses identified in Merkel cell carcinomas and blood. *Clin Cancer Res*, 2011;17(21):6671-6680.

- Iyer JG, Storer BE, Paulson KG, Lemos B, Phillips JL, Bichakjian CK, Zeitouni N, Gershenwald JE, Sondak V, Otley CC, Yu SS, Johnson TM, Liegeois NJ, Byrd D, Sober A, Nghiem P. Relationships among primary tumor size, number of involved nodes, and survival for 8044 cases of Merkel cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol*, 2014;70(4):637-643.
- Iyer JG, Blom A, Doumani R, Lewis C, Tarabardkar ES, Anderson A, Ma C, Bestick A, Parvathaneni U, Bhatia S, Nghiem P. Response rates and durability of chemotherapy among 62 patients with metastatic Merkel cell carcinoma. *Cancer Med*, 2016;5(9):2294-2301.
- Jaeger T, Ring J, Andres C. Histological, immunohistological, and clinical features of merkel cell carcinoma in correlation to merkel cell polyomavirus status. *J Skin Cancer*, 2012;2012: 983421.
- Jelinek F, Felsberg J, Mestan M. Familial incidence of mammary gland tumours in the Djungarian hamster (*Phodopus sungarus*): a case report. *Veterinarni Medicina*, 2013;53(8): 442–448.
- Jenkins NA, Copeland NG, Taylor BA, Lee BK. Dilute (d) coat color mutation of DBA/2J mice is associated with the site of integration of an ecotrophic MuLV genome. *Nature*, 1981;293(5831):370-374.
- Jouary T, Leyral C, Dreno B, Doussau A, Sassolas B, Beylot-Barry M, Renaud-Vilmer C, Guillot B, Bernard P, Lok C, Bedane C, Cambazard F, Misery L, Estève E, Dalac S, Machet L, Grange F, Young P, Granel-Brocard F, Truchetet F, Vergier B, Delaunay MM, Grob JJ. Adjuvant prophylactic regional radiotherapy versus observation in stage I Merkel cell carcinoma: a multicentric prospective randomized study. *Ann Oncol*, 2012;23(4):1074-1080.
- Jour G, Aung PP, Rozas-Muñoz E, Curry JL, Prieto V, Ivan D. Intraepidermal Merkel cell carcinoma: A case series of a rare entity with clinical follow up. *J Cutan Pathol*, 2017;44(8):684-691.
- Kaae J, Hansen AV, Biggar RJ, Boyd HA, Moore PS, Wohlfahrt J, Melbye M. Merkel cell carcinoma: incidence, mortality, and risk of other cancers. *J Natl Cancer Inst*, 2010;102(11): 793-801.
- Kachare SD, Wong JH, Vohra NA, Zervos EE, Fitzgerald TL. Sentinel lymph node biopsy is associated with improved survival in merkel cell carcinoma. *Ann Surg Oncol*, 2014;21(5):1624-1630.
- Kassiotis G, Stoye JP. Making a virtue of necessity: the pleiotropic role of human endogenous retroviruses in cancer. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2017;372(1732):20160277.
- Katz E, Lareef MH, Rassa JC, Grande SM, King LB, Russo J, Ross SR, Monroe JG. MMTV Env encodes an ITAM responsible for transformation of mammary epithelial cells in three-dimensional culture. *J Exp Med*, 2005;201(3):431-439.

Kaufman HL, Russell JS, Hamid O, Bhatia S, Terheyden P, D'Angelo SP, Shih KC, Lebbé C, Linette GP, Milella M, Brownell I, Lewis KD, Lorch JH, Chin K, Mahnke L, von Heydebreck A, Cuillerot JM, Nghiem P. Avelumab in patients with chemotherapyrefractory metastatic Merkel cell carcinoma: A multicentre, single-group, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*, 2016;17(10):1374-1385.

Kaufman HL, Russell JS, Hamid O, Bhatia S, Terheyden P, D'Angelo SP, Shih KC, Lebbé C, Milella M, Brownell I, Lewis KD, Lorch JH, von Heydebreck A, Hennessy M, Nghiem P. Updated efficacy of avelumab in patients with previously treated metastatic Merkel cell carcinoma after ≥ 1 year of follow-up: JAVELIN Merkel 200, a phase 2 clinical trial. *J Immunother Cancer*, 2018;6(1):e7.

Kelloff G, Huebner RJ, Lee YK, Toni R, Gilden R. Hamster-tropic sarcomagenic and nonsarcomagenic viruses derived from hamster tumors induced by the Gross pseudotype of Moloney sarcoma virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1970;65(2):310-317.

Keydar I, Ohno T, Nayak R, Sweet R, Simoni F, Weiss F, Karby S, Mesa-Tejada R, Spiegelman S. Properties of retrovirus-like particles produced by a human breast carcinoma cell line: immunological relationship with mouse mammary tumor virus proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984;81(13):4188-4192.

Khong HT, Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol*, 2002;3(11):999-1005.

Kim J, McNiff JM. Nuclear expression of survivin portends a poor prognosis in Merkel cell carcinoma. *Mod Pathol*, 2008;21(6):764-769.

Kondo H, Onuma M, Shibuya H, Sato T. Spontaneous tumors in domestic hamsters. *Vet Pathol*, 2008;45(5):674-680.

Kontochristopoulos GJ, Stavropoulos PG, Krasagakis K, Goerdts S, Zouboulis CC. Differentiation between merkel cell carcinoma and malignant melanoma: An immunohistochemical study. *Dermatology*, 2000;201(2):123-126.

Korup S, Rietscher J, Calvignac-Spencer S, Trusch F, Hofmann J, Moens U, Sauer I, Voigt S, Schmuck R, Ehlers B. Identification of a Novel Human Polyomavirus in Organs of the Gastrointestinal Tract. *PLoS One*, 2013;8(3):1-7.

Kukko H, Koljonen V, Lassus P, Tukiainen E, Haglund C, Böhling T. Expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 in Merkel cell carcinoma. *Anticancer Res*, 2007;27(4C):2587-2589.

Kukko H, Böhling T, Koljonen V, Tukiainen E, Haglund C, Pokhrel A, Sankila R, Pukkala E. Merkel cell carcinoma - a population-based epidemiological study in Finland with a clinical series of 181 cases. *Eur J Cancer*, 2012;48(5):737-742.

Kusmartsev S, Nagaraj S, Gabrilovich DI. Tumor-associated CD8⁺ T cell tolerance induced by bone marrow-derived immature myeloid cells. *J Immunol*, 2005;175(7):4583-4592.

Kuwamoto S, Higaki H, Kanai K, Iwasaki T, Sano H, Nagata K, Kato K, Kato M, Murakami I, Horie Y, Yamamoto O, Hayashi K. Association of merkel cell polyomavirus infection with morphologic differences in merkel cell carcinoma. *Hum Pathol*, 2011;42:632-640.

Kwok G, Yau TC, Chiu JW, Tse E, Kwong YL. Pembrolizumab (Keytruda). *Hum Vaccin Immunother*, 2016;12(11):2777-2789.

Kwon NJ, Otley CC, Paulson KG, Ross MI, Yu SS, Zeitouni NC, Byrd DR, Sondak VK, Gershenwald JE, Sober AJ, Nghiem P. 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*, 2010;63(5):751-761.

Lander ES et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 2001;409(6822):860-921.

Lanoy E, Costagliola D, Engels EA. Skin cancers associated with HIV infection and solidorgan transplantation among elderly adults. *Int J Cancer*, 2010;126(7):1724-1731.

Lawson JS, Glenn WK, Salmons B, Ye Y, Heng B, Moody P, Johal H, Rawlinson WD, Delprado W, Lutze-Mann L, Whitaker NJ. Mouse mammary tumor virus-like sequences in human breast cancer. *Cancer Res*, 2010;70(9):3576-3585.

Leib-Mösch C, Seifarth W, Schön U. Influence of human endogenous retroviruses on cellular gene expression. In: Sverdlov E. (ed.), *Retroviruses and primate genome evolution*. Landes Bioscience, Georgetown, Texas, 2004.

Leitz M, Stieler K, Grundhoff A, Moll I, Brandner JM, Fischer N. Merkel cell polyomavirus detection in Merkel cell cancer tumors in Northern Germany using PCR and protein expression. *J Med Virol*, 2014;86:1813–1819.

Lemos B, Nghiem P. Merkel cell carcinoma: more deaths but still no pathway to blame. *J Invest Dermatol*, 2007;127(9):2100-2103.

Lemos BD, Storer BE, Iyer JG, Phillips JL, Bichakjian CK, Fang LC, Johnson TM, Liegeois-Prieto Muñoz I, Pardo Masferrer J, Olivera Vegas J, Fortes Alen JR, Pérez Casas AM. Merkel cell carcinoma: what do we know about it and what should we do? *Clin Transl Oncol*, 2012;14(6):401-412.

Levy J. *The Retroviridae*, Plenum Press New York, 1992.

Lewis KG, Weinstock MA, Weaver AL, Otley CC. Adjuvant local irradiation for Merkel cell carcinoma. *Arch Dermatol*, 2006;142(6):693-700.

Lim CS, Whalley D, Haydu LE, Murali R, Tippet J, Thompson JF, Hruby G, Scolyer RA. Increasing tumor thickness is associated with recurrence and poorer survival in patients with Merkel cell carcinoma. *Ann Surg Oncol*, 2012;19(11):3325-3334.

Lim ES, Reyes A, Antonio M, Saha D, Ikumapayi UN, Adeyemi M, Stine OC, Skelton R, Brennan DC, Mkakosya RS, Manary MJ, Gordon JI, Wang D. Discovery of STL polyomavirus, a polyomavirus of ancestral recombinant origin that encodes a unique T antigen by alternative splicing. *Virology*, 2013;436(2):295–303.

- Liu B, Wang Y, Melana SM, Pelisson I, Najfeld V, Holland JF, Pogo BG. Identification of a proviral structure in human breast cancer. *Cancer Res*, 2001;61(4):1754–1759.
- Liu W, MacDonald M, You J. Merkel cell polyomavirus infection and Merkel cell carcinoma. *Curr Opin Virol*, 2016;20:20-27.
- Liu YG, Whittier RF. Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics*, 1995;25(3):674-681.
- Llombart B, Monteagudo C, López-Guerrero JA, Carda C, Jorda E, Sanmartín O, Almenar S, Molina I, Martín JM, Llombart-Bosch A. Clinicopathological and immunohistochemical analysis of 20 cases of Merkel cell carcinoma in search of prognostic markers. *Histopathology*, 2005;46(6):622-634.
- Lok B, Khan S, Mutter R, Liu J, Fields R, Pulitzer M, Shi W, Zhang Z, Kraus D, Pfister D, Busam KJ, Brownell I, Lee N. Selective radiotherapy for the treatment of head and neck Merkel cell carcinoma. *Cancer*, 2012;118(16):3937-3944.
- Luke JJ, Ott PA. PD-1 pathway inhibitors: the next generation of immunotherapy for advanced melanoma. *Oncotarget*, 2015;6(6):3479-3492.
- Lunder EJ, Stern RS. Merkel-cell carcinomas in patients treated with methoxsalen and ultraviolet A radiation. *N Engl J Med*, 1998;339(17):1247-1248.
- Martel-Jantin C, Filippone C, Cassar O, Peter M, Tomasic G, Vielh P, Brière J, Petrella T, Aubriot-Lorton MH, Mortier L, Jouvion G, Sastre-Garau X, Robert C, Gessain A. Genetic variability and integration of Merkel cell polyomavirus in Merkel cell carcinoma. *Virology*, 2012;426(2):134-142.
- Martel-Jantin C, Pedergrana V, Nicol JT, Leblond V, Trégouët DA, Tortevoye P, Plancoulaine S, Coursaget P, Touzé A, Abel L, Gessain A. Merkel cell polyomavirus infection occurs during early childhood and is transmitted between siblings. *J Clin Virol*, 2013;58(1):288-291.
- Matsushita M, Nonaka D, Iwasaki T, Kuwamoto S, Murakami I, Kato M, Nagata K, Kitamura Y, Hayashi K. A new in situ hybridization and immunohistochemistry with a novel antibody to detect small T-antigen expressions of Merkel cell polyomavirus (MCPyV). *Diagn Pathol*, 2014;9:65.
- McCardle TW, Sondak VK, Zager J, Messina JL. Merkel cell carcinoma: pathologic findings and prognostic factors. *Curr Probl Cancer*, 2010;34(1):47-64.
- McGrath JA, Uitto J. Anatomy and organization of human skin. In: Burns T, editor. *Rook's Textbook of Dermatology*. 8th ed. UK: Wiley-Blackwell; 2010.
- Merkel FS. Tastzellen und Tastkörperchen bei den Hausthieren und beim Menschen. *Archiv für mikroskopische Anatomie*, 1875.

Mesa-Tejada R, Oster MW, Fenoglio CM, Magidson J, Spiegelman S. Diagnosis of primary breast carcinoma through immunohistochemical detection of antigen related to mouse mammary tumor virus in metastatic lesions: a report of two cases. *Cancer*, 1982;49(2):261-268.

Miller AD, Bonham L, Alfano J, Kiem HP, Reynolds T, Wolgamot G. A novel murine leukemia virus identified during testing for helper virus in human gene transfer trials. *J. Virol*, 1996;70(3):1804-1809.

Mishra N, Pereira M, Rhodes RH, An P, Pipas JM, Jain K, Kapoor A, Briese T, Faust PL, Lipkin WI. Identification of a novel Polyomavirus in a pancreatic transplant recipient with retinal blindness and Vasculitic Myopathy. *J Infect Dis*, 2014;210(10):1595–1599.

Mojica P, Smith D, Ellenhorn JDI. Adjuvant radiation therapy is associated with improved survival in Merkel cell carcinoma of the skin. *J Clin Oncol*, 2007;25(9):1043-1047.

Moll R, Osborn M, Hartschuh W, Moll I, Mahrle G, Weber K. Variability of expression and arrangement of cytokeratin and neurofilaments in cutaneous neuroendocrine carcinomas (Merkel cell tumors): immunocytochemical and biochemical analysis of twelve cases. *Ultrastruct Pathol*, 1986;10(6):473-495.

Moll R, Löwe A, Laufer J, Franke WW. Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. *Am J Pathol*, 1992;140(2):427-447.

Nardi V, Song Y, Santamaria-Barria JA, Cosper AK, Lam Q, Faber AC, Boland GM, Yeap BY, Bergethon K, Scialabba VL, Tsao H, Settleman J, Ryan DP, Borger DR, Bhan AK, Hoang MP, Iafrate AJ, Cusack JC, Engelman JA, Dias-Santagata D. Activation of PI3K signaling in Merkel cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2012;18(5):1227-1236.

Neumann F, Borchert S, Schmidt C, Reimer R, Hohenberg H, Fischer N, Grundhoff A. Replication, gene expression and particle production by a consensus Merkel Cell Polyomavirus (MCPyV) genome. *PLoS One*, 2011;6(12):e29112.

Nghiem PT, Bhatia S, Lipson EJ, Kudchadkar RR, Miller NJ, Annamalai L, Berry S, Chartash EK, Daud A, Fling SP, Friedlander PA, Kluger HM, Kohrt HE, Lundgren L, Margolin K, Mitchell A, Olencki T, Pardoll DM, Reddy SA, Shantha EM, Sharfman WH, Sharon E, Shemanski LR, Shinohara MM, Sunshine JC, Taube JM, Thompson JA, Townson SM, Yearley JH, Topalian SL, Cheever MA. PD-1 blockade with Pembrolizumab in advanced Merkel cell carcinoma. *N Engl J Med*, 2016;374(26):2542-2552.

Nghiem P, Kaufman HL, Bharmal M, Mahnke L, Phatak H, Becker JC. Systematic literature review of efficacy, safety and tolerability outcomes of chemotherapy regimens in patients with metastatic Merkel cell carcinoma. *Future Oncol*, 2017;13(14):1263-1279.

Nicholas KB, Nicholas HBJ. GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignment. Distributed by the author. 1997, <http://www.psc.edu/biomed/gendoc>

Nicol JT, Robinot R, Carpentier A, Carandina G, Mazzoni E, Tognon M, Touzé A, Coursaget P. Age-specific seroprevalences of merkel cell polyomavirus, human polyomaviruses 6, 7, and 9, and trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus. *Clin Vaccine Immunol*, 2013;20(3):363-368.

O'Reilly KE, Rojo F, She QB, Solit D, Mills GB, Smith D, Lane H, Hofmann F, Hicklin DJ, Ludwig DL, Baselga J, Rosen N. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res*, 2006;66(3):1500-1508.

Padgett BL, Walker DL, ZuRhein GM, Eckroade RJ, Dessel BH. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet*, 1971;1(7712):1257-1260.

Pantulu ND, Pallasch CP, Kurz AK, Kassem A, Frenzel L, Sodenkamp S, Kvasnicka HM, Wendtner CM, Zur Hausen A. Detection of a novel truncating Merkel cell polyomavirus large T antigen deletion in chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*, 2010;116(24):5280-5284.

Pape E, Rezvoy N, Penel N, Salleron J, Martinot V, Guerreschi P, Dziwniel V, Darras S, Mirabel X, Mortier L. Radiotherapy alone for Merkel cell carcinoma: A comparative and retrospective study of 25 patients. *J Am Dermatol*, 2011;65(5):983-990.

Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int. J. Cancer*, 2006;118(12):3030-3044.

Patel M, Newlands C, Whitaker S. Single-centre experience of primary cutaneous Merkel cell carcinoma of the head and neck between 1996 and 2014. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 2016;54(7):741-745.

Paulson KG, Carter JJ, Johnson LG, Cahill KW, Iyer JG, Schrama D, Becker JC, Madeleine MM, Nghiem P, Galloway DA. Antibodies to merkel cell polyomavirus T antigen oncoproteins reflect tumor burden in merkel cell carcinoma patients. *Cancer Res*, 2010;70(21):8388-8397.

Paulson KG, Iyer JG, Tegeder AR, Thibodeau R, Schelter J, Koba S, Schrama D, Simonson WT, Lemos BD, Byrd DR, Koelle DM, Galloway DA, Leonard JH, Madeleine MM, Argenyi ZB, Disis ML, Becker JC, Cleary MA, Nghiem P. Transcriptome-wide studies of merkel cell carcinoma and validation of intratumoral CD8+ lymphocyte invasion as an independent predictor of survival. *J Clin Oncol*, 2011;29(12):1539-1546.

Paulson KG, Lewis CW, Redman MW, Simonson WT, Lisberg A, Ritter D, Morishima C, Hutchinson K, Mudgistratova L, Blom A, Iyer J, Moshiri AS, Tarabdkar ES, Carter JJ, Bhatia S, Kawasumi I, Galloway DA, Wener MH, Nghiem P. Viral oncoprotein antibodies as a marker for recurrence of Merkel cell carcinoma: A prospective validation study. *Cancer*, 2017;123(8):1464-1474.

- Phan TG, Vo NP, Boros Á, Pankovics P, Reuter G, Li OTW, Wang C, Deng X, Poon LLM, Delwart E. The viruses of wild pigeon droppings. *PLoS ONE*, 2013;8(9):e72787.
- Phillips AA, Harewood JCK. Adult T Cell Leukemia-Lymphoma (ATL): State of the Art. *Curr Hematol Malig Rep*, 2018;13(4):300-307.
- Plummer M, de Martel C, Vignat J, Ferlay J, Bray F, Franceschi S. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *Lancet Glob. Health*, 2016;4(9):e609-e616.
- Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1980;77(12):7415-7419.
- Rao NG. Review of the role of radiation therapy in the management of Merkel cell carcinoma. *Curr Probl Cancer*, 2010;34(1):108-117.
- Rennspiess D, Pujari S, Keijzers M, Abdul-Hamid MA, Hochstenbag M, Dingemans AM, Kurz AK, Speel EJ, Haugg A, Pastrana DV, Buck CB, De Baets MH, Zur Hausen A. Detection of human polyomavirus 7 in human thymic epithelial tumors. *J Thorac Oncol*, 2015;10(2):360-366.
- Ricard AS, Sessieq Q, Siberchicot F, Jouary T, Laurentjoye M. Sentinel lymph node biopsy for head and neck Merkel cell carcinoma: a preliminary study. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis*, 2015;132(2):77-80.
- Reichgelt BA, Visser O. Epidemiology and survival of Merkel cell carcinoma in the Netherlands. A population-based study of 808 cases in 1993-2007. *Eur J Cancer*, 2011;47(4): 579-585.
- Ricard AS, Sessieq Q, Siberchicot F, Jouary T, Laurentjoye M. Sentinel lymph node biopsy for head and neck Merkel cell carcinoma: a preliminary study. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis*, 2015;132(2):77-80.
- Rosenberg N, Jolicoeur P. Retroviral Pathogenesis, In: *Retroviruses*, Coffin J.M., Hughes S.H., Varmus H.E. (Ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY), 1997.
- Roger S, Ducancelle A, Le Guillou-Guillemette H, Gaudy C, Lunel F. HCV virology and diagnosis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2021;45(3):101626
- Rosenblatt JD, Gasson JC, Glaspy J, Bhuta S, Aboud M, Chen IS, Golde DW. Relationship between human T cell leukemia virus-II and atypical hairy cell leukemia: a serologic study of hairy cell leukemia patients. *Leukemia*, 1987;1(4):397-401.
- Ross SR. MMTV infectious cycle and the contribution of virus-encoded proteins to transformation of mammary tissue. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2008;13(3):299-307.
- Ross SR. Mouse mammary tumor virus molecular biology and oncogenesis. *Viruses*, 2010;2(9):2000-2012.

Rous P. A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *J Exp Med*, 1911;13:397-411.

Russell P, Gregerson DS, Albert DM, Reid TW. Characteristics of a retrovirus associated with a hamster melanoma. *J Gen Virol*, 1979;43(2):317-326.

Sadeghi R, Adinehpoor Z, Maleki M, Fallahi B, Giovanella L, Treglia G. Prognostic significance of sentinel lymph node mapping in Merkel cell carcinoma: systematic review and meta-analysis of prognostic studies. *Biomed Res Int*, 2014;2014:489536.

Samimi M, Molet L, Fleury M, Laude H, Carlotti A, Gardair C, Baudin M, Gouguet L, Maubec E, Avenel-Audran M, Esteve E, Wierzbicka-Hainaut E, Beneton N, Aubin F, Rozenberg F4, Dupin N, Avril MF, Lorette G, Guyetant S, Coursaget P, Touzé A. Prognostic value of antibodies to Merkel cell polyomavirus T antigens and VP1 protein in patients with Merkel cell carcinoma. *Br J Dermatol*, 2016;174(4):813-822.

Sauer CM, Haugg AM, Chteinberg E, Rennspiess D, Winnepeninckx V, Speel EJ, Becker JC, Kurz AK, Zur Hausen A. Reviewing the current evidence supporting early B-cells as the cellular origin of Merkel cell carcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2017;116:99-105.

Scarpa M, Cournoyer D, Muzny DM, Moore KA, Belmont JW, Caskey CT. Characterization of recombinant helper retroviruses from Moloney-based vectors in ecotropic and amphotropic packaging cell lines. *Virology*, 1991;180(2):849-852.

Schowalter RM, Pastrana DV, Pumphrey KA, Moyer AL, Buck CB. Merkel cell polyomavirus and two previously unknown polyomaviruses are chronically shed from human skin. *Cell Host Microbe*, 2010;7(6):509-515.

Schrama D, Ugurel S, Becker JC. Merkel cell carcinoma: recent insights and new treatment options. *Curr Opin Oncol*, 2012;24(2):141-149.

Schrama D, Sarosi EM, Adam C, Ritter C, Kaemmerer U, Klopfacki E, König EM, Utikal J, Becker JC, Houben R. Characterization of six Merkel cell polyomavirus-positive Merkel cell carcinoma cell lines: Integration pattern suggest that large T antigen truncating events occur before or during integration. *Int J Cancer*, 2019;145(4):1020-1032.

Schwartz JL, Bichakjian CK, Lowe L, Griffith KA, Frohm ML, Fullen DR, Hayman JA, Lao CD, Shah KS, McLean SA, Bradford CR, Johnson TM, Wong SL. Clinicopathologic features of primary merkel cell carcinoma: a detailed descriptive analysis of a large contemporary cohort. *Dermatol Surg*, 2013;39(7):1009-1016.

Scuda N, Hofmann J, Calvignac-Spencer S, Ruprecht K, Liman P, Kühn J, Hengel H, Ehlers B. A novel human polyomavirus closely related to the african green monkey-derived lymphotropic polyomavirus. *J Virol*, 2011;85(9):4586-4590.

Servy A, Maubec E, Sugier PE, Grange F, Mansard S, Lesimple T, Marinho E, Couturaud B, Girod A, Albert S, Dendale R, Calitchi E, Sarda L, Chanal J, Deschamps L, Sastre-Garau X, Laroche L, Crickx B, Avril MF. Merkel cell carcinoma: value of sentinel lymphnode status and adjuvant radiation therapy. *Ann Oncol*, 2016;27(5):914-919.

Sexton KW, Poteet SP, Hill JB, Schmidt A, Patel A, Del Corral GA, Axt J, Kelley MC, Thayer WP, Shack RB. Adjuvant radiation therapy increases disease-free survival in stage Ib Merkel cell carcinoma. *Ann Plast Surg*, 2014;73(5):531-534.

Shavaleh R, Kamandi M, Feiz Disfani H, Mansori K, Naseri SN, Rahmani K, Ahmadi Kanrash F. Association between JC virus and colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. *Infect Dis (Lond)*, 2020;52(3):152-160.

Shibayama Y, Imafuku S, Takahashi A, Nakayama J. Role of sentinel lymph node biopsy in patients with Merkel cell carcinoma: statistical analysis of 403 reported cases. *Int J Clin Oncol*, 2015;20(1):188-193.

Shih C, Yang CC, Chojjilsuren G, Chang CH, Liou AT. Hepatitis B Virus. *Trends Microbiol*, 2018;26(4):386-387.

Shuda M, Feng H, Kwun HJ, Rosen ST, Gjoerup O, Moore PS, Chang Y. T antigen mutations are a human tumor-specific signature for Merkel cell polyomavirus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008;105(42):16272-16277.

Shuda M, Arora R, Kwun HJ, Feng H, Sarid R, Fernández-Figueras MT, Tolstov Y, Gjoerup O, Mansukhani MM, Swerdlow SH, Chaudhary PM, Kirkwood JM, Nalesnik MA, Kant JA, Weiss LM, Moore PS, Chang Y. Human Merkel cell polyomavirus infection I. MCV T antigen expression in Merkel cell carcinoma, lymphoid tissues and lymphoid tumors. *Int J Cancer*, 2009;125:1243-1249.

Shuda M, Kwun HJ, Feng H, Chang Y, Moore PS. Human Merkel cell polyomavirus small T antigen is an oncoprotein targeting the 4E-BP1 translation regulator. *J Clin Invest*, 2011; 121(9):3623-3634.

Sidiropoulos M, Hanna W, Raphael SJ, Ghorab Z. Expression of TdT in Merkel cell carcinoma and small cell lung carcinoma. *Am J Clin Pathol*, 2011;135(6):831-838.

Siebrasse EA, Reyes A, Lim ES, Zhao G, Mkakosya RS, Manary MJ, Gordon JI, Wang D. Identification of MW Polyomavirus, a Novel Polyomavirus in Human Stool. *J Virol*, 2012; 86(19):10321-10326.

Sihto H, Kukko H, Koljonen V, Sankila R, Böhling T, Joensuu H. Clinical factors associated with Merkel cell polyomavirus infection in Merkel cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 2009;101(13):938-945.

Smatti MK, Al-Sadeq DW, Ali NH, Pintus G, Abou-Saleh H, Nasrallah GK. Epstein-Barr Virus Epidemiology, Serology, and Genetic Variability of LMP-1 Oncogene Among Healthy Population: An Update. *Front Oncol*, 2018;8:211.

Smith PD, Patterson JW. Merkel cell carcinoma (neuroendocrine carcinoma of the skin). *Am J Clin Pathol*, 2001;115 Suppl:S68-S78.

Spiegelman S, Burny A, Das MR, Keydar J, Schlom J, Travnicek M, Watson K. Characterization of the products of DNA-directed DNA polymerases in oncogenic RNA viruses. *Nature*, 1970;227(5258):563-567.

Sridharan V, Muralidhar V, Margalit DN, Tishler RB, DeCaprio JA, Thakuria M, Rabinowits G, Schoenfeld JD. Merkel cell carcinoma: A population analysis on survival. *J Natl Compr Canc Netw*, 2016;14(10):1247-1257.

Stang A, Becker JC, Nghiem P, Ferlay J. The association between geographic location and incidence of Merkel cell carcinoma in comparison to melanoma: An international assessment. *Eur J Cancer*, 2018;94:47–60.

Starrett GJ, Marcelus C, Cantalupo PG, Katz JP, Cheng J, Akagi K, Thakuria M, Rabinowits G, Wang LC, Symer DE, Pipas JM, Harris RS, DeCaprio JA. Merkel Cell Polyomavirus Exhibits Dominant Control of the Tumor Genome and Transcriptome in Virus-Associated Merkel Cell Carcinoma. *mBio*, 2017;8(1):e02079-16.

Strom T, Carr M, Zager JS, Naghavi A, Smith FO, Cruse CW, Messina JL, Russell J, Rao NG, Fulp W, Kim S, Torres-Roca JF, Padhya TA, Sondak VK, Trotti AM, Harrison LB, Caudell JJ. Radiation therapy is associated with improved outcomes in Merkel cell carcinoma. *Ann Surg Oncol*, 2016;23(11):3572-3578.

Stoye JP, Fenner S, Greenoak GE, Moran C, Coffin JM. Role of endogenous retroviruses as mutagens: The hairless mutation of mice. *Cell*, 1988;54(3):383-391.

Somers KD, May JT, Kit S, McCormick KJ, Hatch GG, Stenback WA, Trentin JJ. Biochemical properties of a defective hamster C-type oncornavirus. *Intervirology*, 1973;1(1):11-18.

Szeder V, Grim M, Halata Z, Sieber-Blum M. Neural crest origin of mammalian Merkel cells. *Dev Biol*, 2003;253(2):258-263.

Szymonowicz KA, Chen J. Biological and clinical aspects of HPV-related cancers. *Cancer Biol Med*. 2020;17(4):864-878.

Sweet BH, Hilleman MR. The vacuolating virus, S.V. 40. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1960;105:420-427.

Tai P. A practical update of surgical management of merkel cell carcinoma of the skin. *ISRN Surg*, 2013;2013:850797.

Tarantola TI, Vallow LA, Halyard MY, Weenig RH, Warschaw KE, Weaver AL, Roenigk RK, Brewer JD, Otley CC. Unknown primary Merkel cell carcinoma: 23 new cases and a review. *J Am Acad Dermatol*, 2013;68(3):433-440.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*, 2013;30(12):2725-2729..

Teicher BA. Transforming growth factor-beta and the immune response to malignant disease. *Clin Cancer Res*, 2007;13(21):6247-6251.

Terheyden P, Becker Jürgen C. New developments in the biology and the treatment of metastatic Merkel cell carcinoma. *Curr Opin Oncol*, 2017;29(3):221-226.

Thomson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acid Res*, 1997;25(24):4876-4882.

Timmer FCA, Klop WMC, Relyveld GN, Crijns MB, Balm AJ, van den Brekel MW, Lohuis PJ. Merkel cell carcinoma of the head and neck: emphasizing the risk of undertreatment. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2016;273(5):1243-1251.

Tipples GA, Ma MM, Fischer KP, Bain VG, Kneteman NM, Tyrrell DL. Mutation in HBV RNA-dependent DNA polymerase confers resistance to lamivudine in vivo. *Hepatology*, 1996;24(3):714-717.

Toker C. Trabecular carcinoma of the skin. *Arch Dermatol*, 1972;105(1):107-110.

Topalian SL, Bhatia S, Hollebecque A, Awada A, De Boer JP, Kudchadkar RR., Goncalves A, Delord JP, Martens UM., Picazo JML, Oaknin A, Spanos WC, Aljumaily R, Sharfman WH, Rao S Soumaoro I, Cao ZA, Nghiem P, Schadendorf D. Noncomparative, Open-label, Multiple Cohort, Phase 1/2 Study to Evaluate Nivolumab in Patients With Virus-associated Tumors (CheckMate 358): Efficacy and Safety in Merkel Cell Carcinoma. Abstract Number CT074, AACR 2017

Topalian SL, Bhatia S, Amin A, Kudchadkar RR, Sharfman WH, Lebbé C, Delord JP, Dunn LA, Shinohara MM, Kulikauskas R, Chung CH, Martens UM, Ferris RL, Stein JE, Engle EL, Devriese LA, Lao CD, Gu J, Li B, Chen T, Barrows A, Horvath A, Taube JM, Nghiem P. Neoadjuvant Nivolumab for Patients With Resectable Merkel Cell Carcinoma in the CheckMate 358 Trial. *J Clin Oncol*, 2020;38(22):2476-2487.

Tolstov YL, Pastrana DV, Feng H, Becker JC, Jenkins FJ, Moschos S, Chang Y, Buck CB, Moore PS. Human Merkel cell polyomavirus infection II. MCV is a common human infection that can be detected by conformational capsid epitope immunoassays. *Int J Cancer*, 2009;125(6):1250-1256.

Tolstov YL, Knauer A, Chen JG, Kensler TW, Kingsley LA, Moore PS, Chang Y. Asymptomatic primary Merkel cell polyomavirus infection among adults. *Emerg Infect Dis*, 2011;17(8):1371-1380.

Torres C, Barrios ME, Cammarata RV, Victoria M, Fernandez-Cassi X, Bofill-Mas S, Colina R, Blanco Fernández MD, Mbayed VA. Phylodynamics of Merkel-cell polyomavirus and human polyomavirus 6: A long-term history with humans. *Mol Phylogenet Evo*, 2018;126:210-220.

Touze A, Le Bidre E, Laude H, Fleury MJ, Cazal R, Arnold F, Carlotti A, Maubec E, Aubin F, Avril MF, Rozenberg F, Tognon M, Maruani A, Guyetant S, Lorette G, Coursaget P. High levels of antibodies against merkel cell polyomavirus identify a subset of patients with merkel cell carcinoma with better clinical outcome. *J Clin Oncol*, 2011;29(12):1612-1619.

Uchi H. Merkel cell carcinoma: an update and immunotherapy. *Front Oncol*, 2018;8:48.

van der Meijden E, Janssens RW, Lauber C, Bouwes Bavinck JN, Gorbalenya AE, Feltkamp MC. Discovery of a new human polyomavirus associated with trichodysplasia spinulosa in an immunocompromized patient. *PLoS Pathog*, 2010;6(7):e1001024.

- van der Meijden E, Bialasiewicz S, Rockett RJ, Tozer SJ, Sloots TP, Feltkamp MC. Different serologic behavior of MCPyV, TSPyV, HPyV6, HPyV7 and HPyV9 polyomaviruses found on the skin. *PLoS One*, 2013;8(11):e81078
- Vandeven N, Lewis CW, Makarov V, Riaz N, Paulson KG, Hippe D, Bestick A, Doumani R, Marx T, Takagishi S, Chan TA, Choi J, Nghiem P. Merkel cell carcinoma patients presenting without a primary lesion have elevated markers of immunity, higher tumor mutation burden, and improved survival. *Clin Cancer Res*, 2018;24(4):963-971.
- Van Epps HL. Peyton Rous: father of the tumor virus. *The Journal of experimental medicine*, 2005;201(3):320.
- Van Keymeulen A, Mascré G, Youseff KK, Harel I, Michaux C, De Geest N, Szpalski C, Achouri Y, Bloch W, Hassan BA, Blanpain C. Epidermal progenitors give rise to Merkel cells during embryonic development and adult homeostasis. *J Cell Biol*, 2009;187(1):91-100.
- Varga E, Kiss M, Szabó K, Kemény L. Detection of Merkel cell polyomavirus DNA in Merkel cell carcinomas. *Br J Dermatol*, 2009;161(4):930-932.
- Varmus H. Retroviruses. *Science*, 1988;240(4858):1427-1435.
- Veness M, Howle J. Radiotherapy alone in patients with Merkel cell carcinoma: The Westmead Hospital experience of 41 patients. *Austral J Dermatol*, 2015;56(1):19-24.
- Verma IM, Meuth NL, Fan H, Baltimore D. Hamster leukemia virus: lack of endogenous DNA synthesis and unique structure of its DNA polymerase. *J Virol*, 1974;13(5):1075-1082.
- Victoria JG, Kapoor A, Li L, Blinkova O, Slikas B, Wang C, Naeem A, Zaidi S, Delwart E. Metagenomic analysis of viruses in stool samples from children with acute flaccid paralysis. *J Virol*, 2009;83(9):4642-4651.
- Voog E, Biron P, Martin JP, Blay JY. Chemotherapy for patients with locally advanced or metastatic Merkel cell carcinoma. *Cancer*, 1999;85(12):2589-2595.
- Wabinga HR, Parkin DM, Namboozé S. Kampala Cancer Registry Report for the period 2007-2009. Kampala, Uganda: Kampala Cancer Registry. 2012.
http://www.iacr.com.fr/index.php?option=com_comprofiler&task=fieldclass&field=cb_file&function=download&user=867&reason=profile
- Walsh NM. Primary neuroendocrine (Merkel cell) carcinoma of the skin: morphologic diversity and implications thereof. *Hum Pathol*, 2001;32(7):680-689.
- Walsh NM. Complete Spontaneous Regression of Merkel Cell Carcinoma (1986-2016): A 30 year perspective. *J Cutan Pathol*, 2016;43(12):1150-1154.
- Walsh NM, Cerroni L. Merkel cell carcinoma: A review. *J Cutan Pathol*. 2021;48(3):411-421.

Waltari M, Sihto H, Kukko H, Koljonen V, Sankila R, Böhling T, Joensuu H. Association of Merkel cell polyomavirus infection with tumor p53, KIT, stem cell factor, PDGFR-alpha and survival in Merkel cell carcinoma. *Int J Cancer*, 2011;129(3):619-628.

Wang Y, Holland JF, Bleiweiss IJ, Melana S, Liu X, Pelisson I, Cantarella A, Stellrecht K, Mani S, Pogo BG. Detection of mammary tumor virus env gene-like sequences in human breast cancer. *Cancer Res*, 1995;55(22):5173-5179.

Wendzicki JA, Moore PS, Chang Y. Large T and small T antigens of Merkel cell polyomavirus. *Curr Opin Virol*, 2015;11:38-43.

Wilkinson TMA. Immune checkpoints in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir Rev*, 2017;26(144):170045.

Woo SH, Stumpfova M, Jensen UB, Lumpkin EA, Owens DM. Identification of epidermal progenitors for the Merkel cell lineage. *Development*, 2010;137(23):3965-3971.

Wright GP, Holtzman MP. Surgical resection improves median overall survival with marginal improvement in long-term survival when compared with definitive radiotherapy in Merkel cell carcinoma: A propensity score matched analysis of the National Cancer Database. *American J Surgery*, 2018;215(3):384-387.

Zaar O, Gillstedt M, Lindelöf B, Wennberg-Larkö AM, Paoli J. Merkel cell carcinoma incidence is increasing in Sweden. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2016;30(10):1708-1713.

Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, 2006;6(4):295-307.

Zur Hausen A, Rennspiess D, Winnepeninckx V, Speel EJ, Kurz AK. Early B-cell differentiation in Merkel cell carcinomas: clues to cellular ancestry. *Cancer Res*, 2013;73(16):4982-4987.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

Merkel-sejtes polyomavírus mint a Merkel-sejtes carcinoma valószínű kóroka

Horváth Katalin Barbara¹ ■ Pankovics Péter¹ ■ Battyáni Zita dr.²
Kálmán Endre dr.³ ■ Reuter Gábor dr.¹

¹Állami Népegészségügyi és Tisztiorvosi Szolgálat Dél-dunántúli Regionális Intézete,
Regionális Virologiai Laboratórium, Gastroenteralis Vírusok Nemzeti Referencialaboratóriuma, Pécs
Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar,

²Bőr-, Nemikórtani és Onkodermatológiai Klinika, ³Patológiai Intézet, Pécs

Az emberi daganatok mintegy 20%-ában bizonyítható valamilyen fertőző virális ágens kóroki szerepe. A Merkel-sejtes carcinoma ritka, igen agresszív, bizonytalan eredetű, vélhetően a hám stratum basale rétegéből kiinduló daganat. Elsősorban az időseket és az immunszuppresszált személyeket érinti, többnyire a napfénynek kitett bőrterületeken, különösen a fej-nyaki régiókon jelentkezik. Gyakorisága rohamosan növekszik, nemritkán differenciáldiagnosztikai problémát okoz. A Merkel-sejtes carcinomákból 2008-ban egy DNS-polyomavírust (Merkel-sejtes polyomavírus) sikerült azonosítani, amely megnyitotta az utat a daganat valódi kóroki hátterének feltárásához. Az elváltozás fertőző – virális – kóreredete szemléletváltást eredményez a patogenezis és remélhetőleg majd a kezelés területén is. Az ismeretek hazai klinikai gyakorlatba való mielőbbi átterülése érdekében vállalkoztak a szerzők a Merkel-sejtes carcinoma és az első emberi daganatkeltő polyomavírus, a Merkel-sejtes polyomavírus összefoglalására. Orv. Hetil., 2013, 154, 102–112.

Kulcsszavak: Merkel-sejtes polyomavírus, Merkel-sejtes carcinoma, bőrdaganat

A probable etiological role for Merkel cell polyomavirus in the development of Merkel cell carcinoma

Approximately 20% of the tumours in humans are associated with contagious viral agents. Merkel cell carcinoma is a rare and highly aggressive tumour which may originate from the epidermal stratum basale, although the origin is still controversial. This tumour is most commonly found in elderly and immunocompromised patients in sun exposed areas, especially in the head and neck regions. Merkel cell carcinoma often causes a diagnostic challenge with a dramatically increasing incidence. In 2008, a DNA tumour virus, a polyomavirus (Merkel cell polyomavirus) was detected in Merkel cell carcinomas, and this finding helped to understand the etiological background of the disease. The infectious – probably viral – etiology resulted in a paradigm shift in pathogenesis and, hopefully, in therapy as well. This review summarizes the current knowledge related to Merkel cell carcinoma and the first oncogenic human polyomavirus, the Merkel cell polyomavirus, to promote the clinical adaptation of the information. Orv. Hetil., 2013, 154, 102–112.

Keywords: Merkel cell polyomavirus, Merkel cell carcinoma, skin cancer

(Beérkezett: 2012. november 12.; elfogadva: 2012. december 12.)

Rövidítések

AIDS = (acquired immunodeficiency syndrome) szerzett immunhiányos tünetegyüttes; HIV = humán immundeficiencia vírus; IgG = immunoglobulin G; LT = (large T protein) nagy T fehérje; MC = Merkel-sejtes polyomavírus; MCC = (Merkel-cell carcinoma) Merkel-sejtes carcinoma; PCR = polimeráz láncreakció; st = (small t protein) kis t fehérje; SV40 = Simian vacuolating virus 40; UV = ultraviola; VP = (viral protein) vírusfehérje

A Merkel-sejtes carcinoma (MCC) ritka, igen agresszív, bizonytalan eredetű, vélhetően a hám stratum basale rétegéből kiinduló (neuroendokrin?/epithelialis?) daganat. A sejtféleség első leírója (1875) [1], egyben későbbi névadója *Friedrich Sigmund Merkel* (1845–1919) német anatómus, hisztopatológus volt, míg a bőr, eredetileg „trabecularis” carcinoma néven megnevezett első leírója *Cyril Toker* volt 1972-ben [2]. A daganat elsősorban az időseket és az immunszuppresszált személyeket érinti és többnyire a napfénynek kitett bőrterületeken, különösen a fej-nyaki régiókon jelentkezik. Az immunszuppresszív kezelések terjedése és a diagnosztika fejlődése miatt azonban évről évre rohamosan növekszik a felfedezett esetek száma. Mivel korán ad áttétet, ezért rendkívül fontos a gyors felismerés, az egyéb bőrdaganatoktól (például bazálsejtes carcinoma) való elkülönítés és a szakszerű kezelés. Különös jelentőséget az ad a kórképnek, hogy 2008-ban egy DNS-tumorvírust, egy polyomavírust sikerült a Merkel-sejtes carcinomákból azonosítani, amely megnyithatja az utat a daganat valódi kóroki hátterének feltárásához. Az elváltozás immár valószínű fertőző – virális – kóreredete szemléletváltást eredményez az etiológia mellett a patogenezis és a kezelési területén is. Az ismeretek hazai klinikai gyakorlatba való mielőbbi átterjedése érdekében vállalkoztak a szerzők a Merkel-sejtes carcinoma és polyomavírus összefoglalására.

Polyomavírusokról röviden

A polyoma görög eredetű elnevezés, a „poly” jelentése sok, az „oma” jelentése daganat. A *Polyomaviridae* család első tagját *Gross* 1953-ban írta le, mint filtrálható fertőző ágens, amely a fültőmirigy-tumor kiváltására képes egerekben [3]. Már ekkor felmerült a gyanú, hogy létezhetnek emberi és emberi daganatokban is szerepet játszó polyomavírusok. Azonban az első igazolhatóan emberi daganatot okozó polyomavírus – a Merkel-sejtes carcinomavírus – leírásáig 2008-ig kellett várni [4]. A *Polyomaviridae* család külön említésre méltó, nem emberi, de állatokban daganatkeltő tagja az SV40 (Simian vacuolating virus 40) majompolyomavírus. Az SV40 polyomavírus prototípus ágens a vírusok okozta daganatkeltés tanulmányozásában [5]. Ezért nagy riadalmat okozott, amikor kiderült, hogy 1955–1961 között (egy kelet-európai országokban 1980-ig!) az emberi poliovírus oltóanyagok (Sabin és Salk) előállításánál használt majomsejtvonalak SV40-fertőzöttek voltak.

A *Polyomaviridae* családnak jelenleg 10 típusa ismert emberben. Az első felfedezett emberi polyomavírus a BK-vírus volt, amelyet 1971-ben azonosítottak veseátültetésen átesett beteg vizeletéből, aki a monogramjával a vírus névadójává is vált [6]. Ezt követte a JC-polyomavírus (John Cunningham-polyomavírus), amelyet szintén 1971-ben izoláltak progresszív multifokális leukoencephalopathiás beteg agyszövetéből, és egyben igazolták a vírus kóroki szerepét is [7]. Ezt követően 35 év telt el a következő emberi polyomavírusok felfedezéséig. Ezek a KI- (Karolinska Institute-polyomavírus) és a WU- (Washington University-polyomavírus) polyomavírusok voltak [8, 9]. 2008 óta további hat új emberi polyomavírust fedeztek fel: MC- (Merkel-sejtes polyomavírus, az ötödik a sorban) [4], HPyV6 és HPyV7 (humán polyomavírus 6 és 7) [10], TSV (Trichodysplasia spinulosa spinulosa-hoz kapcsolt polyomavírus) [11], HPyV9 (humán polyomavírus 9) [12] és a MWPyV (Malawi-

1. táblázat | A jelenleg ismert emberi polyomavírusok jellegzetességei

Vírus neve	Felfedezés éve	Minta, amelyből a víruspartikulákat kimutatták	Általa okozott betegség	Bővebb irodalom
BKV	1971	Légúti váladék, vizelet	Enyhe légúti fertőzés, haemorrhagiás cystitis, nephritis (vesetranszplantáción átesett egyénekben)	[97]
JCV	1971	Légút váladék, vizelet, agyszövet	Progresszív multifokális leukoencephalopathia	[98]
KIV	2007	Légúti váladék, széklet	Légúti megbetegedés	[99]
WUV	2007	Légúti váladék, széklet	Légúti megbetegedés	[100]
MCV	2008	Kaposi-sarcoma, CLL, Merkel-sejtes carcinomasejtek, egészséges egyének szájüreg- és légzőhám	Merkel-sejtes carcinoma	[101]
HPyV6	2010	Bőr	Még nem ismert	[10]
HPyV7	2010	Bőr	Még nem ismert	[10]
TSV	2010	Trichodysplasia spinulosa, bőr	Trichodysplasia spinulosa	[102]
HPyV9	2011	Vérszérum és csont	Még nem ismert	[12]
MWPyV	2012	Széklet	Még nem ismert	[13]

polyomavírus) [13]. A jelenleg ismert emberi polyomavírusokról a legfontosabb tudnivalókat az 1. táblázat foglalja össze.

Merkel-sejtes polyomavírus (MC)

Felfedezés

Feng és munkatársai 2008-ban 10 Merkel-sejtes carcinomamintából nyolc esetben metagenomikai és mélyszekvenálási módszerrel korábban ismeretlen polyomavírust azonosítottak, amelyet Merkel-sejtes polyomavírusnak (MC) neveztek el. Nyolcból hat esetben sikerült igazolni, hogy a virális DNS integrálódott a tumorsejtek genomjába is és hogy az MC-polyomavírus-fertőzés megelőzi a tumorsejtek klonális növekedését [4]. A módszertanok különbözősége ellenére is az MC-polyomavírus jelenléte a Merkel-sejtes carcinomák 71–94%-ában kimutatható [14, 15, 16, 17, 18].

Morfológia, genomszerkezet

A polyomavírus 45 nm átmérőjű, ikozahedrális szimmetriájú, 72 kapszomerből álló, kerek, burok nélküli vírus. A kapszomert a VP1, VP2 és VP3 vírusfehérjék alkotják. A VP1 molekulák spontán vírusszerű partikulákká is rendeződhetnek üres nukleokapszidot alkotva [19]. A vírusgenom kovalensen zárt, a prototípus 5387 bázispár hosszúságú, cirkuláris, kettős szálú DNS-t tartalmaz. A virális genom három régióra osztható: korai, késői és regulátor régiók. A korai régió nem strukturális onkoproteineket, a kis T (st) és nagy T (LT) fehérjéket kódolja. Ezek közül az LT nemcsak a virális replikáció elindulását idézi elő a DNS-hez való kötődésével és celluláris osztódási faktorok aktiválásával, hanem kapcsolatba lép számos sejtosztódásban kulcsfontosságú fehérjével, amelynek eredményeként a fertőzött sejt az S fázisba lép át. Ez a mozzanat fontos szerepet tölt be a sejt rosszindulatú daganatos átalakulásában [20]. Az st onkoprotein nélkülözhetetlen a tumorsejtek növekedéséhez [21]. A késői régió a strukturális fehérjéket kódolja (VP). A VP1 a gazdasejt-receptorhoz való kötődésben játszik szerepet. A virális genom replikációjának helye a sejtmag [20].

Patogenezis: a Merkel-sejtes polyomavírus daganatkeltő szerepe

Ugyan az MC-polyomavírus jelenléte és a genomjának integrációja az MCC-sejtek kromoszómájában igazolni látszik szerepét a daganat kialakulásában, ennek pontos patomechanizmusa még sok kérdést vet fel. Feltehetőleg összetett, többlépcsős, a gazdaszervezettől is függő folyamatról lehet szó, hiszen a vírus kimutatható MCC-s vagy egyéb bőrdaganatban szenvedő betegekben az egészségesnek tűnő bőrterületekből, de a száj-

üreg- és a légzőhamból is [22, 23, 24]. Továbbá, az MC a többi polyomavírushoz hasonlóan az egészséges populációban is megtalálható [10]. Fordítva, az MCC-k együtödében nem mutatható ki MC-polyomavírus, amely esetekről azonban egyre biztosabban kijelenthető, hogy önálló klinikopatológiai entitásról lehet szó, amelyek szövettani képükben hasonlóak, de lefolyásukban elkülöníthetőek a vírust hordozó változattól [4].

Az MCC kialakulásának fontos kezdő lépése lehet a virális DNS klonális integrációja, amely véletlenszerűen (random módon) számos helyen történhet a sejtek genetikai állományában. *Martel-Jantin és munkatársai* átfogó vizsgálata alapján leggyakrabban (21%-ban) az 5. kromoszóma érintett, de további nyolc különböző kromoszómán (1., 3., 4., 6., 11., 14., 18., 19.) is találtak integrációt 5–16%-os gyakorisággal, de a kromoszómán belül minden esetben egyedi helyen. Megjegyzendő, hogy az integráció kimutathatóságát technikai okok is zavarhatják. (Itt nagy jelentősége van a kiindulási minta minőségének: a friss fagyasztott mintából szokványos módszerekkel jóval nagyobb eséllyel mutatható ki az integráció, mint a formalinfixált mintákból.) A daganat keletkezésében szerepet játszó gazdasejtgen jelenleg nem ismert és az MC-polyomavírus kettős szálú cirkuláris DNS-ének az integrációhoz szükséges felszakadásának sincs kitüntetett helye, bár ez leggyakrabban (~70%) az LT („large T”) régiójában következik be. Az LT-régió teszi ki a teljes virális genom több mint felét [15], ezért a megfigyelés részben ezzel is magyarázható. A legfontosabb szerepe a daganatképződésben azonban a virális LT-fehérje tumorbéli kifejeződés mértékének és módjának van. Ez az onkoprotein ugyanis konzervált szakaszokat hordoz (például a DnaJ, „pocket” fehérjekötő LXCXE és pp2A-kötő domének), amelyek onkógen hatása egyéb polyomavírusokban (például: SV40) már bizonyított [4]. A tumoros sejtek genomjába integrált vírus LT-antigén helikáz régiója jellemzően károsodást szenved (valószínűleg külső hatásra káros mutációk keletkeznek), hiszen a tumormentes alanyok MC-polyomavírussal integrált hámsajtjeiben (még) nem találunk ilyet. A daganatos sejtekben a vírusreplikációra jellemző LT-fehérje helikáz aktivitása eltűnik (a „vírus” ilyenkor már nem fertőző), ugyanakkor a károsodott LT-fehérje a tumor kialakulása felé tereli a folyamatokat [10, 15, 25]. Az LT-fehérje, többek között a sejtek tumorszuppresszor fehérjéire hatva, gátolja azok funkcióját, emellett a celluláris survivin (baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5: BIRC5a) onkoprotein is megjelenik és expressziója többszörösére emelkedik a sejtben [26]. Ennek az apoptózist gátló fehérjének a megjelenése a daganat fenntartásában játszik szerepet, a magi lokalizációja pedig rossz prognózissal társul [26].

További jellegzetességet mutat a szövettani mintákban a daganat érhálózata, amelyek háttérében VEGFR-2 (vascularis endothelialis növekedési faktor receptor 2)

állhat [27]. A faktor expressziója összefüggést mutatott a daganat méretével és áttétképző hajlamával [28].

Az MCC kialakulásában továbbá szerepe lehet a jelátviteli útvonalakat célzó kutatások szerint az mTor (mammalian target of rapamycin) receptoroknak, az AKT/PI3C és Ras útvonalaknak [29].

A vírussal fertőzöttek közül csak nagyon kevesekben alakul ki Merkel-sejtes carcinoma, ez arra enged következtetni, hogy az MC-polyomavírus-fertőzésen kívül más tényezők is fontos szerepet tölthetnek be a patogenezisben. Ilyen lehet például az ultraibolya (UV)/ionizáló sugárzás. Erre utal, hogy a daganat a napnak kitett bőrfelületeken gyakrabban fordul elő, az UV sugárzás segítheti elő a virális genom integrációját és LT-régiót csonkoló mutációt, amelyek együttesen megszüntetik a vírus replikációját.

Az MCC epidemiológiája

Az 1970-1980-as években csak nagyon ritkán diagnosztizáltak Merkel-sejtes carcinomát. Az 1990-es évek elején az immunhisztokémiai vizsgálatok fejlődésének és a citokeratin-20 (CK-20) antitest bevezetésének köszönhetően már könnyebbé vált a diagnózis felállítása [30, 31, 32]. Ezt követően a jelentett esetek száma gyorsan növekedett [33]. Az MCC elsősorban a világosabb bőrű és idősebb egyéneket érinti. Az eseteknek csak 10%-a fordul elő az 50 évnél fiatalabb korosztályban. Az MCC valamivel gyakrabban érinti a férfiakat (61,3%), mint a nőket [34]. Az Egyesült Államokban az elmúlt 20 évben megháromszorozódott (jelenleg évente 1500 új esetet fedeznek fel) [33], Hollandiában az 1993–2007 közötti időszakban megduplázódott a regisztrált MCC-betegek száma [35], továbbá spanyol [36], olasz [37], osztrák [38], dán [39] tanulmányok és a hazai tapasztalatok is az MCC növekvő előfordulásáról számolnak be. Ez részben a javuló diagnosztikus lehetőségekkel, valamint a napnak előzetesen kitett idős egyének és az immunzuppresszált betegek (például: szervtranszplantáció, szteroidkezelés, HIV, krónikus lymphoid leukaemia stb.) növekvő számával is magyarázható [31]. Valószínűleg az MCC-esetek száma továbbra is emelkedni fog a veszélyeztetett populáció növekedése következtében. A prognózis jelentőségének súlyát növeli az, hogy az MCC mortalitása több mint háromszor nagyobb (46%), mint a malignus melanomának (12%) az összes diagnózisra vetítve [34, 40].

Hazai és saját vizsgálatok

Vizsgálataink során a Pécsi Orvostudományi Egyetem Patológiai Intézetében 2007–2011 között diagnosztizált Merkel-sejtes carcinoma eseteit egy 2009-es szegedi vizsgálat eredményeivel vetettük össze [14]. Szegeden hét betegből származó kilenc paraffinba ágyazott MCC-mintát, Pécsen hét betegből származó 11 natív és paraffinba ágyazott mintát vizsgáltunk: szövettani vizsgálat

tal korábban Merkel-sejtes carcinomának diagnosztizált bőrmintát és ezek nyirokcsomóáttétét, MCC melletti elhelyezkedésű bazálsejtes carcinomát és laphámrákot. Ezenfelül Szegeden további random módon kiválasztott, paraffinba ágyazott laphámrák- és bazálsejtes carcinoma-mintákban vizsgálták a Merkel-sejtes carcinoma-vírus jelenlétét. A hazai eredmények egymást erősítik: PCR-vizsgálattal sem laphámrákból, sem bazálsejtes carcinomából, sem azokból az MCC-kből, amelyek e tumorok mellett helyezkedtek el, nem sikerült MC-polyomavírust kimutatni. Szegeden hét betegből ötben, Pécsen pedig hét betegből hátról sikerült az MC-polyomavírus jelenlétét PCR-módszerrel igazolni. A pécsi eseteknél megfigyeltük, hogy az összes olyan mintában, ahol korábban nem volt ugyanazon a helyen vagy az MCC kimetszésének idejében más daganatos megbetegedés, PCR-vizsgálattal az MCC-vírus jelenléte igazolható volt. Szegeden a vizsgált betegek átlagéletkora 73, Pécsen 72 év volt, a legfiatalabb Szegeden 56, Pécsen 55 éves, a legidősebb Szegeden 87, míg Pécsen 80 éves volt.

Egy 70 éves nőbeteg Merkel-sejtes carcinomájának nyirokcsomóáttétéből származó natív mintájából az MCC-polyomavírus teljes genomját megszekvenáltuk. A genom csak 10 nukleotideltérést (0,19%) mutat a prototípus MC-polyomavírusról. Ez az alacsony mutációs ráta (a vírusgenom stabilitása) az MC-polyomavírusra jellemző tulajdonság.

Az MCC klinikuma

A Merkel-sejtes carcinoma a bőrön gyorsan növekvő, típusos formájában 1-2 cm nagyságú, tömött tapintatú, fájdalommentes, általában pirosasrózsaszínű, de lehet akár kékeslila vagy bőrszínű daganat (tumor), amely leggyakrabban a fej-nyak régióban jelenik meg [31]. Többnyire jéghegyszerűen a mélybe terjed, a laesiót fedő felhám az esetek többségében ép, ráfeszül a tumorra és fénylik, rajta ritkán ulceratio vagy megvastagodott szaruréteg látható [32]. A carcinoma rendkívül agresszív, a kialakulását követően néhány héten vagy hónapon belül ad áttétet, először a környező nyirokcsomókba, majd később távoli nyirokcsövekbe, távoli bőrterületekre és a zsigeri szervek bármelyikébe, főként májba és tüdőbe (2. táblázat) [41].

Mivel a klinikai megjelenés, bár hordoz jellegzeteségeket, de mégsem specifikus, a Merkel-sejtes carcinoma gyanúja a beteg első látogatása során, sajnos, ma még csak ritkán merül fel. A következő klinikai kórképek viszont gyakran szerepelnek – tévesen – az elváltozás első diagnózisaként: bazálsejtes carcinoma, laphámcarcinoma, pyogen granuloma, keratoacantoma, amelanocytás melanoma, benignus cysta, bőrfüggelék-tumor, bőrlymphoma és egyéb metasztatikus neoplasia [32]. Mivel ezek között a kórképek között jóindulatú, illetve mérsékelt agresszivitású elváltozások is vannak, előfordul, hogy az észlelő orvos az elváltozást nem

2. táblázat | A Merkel-sejtes carcinoma (MCC) áttéteinek leggyakoribb helye és gyakorisága

MCC-áttétek gyakorisága 107 beteg adata alapján	
Bőr	28%
Nyirokcsomó	27%
Máj	13%
Tüdő	10%
Csont	10%
Agy	6%
Csontvelő	2%
Mellhártya	2%
Egyéb	4%

tartja veszélyesnek. Hazánkban is gyakori, hogy a fizikális vizsgálattal „basaliomának” tűnő elváltozás miatt a beteg hónapokkal később kerül műtetre, de ekkor már a Merkel-sejtes carcinoma gyors metasztatikus képessége miatt a beteg menthetetlen stádiumba kerül. A diagnózis helyes felállításához ezért a szövettani vizsgálat nélkülözhetetlen.

Bonyolítja a képet, hogy az MCC más malignus bőrdaganatok szomszédságában is kialakulhat, mint például a laphámrák és a bazálsejtes carcinoma [42]. E daganatok kialakulásának folyamata eltérhet az önállóan megjelenő Merkel-sejtes carcinomáétól [43]. Ez különösen fontos a legújabb kutatási eredmények fényében, miszerint a Merkel-sejtek talán epidermalis (és nem crista neuralis) eredetűek, azaz elvben az epidermalis premalignus progenitor sejtek hám vagy neuroendokrin irányba is fejlődhetnek [44, 45]. Az eddigiek során vizsgált laphámrák szomszédságában elhelyezkedő Merkel-sejtes carcinomákból MC-polyomavírust sosem sikerül kimutatni [46]. Saját eseteink között is előfordult basaliomával és egy másik esetben laphámsejtes carcinomával egy időben és szomszédos elhelyezkedésben a Merkel-sejtes carcinoma. Egyik esetben sem találtunk PCR-rel MC-polyomavírust a mintákban.

Több körülményt ismerünk, amelyek befolyásolhatják az MCC kialakulását, lefolyását, a betegség prognózisát. Az életkor (>55 év) mellett legfontosabbnak az immunrendszert érintő alapbetegségek tekinthetők. Merkel-sejtes carcinoma kockázata kifejezetten emelkedett AIDS-ben vagy egyéb szerzett immundeficiens szindrómákban (13-szoros), szervátültetésen átesett betegekben a krónikus immunszuppresszív kezelések következtében (10-szeres) és krónikus lymphoid leukaemiában (30-50-szeres). Ez alapján feltételezhető, hogy a károsodott T-sejtes immunválasznak fontos a szerepe a Merkel-sejtes carcinoma kialakulásában. Az UV sugárzásnak való tartós kitétség ugyancsak fontos kockázati tényező [47]. Ez a daganat szinte kizárólagosan a fehér bőrű embereket érinti a napnak kitett területeken, így a nyakon, fejen, a kéz háti oldalán [31, 34,

47]. Azoknak a betegeknek, akik több ízben PUVA- (Psoralen UV-A) kezelésben részesültek (például pikelysömör miatt), hozzávetőlegesen százszorosára növekedik az esélye az MCC-re [48]. Annak ellenére, hogy az UV sugárzás fontos körülmény, az esetek 5%-ában a fénytől elzárt területeken (például szeméremtest, far) és hozzávetőlegesen 15%-ban fénytől védett bőrterületeken (például has, comb) is megjelenhet a daganat [31]. A Merkel-sejtes daganatokban ugyanaz az UV hatásra jellemző p53 gén mutáció is megfigyelhető, mint a laphám- és bazálsejtes carcinomákban, illetve solaris keratosisban [49].

Körelőzményként gyakran jellemző, hogy a Merkel-sejtes carcinomás beteg korábban más, daganatos megbetegedésben is szenvedett [39]. Ezt támasztják alá saját betegeink is, hisz a hét betegből hat esetében az MCC-t megelőzte valamilyen daganatos megbetegedés (például: krónikus lymphoid leukaemia, méhnyakrák, basalioma).

Érdekes megfigyelés, hogy azok a Merkel-sejtes carcinomák, amelyekből az MC-polyomavírust sikerül kimutatni, szignifikánsan jobb kimenetelűek [50, 51]. Emellett két tanulmány is alátámasztja azt, hogy az erős immunválaszkézség, a VPI fehérje ellen termelt specifikus antitest magas szintje és a CD8+ sejtek beszűrődése a tumorba összefüggésben van a Merkel-sejtes carcinoma jobb kimenetelével [52, 53]. *Andea és munkatársai* visszamenőleg értékelték a következő szövettani viselkedés alapján a Merkel-sejtes carcinomás betegek prognózisát: tumor vastagsága, mikroanatómiai struktúrák tumoros érintettsége (irha és/vagy bőr alja és/vagy mélyebb rétegek), a tumor növekedési mintázata (nodularis körülhatárolt vagy infiltráló) nyirokér-beszűrődés, tumor lymphocytákkal való beszűrődése, nekrozisa, ulceratio a tumor felett. A többváltozós analízis eredményeként azt találták, hogy a tumor nodularis növekedése, alacsony mélysége és a lymphovascularis invázió hiánya szignifikáns összefüggésben van a hosszabb túléléssel [54].

A tumor klinikai stádiumának meghatározásánál jelentős szerepet játszik a tumor mérete, nyirokcsomó- vagy a távoli áttét megléte (3. táblázat). Már 2 cm-nél kisebb átmérőjű daganatnál is 60–80%-ra csökken az ötéves túlélés. Az előrehaladott MCC-ben szenvedő betegek 50%-ának a túlélése kevesebb mint kilenc hónap [34].

MC-polyomavírus elleni ellenanyagok, immunitás

Az MC-polyomavírus szeroprevalenciáját több kutatócsoport is vizsgálta az egészséges népesség körében. Ennek alapján a felnőtt lakosság 46–88%-a rendelkezik ellenanyaggal az MC-polyomavírus VPI kapszidfehérjeje ellen, tehát a népesség nagy része átesik a fertőzésen [55, 56, 57]. Amerikai és finn tanulmányok azt is kimutatták, hogy a gyermekek közt is nagy arányban

3. táblázat | TNM-kritériumok (A) és stádiumbeosztások (B) a legújabb ajánlás alapján (American Joint Committee of Clinical Oncology 2010. évi ajánlása)

A

T	N	M
Tx elsődleges tumor nem ítéhető meg	Nx regionális nyirokcsomó-érintettség nem ítéhető meg	Mx távoli áttét jelenléte nem ítéhető meg
To nincs elsődleges tumor	No nincs regionális nyirokcsomóáttét*	Mo nincs távoli áttét
Tis elsődleges tumor in situ	cNo klinikailag nem detektálható nyirokcsomóáttét*	M1 távoli áttét jelenléte igazolt
T1 elsődleges tumor ≤2 cm	cN1 klinikailag detektálható nyirokcsomóáttét*	M1 a távoli bőr, bőr alatti szövet vagy nyirokcsomóáttét
T2 elsődleges tumor >2 cm és ≤5 cm	pNo nyirokcsomó patológiai vizsgálata negatív	M1 b tüdőáttét
T3 elsődleges tumor >5 cm	N1 a mikrometasztázis ¹	M1 c bármilyen zsigeri áttét
T4 elsődleges tumor csont-, izom- vagy porcbeáttét	N1 b makrometasztázis ²	
	N2 in transit metasztázis ³	

*Negatív a nyirokcsomó klinikai, patológiai vagy mindkét vizsgálattal. Klinikailag metasztatikus nyirokcsomó-vizsgálata megtekintés, tapintás és/vagy képalkotó eljárások segítségével történhet. cNo csak azoknál a betegeknél használatos, akiknél nem történt nyirokcsomó patológiai vizsgálat.

¹Mikrometasztázis diagnosztizálható őrszemnyirokcsomó eltávolítása vagy elektív nyirokcsomó-eltávolítás után.

²Makrometasztázis állapítható meg, amikor klinikailag bizonyítható nyirokcsomó-metasztázis és megerősítik patológiai vizsgálatokkal biopsziából vagy terápiás nyirokcsomó-eltávolításból származó mintákból.

³In transit metasztázis olyan tumor, ami az elsődleges tumor és a drenáló regionális nyirokcsomók között helyezkedik el.

B

Stádiumcsoportok	1 éves várható túlélés	2 éves várható túlélés	3 éves várható túlélés	4 éves várható túlélés	5 éves várható túlélés
0 Tis No Mo	NA*	NA*	NA*	NA*	NA*
IA T1 pNo Mo	100	92	86	84	79
IB T1 cNo Mo	90	79	70	64	60
IIA T2/T3 pNo Mo	90	77	64	62	58
IIB T2/T3 cNo Mo	81	68	58	54	49
IIC T4 No Mo	72	59	55	48	47
IIIA Bármely T N1a Mo	76	57	50	45	42
IIIB Bármely T N1b/N2 Mo	70	47	34	30	26
IV Bármely T Bármely N M1	40	26	20	18	18

*Nincs pontos adat, a várható túlélés hosszú.

fordul elő szeropozitivitás, az egyik tanulmány szerint kettő-öt éves kor között ez már 43% [56, 58, 59]. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a fertőzés ideje gyermekkorra tehető, feltehetően tünetmentesen zajlik, és beindítja a humorális és sejtes immunválaszt is.

Humorális immunitás

Bár a VP1 felszíni kapszidfehérje elleni antitestek előfordulása a teljes népességben magas, minden ezzel foglalkozó kutatócsoport azt találta, hogy az IgG-antitestek a VP1 és VP2 fehérjék ellen egyértelműen magasabb szintet mutatnak az MCC-betegekben [57, 58, 60]. Ennek oka jelenleg nem ismert, részben ellentmondásos, mindenesetre önmagában védelmet nem jelenthet [53, 55]. A T-antigén elleni antitest azonban jobban kapcsolódik az MCC-betegekhez és a betegség prog-

ressziójához. Míg a kontrollnépességből kevesebb mint 1%-ban, a Merkel-sejtes carcinomás betegek 40%-ából mutatható ki ez az ellenanyag; sőt sikeres tumoreltávolítás esetén szintje rohamosan csökken, kiújulásakor – a már nyilvánvaló tünetek előtt – ismét emelkedik, azaz biomarkerként is szolgálhat [61, 62].

Sejtes immunitás

A sejtes immunitás csökkenése mellett gyakrabban fordul elő MCC [62]. Szöveti vizsgálatok tumort infiltráló T-lymphocyták jelenlétét mutatták ki, amelyek egyben prognosztikai jelentőséggel bírnak [54]. A tumoron belüli CD8+ lymphocyták infiltrációja független jelzője az MCC jobb prognózisának. Ez az immunválasz olyan géneket indukál, amelyek citotoxikus granulomokat, citokineket aktiválnak, mint például

CCL19, lymphocita aktiválta és CD8 receptorok [52]. Nehezen értékelhető a természetes ölü- (NK-) sejtek infiltrációja a tumorban, hiszen az MCC-sejtek több mint 90%-a expresszálja az NK-sejtek fontos immunhisztokémiai markerét, a CD56-ot [52]. Vérből és Merkel-sejtes carcinomákból (amelyekben igazolható az MCC-vírus jelenléte) azonosíthatóak immunogén MC-polyomavírus-specifikus CD8+ és CD4+ T-sejtek. Ehhez kapcsolódó specifikus T-sejt-válaszok lehetnek az MCC specifikus célzott terápiájának későbbi célpontjai is [63]. Az is nyilvánvaló, hogy a tumorsejtek képesek megkerülni a gazdaszervezet immunválaszát [64]. Valószínűsíthető, hogy az MCC-tumorsejtek hozzájárulnak a mikroenvironment immunosuppressziójának előidézésében, daganatsejtszubklónokat létrehozva, immunosuppressziót előidéző citokinek, mint TGF- β , Fas-ligand, IL-10 vagy T-sejteket gátló galectin-1 és indoleamin 2,3-dioxigenáz termelése révén [62, 65, 66, 67, 68, 69]. Továbbá a tumorsejtek képesek az immunosuppresszív sejtek, mint például a CD4+-CD25+ regulátoros T-sejtek (T-reg) és a myeloid eredetű szuppresszor sejtek termelését, aktiválását és funkcióját segítve hozzájárulni az immunrendszer toleranciájának kialakulásához is [70, 71, 72].

Laboratóriumi diagnózis

Szövettan

A sebészi kimetszést követően a minták patológiai feldolgoása során célszerű a formalinfixált és paraffinba ágyazott minta mellett natív mintát is biztosítani (ez utóbbit lásd később). A szövetteni vizsgálat az MCC-t általában tömör, göbös bőrelváltozásként mutatja be, amely gyakran betérjed a bőr alatti zsírszövetbe [73]. A tumor tömör fészkekbe vagy gerendákba szerveződő alacsonyan differenciált, egyforma sejtekből épül fel, úgynevezett kis kerek, kék sejt tumorok csoportjába tartozik. A sejtek bazofil magjai változatos alakúak lehetnek a kerektől az oválisig, a kromatin a vesiculálttól a só-bors mintázatig [54]. A sejtmagvacska alig látható. A citoplazma kevés és bizonytalan szélű. Néhány esetben viszonylag szabálytalan alakú magok láthatóak. A daganatban számos mitotikus alak és apoptotikus test, valamint helyenként nekrosis is látható. Az apoptotikus index magas [73]. Rozetta kialakulása ritka [74].

A daganatok nélkül növekszik, beszűri a környező állományt, olykor az ér- és nyirokképleteket is. A borító felhám azonban általában jól elkülönül a tumorhártyától, ritkán érintett [73]. A Merkel-sejtes carcinomáknak kizárólagosan a felhámra korlátozott variánsa nagyon ritka, azonban *Al-Ahmadie és munkatársai* szerint az ilyen esetek bizonyíthatják, hogy az MCC intraepidermalis neoplasiaként kezdheti az inváziót, amelyet MCC in situ-nak neveznek [75].

Három szövettani típust lehet megkülönböztetni, amelyek részben egymás mellett, egyazon tumorban is előfordulhatnak: a ritka trabecularis, a kis sejt és a gyakori intermedier típust. A legfrissebb adatok szerint a trabecularis forma a legjobban differenciált, jobb prognózissal, míg a kis sejt a legdifferenciálatlanabb, rosszabb prognózissal. Ez azonban az átfogó adatok hiányában és a kevert és átmeneti formák gyakorisága következtében nem tekinthető egyértelmű hisztopatológiai összefüggésnek [74].

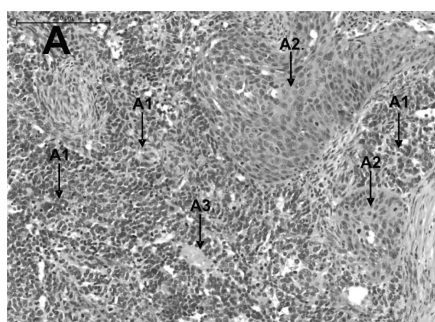
Mivel az MCC más malignus bőrdaganatokkal együtt is kialakulhat, mint például Bowen-betegség, bazálsejtes carcinoma, leggyakrabban laphámrák, ezért ezek jellegzetességei színezik a szövettani képet. A laphámrák többnyire solaris keratosist vagy Bowen-kórt fedő elrendezésben tűnik fel vagy in situ formájában elhatárolódva a dermalis MCC-komponenstől. Átmenet a két sejt típus között általában nem látható [75, 76]. *Busam és munkatársai* érdekes felfedezést tettek: hét olyan esetet vizsgáltak meg, amikor egymás mellett fejlődött ki a Merkel-sejtes és a laphámcarcinoma. Ezekben az esetekben az MC-polyomavírust nem lehetett kimutatni. Véltetően e társ malignitás patomechanizmusa eltér a többi Merkel-sejtes carcinomáétól [46]. Saját vizsgálatunkban is előfordult ez a kapcsolat, egy 77 éves férfi beteg homlokáról származó minta esetében.

Már szövettani vizsgálattal is lehet gyanítani, hogy a mintában jelen van-e a Merkel-sejtes polyomavírus, hiszen a vírusnegatív daganatok szövettani képén sokkal irregulárisabb, változatos, poligonális magvú daganatsejteket láthatunk, helyenként világos, kevésbé egységes citoplazmával. Az MC-vírus-pozitív daganatok típusos morfológiát mutató kerek vagy ovális alakú, vesicularis magokkal és egységesebb citoplazmával rendelkező sejtekből állnak [77, 78]. Ezeket a különbségeket az *I. ábra* segítségével szemléltetjük.

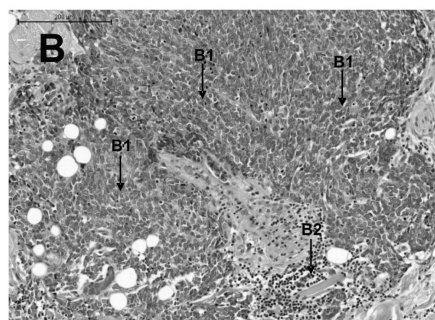
Bár az MCC kellően jellegzetes, tipikus a szövettani képe hematoxilin-eozinnal, további immunhisztokémiai vizsgálatok szükségesek a diagnózis megerősítéséhez. Az MCC neuroendokrin és epithelialis markereket is kifejez, valamint ezen túlmenően jellegzetes, hogy az esetek 97%-ában paranukleárisan pontszerű CK20-pozitivitást (citokeratin-20) ad. A CK-20 marker nagy jelentőséggel bír más kicsi, kerek, kék sejt daganatoktól való elkülönítésben, amelyek CK-20 markerrel negatívak, például bazálsejtes carcinoma, malignus melanoma, non-Hodgkin-lymphoma, metasztatikus kis sejt carcinoma [30, 79, 80].

Neuroendokrin immunhisztokémiai markerekkel pozitívítást mutat minden esetben például chromogranin A-val és synaptophysinnel, viszont TTF-1- (thyroid transkripció faktor-1) negatívak, szemben a metasztatikus kis sejt carcinoma-kkal [81, 82]. A CK-7- (citokeratin-7) negativitás is ezt a diagnózist erősíti [82].

Proliferációs aktivitás vizsgálatára használt Ki-67-tel az MCC-daganatos sejtek sejtmagjai 15-95%-ban pozitívak (átlag 50,6%, medián 50%) [83]. A Ki-67 alkal-



- A1. Változatos citoplazmájú és magvú, nagy mitotikus és apoptotikus aktivitású MCC-daganatsejtmezők
- A2. Laphámcarcinomasejt-csoportok
- A3. Nekrotikus terület



- B1. Ovális alakú, vesicularis magvú MCC-daganatsejtmezők
- B2. Kötőszövetes sűrűség szélében lymphocyttákkal

1. ábra | Merkel-sejtes carcinoma primer bőrtumorok jellegzetességei szövettani metszetekben (hematoxilin-eozin; 12-szeres nagyítás).
 a) Merkel-sejtes polyomavírus nincs jelen; b) Merkel-sejtes polyomavírus nukleinsav jelen van a mintában PCR-módszerrel. Az a) ábrán laphám-ráksejtcsoportok is láthatóak (A szerzők felvételei)

mas prognosztikai markernek is, hiszen a magasabb Ki-67-expresszió szignifikáns összefüggésben áll az MCC rosszabb prognózisával [84].

A melanomától való elkülönítésben segít az S-100 segít, amellyel MCC-negatív melanoma pozitív [85].

CM2B4 monoklonális antitesttel immunhisztokémiai vizsgálatok során ki lehet mutatni a Merkel-sejtes carcinomavírus LT antigénjét. Azonban ennek eredményét kritikával kell értékelni, hiszen nem elég specifikus és szenzitív a PCR-vizsgálattal összevetve [86].

Megfigyelték, hogy a tumorsejtek P63-kifejezése rosszabb prognózzal társul. Ez a marker nagy jelentőségű a várható prognózis megítélésében is [43, 46, 84].

Az MC-polyomavírus kimutatása

A diagnosztika a szövettani vizsgálaton alapul. Nem gyakorlat, de lehetőség van az MC-polyomavírus közvetlen molekuláris (PCR) kimutatására is a sebészeti kimetszést követően. Célszerű natív mintát vizsgálni, mert így a virális nukleinsav kimutatásának nagyobb az esélye: a Merkel-sejtes carcinomák frissen fagyasztott mintáiból 88%-ban, a paraffinba ágyazott minták esetében csak 47%-ban volt sikeres a kimutatás [15]. A paraffinba ágyazott mintákból készült PCR-vizsgálatok értéke nagyban függ a kimetszés és a fixálás közt eltelt idő hosszúságától, a fixálás minőségétől, a deparaffinálás technikájától és attól is, hogy a minta mely részéből metszenek ki. MC-polyomavírus elleni IgG-ellenanyag-szintet ELISA-módszerrel lehet kimutatni [87].

Kezelés

A Merkel-sejtes carcinoma megfelelő kezelésével kapcsolatban még nincsenek jól bevált terápiás irányelvek. E daganat növekvő előfordulásának és az etiológia következtében azonban esszenciális kérdés a kezelések modernizálása. Jelenleg az MC-polyomavírus jelenléte vagy hiánya azonban még nem befolyásolja az MCC kezelését.

A jelenleg alkalmazott eljárás a teljes sebészi kimetszés, széles sebészi széllel, mélyen az izom bonyéig, azonban adjuváns radioterápia vagy radioterápia mint elsődlegesen választandó gyógymód is megfontolható lehetőség. Korai stádiumú MCC-k esetén tumormentes szélt biztosító sebészi eljárás esetében jó gyógyulási eredmények érhetőek el [88]. *Boyer és munkatársai* 45, I. stádiumú Merkel-sejtes carcinomás sebészi rezekeción átesett beteget tanulmányoztak. Húsz beteg a műtetet követően adjuváns radioterápiában részesült, míg másik 25 beteg nem. A kiegészítő radioterápiát kapó csoportban nem volt recidíva, de ahol csak sebészi eltávolítás történt, négy esetben kiújult a daganat [89]. *Lewis és munkatársai* is hasonló eredményre jutottak a világ különböző részeiről származó 1254 eset vizsgálatakor. Statisztikailag szignifikánsan kevesebb volt a recidíva azon betegeknél, akik a sebészi kezelések mellett kiegészítő radioterápiában is részesültek. Annál a betegpopulációnál, ahol a betegek csak sebészi kezelésben részesültek, 3,7-szer gyakrabban tapasztalták a daganat kiújulását [90].

A helyi széles sebészi kimetszést primer MCC-k esetében gyakran a melanoma protokollja szerint vizsik véghez, 2 cm-es sebészi széllal, ha lehetséges, de nincsenek követéses vizsgálatok a reszekciós szél ideális mértékét illetően [88]. Ha a primer laesio nem reszekálabilis, megkísérélhető a radioterápia önmagában. Az ajánlott dózis 45–70 Gy [91].

Az őrszemnyirokcsomó-biopszia eredménye befolyásolja a kezelést [92]. Távoli áttétek kezelésében a kemoterápia játssza a vezető szerepet. A terápia fegyvertár a platinaalapú szerek, mint például ciszplatin vagy carboplatin, esetleg etoposid, doxorubicin. Akár 40%-ban is elérhető terápiai válasz, de csak rövid ideig [88, 93, 94, 95]. Az intranzit metasztázisok esetén alternatív megoldás lehet a radio- és a kemoterápia együttes alkalmazása. Kiterjedt, de lokalizált laesióknál a radioterápia önmagában is jó megoldás lehet.

A kiújuló betegségek kezelésének terén nincs meggyezés [88].

Az MCC patomechanizmusának részletes feltárása elvezethet specifikus kezelési módszerek megalkotásához [88]. A virális eredetből értelemszerűen az is következik, hogy ez a súlyos daganatos betegség a jövőben talán vakcinával megelőzhető lehet.

Következtetések

A jelenlegi ismereteink szerint az emberi daganatok mintegy 20%-ában már most is bizonyítható valamilyen fertőző virális ágens kóroki szerepe [96]. A Merkel-sejtes carcinoma egy újabb klinikai entitás abban a sorban, amelynek hátterében igazolhatóan daganatkeltő mikroba áll. Bár e korábban ritka kórkép régóta ismert volt, ebben az esetben is a megszorodott, szerzett immunszuppresszív állapotok vezettek előbb a kórkép számának megnövekedéséhez, majd ezt észlve, a kórkép fertőző eredetének bizonyításához. Az újonnan felfedezett, első igazoltan emberi daganatkeltő polyomavírus, az MC-polyomavírus bemutatásával a szerzők célja az volt, hogy az ismereteket a klinikum számára érthető formában összefoglalja, hogy a vírus által okozott agresszív MCC – tudatosan – korai felismerésre kerüljön és az időbeli kezeléssel a betegek számára nagyobb esélyt adjunk a túlélésre.

Irodalom

- [1] Merkel, F. S.: Tastzellen und Tastkörperchen bei den Haustieren und beim Menschen. Archiv für mikroskopische Anatomie, 1875, 11, 636–652.
- [2] Toker, C.: Trabecular carcinoma of the skin. Arch. Dermatol., 1972, 105, 107–110.
- [3] Gross, L.: A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1953, 83, 414–421.
- [4] Feng, H., Shuda, M., Chang, Y., et al.: Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. Science, 2008, 319, 1096–1100.
- [5] Sweet, B. H., Hilleman, M. R.: The vacuolating virus, S.V. 40. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1960, 105, 420–427.
- [6] Gardner, S. D., Field, A. M., Coleman, D. V., et al.: New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. Lancet, 1971, 1 (7712), 1253–1257.
- [7] Padgett, B. L., Walker, D. L., ZuRhein, G. M., et al.: Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. Lancet, 1971, 1 (7712), 1257–1260.
- [8] Gaynor, A. M., Nissen, M. D., Whitley, D. M., et al.: Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. PLoS Pathog., 2007, 3, e64.
- [9] Allander, T., Andreasson, K., Gupta, S., et al.: Identification of a third human polyomavirus. J. Virol., 2007, 81, 4130–4136.
- [10] Schowalter, R. M., Pastrana, D. V., Pumphrey, K. A., et al.: Merkel cell polyomavirus and two previously unknown polyomaviruses are chronically shed from human skin. Cell Host Microbe, 2010, 7, 509–515.
- [11] Van der Meijden, E., Janssens, R. W., Lauber, C., et al.: Discovery of a new human polyomavirus associated with trichodysplasia spinulosa in an immunocompromized patient. PLoS Pathog, 2010, 6, e1001024.
- [12] Scuda, N., Hofmann, J., Calvignac-Spencer, S., et al.: A novel human polyomavirus closely related to the african green monkey-derived lymphotropic polyomavirus. J. Virol., 2011, 85, 4586–4590.
- [13] Siebrasse, E. A., Reyes, A., Lim, E. S., et al.: Identification of MW polyomavirus, a novel polyomavirus in human stool. J. Virol., 2012, 86, 10321–10326.
- [14] Varga, E., Kiss, M., Szabó, K., et al.: Detection of Merkel cell polyomavirus DNA in Merkel cell carcinomas. Br. J. Dermatol., 2009, 161, 930–932.
- [15] Martel-Jantin, C., Filippone, C., Cassar, O., et al.: Genetic variability and integration of Merkel cell polyomavirus in Merkel cell carcinoma. Virology, 2012, 426, 134–142.
- [16] Foulongne, V., Kluger, N., Dereure, O., et al.: Merkel cell polyomavirus and Merkel cell carcinoma, France. Emerg. Infect. Dis., 2008, 14, 1491–1493.
- [17] Becker, J. C., Houben, R., Ugurel, S., et al.: MC polyomavirus is frequently present in Merkel cell carcinoma of European patients. J. Invest. Dermatol., 2009, 129, 248–250.
- [18] Kassem, A., Schöpflin, A., Diaz, C., et al.: Frequent detection of Merkel cell polyomavirus in human Merkel cell carcinomas and identification of a unique deletion in the VP1 gene. Cancer Res., 2008, 68, 5009–5013.
- [19] Houben, R., Schrama, D., Becker, J. C.: Molecular pathogenesis of Merkel cell carcinoma. Exp. Dermatol., 2009, 18, 193–198.
- [20] Neumann, F., Borchert, S., Schmidt, C., et al.: Replication, gene expression and particle production by a consensus Merkel Cell Polyomavirus (MCPyV) genome. PLoS One, 2011, 6, e29112.
- [21] Shuda, M., Kvun, H. J., Feng, H., et al.: Human Merkel cell polyomavirus small T antigen is an oncoprotein targeting the 4E-BP1 translation regulator. J. Clin. Invest., 2011, 121, 3623–3634.
- [22] Foulongne, V., Dereure, O., Kluger, N., et al.: Merkel cell polyomavirus DNA detection in lesional and nonlesional skin from patients with Merkel cell carcinoma or other skin diseases. Br. J. Dermatol., 2010, 162, 59–63.
- [23] Babakir-Mina, M., Ciccozzi, M., Lo Presti, A., et al.: Identification of Merkel cell polyomavirus in the lower respiratory tract of Italian patients. J. Med. Virol., 2010, 82, 505–509.
- [24] Bergallo, M., Costa, C., Terlizzi, M. E., et al.: Quantitative detection of the new polyomaviruses KI, WU and Merkel cell virus in transbronchial biopsies from lung transplant recipients. J. Clin. Pathol., 2010, 63, 722–725.
- [25] Pantulu, N. D., Pallasch, C. P., Kurz, A. K., et al.: Detection of a novel truncating Merkel cell polyomavirus large T antigen deletion in chronic lymphocytic leukemia cells. Blood, 2010, 116, 5280–5284.

- [26] Kim, J., McNiff, J. M.: Nuclear expression of survivin portends a poor prognosis in Merkel cell carcinoma. *Mod. Pathol.*, 2008, 21, 764–769.
- [27] Gaudin, P. B., Rosai, J.: Florid vascular proliferation associated with neural and neuroendocrine neoplasms. A diagnostic clue and potential pitfall. *Am. J. Surg. Pathol.*, 1995, 19, 642–652.
- [28] Kukko, H., Koljonen, V., Lassus, P., et al.: Expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 in Merkel cell carcinoma. *Anticancer Res.*, 2007, 27, 2587–2589.
- [29] O'Reilly, K. E., Rojo, F., She, Q. B., et al.: mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res*, 2006, 66, 1500–1508.
- [30] Moll, R., Löwe, A., Laufer, J., et al.: Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. *Am. J. Pathol.*, 1992, 140, 427–447.
- [31] Heath, M., Jaimes, N., Lemos, B., et al.: Clinical characteristics of Merkel cell carcinoma at diagnosis in 195 patients: the AEIOU features. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2008, 58, 375–381.
- [32] Smith, P. D., Patterson, J. W.: Merkel cell carcinoma (neuroendocrine carcinoma of the skin). *Am. J. Clin. Pathol.*, 2001, 115 (Suppl.), S68–S78.
- [33] Hodgson, N. C.: Merkel cell carcinoma: changing incidence trends. *J. Surg. Oncol.*, 2005, 89, 1–4.
- [34] Lemos, B. D., Storer, B. E., Iyer, J. G., et al.: 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.*, 2010, 63, 751–761.
- [35] Reichgelt, B. A., Visser, O.: Epidemiology and survival of Merkel cell carcinoma in the Netherlands. A population-based study of 808 cases in 1993–2007. *Eur. J. Cancer*, 2011, 47, 579–585.
- [36] Prieto Muñoz, I., Pardo Masferrer, J., Olivera Vegas, J., et al.: Merkel cell carcinoma: what do we know about it and what should we do? *Clin. Transl. Oncol.*, 2012, 14, 401–412.
- [37] Ascoli, V., Minelli, G., Kanieff, M., et al.: Merkel cell carcinoma: a population-based study on mortality and the association with other cancers. *Cancer Causes Control*, 2011, 22, 1521–1527.
- [38] Schrama, D., Ugurel, S., Becker, J. C.: Merkel cell carcinoma: recent insights and new treatment options. *Curr. Opin. Oncol.*, 2012, 24, 141–149.
- [39] Kaae, J., Hansen, A. V., Biggar, R. J., et al.: Merkel cell carcinoma: incidence, mortality, and risk of other cancers. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2010, 102, 793–801.
- [40] American Cancer Society: Cancer Facts & Figures – 2012. 4. oldal.
- [41] Voog, E., Biron, P., Martin, J. P., et al.: Chemotherapy for patients with locally advanced or metastatic Merkel cell carcinoma. *Cancer*, 1999, 85, 2589–2595.
- [42] Cerroni, L., Kerl, H.: Primary cutaneous neuroendocrine (Merkel cell) carcinoma in association with squamous- and basal-cell carcinoma. *Am. J. Dermatopathol.*, 1997, 19, 610–613.
- [43] Kuwamoto, S.: Recent advances in the biology of Merkel cell carcinoma. *Hum. Pathol.*, 2011, 42, 1063–1077.
- [44] Van Keymeulen, A., Mascere, G., Youseff, K. K., et al.: Epidermal progenitors give rise to Merkel cells during embryonic development and adult homeostasis. *J. Cell Biol.*, 2009, 187, 91–100.
- [45] Woo, S. H., Stumpfova, M., Jensen, U. B., et al.: Identification of epidermal progenitors for the Merkel cell lineage. *Development*, 2010, 137, 3965–3971.
- [46] Busam, K. J., Jungbluth, A. A., Rektman, N., et al.: Merkel cell polyomavirus expression in Merkel cell carcinomas and its absence in combined tumors and pulmonary neuroendocrine carcinomas. *Am. J. Surg. Pathol.*, 2009, 33, 1378–1385.
- [47] Agelli, M., Clegg, L. X.: Epidemiology of primary Merkel cell carcinoma in the United States. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2003, 49, 832–841.
- [48] Lunder, E. J., Stern, R. S.: Merkel-cell carcinomas in patients treated with methoxsalen and ultraviolet A radiation. *N. Engl. J. Med.*, 1998, 339, 1247–1248.
- [49] Van Gele, M., Kaghad, M., Leonard, J. H., et al.: Mutation analysis of P73 and TP53 in Merkel cell carcinoma. *Br. J. Cancer*, 2000, 82, 823–826.
- [50] Sihto, H., Kukko, H., Koljonen, V., et al.: Clinical factors associated with Merkel cell polyomavirus infection in Merkel cell carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2009, 101, 938–945.
- [51] Waltari, M., Sihto, H., Kukko, H., et al.: Association of Merkel cell polyomavirus infection with tumor p53, KIT, stem cell factor, PDGFR-alpha and survival in Merkel cell carcinoma. *Int. J. Cancer*, 2011, 129, 619–628.
- [52] Paulson, K. G., Iyer, J. G., Tegeder, A. R., et al.: Transcriptome-wide studies of Merkel cell carcinoma and validation of intratumoral CD8+ lymphocyte invasion as an independent predictor of survival. *J. Clin. Oncol.*, 2011, 29, 1539–1546.
- [53] Touzé, A., Le Bidre, E., Laude, H., et al.: High levels of antibodies against merkel cell polyomavirus identify a subset of patients with Merkel cell carcinoma with better clinical outcome. *J. Clin. Oncol.*, 2011, 29, 1612–1619.
- [54] Andea, A. A., Coit, D. G., Amin, B., et al.: Merkel cell carcinoma. Histologic features and prognosis. *Cancer*, 2008, 113, 2549–2558.
- [55] Pastrana, D. V., Tolstov, Y. L., Becker, J. C., et al.: Quantitation of human seroresponsiveness to Merkel cell polyomavirus. *PLoS Pathog.*, 2009, 5, e1000578.
- [56] Kean, J. M., Rao, S., Wang, M., et al.: Seroepidemiology of human polyomaviruses. *PLoS Pathog.*, 2009, 5, e1000363.
- [57] Carter, J. J., Paulson, K. G., Wipf, G. C., et al.: Association of Merkel cell polyomavirus-specific antibodies with Merkel cell carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2009, 101, 1510–1522.
- [58] Tolstov, Y. L., Pastrana, D. V., Feng, H., et al.: Human Merkel cell polyomavirus infection II. MCV is a common human infection that can be detected by conformational capsid epitope immunoassays. *Int. J. Cancer*, 2009, 125, 1250–1256.
- [59] Chen, T., Hedman, L., Mattila, P. S., et al.: Serological evidence of Merkel cell polyomavirus primary infections in childhood. *J. Clin. Virol.*, 2011, 50, 125–129.
- [60] Faust, H., Pastrana, D. V., Buck, C. B., et al.: Antibodies to Merkel cell polyomavirus correlate to presence of viral DNA in the skin. *J. Infect. Dis.*, 2011, 203, 1096–1100.
- [61] Paulson, K. G., Carter, J. J., Johnson, L. G., et al.: Antibodies to Merkel cell polyomavirus T antigen oncoproteins reflect tumor burden in Merkel cell carcinoma patients. *Cancer Res.*, 2010, 70, 8388–8397.
- [62] Bhatia, S., Afanasiev, O., Nghiem, P.: Immunobiology of Merkel cell carcinoma: implications for immunotherapy of a polyomavirus-associated cancer. *Curr. Oncol. Rep.*, 2011, 13, 488–497.
- [63] Iyer, J. G., Afanasiev, O. K., McClurkan, C., et al.: Merkel cell polyomavirus-specific CD8+ and CD4+ T-cell responses identified in Merkel cell carcinomas and blood. *Clin. Cancer Res.*, 2011, 17, 6671–6680.
- [64] Shuda, M., Feng, H., Kwun, H. J., et al.: T antigen mutations are a human tumor-specific signature for Merkel cell polyomavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, 105, 16272–16277.
- [65] Teicher, B. A.: Transforming growth factor-beta and the immune response to malignant disease. *Clin. Cancer Res.*, 2007, 13, 6247–6251.
- [66] Khong, H. T., Restifo, N. P.: Natural selection of tumor variants in the generation of “tumor escape” phenotypes. *Nat. Immunol.*, 2002, 3, 999–1005.
- [67] Rubinstein, N., Ilarregui, J. M., Toscano, M. A., et al.: The role of galectins in the initiation, amplification and resolution of the inflammatory response. *Tissue Antigens*, 2004, 64, 1–12.
- [68] Houston, A., Bennett, M. W., O'Sullivan, G. C., et al.: Fas ligand mediates immune privilege and not inflammation in human colon cancer, irrespective of TGF-beta expression. *Br. J. Cancer*, 2003, 89, 1345–1351.
- [69] Uytendove, C., Pilotte, L., Théate, I., et al.: Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan

- degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat. Med.*, 2003, 9, 1269–1274.
- [70] *Terabe, M., Berszofsky, J. A.*: Immunoregulatory T cells in tumor immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, 2004, 16, 157–162.
- [71] *Zou, W.*: Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.*, 2006, 6, 295–307.
- [72] *Kusmartsev, S., Nagaraj, S., Gabrilovich, D. I.*: Tumor-associated CD8+ T cell tolerance induced by bone marrow-derived immature myeloid cells. *J. Immunol.*, 2005, 175, 4583–4592.
- [73] *McCardle, T. W., Sondak, V. K., Zager, J., et al.*: Merkel cell carcinoma: pathologic findings and prognostic factors. *Curr. Probl. Cancer*, 2010, 34, 47–64.
- [74] *Jaeger, T., Ring, J., Andres, C.*: Histological, immunohistological, and clinical features of Merkel cell carcinoma in correlation to Merkel cell polyomavirus status. *J. Skin Cancer*, 2012, 2012, 983421.
- [75] *Al-Ahmadie, H. A., Mutasim, D. F., Mutema, G. K.*: A case of intraepidermal Merkel cell carcinoma within squamous cell carcinoma in-situ: Merkel cell carcinoma in-situ? *Am. J. Dermatopathol.*, 2004, 26, 230–233.
- [76] *Walsh, N. M.*: Primary neuroendocrine (Merkel cell) carcinoma of the skin: morphologic diversity and implications thereof. *Hum. Pathol.*, 2001, 32, 680–689.
- [77] *Kuwamoto, S., Higaki, H., Kanai, K., et al.*: Association of Merkel cell polyomavirus infection with morphologic differences in Merkel cell carcinoma. *Hum. Pathol.*, 2011, 42, 632–640.
- [78] *Katano, H., Ito, H., Suzuki, Y., et al.*: Detection of Merkel cell polyomavirus in Merkel cell carcinoma and Kaposi's sarcoma. *J. Med. Virol.*, 2009, 81, 1951–1958.
- [79] *Dancey, A. L., Rayatt, S. S., Soon, C., et al.*: Merkel cell carcinoma: a report of 34 cases and literature review. *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.*, 2006, 59, 1294–1299.
- [80] *Moll, R., Osborn, M., Hartschub, W., et al.*: Variability of expression and arrangement of cytokeratin and neurofilaments in cutaneous neuroendocrine carcinomas (Merkel cell tumors): immunocytochemical and biochemical analysis of twelve cases. *Ultrastruct. Pathol.*, 1986, 10, 473–495.
- [81] *Bobos, M., Hytiroglou, P., Kostopoulos, I., et al.*: Immunohistochemical distinction between Merkel cell carcinoma and small cell carcinoma of the lung. *Am. J. Dermatopathol.*, 2006, 28, 99–104.
- [82] *Sidiropoulos, M., Hanna, W., Raphael, S. J., et al.*: Expression of TdT in Merkel cell carcinoma and small cell lung carcinoma. *Am. J. Clin. Pathol.*, 2011, 135, 831–838.
- [83] *Llombart, B., Montegudo, C., López-Guerrero, J. A., et al.*: Clinicopathological and immunohistochemical analysis of 20 cases of Merkel cell carcinoma in search of prognostic markers. *Histopathology*, 2005, 46, 622–634.
- [84] *Asioli, S., Righi, A., Volante, M., et al.*: P63 expression as a new prognostic marker in Merkel cell carcinoma. *Cancer*, 2007, 110, 640–647.
- [85] *Kontochristopoulos, G. J., Stavropoulos, P. G., Krasagakis, K., et al.*: Differentiation between Merkel cell carcinoma and malignant melanoma: An immunohistochemical study. *Dermatology*, 2000, 201, 123–126.
- [86] *Shuda, M., Arora, R., Kwun, H. J., et al.*: Human Merkel cell polyomavirus infection I. MCV T antigen expression in Merkel cell carcinoma, lymphoid tissues and lymphoid tumors. *Int. J. Cancer*, 2009, 125, 1243–1249.
- [87] *Tolstov, Y. L., Knauer, A., Chen, J. G., et al.*: Asymptomatic primary Merkel cell polyomavirus infection among adults. *Emerg. Infect. Dis.*, 2011, 17, 1371–1380.
- [88] *Duprat, J. P., Landman, G., Salvajoli, J. V., et al.*: A review of the epidemiology and treatment of Merkel cell carcinoma. *Clinics (Sao Paulo)*, 2011, 66, 1817–1823.
- [89] *Boyer, J. D., Zitelli, J. A., Brodland, D. G., et al.*: Local control of primary Merkel cell carcinoma: review of 45 cases treated with Mohs micrographic surgery with and without adjuvant radiation. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2002, 47, 885–892.
- [90] *Lewis, K. G., Weinstock, M. A., Weaver, A. L., et al.*: Adjuvant local irradiation for Merkel cell carcinoma. *Arch. Dermatol.*, 2006, 142, 693–700.
- [91] *Rao, N. G.*: Review of the role of radiation therapy in the management of Merkel cell carcinoma. *Curr. Probl. Cancer*, 2010, 34, 108–117.
- [92] *Arruda, E. P., Higgins, K. M.*: Role of sentinel lymph node biopsy in the management of Merkel cell carcinoma. *J. Skin Cancer*, 2012, 2012, 176173.
- [93] *Boyle, F., Pendlebury, S., Bell, D.*: Further insights into the natural history and management of primary cutaneous neuroendocrine (Merkel cell) carcinoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 1995, 31, 315–323.
- [94] *Westgate, S. J.*: Radiation therapy for skin tumors. *Otolaryngol. Clin. North Am.*, 1993, 26, 295–309.
- [95] *Fenig, E., Lurie, H., Klein, B., et al.*: The treatment of advanced Merkel cell carcinoma. A multimodality chemotherapy and radiation therapy treatment approach. *J. Dermatol. Surg. Oncol.*, 1993, 19, 860–864.
- [96] *De Martel, C., Ferlay, J., Franceschi, S., et al.*: Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol.*, 2012, 13, 607–615.
- [97] *Acott, P., Babel, N.*: BK virus replication following kidney transplant: does the choice of immunosuppressive regimen influence outcomes? *Ann. Transplant.*, 2012, 17, 86–99.
- [98] *Steiner, I., Berger, J. R.*: Update on Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.*, 2012, 12, 680–686.
- [99] *Falcone, V., Panning, M., Strahm, B., et al.*: Prolonged KI polyomavirus infection in immunodeficient child. *Emerg. Infect. Dis.*, 2012, 18, 706–708.
- [100] *Bialasiewicz, S., Rockett, R., Whitley, D. W., et al.*: Whole-genome characterization and genotyping of global WU polyomavirus strains. *J. Virol.*, 2010, 84, 6229–6234.
- [101] *Donepudi, S., DeConti, R. C., Samlowski, W. E.*: Recent advances in the understanding of the genetics, etiology, and treatment of Merkel cell carcinoma. *Semin. Oncol.*, 2012, 39, 163–172.
- [102] *Tan, B. H., Busam, K. J.*: Virus-associated Trichodysplasia spinulosa. *Adv. Anat. Pathol.*, 2011, 18, 450–453.

(Reuter Gábor dr,
Pécs, Szabadság u. 7., 7623
e-mail: reuter.gabor@ddr.antsz.hu)

Epidemiological, Clinicopathological and Virological Features of Merkel Cell Carcinomas in Medical Center of University of Pécs, Hungary (2007–2012)

Katalin Barbara Horváth^{1,2} · Péter Pankovics¹ · Endre Kálmán² · Zsolt Kádár³ · Zita Battyáni³ · Zsuzsanna Lengyel³ · Gábor Reuter¹

Received: 13 April 2015 / Accepted: 19 August 2015 / Published online: 26 August 2015
© Arányi Lajos Foundation 2015

Abstract Merkel cell carcinoma (MCC) is a rare, highly aggressive skin tumour. In 2008, a Merkel cell polyomavirus (MC) was identified in MCCs as a potential etiological factor of MCC. The aims of this retrospective study were to investigate the epidemiological, clinicopathological and virological features of MCCs. Between 2007 and 2012, 11 patients had been diagnosed with MCC by histological methods in University of Pécs, Hungary. In eight MCC cases MC was tested by PCR (in primary skin lesions, lymph nodes/cutaneous metastases, MCC neighboring carcinomas). Clinicopathological characteristics (age, histological pattern, lymphovascular invasion, co-morbidities) of MC-positive and MC-negative cases were compared. MC was detected in three (37.5 %) out of eight patients' primary tumour or metastasis. The average age was 73.8 (64.3 in MC-positive group). Except the youngest, 55 year-old patient (the primary tumour appeared on his leg), all tumours were found at the head and neck region. Immunosuppression (steroid therapy, chronic lymphoid leukaemia, chronic obstructive pulmonary disease) and/or old age were characteristic for all cases. Histological pattern was different in MC-positive and in MC-negative groups: MCCs with MC showed more homogeneous histological pattern, lack of lymphovascular invasion and were associated with better prognosis (mortality rate: 33 % versus 80 %). MCC associated with oncogenic virus is a newly recognized clinical

entity. However, MC could not be detected in all histologically proven MCCs. The well-defined selection of patients/disease groups and better characterization of differences between MC-positive and negative cases is an important step towards the recognition of the etiology and pathogenesis of all MCCs.

Keywords Merkel cell polyomavirus · Merkel cell carcinoma · Skin tumour · DNA tumour virus

Introduction

The pathogenic role of infectious agents has already been proved in ~20 % of the human tumours. Merkel cell carcinoma (MCC) is a rare and highly aggressive type of skin cancer. Its origin is uncertain, but it is thought that this (neuroendocrine?/epithelial?) carcinoma arises from the stratum basale [1, 2]. MCC affects mostly elderly and immunosuppressed patients, and it frequently occurs on sun-exposed areas of the skin, especially at the head and neck region [3]. A DNA tumour virus, a Merkel cell polyomavirus (MC), was identified in MCC in 2008 [4]. The discovery opened new perspectives for uncovering the etiology of the disease. The suggested infectious – viral – origin of the disease results in attitude change not only concerning the etiology, but also pathogenesis, diagnostics, and then in the future, prevention and therapy of MCC. The importance of the prognosis is further emphasized by the fact that the lethality of MCC is more than three times higher (46 %) than that of malignant melanoma (12 %) related to all diagnoses [5]. Since its discovery, MC polyomavirus is detected between 71 and 94 % of the MCCs by PCR, worldwide [6]. The MC polyomavirus is not well studied in Hungary. Recently, MC polyomavirus was detected by molecular methods in seven of the eight MCC lesions both in primary

✉ Gábor Reuter
reuter.gabor@gmail.com

¹ Regional Laboratory of Virology, ÁNTSZ Regional Institute of State Public Health Service, Szabadság út 7., Pécs H-7623, Hungary

² Department of Pathology, University of Pécs, Pécs, Hungary

³ Department of Dermatology, Venereology and Oncodermatology, University of Pécs, Pécs, Hungary

tumors and in recurrent lesions in University of Szeged, Szeged, Hungary [7].

The aim of this study was the detection of MC polyomavirus in our series of MCC samples in Southwest Hungary, and the investigation of the epidemiological and clinicopathological characteristics.

Materials and Methods

Sample Selection

Archived skin samples were collected retrospectively from the period between 2007 and 2012 in the Department of Pathology, University of Pécs. The histological diagnosis relied on haematoxylin-eosin morphology and immunophenotype, using monoclonal antibodies as CK20, CD56, Synaptophysin, ChromograninA and TTF1 [8]. All samples were reanalysed histologically in 2012. Beside the primary MCC, the available skin and lymph node metastases, and the basal and squamous cell carcinomas adjacent to some MCCs were also tested. Samples with inadequate DNA quality were excluded from the study.

Viral DNA Isolation and PCR

Viral DNA was isolated from native ($N = 6$) or in paraffin embedded ($N = 9$) tissue samples after deparaffinization using commercial extraction buffer (BK virus PCR kit, Shanghai Biotech, Brussels, Belgium) [9]. MC polyomavirus was detected by PCR method as published previously [4]. In one case, the total genome sequence of the MC polyomavirus was determined by primer walking method.

Detection of non-MC Polyomaviruses in MCC Samples

Newly discovered polyomaviruses, polyomavirus 6, 7, 9 and trichodysplasia spinulosa associated polyomavirus were also screened by PCR method as published previously in MCCs samples [10–12].

Epidemiological and Clinical Data

The patients' data have been collected from the electronic medical reports with special attention to the case history, comorbidities, potential immunosuppressive factors, location of MCC and the time elapsed between the appearance of symptoms and the diagnosis. Clinicopathological characteristics (age, histological picture and lymphovascular invasion, comorbidities) have been evaluated in MC-positive and MC-negative cases.

Results

Altogether, 11 patients have been diagnosed histologically with MCC in the Department of Pathology, University of Pécs between 2007 and 2012. A total of 15 histological samples of the 11 patients were available. Three patients and their samples were excluded from the study because of inadequate sample quality.

Out of the eight patients, two had three different samples, three had two different samples and three patients had one sample each (Table 1). MC polyomavirus was successfully detected by PCR in samples from three (37.5 %) patients' primary tumours (2 samples), skin (1 sample) and lymph node (2 samples) metastases (Table 1). In one patient (No1), the viral genome was present both in the primary skin tumour, and in the skin and lymph node metastases (Table 1). The histologically non-metastatic lymph node (patient No3) was negative for MC by PCR. None of the 15 samples were positive for polyomavirus 6, 7 and 9 by PCR.

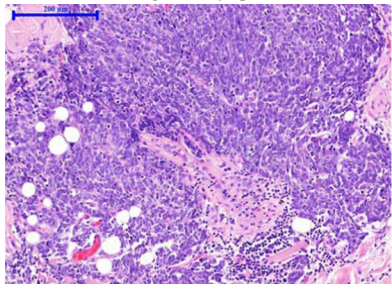
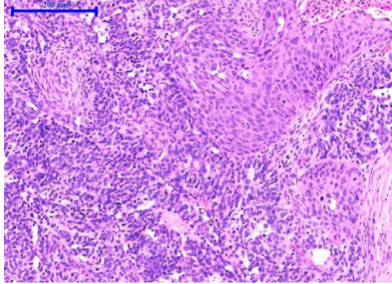
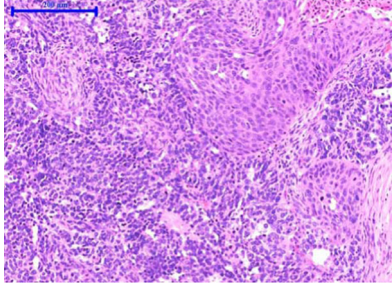
Table 1 summarizes the epidemiological, clinical, virological and histopathological characteristics of the eight patients investigated (Table 1). None of the preliminary clinical diagnoses was MCC before the histological examination. Pyogenic granuloma, keratoacanthoma, basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma were established as primary clinical diagnoses. Out of the eight patients, 6 (75 %) were male and 2 (25 %) were female. In the case of the MC PCR-positive patients, 66 % percent were female and 33 % were male. The year-wise distribution of the histological diagnoses was as follows: one patient in 2007, 2008, and 2012 in each, two patients in 2010, and three patients in 2011. The youngest patient was 55 year old, the oldest was 86. The patients' average age was 73.8 (this was 64.3 in the case of the MC PCR-positive patients). With the exception of the youngest patient (the MC-positive primary tumour appeared on his leg), all tumours were found at the head and neck region (face, forehead, nostril and neck). Factors predisposing to MCC such as immunosuppression (e.g. prolonged oral steroid therapy, chronic lymphoid leukaemia, chronic obstructive pulmonary disease) and/or old age were found in all cases.

Morphological differences could be found in the histological pattern of the MC-positive and MC-negative groups (Table 1). In the MC polyomavirus-associated cases, the histological samples have much more ordered structure (round or oval cells with vesicular nuclei and homogeneous cytoplasm), while the structure of MC-negative cases was much more disordered (irregular, heterogeneous tumour cells having polygonal nuclei and heterogeneous cytoplasm).

Additionally, there were differences regarding lymphovascular invasion of the primary tumour (Fig. 1). While lymphovascular invasion could be observed at the edge of the MC-negative primary tumours, this could not be observed in the MC-positive cases.

Table 1 Epidemiological, clinicopathological, and virological characteristics of the Merkel cell carcinoma including histopathological characteristics of primary skin tumours (Merkel cell carcinoma) in histological samples (haematoxylin-eosin; 14-fold magnification): (A)

Merkel cell polyomavirus can be detected by PCR; (B) Merkel cell polyomavirus can not be detected by PCR. In picture (B), squamous cell carcinomas can also be observed

Epidemiological data			Clinical data			Virological results	Histopathological results	
Patients (sample)	Age (years)	Date of the (histological) diagnosis († death)	Type of the sample	Localization	Co-morbidities	MC-polyomavirus (PCR)	Lymphovascular invasion of primary MCC	Histological pattern
No1 ♂	55	June, 2011 († May, 2013)	MCC	leg	COPD, psoriasis, (PUVA therapy)	+	-	A: round or oval cells with vesicular nuclei and homogeneous cytoplasm 
			skin metastasis	leg (native)		+		
			lymph node	groin (native)		+		
No2 ♀	68	May, 2011	MCC	nostril	pemphigus vulgaris, steroid therapy	+	-	B: irregular, heterogeneous tumour cells with polygonal nuclei, and heterogeneous cytoplasm 
No3 ♀	70	December, 2010	lymph node	neck (native)	severe coronary artery disease	+	-	
			lymph node (histology revealed no metastasis)	neck		-		
No4 ♂	86	November, 2012	MCC	face (native)	stroke basal cell carcinoma	-	+	
No5 ♂	77	November, 2010 († January 2011)	MCC	forehead (native)	seborrhic keratosis, CLL	-	+	
No6 ♂	80	July, 2011 († April 2012)	MCC	face (native)	COPD, diabetes, basal cell carcinoma, hypertonia	-	+	
			lymph node	face		-		
			basal cell carcinoma	face		-		
No7 ♂	77	October, 2007 († June 2010)	MCC	face	COPD basal cell carcinoma	-	+	
			lymph node	neck		-		
No8 ♂	78	November, 2008 († January 2009)	MCC	neck	squamous cell carcinoma	-	+	
			squamous cell carcinoma (in situ)	neck		-		

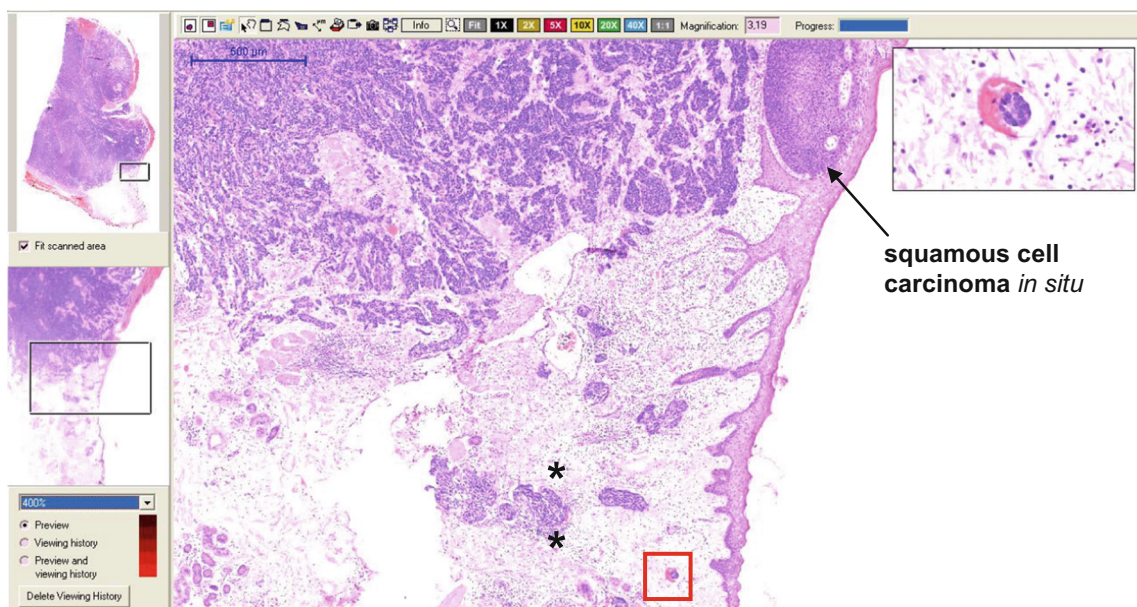


Fig. 1 MC polyomavirus-negative Merkel cell carcinoma (haematoxylin-eosin, 3.19-fold magnification). The invasion of lymphovascular spaces by the tumour cells can be observed at the areas

marked by asterix (*); invasion into a small vascular structure can be seen in the small red square (12.76-fold magnification in the right upper corner); and an in situ squamous cell carcinoma can also be seen

Detailed Characteristics of the Cases

The medical history of the youngest patient (No1) revealed end stage COPD and psoriasis vulgaris (Table 1) treated with PUVA for 8-years. The primary tumour appeared on his left lower leg, which was incompletely excised surgically in June 2, 2011, 2 months after the first appearance. After the histological diagnosis of MCC, the patient experienced a rapid re-growth of the tumour in the primary tumour site and enlarged left inguinal lymph nodes were palpable upon physical examination. In November 2011, primary tumour site was re-operated with wide surgical margins and left inguinal block dissection was performed (Fig. 2). Radiotherapy was introduced to the left groin region. The dissemination of the disease was detected on January 14, 2013. CDDP/EPI chemotherapy was started according to the established guidelines. The

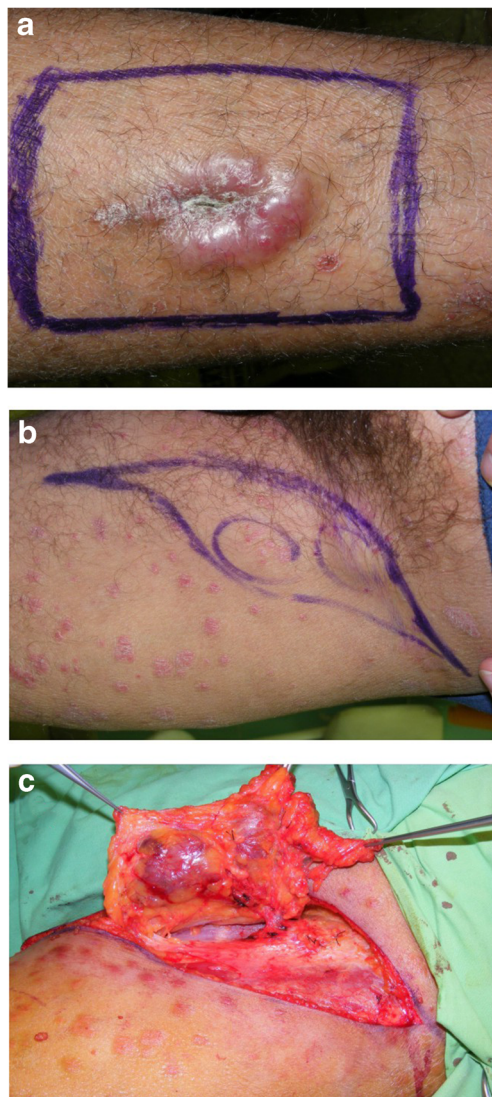


Fig. 2 Recurrent MCC at the primary site of the tumour (a), inguinal lymph nodes metastasis (b) and its surgical excision (c) (Patient No1). Erythro-squamous lesions due to psoriasis were also visible on the skin

control CT-scan showed progression after the 4th treatment cycle. After 6 cycles of chemotherapy the patient died of progressive carcinoma in May 17, 2013. MC polyomavirus could be detected in the paraffin-embedded sample of his primary tumour and the native samples of the skin and lymph node metastases.

Patient No2 was 68 when she was diagnosed with MCC in May 2011. She was diagnosed with pemphigus vulgaris in 2004, and therefore she was administered methylprednisolone and azathioprine daily. In March 19, 2011, there was a growing lesion on her left nostril for about 1 month, which was diagnosed as pyogenic granuloma. She got a surgery date for June 6, 2011 but due to the rapid tissue growth the surgery was done on May 24, 2011. MC-polyomavirus could be detected in the paraffin-embedded sample. Since the operation, the patient is under close observation, and no progression was found to date.

Patient No3 with ischaemic heart disease had an acute myocardial infarction in 1994. She was diagnosed with paroxysmal atrial fibrillation in 2002. She had triple coronary bypass surgery in December 2004 and pacemaker implantation in July 2011. A firm, elastic nodule 10 mm in diameter was removed from her nostril in a city hospital in December 6, 2010. By then, the nodule has already grown for 1 month. The neck ultrasound and the ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy (FNAB) revealed right-sided submandibular lymph node metastasis in March 30, 2011. The neck block dissection was carried out in May 9, 2011. The primary tumour was not available for further analysis. MC polyomavirus could be detected by PCR in the metastatic lymph node. Since the operation, the patient is under close follow-up, and no progression was found to date. In the native metastatic lymph node sample the complete 5392 nucleotide long genome of MC polyomavirus (KC202810) could be determined. The polyomavirus differed from the prototype MC (EU375803) in 10 nucleotides (0.19 %). Truncating point mutation (cytosine to thymine) could be detected at nucleotide position 1461th of the large T (LT)-protein-coding part of the MC polyomavirus genome.

Patient No5 was 77, when he was diagnosed with MCC in November 13, 2010. Previously, he was diagnosed with chronic lymphocytic leukaemia in 2005 and type-II diabetes in 2007. The MCC appeared on his forehead and was rapidly growing towards the vertex. The tumour was $3 \times 3 \times 2$ cm in size, bleeding, and ulcerated by the time of the surgery in November 28, 2010 (Fig. 3). At the same time, a pigmented, reticular type seborrhoeic keratosis 5×5 mm in size was also excised left and caudally from the MCC. MC polyomavirus could not be detected in the paraffin-embedded sample. The patient died 1.5 month after the surgery.

Neighbouring MCC, squamous cell carcinoma in situ could be observed in patient No8, and basal cell carcinoma in patients No4, No6 and No7. In these cases, MC

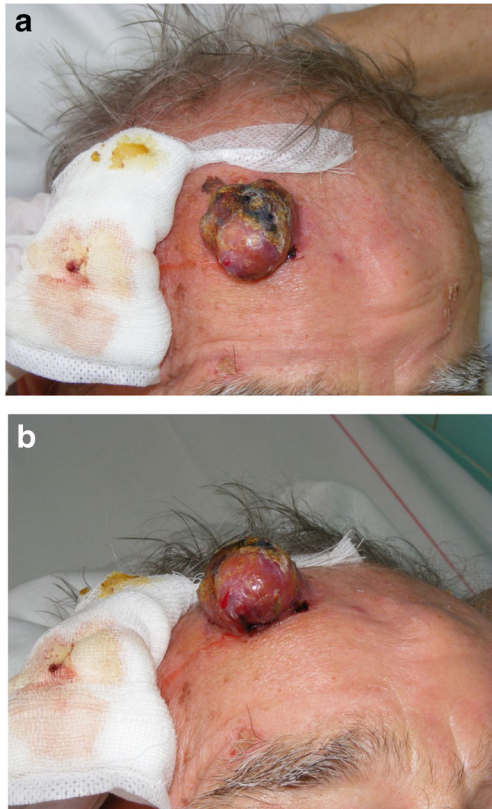


Fig. 3 Merkel cell carcinoma in the right frontal region with 1 month history of appearance (Patient No5). Pigmented seborrhoeic keratosis is visible at left and caudally from the MCC

polyomavirus could not be detected by PCR neither in MCC, nor in associated tumours and metastatic lymph nodes (three native and seven paraffin-embedded samples). Three out of the four patients died meanwhile.

Discussion

Merkel cell carcinoma of the skin was first described by Toker in 1972 as “trabecular carcinoma of the skin” [13]. As an oncogenic virus associated cancer, it is a novel clinical entity. Although this previously rare disease has been known for a long time, the increasing number of the acquired immunosuppressive conditions has led to the increasing occurrence of the disease, and later to the confirmation of the infectious origin [3, 14]. In this study, MC polyomavirus was detected partly in histological samples of MCC by molecular techniques, and in one case the location of the truncating point mutation having crucial role in tumour formation was identified.

None of the preliminary clinical diagnoses raised the suspicion of MCC before the histological examination in cases above, emphasizing the differential diagnostic problem leading to incorrect or incomplete diagnoses in clinical practice. Some of the conditions do not require urgent, wide surgical excision as opposed to the rapidly progressing MCC. The

early recognition of MCC is especially important, since the expected 5-year survival is 79 % in the early stage (I/A), but it is only 18 % by the time of the appearance of the first distant metastasis (stage IV) [5].

The improvement of knowledge, minimization of risk factors, early recognition and effective treatment highly contribute to the increase in MCC patients' survival. We consider the case of the young 55-year-old patient especially instructive, since the development of the MCC and the patient's (early) death was probably activated by a medical treatment (PUVA) of a basically non-lethal disease (psoriasis), which therapy increases the risk of MCC nearly 100-fold [15]. This raises the attention to the fact that risk factors should be known and avoided as much as possible. Patients treated by any means of immunosuppressive method should be followed up closely, and in case of suspicious skin changes, an early intervention is necessary. This also means that similarly to other tumour types, MCC also requires cooperation of different specialists. Close co-operation of the observing physician and the dermatologist, pathologist, oncologist, radiologist, surgeon and in some cases the microbiologist may also be needed.

Although we worked with a relatively small cohort, and our results are based on retrospective data and archival histological samples, we consider our findings important. Considering the epidemiological characteristics of our patients, we should highlight that the average age (73.8 years) was in accordance with the published data (69 years), as was gender distribution (66 % of our patients are male similarly to known international data demonstrating a higher ratio – 59 % - of MCC patients being males) [3]. Considering the localization of the tumour, there was no difference between the virus-associated and virus non-associated cases. Similarly to the literature data, the tumour appeared at the head and neck region in all but one case. In our series in case of the youngest patient the primary tumour developed on a naturally sun-protected area of the leg. All patients' history revealed some factors predisposing to MCC, like immunosuppression and/or old age. In our patients, the most frequent locations of the metastases were the skin and the lymph nodes. This could be observed in three quarter of the cases, which can be partially explained by the fact that the tumours were diagnosed in late stages, and the treatments were ineffective.

Our results can be useful not only for clinical practice but also for laboratory diagnostics. The well-defined selection of patients/disease groups and better characterization of differences between MC-polyomavirus positive and negative cases is an important step towards the recognition of the etiology and pathogenesis of all MCCs. The diagnosis of MCC is based on histological examination. According to our observations, the presence of MC polyomavirus can already be suggested based on the histological examination. The histological pattern of the virus-negative tumour tissues shows much more irregular, heterogeneous tumour cells with polygonal nuclei

and sometimes light-coloured, less uniform cytoplasm. The MC-positive tumour cells are round or oval; they have vesicular nuclei and homogeneous cytoplasm. This study supports the theory that among the histologically proven MCC (more homogeneous histological pattern, lack of lymphovascular invasion) the presence of MC polyomavirus is associated with better prognosis [16–19]. Based on earlier experiences, it seems certain that the virus non-associated cases might represent independent clinicopathological entity, that is similar to the virus-associated type in its clinical manifestation, but differ from it histologically and development. Other types of skin cancer are also commonly found in MC-negative cases, of which the pathomechanism may be better understood in the light of the recent discovery that Merkel cells have epidermal (and not neural crest) origin. So, theoretically, the epidermal premalignant progenitor cells may develop into epithelial or neuroendocrine structures [1, 2, 20]. In MC polyomavirus-negative MCC cases, other factors, such as ultraviolet irradiation alone, immunosenescence and use of immunosuppressants may be involved in the carcinogenesis [3]. Ionizing radiation may also be related to the occurrence of MCC. Consequently, the tumour presumably originates from immature cells in these cases, which may explain the unfavourable prognosis of the MC-negative cases by itself. Although the presence of the MC polyomavirus and the unequivocal integration of its genome into the genome of the MCC cells seem to prove its role in the development of the tumour. However, the exact pathomechanism still raises many questions and requires further investigations [21].

It also deserves attention that the detection of the nucleic acid of MC polyomavirus is not equal to the diagnosis of the carcinoma. According to the present knowledge, only viral nucleic acid integrated in the host cell's genome can be responsible for the development of a malignant tumour [4, 21]. This phenomenon is similar to the carcinogenetic mechanism of human papillomavirus, the closest relative of MC polyomavirus. The virus may be present “innocently” (i.e. it can be detected) e.g. in the cervix, but only human papillomavirus integrated into the genome of the infected host cell can be hold responsible for cervix carcinoma.

There are only small nucleotide differences in the genome of the MC polyomaviruses investigated in different geographical areas. Only every 540th nucleotide of MC polyomavirus found in our patient differs from those of the prototype virus (including the truncating point mutation that results in a stop codon which has a prominent role in the viral oncogenesis). This stops the viral replication and induces the pathological cell proliferation. The former indicates that the evolutionary mutation rate of these viruses having double-stranded DNA genome – related to the whole genome – may be low. This may also mean that the difficulties in the molecular diagnostics originating from the genetic variability should be less considered than that of the RNA viruses characterized by high

mutation rate. Well-developed, sensitive, differentiating molecular biology techniques (based on either quantitative or mutational measurements) will be of significant diagnostic and prognostic importance in the detection of both the virus and the antibodies against the large T antigen (used as a biomarker) in MCC diagnostics in the future.

MC polyomavirus is the first known cancer-causing polyomavirus in human, which has an association with MCC [4]. The potential infectious origin of this aggressive carcinoma leads to a change in attitude in the field of its pathogenesis and diagnostics. However, only detailed disclosure of the pathomechanism of the MCC may lead to effective prevention and specific treatment modalities. MCC with viral origin – similarly to tumours caused by hepatitis B and papillomaviruses – may be preventable by vaccines in the future.

Acknowledgments This work was supported by grant from the Hungarian Scientific Research Fund (OTKA/NKFIH K111615).

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Informed Consent Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

References

1. Woo SH, Stumpfova M, Jensen UB, Lumpkin EA, Owens DM (2010) Identification of epidermal progenitors for the Merkel cell lineage. *Development* 137(23):3965–3971
2. Van Keymeulen A, Mascre G, Youseff KK, Harel I, Michaux C, De Geest N, Szpalski C, Achouri Y, Bloch W, Hassan BA, Blanpain C (2009) Epidermal progenitors give rise to Merkel cells during embryonic development and adult homeostasis. *J Cell Biol* 187(1):91–100
3. Heath M, Jaimes N, Lemos B, Mostaghimi A, Wang LC, Penas PF, 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
4. Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS (2008) Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science* 319(5866):1096–1100
5. Lemos BD, Storer BE, Iyer JG, Phillips JL, Bichakjian CK, Fang LC, Johnson TM, Liegeois-Kwon NJ, Otley CC, Paulson KG, Ross MI, Yu SS, Zeitouni NC, Byrd DR, Sondak VK, Gershenwald JE, Sober AJ, 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
6. Becker JC, Houben R, Uqrel S, Trefzer U, Pföhler C, Schrama D (2009) MC polyomavirus is frequently present in Merkel cell carcinoma of European patients. *J Invest Dermatol* 129(1):248–250
7. Varga E, Kiss M, Szabó K, Kemény L (2009) Detection of Merkel cell polyomavirus DNA in Merkel cell carcinomas. *Br J Dermatol* 161(4):930–932
8. Pilloni L, Manieli C, Senes G, Ribuffo D, Faa G (2009) Merkel cell carcinoma with an unusual immunohistochemical profile. *Eur J Histochem* 53(4):e33

9. Bagasra O (2007) Protocols for the in situ PCR-amplification and detection of mRNA and DNA sequences. *Nat Protoc* 2(11):2782–2795
10. Schowalter RM, Pastrana DV, Pumphrey KA, Moyer AL, Buck CB (2010) Merkel cell polyomavirus and two previously unknown polyomaviruses are chronically shed from human skin. *Cell Host Microbe* 7(6):509–515
11. van der Meijden E, Janssens RW, Lauber C, Bouwes Bavinck JN, Gorbalenya AE, Feltkamp MC (2010) Discovery of a new human polyomavirus associated with trichodysplasia spinulosa in an immunocompromized patient. *PLoS Pathog* 6(7): e1001024
12. Scuda N, Hofmann J, Calvignac-Spencer S, Ruprecht K, Liman P, Kühn J, Hengel H, Ehlers B (2011) A novel human polyomavirus closely related to the African green monkey-derived lymphotropic polyomavirus. *J Virol* 85(9):4586–4590
13. Toker C (1972) Trabecular carcinoma of the skin. *Arch Dermatol* 105(1):107–110
14. Hodgson NC (2005) Merkel cell carcinoma: changing incidence trends. *J Surg Oncol* 89(1):1–4
15. Lunder EJ, Stern RS (1998) Merkel-cell carcinomas in patients treated with methoxsalen and ultraviolet a radiation. *N Engl J Med* 339(17):1247–1248
16. Sihto H, Kukko H, Koljonen V, Sankila R, Böhling T, Joensuu H (2009) Clinical factors associated with Merkel cell polyomavirus infection in Merkel cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 101(13):938–945
17. Laude HC, Jonchère B, Maubec E, Carlotti A, Marinho E, Couturaud B, Peter M, Sastre-Garau X, Avril MF, Duprin N, Rozenberg F (2010) Distinct merkel cell polyomavirus molecular features in tumour and non tumour specimens from patients with merkel cell carcinoma. *PLoS Pathog* 6(8):e1001076
18. Bhatia K, Goedert JJ, Modali R, Preiss L, Ayers LW (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
19. Waltari M, Sihto H, Kukko H, Koljonen V, Sankila R, Böhling T, Joensuu H (2011) Association of Merkel cell polyomavirus infection with tumor p53, KIT, stem cell factor, PDGFR-alpha and survival in Merkel cell carcinoma. *Int J Cancer* 129(3):619–628
20. Busam KJ, Jungbluth AA, Rektman N, Coit D, Pulitzer M, Bini J, Arora R, Hanson NC, Tassello JA, Frosina D, Moore P, Chang Y (2009) Merkel cell polyomavirus expression in merkel cell carcinomas and its absence in combined tumors and pulmonary neuroendocrine carcinomas. *Am J Surg Pathol* 33(9):1378–1385
21. Martel-Jantin C, Filippone C, Cassar O, Peter M, Tomasic G, Vielh P, Brière J, Petrella T, Aubriot-Lorton MH, 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



Short communication

Characterization of an integrated, endogenous mouse mammary tumor virus-like (MMTV) betaretrovirus genome in a black Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*)



Katalin B. Horváth^{a,b}, Ákos Boros^{a,b}, Endre Kálmán^c, Péter Pankovics^{a,b}, Eric Delwart^{d,e}, Gábor Reuter^{a,b,*}

^a Department of Medical Microbiology and Immunology, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary

^b Regional Laboratory of Virology, National Reference Laboratory of Gastroenteric Viruses, ÁNTSZ Regional Institute of State Public Health Service, Pécs, Hungary

^c Department of Pathology, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary

^d Blood Systems Research Institute, San Francisco, CA, USA

^e University of California, San Francisco, CA, USA

ARTICLE INFO

Keywords:

Retrovirus
Provirus
Betaretrovirus
MMTV
Hamster
Tumor

ABSTRACT

Retroviruses (family *Retroviridae*) are important agents of humans and animals. This study reports the detection and complete genome characterization of a novel endogenous retrovirus from the black Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) with a squamous cell skin tumor. The proviral genome, tentatively named black Syrian hamster retrovirus (BSHRV/2013/HUN, MK304634), was 8784 nucleotide in length with typical full-length betaretrovirus genome organization of 5'LTR-gag-pro-pol-env-3'LTR and with a characteristic mouse mammary tumor virus-like (MMTV) betaretrovirus dUTPase domain but without a sag gene. The BSHRV gag (534aa), pro/pol (~1099aa) and env (672aa) proteins had 56%/63%/50% aa identity to the corresponding proteins of MMTV (AF228552). The proviral DNA is detectable in tumor as well as in tumor-free cells by conventional PCR and qPCR but only visible in the tumor cells by *in situ* hybridization. Low level retroviral RNA expression was found only in the DNase-treated RNA tumor samples using RT/nested PCR. BSHRV/2013/HUN-like betaretrovirus DNA was also identified from a faecal and tissue samples from 1 of the further 3 tested individuals by nested-PCR and qPCR. Further research is needed to investigate the distribution, activity and etiological role of this novel MMTV-like betaretrovirus species in hamster.

1. Introduction

The members of the family *Retroviridae* are important pathogens of humans and animals. The ability of some retroviruses to induce tumors has been known since the turn of the 20th century. In 1908, Ellerman and Bang described a chicken erythroleukemia that was caused by a retrovirus followed by isolation of Rous sarcoma virus from a chicken fibrosarcoma by Peyton Rous (Ellerman and Bang, 1908; Rous, 1911). These discoveries mark the beginning of experimentation that led to our current understanding of retroviruses as cancer-causing agents. Subsequent studies extended the general paradigm to mammalian hosts. The discoveries of Bittner and Gross revealed that mouse mammary tumor virus (MMTV) retroviruses were associated with mammary epithelial tumors and thymic lymphomas in mice (Bittner, 1936). The list of animals affected by oncogenic retroviruses expanded as the 20th

century progressed to include cats, cows, rats, mice, sheep, goats, several primates, fish and humans (Dudley, 2011; Feller and Chopra, 1969; Wang et al., 1995).

Endogenous retroviral elements comprise 8% of the total human genome (Lander et al., 2001). Modern-day exogenous retroviruses, as well as the infectious predecessors of endogenous retroviruses (ERVs), are demonstrably oncogenic (Young et al., 2013; Gonzalez-Cao et al., 2016). Further, replication-competent ERVs contribute to cancer development (Kassiotis and Stoye, 2017). Moreover, human cancers are characterized by transcriptional activation of ERVs. These observations combine to incriminate ERVs as potential causative agents of some cancers, too (Kassiotis, 2014).

MMTV, formerly known as Bittner agent, has a causal role in the majority of mouse mammary tumors in feral and experimental mice (Ross, 2008). MMTV is a prototype species of the genus *Betaretrovirus* in

* Corresponding author at: Department of Medical Microbiology and Immunology, Medical School, University of Pécs, H-7624 Szigeti út 12, Pécs, Hungary.
E-mail address: reuter.gabor@gmail.com (G. Reuter).

<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.103995>

Received 12 March 2019; Received in revised form 2 August 2019; Accepted 5 August 2019

Available online 09 August 2019

1567-1348/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

Table 1

List of oligonucleotide primers used in this study. ISH: *in situ* hybridization, AS: anti-sense probe, S: sense probe, Lowercase letters in 5'-3' sequence column: T = RNA polymerase recognition sites.

Application	Primer name	5'-3' sequence	PCR-product size (bp)
1st PCR round	HamREV-972-F-out	CTGCAGTCCCAGTGAAGATAG	672
1st PCR round	HamREV-1643-R-out	CTCTGCCAATGCCCTTGAA	
2nd PCR round (nested)	HamREV-1036-F-in	ACTCGGGCTCAAAGGGACAGAAAA	587
2nd PCR round (nested)	HamREV-1622-R-in	GCCTATGGGTGGCAGGTATTC	
ISH AS probe production	HamREV-2847-F-ISH	GCTCTTGGGAAAGAGCTCCA	191
ISH AS probe production	HamREV-3038-R-T7-ISH	taatacgaactactataggGCTGTAGCTCAGGATTGGG	
ISH S probe production	HamREV-6242-F-T7-ISH	taatacgaactactataggTTACATCCGGTGGTTGGGG	193
ISH S probe production	HamREV-6435-R-ISH	CTGACAGGCAAACAACCAGC	
qPCR standard	HamREV-2540-R	TTTACATCTTGGGCAAATGCCA	428
qPCR standard	HamREV-2113-F	CAGGGATTCAACAAGGCAATGA	
qPCR reaction	HamREV-2310-F	GTATGTGCAGATGCCTCACC	104
qPCR reaction	HamREV-2413-R	CCTCCCCATATGTCTGTTTC	

the family *Retroviridae* (ICTV, 2011). Multiple double-stranded MMTV DNA copies are also found in the chromosomal DNA (called integrated or endogenous proviruses) of laboratory mice (Coffin, 1992). The virus is mostly transmitted vertically (endogenous virus) when embryonic germ-line cells are infected (Cohen and Varmus, 1979), but it is also usually transmitted horizontally through maternal milk, as exogenous virus or milk-borne virus (Bittner, 1936). MMTV-induced mammary tumorigenesis is mediated by proviral integration, usually by enhancer-mediated activation of nearby cellular oncogenes, although coding region insertions that alter the gene product have also been described (Callahan and Smith, 2008; Ross, 2010). Additionally, the MMTV envelope (env) protein has been implicated in mammary tumorigenesis (Katz et al., 2005). The identification of a retrovirus that causes breast cancer in mice created great interest in determining whether similar viruses exist in other species, particularly in humans (Spiegelman et al., 1970; Axel et al., 1972; Mesa-Tejada et al., 1982; Keydar et al., 1984). MMTV-like sequences were identified in humans using nested PCR techniques (Wang et al., 1995; Liu et al., 2001; Lawson et al., 2010): a human endogenous retrovirus K (HERV-K) human mouse mammary tumor virus (HMTV)-like 2 (HML-2) (Hohn et al., 2013; Garcia-Montojo et al., 2018) 90–98% homologous to MMTV has been detected in approximately 40% of breast cancers in American women (Wang et al., 1995) but interpretation of these reports remains controversial.

Hamsters are popular pet animals with Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) and Djungarian hamsters (*Phodopus sungarus*) being among the most frequently kept species. Reports of spontaneous tumors in domestic hamsters are scarce, and most are individual case reports (Kondo et al., 2008). The incidence of tumors in these two species is quite different. In the integumentary system of Syrian hamsters' melanomas and cutaneous lymphoma are the most frequently detected tumors, but both are low in incidence. However, the incidence of cutaneous neoplasias is five times greater in Djungarian than in Syrian hamsters and these are predominantly represented by mammary tumors, atypical fibromas and papillomas (Jelinek et al., 2013).

In the 1960–1970's there were several reports of the isolation of type-C-like retroviruses from hamster cells including the hamster leukaemia virus (HaLV), the hamster sarcoma virus (HaSV) and the D-9 virus was described (Bassin et al., 1968; Kelloff et al., 1970; Somers et al., 1973). These viruses have been reported to have little or no endogenous reverse transcriptase activity and to be unable to transform murine cells (Kelloff et al., 1970; Verma et al., 1974). In 1979, a hamster retrovirus (HaRV) with typical type-C characteristics was described in the continuous culture of natural hamster melanoma cell line (Y-22). The virus differs from all other known hamster viruses in its ability to transform murine as well as rat and hamster cells with apparent one-hit kinetics (Russell et al., 1979). Since then there was no further data in this research area.

This study reports the identification and characterization of the complete genome of a novel MMTV-like betaretrovirus in an integrated

form (provirus) in black Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) by molecular and *in situ* hybridization methods.

2. Materials and methods

2.1. Specimens

Post mortem tumor specimen and tumor-free tissue samples from the tail, liver, testes and lung were collected from a male black Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) pet animal, euthanized for clinical reasons, and used for molecular and histo/immunopathological investigation (Animal 1).

To acquire cellular nucleic acids in a non-invasive way, fresh faecal specimens which are known to contain intestinal epithelial cells were collected from another three, clinically healthy, 12–21-month-old black Syrian hamsters ($n = 2$ female and $n = 1$ male) kept as house pets by three different owners (medical students) in the town of Pécs (Hungary), in May and June 2018 to test for the study sequence. One of these animals (a 1.5-year-old female) died – because of old age - on November 22, 2018. Different *post mortem* tissue specimens (skin, lung, ovaries and liver) collected from this animal (Animal 2) were also tested by (RT/) nested PCR (Table 1) for the studied virus.

2.2. Viral metagenomics

A tumor sample from the face (Fig. 1) of Animal 1 was subjected to viral metagenomic analysis using random nucleic acid amplification of enriched tissue associated viral particles (Victoria et al., 2009). Briefly, phosphate-buffered saline-diluted (PBS) tissue homogenates were passed through a 0.45 μ m sterile filter (Millipore) and centrifuged at 6000 \times g for 5 min (Phan et al., 2013). Then the filtrate was treated with a mixture of DNases and RNases to digest unprotected nucleic acids (Phan et al., 2013). Nucleic acids were then extracted (RNA extraction without DNAase step) using the QIAamp spin-column technique (Qiagen, Hilden, Germany) and subjected to sequence independent random PCR/RT-PCR amplification. A cDNA library was constructed from the extracted RNA by ScriptSeq™ v2 RNA-Seq Library Preparation Kit (Epicentre). The random PCR/RT-PCR amplicons from the cDNA library and the extracted DNA were sequenced by the MiSeq Illumina platform according to the manufacturer's instruction, and as described previously (Phan et al., 2013). Paired-end reads of 250 bp generated by MiSeq are debarcoded using Illumina vendor software. Using an in-house analysis pipeline running on a 36-nodes Linux cluster human and bacterial reads were subtracted by mapping to human reference genome hg38 and bacterial nucleotide sequences from nt using Bowtie 2 (Langmead and Salzberg, 2012). Adaptor and primer sequences were trimmed using the default parameters of VecScreen (Ye et al., 2006). The cleaned reads were then de-novo assembled using Ensemble Assembler (Deng et al., 2015). The assembled contigs > 100-

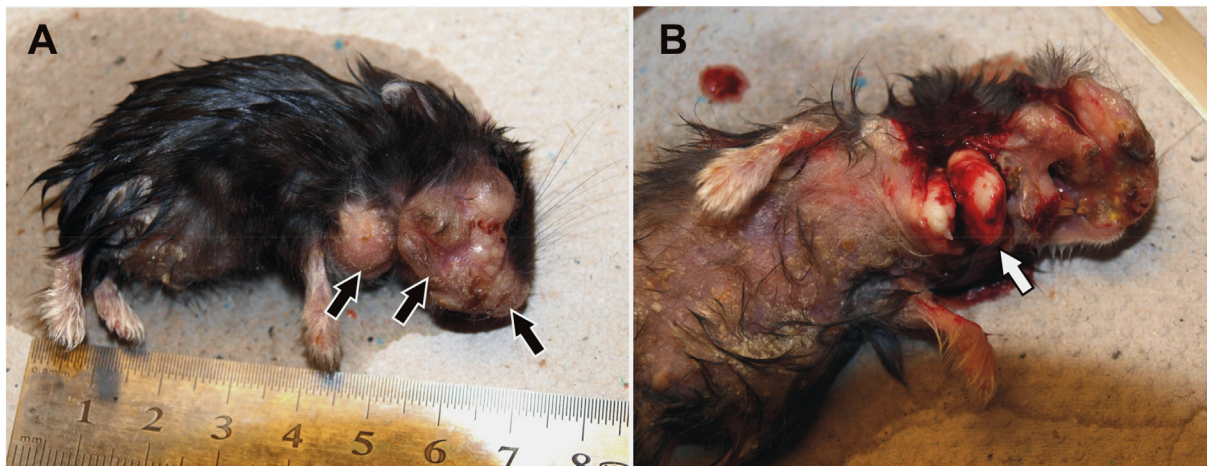


Fig. 1. Gross photography of the affected (euthanized) black Syrian hamster (Animal 1). (A) Primary skin tumor masses are visible on the face, neck and metastasis on the chest area (black arrows). The tumor was circumscribed and white-brown in color. On the cut surface, a large central necrosis circumscribed by homogeneous grayish tissue was apparent. (B) The metastasis on the chest was solid, well circumscribed, measured 0.7 cm in diameter and of white color on cut surface (white arrow). No other metastasis was observed in other parts or organs of the body. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

bp, along with singlets, were aligned to an in-house viral proteome and nucleotide database using GenBank BLASTx and BLASTn using *E*-value cut-off of 10^{-10} . The significant hits to virus were then aligned to an in-house non-virus-non-redundant universal proteome database using DIAMOND (Buchfink et al., 2015). A web-based graphical user interface was used to show the viral matches, along with taxonomy information and processing meta-information. Metagenomic raw reads were submitted and deposited in the NCBI short read archive (SRA) under BioProject PRJNA550124 (Experiment SRX6101754 and Run SRR9335418).

2.3. Complete genome determination and sequencing

The freshly dissected tumor specimen and tumor-free tissue samples from the tail, skin, liver and lung were homogenized separately using a Potter-Elvehjem pestle (Sigma-Aldrich Co., Munich, Germany).

Total RNA and DNA were extracted in separate reactions from approximately 50 mg of freshly homogenized tissue samples and 150–150 μ l of 40 w/v% faecal suspensions (in 0.1 M PBS) using TRI Reagent (Molecular Research Centre, Cincinnati, OH, USA) for RNA isolation and innuPREP DNA Mini Kit (Analytik Jena, Germany) for DNA isolation according to the manufacturer's instructions. To remove the genomic DNA the extracted total RNA samples were digested with DNase I (Thermo Scientific USA Waltham, MA) in the presence of Mg^{2+} for an hour at 37 °C. The efficiency of the DNase treatment was verified by RT-nested PCR without the use of reverse transcriptase enzyme which showed negative results. For the RT-nested PCR outer and inner primer pairs targeting the 5'LTR (long terminal repeat) and P10 junction was used (Table 1).

The complete genome of the black Syrian hamster retrovirus (BSHRV/2013/HUN, GenBank accession number MK304634) was determined by a primer-walking method and PCR techniques using DNA extract from the tumor tissue from Animal 1. Sequence-specific oligonucleotide primers were designed using the retroviral reads and contigs determined by viral metagenomics. Both ends of the genome and the flanking chromosomal regions of the provirus were determined using Thermal Asymmetric Interlaced PCR (TAIL-PCR) method (Liu and Whittier, 1995). The sequences determined by TAIL-PCR and viral metagenomics were verified by conventional and Long Range PCR using reagents and methods described previously (Boros et al., 2012).

PCR products were sequenced directly in both directions using a BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied

Biosystems, Warrington, UK) with the specific primers and run on an automated sequencer (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer; Applied Biosystems, Stafford, USA).

2.4. Sequence- and phylogenetic analysis

ClustalX (version 2.1) and GeneDoc (version 2.7) software were used to align, assemble and compare the study strain and the prototype betaretroviral sequences available in GenBank. The phylogenetic tree from the aligned amino acid sequences of the pol gene was constructed by the neighbor-joining method using MEGA 6 (Tamura et al., 2013). Bootstrap analysis of 1000 replicates was done to measure the significance of branching.

2.5. Integrated viral genome copy number determination using quantitative PCR (qPCR)

For the absolute quantification of integrated viral copy number of tumor, tail, liver and lung tissue samples (10 ng DNA/specimen), the SYBR Green-based qPCR method (Maxima SYBR Green qPCR Master Mix; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) was used according to the manufacturer's instructions. The qPCR reaction mix contained 12.5 μ l 2 \times Maxima SYBR Green/ROX qPCR mastermix and 0.3–0.3 μ l of 20 μ M strain specific HamREV-2310-F and HamREV-2413-R oligonucleotide primers (gag gene, Table 1) and 10–10 ng of isolated total DNA as templates in the final volume of 25 μ l. The qPCR thermal program contained a Pre-Incubation step (95 °C-10 min) followed by a 39 cycles of quantification steps [95 °C-15 s, 57 °C-15 s, 72 °C-33 s] and a dissociation assay and ran both in a plate format on an ABI 7500 qPCR thermal cycler. For the generation of the standard curve, a 10-fold dilution series ($2.26E+06$ – $2.26E+03$) of purified (GeneJet Gel Extraction Kit, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) and spectrophotometrically (NanoDrop ND-1000) quantified 428 bp long PCR product of gag gene were used. The PCR product used for the standard curve includes the target sequences of HamREV-2310-F and HamREV-2413-R oligonucleotide primers (Table 1) of the qPCR reactions. The qPCR assay contained three technical repeats of all samples and standards. The slope of the standard curve was -3.398550 and the calculated PCR efficiency was 99.92% (Supplementary Fig. S1).

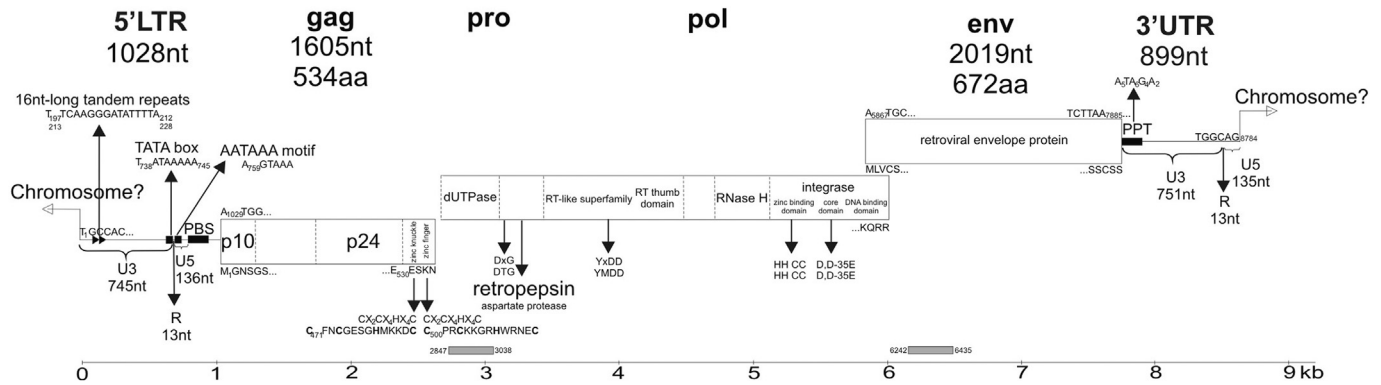


Fig. 2. Schematic organization of the betaretroviral genome of black Syrian hamster retrovirus (BSHRV/2013/HUN, GenBank accession number MK304634). The full length of the provirus is 8784 nt. The sense and antisense ISH probes were located in the presumed dUTPase (sense) and the retroviral envelope protein-coding (antisense) regions (gray lines above the scale). The figure is drawn to scale. Abbreviations: dUTPase = trimeric dUTP (deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotide diphosphatase domain; LTR = long terminal repeat; PBS = primer-binding site; PPT = polypurine tract; U3 = unique 3 region; R = terminal repeat; U5 = unique 5 region.

2.6. Histopathology

Samples (Animal 1) for histopathological examination were fixed in 10% neutral buffered formalin, embedded in paraffin wax, sectioned at 5 µm thick slices and stained with haematoxylin and eosin.

2.7. In situ hybridization

2.7.1. Probe production

Two, 191-nt-long sense, and 193-nt-long antisense Digoxigenin-11-UTP (DIG, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI, USA) labeled RNA probes (Table 1, Fig. 2) were produced using TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit (Thermo Scientific USA Waltham, MA) and T7-promoter-tagged silica-column (Qiagen, Germany) purified PCR products as templates. The sense and antisense probes were located in the presumed dUTPase (sense) and the retroviral envelope protein-coding (antisense) regions (Fig. 2).

The produced DIG-labeled RNA probes were purified using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germany). For the evaluation of the integrity, length and yield of the transcripts the purified samples were run on a 1% agarose gel with ethidium bromide along with RiboRuler™ RNA Ladder (Thermo Scientific USA Waltham, MA). The produced DIG-labeled RNA probes were used for the detection of retroviral DNA and/or RNA using *in situ* hybridization of formalin fixed paraffin embedded slides.

2.7.2. Chromogenic *in situ* hybridization of FFPE sections

Slides of 10 µm thick formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) sections were deparaffinized and rehydrated using xylene and descending concentrations of ethanol (100% to 50%). The rehydrated sections were digested with Proteinase K (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI, USA) at 37 °C for 10 min. After extensive washing with 1 × phosphate-buffered saline (1xPBS, pH 7.4) the samples were post-fixed with freshly prepared 4% paraformaldehyde for 5 min at room temperature (RT). After washing in 1xPBS the slides were acetylated using 0.1 M triethanolamine buffer containing 0.25% acetic anhydride (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI, USA) (pH 8.0). The pre-hybridization was done at 42 °C for 2 h in a pre-hybridization buffer containing 50% deionized formamide, 4 × saline-sodium citrate (SSC), 2.5 × Denhardt's solution, 0.25% yeast RNA. After pre-hybridization the slides were incubated at 80 °C for 5 min (DNA denaturation) then at 42 °C for overnight (probe hybridization) in a hybridization buffer containing 50% deionized formamide, 4 × saline-sodium citrate (SSC), 2.5 × Denhardt's solution, 0.5% yeast RNA, 10% Dextran sulphate and 1.4 µg/ml of the sense or antisense DIG-labeled probes. The slides were washed in 2xSSC at 42 °C for 2 × 15 min followed by washing in 1xSSC at 42 °C for 2 × 30 min in

a rocking shaker. After stringency washing the sections were washed in 1xPBS-0.1% Triton X-100 (1xPBST) and blocked in 1xPBST containing 10% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI, USA) for an hour at RT. After blocking the slides were incubated overnight in an antibody solution of 1xPBST, 1% FBS and 1:1000 alkaline phosphatase conjugated anti-DIG Fab (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI, USA) at 4 °C. After four times washing with 1xPBST for 15 min, and 100 mM Tris(pH 9.5), 100 mM NaCl for 3x5min the sections were developed with NBT/BCIP diluted in 100 mM Tris (pH 9.5), 100 mM NaCl and 1 mM levamisole for three hours. The chromogenic reaction was stopped by extensive washing in 1xPBS and dH₂O. The sections were covered in 87% glycerol. In case of negative control slides the hybridization procedure was the same except in the probe hybridization step where probe-free hybridization buffer was used.

3. Results

3.1. Case description, clinical and gross pathology

A juvenile male black Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) (Animal 1) was purchased in a pet shop in Slovakia, in January 2013 and kept as a pet in Hungary. Three months later a skin tumor developed on the face and neck area of the hamster. During the following three weeks the neoplasia reached 25 mm in diameter and a skin metastasis on the chest. The hamster survived for 6 months and was euthanized by a veterinarian because of unfavorable prognosis (Fig. 1). At *post mortem* pathology the black Syrian hamster body weight was 40 g. The tumor was circumscribed and white-brown in color. On the cut surface a large central necrosis circumscribed by homogeneous grayish tissue was apparent (Fig. 1). The metastasis on the chest was solid, well circumscribed, measured 0.7 cm in diameter and of white color on the cut surface. No other metastasis was observed in other parts of the body.

3.2. Detection of viral sequences by viral metagenomics

The primary tumor tissue from the face (Animal 1) was subjected to viral metagenomics analysis. After *in silico* analysis and *de novo* assembly, 5593 sequence reads were obtained showing similarity to viruses (BLASTx cut-off E score $<10^{-10}$). The detected sequences containing > 100 reads were only from virus family *Retroviridae* ($N = 2284$) and human endogenous retrovirus elements ($N = 613$). The other ($N = 1622$) and unclassified ($N = 1074$) reads were non-viral repeats and non-relevant sequences by *in silico* sequence analysis. The reads corresponding to virus family *Retroviridae* were further analyzed.

3.3. Determination of the retrovirus sequence

Using multiple sequence-specific primer pairs designed against the metagenomic retroviral sequences the viral DNA sequence was detectable from the DNA extracts of the tumor tissue as well as the additional analyzed tissue samples of liver, lung, testes and tail by PCR. These results suggested that retroviral sequence(s) are present in the DNA form likely integrated as a provirus in the hamster genome. Viral RNA was only detectable in the 2nd PCR round of RT nested-PCR in the DNase-treated RNA extract of the tumor but not in the other RNA samples of tumor-free organs.

Using a primer walking method, TAIL-PCR, Long Range PCR (up to 8800 base pairs in length), multiple control PCRs and sequencing the continuous, single and complete genome of the provirus, tentatively named black Syrian hamster retrovirus (BSHRV/2013/HUN, GenBank accession number MK304634), was determined and verified from the DNA sample of the tumor tissue. The BSHRV genome is 8784 nucleotide (nt) in length and the genome organization follows the typical retroviral genome structure, 5'LTR-gag-pro-pol-env-3'LTR with intact coding regions (Fig. 2). BSHRV encodes the capsid/nucleocapsid (gag) proteins; the enzymes (reverse transcriptase and integrase) needed for genome replication (pro/pol) and the envelope proteins (env) that bind the cell surface molecules used for virus entry. Because the BSHRV genome encodes at least all known fundamental retrovirus genome elements and proteins (Fig. 2) it is considered a simple betaretrovirus (MK304634).

3.4. Analysis of the long terminal repeats (LTRs)

Betaretrovirus LTRs are one of the longest known among retroviruses, with a length exceeding 1000 nt. LTRs contain regulatory sequences such as promoters, polyadenylation signals/sites and enhancers, and can therefore dramatically influence the RNA expression of both retroviral and nonretroviral sequences (Guntaka, 1993; Seifarth et al., 2005). At both ends of the BSHRV genome there are 1028 nt-long and 899 nt-long 5' and 3' long terminal repeats (LTRs), respectively. LTR sequences of the virus predicted to start with the sequence T₁GCCAC and ended with TGGCAG₈₇₈₄. The 5' and 3' LTRs (in U3-R-U5 genome part) of BSHRV has 96% sequence identity to each other, respectively.

At the beginning of the BSHRV 5'LTR, a 16 nt-long tandem repeat (T_{197/213}TCAAGGGATATTTTA_{212/228}) with a high T content (44%) were found (Fig. 2). Conserved elements like TATA box (TATAAAAA) at nts 738–745, an AATAAA motif (AGTAAA) at nts 759–764 and C/T rich stretch can be recognized in BSHRV 5'LTR, respectively (Fig. 2). The predicted lengths of the unique 5' region (U5'), the terminal repeat (R) and the U3' regions are 745 nts, 13nts and 270 nts within the 5'LTR, respectively (Fig. 2). An 18 nt-long conserved primer-binding site (PBS) that bound a cellular tRNA (tRNA^{Lys3}) is located at the terminal part of the BSHRV 5'LTR (TGGCGCCCGAACGGGGAC at nts 895–912). This PBS (PBS(Lys3)) compare to the PBS of HIV, SIV and MMTV (Das et al., 1995) is different with 1 nt at the position 907 (A → G). The region between PBS and the gag start codon is 116 nt; the T content is 27% (A + T = 55%) and it does not contain any repeats. Compared to MMTV (X97044) 5'LTR, the BSHRV 5'LTR is shorter by 293 nt and has 39,1% nt identity to each other. There is also a high degree of nt identity (96% and 94%) between BSHRV 5'LTR and *Phodopus sungorus* (Djungarian hamster) endogenous retrovirus MRS-Ps (M63643) 5'LTR and BSHRV 5'LTR and the 5' LTR of dwarf hamster endogenous retrovirus MRS-X3 (S77169), respectively, available 5'LTR sequences in GenBank from years 1991 (Tikhonenko et al., 1995) and 1994 (Vasetskii, 1994).

The 3'LTR is 899 nt in length and is preceded by an 18 nt long polypurine tract (PPT, A5TA6G4A2 at nts 7885–7902) (Fig. 2) involved in plus-strand DNA synthesis (Bowman et al., 1996). The predicted length of the U5, the R and the U3 regions are 751 nts, 13nts and 135

nts within the 3'LTR, respectively (Fig. 2). Corresponding to the 5'LTR, conserved 3'LTR elements like TATA box (TATAAAAA) at nts 8629–8636 and AATAAA motif (AGTAAA) at nts 8650–8655 can be recognized in BSHRV 3'LTR, respectively. The 3'LTR of BSHRV does not contain any repeats. There is a high degree (93%) of nt identity between BSHRV 3'LTR and dwarf hamster endogenous retrovirus (S77150) 3'LTR.

Only at the express request of the manuscript Reviewer we completed the possible retroviral integration time based on the strongly hypothesis-based mathematical calculation ($t = k/2N$; $k =$ divergence; $N =$ nucleotide substitution rate of host genome) (Martins and Villesen, 2011). A wide range of possible integration time was calculated, between 1639 years to 6.7 million years, depending on the available nucleotide substitution rate of rodent hosts. The authors do not draw conclusions from this result because of its unreliability.

3.5. Analysis of the coding region

The start codon for gag is present at nts 1029–1031 (A₁₀₂₉UGG). The gag, pro/pol and env genes were encoded in three different reading frames (Fig. 2). The gag is 534 amino acids (aa) long and contains the structural betaretrovirus proteins, p10 and p24 (core nucleocapsid protein), a zinc knuckle and the gag-polyprotein viral zinc-finger (Fig. 2). The BSHRV gag protein is 57 aa shorter than the gag protein in MMTV and has 56% aa identity to the corresponding gag protein of MMTV (AF228552). The pro includes the deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotide hydrolase (dUTPase, trimeric dUTP bisphosphatase, dut gene) domain and the retropepsin (aspartate protease). Because the gag-pro-pol gene is translated by ribosomal frameshifting, exact N- and C-terminal ends of the pro proteins are difficult to assign. The pol gene is comprised from nt 3370 to nt 6036. The pol encodes the basic retroviral enzymes the reverse transcriptase (RT) including the RT thumb domain, which is composed of a four-helix bundle, the RNase H transcriptase and the integrase. The highly conserved aa sequence of tyrosine (Y)-methionine (M)-aspartic acid (D)-aspartic acid (D) (YMDD motif) is present in the catalytic domain C of viral RT (Tipples et al., 1996) as well as the active residues ((H)-histidine (C)-cysteine and D,D-35(E)-glutamic acid) of the integrase (Fig. 2). The pro/pol polyprotein (~1099aa) of BSHRV has 63% aa identity to the corresponding protein of MMTV (AF228551). Env gene is comprised from 5867 nt to 7885 nt (672 aa) encoding the surface and transmembrane glycoproteins including the envelope glycoprotein of the viral envelope. The env polyprotein of BSHRV has 50% aa identity to the corresponding protein of MMTV (AF228552). No significant reading frame preceded by a start codon is found downstream of the env gene, suggesting that BSHRV does not encode a MMTV-like superantigen (sag) in 3'LTR.

The possible integration site (or sites) of the proviral BSHRV in the host genome is could not be determined. Identical betaretrovirus coding (intact) protein sequences were not identified in the available genome of the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) (taxid: 10036) and the Chinese hamsters (*Cricetulus griseus*) genomes (taxid: 10029) using blastx (Reference proteins, refseq_protein database) in GenBank. BLASTn search of the full length BSHRV genome (MK304634) against MesAur1.0 - which contains genomic (non intact) scaffold sequences of a female Golden Hamster (ID: GCA_000349665.1) - showed only moderate sequence identity (65.81%) and low query coverage (40%) to a scaffold sequence (ID: 01962; NW_004803565.1) as the closest match. This result could suggest that BSHRV are not consistently present in all genomes of golden hamsters or the available hamster genome sequences.

3.6. Phylogenetic analysis

Phylogenetic analysis of the translated pol and env genes of BSHRV was performed using the neighbor-joining option in MEGA6 and reference sequences from betaretroviruses indicating that BSHRV is

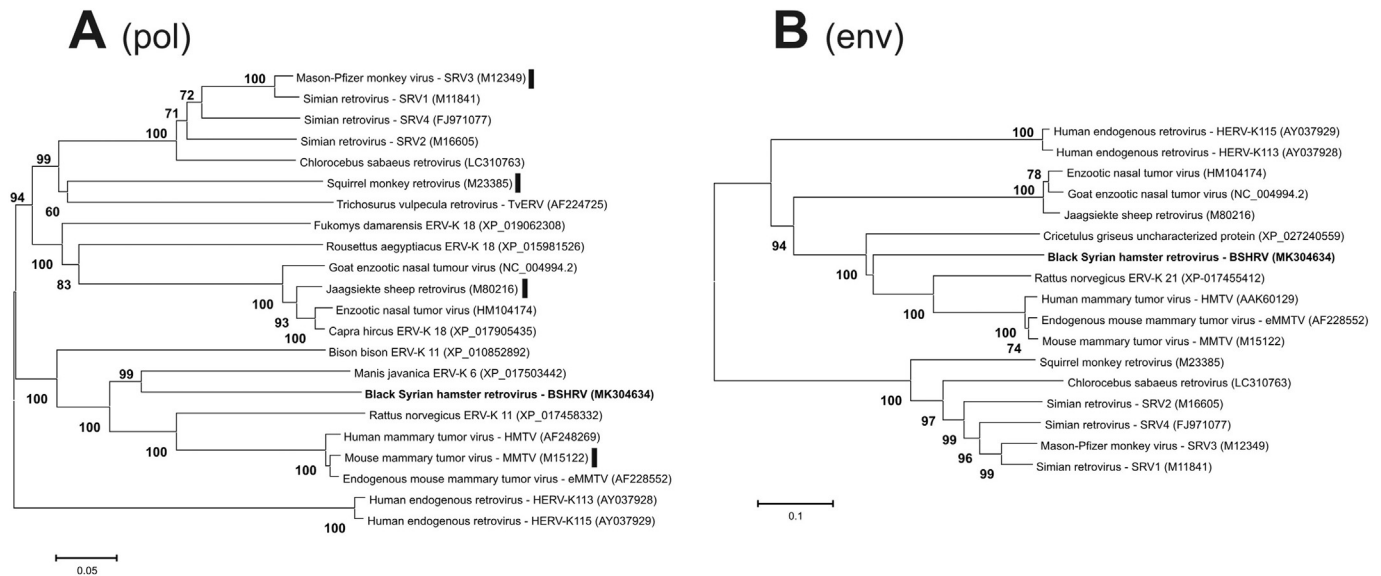


Fig. 3. Phylogenetic analysis of the translated (aa) pol (A) and env (B) genes of BSHRV/2013/HUN (GenBank accession number MK304634, bold letters) using the neighbor-joining option in MEGA6 and reference sequences from betaretroviruses. 1000 bootstrap replicates were analyzed. Bootstrap values > 50 are shown. Sequences had been aligned using the Clustal X program. Vertical black lines indicate the prototype members of the known betaretrovirus species.

situated phylogenetically in a cluster with MMTV confirming the genetic relationship (Fig. 3), however, it could represent a novel betaretrovirus species.

3.7. Histological findings

The haematoxylin and eosin stained histological sections of the tumor (Animal 1) demonstrate a well-differentiated squamous cell carcinoma. The fibroblastic neostroma is infiltrated with typical flame-like tongues of centrally keratinized tumor cell nests (Fig. 4A and B).

3.8. *In situ* hybridization

BSHRV-specific hybridization was predominantly restricted to the proliferating tumor cells of the squamous epithelium which formed numerous concentric keratin nodules (Fig. 4). The hybridizations were observable mainly in the nuclei of the tumor cells in sections hybridized with either sense or antisense probes (Fig. 4C and D). Furthermore, the localization of the hybridization signals were essentially the same in the sections labeled with the sense or the antisense probes (Fig. 4C and D). These results suggest that the probes were detecting the integrated proviral DNA of BSHRV not the viral RNA. There was no visible specific hybridization signal in the negative control sections (Supplementary Fig. S2).

3.9. Detection of BSHRV-like betaretrovirus sequence from further black Syrian hamsters

One of the three DNA extracts from faecal specimens collected from further three animals were strong positive for BSHRV-like betaretrovirus by nested-PCR and sequencing. The amplified 538 nt long gag gene sequence had 99.4% nt identity to the corresponding regions of BSHRV/2013/HUN. This animal (a 1.5-year-old female, Animal 2) died – because of the old age - on November 22, 2018. Different *post mortem* tissue specimens (skin, lung, ovaries and liver) were collected and all specimens tested also positive by nested PCR for the novel betaretrovirus.

3.10. Integrated BSHRV-like betaretrovirus genome copy number determination using qPCR

Based on the results of qPCR analysis the tumor, liver and lung samples of the black Syrian hamster with differentiated squamous cell skin cancer contained similar numbers of integrated viral copies ($\sim 1.18E + 04/\text{ng}$ DNA, Table 2), while the tail sample contained nearly twice as large a copy number of integrated viral genomes ($2.03E + 04/\text{ng}$ DNA, Table 2). Interestingly, the integrated viral genome copy numbers of the tissue samples of the tumor-free animal (Animal 2) were *ca.* one order of magnitude higher (ranged between $1.11E + 05/\text{ng}$ DNA and $1.76E + 05/\text{ng}$ DNA) than the animal (Animal 1) with skin tumor (Table 2).

4. Discussion

In this study, using viral metagenomics, histological analysis, *in situ* hybridization, PCR, RT-PCR and qPCR approaches, we report the serendipitous identification, complete genome characterization and analysis of a novel endogenous retrovirus sequence, that was named black Syrian hamster retrovirus (BSHRV), in a black Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) that presented with differentiated squamous cell skin cancer. Taxonomically, the golden and Syrian hamsters are identical (*M. auratus*) (https://www.ensembl.org/Mesocricetus_auratus/Info/Annotation). Black Syrian hamsters are color variations of *M. auratus*.

The BSHRV retroviral DNA sequence was detectable from the DNA extracts of the tumor tissue as well as the additional analyzed tissue samples of liver, lung, testes and tail collected from the same animal by conventional PCR and qPCR. These results suggested that the retroviral sequence(s) is possibly present in integrated form in this host germ-line, as a provirus. Interestingly, the BSHRV retroviral RNA was detectable only in the 2nd PCR round of RT nested-PCR in the DNase-treated RNA sample of the tumor but not in the other RNA samples of tumor-free organs which suggest a low level viral RNA expression in the tumor but not in the other analyzed tissues. The BSHRV retroviral DNA sequence was also identified in a faecal (most likely from host cells present in the faeces) and other tissue samples (skin, lung, ovaries and liver) – showing the same systemic distribution as in the diseased animal – collected from an additional black Syrian hamster that was clinically healthy at the time of the specimen's collection. Interestingly, the

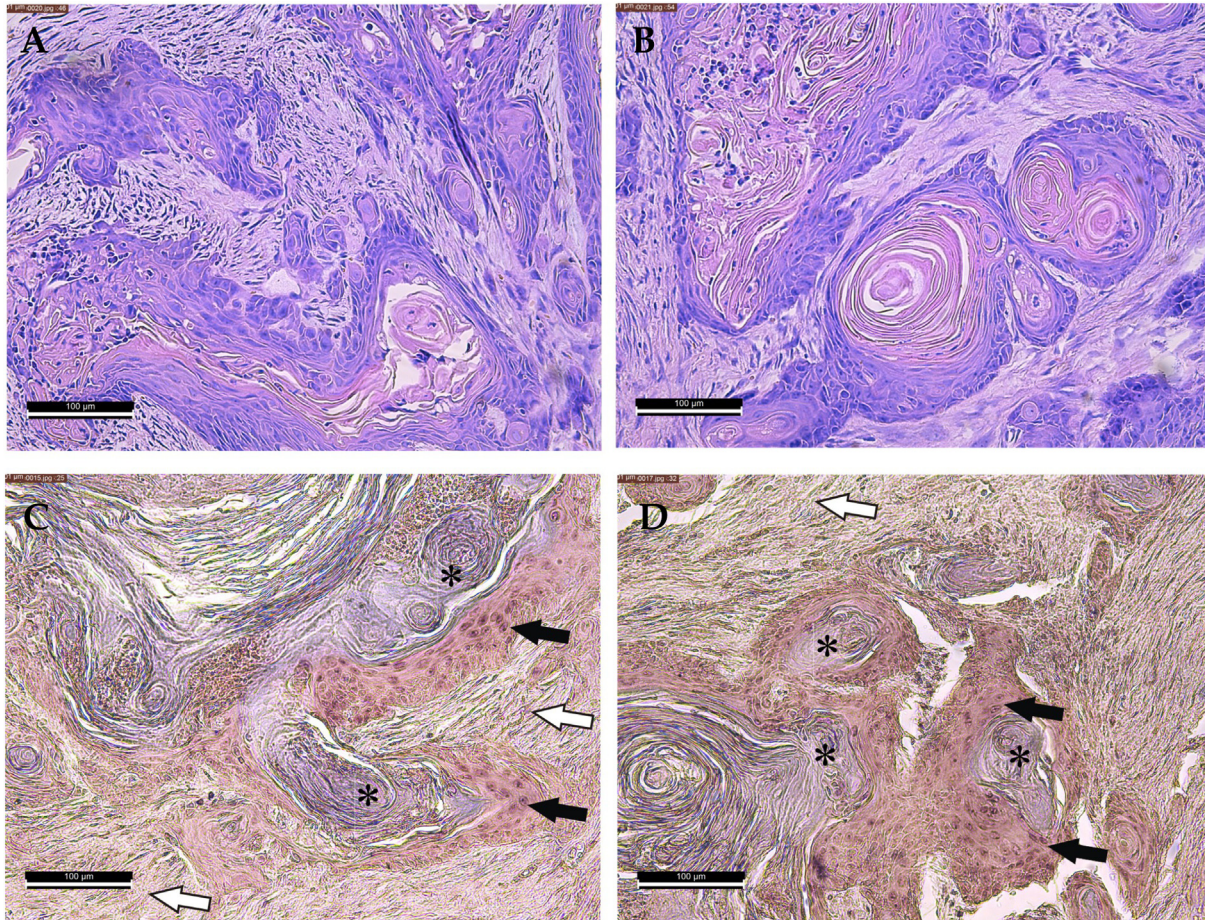


Fig. 4. Sections from squamous cell skin tumor of a black Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) (Animal 1) stained with Haematoxylin and eosin (A) and (B) and chromogenic ISH using sense (C) or antisense (D) probes. Black arrows indicate the stained nuclei of BSHRV-positive tumor cells surrounding the concentric keratin nodules (asterisks). White arrows indicate the BSHRV-negative, potentially tumor-free cells.

Table 2

Summary of the results of absolute quantification of integrated viral copy number in a hamster with a skin tumor (Animal 1) and a clinically healthy hamster (Animal 2) using SYBR-Green based qPCR. Ct: threshold cycle; SD: standard deviation.

Tested animals	Sample type	Average Ct	SD (Ct)	Average copy number/ng DNA
Animal 1	skin tumor	20.3888	0.078	1.18E+04
	liver	20.4348	0.349	1.17E+04
	lung	20.3701	0.064	1.20E+04
Animal 2	tail	19.5900	0.039	2.03E+04
	skin	16.4016	0.057	1.76E+05
	liver	17.7126	0.052	1.11E+05
	lung	16.4566	0.026	1.70E+05

integrated viral genome copy numbers were > 10 times higher in tissue specimens in tumor-free animal than animal with skin cancer. The association between the BSHRV and the skin tumor in hamster remains unknown. A non-viral etiology for tumor formation in the presented case is also the possible. To prove that BSHRV, as do oncogenic retroviruses (Braoudaki and Tzortzotou-Stathopoulou, 2011), influences or contributes to tumor genesis and therefore capable of transforming normal cells into malignant cells will require further studies. Further studies also need to investigate the origin of the BSHRV retroviral DNA shedding in the hamster faecal sample. Interestingly, counterpart study investigating the faeces for the “milk-transmitted” MMTV is not known for mice – to our best knowledge.

The BSHRV retrovirus genome had full length and typical

betaretroviral genome features and organization of 5’LTR-gag-pro-pol-env-3’LTR with the dUTPase domain but without the superantigen (sag) gene in 3’LTR (Hayward et al., 2013). The continuous and single proviral nucleotide sequence was verified by amplification of the full length betaretrovirus genome by Long Range PCR and Sanger sequencing. In the translated region, the gag gene encodes the characteristic betaretrovirus elements p10, p24 (capsid), zinc knuckle and the zinc finger. The pro gene encodes the dUTPase and the retropepsin. The pol gene includes the reverse transcriptase (RT), the RNase H and the integrase. The env gene encodes the envelope proteins. The complete and intact LTR/coding proviral genome regions of BSHRV are remarkable and one of the prerequisites for a viral replication and production of potential viable retrovirus particles.

By sequence- and phylogenetic analysis the proteins of the BSHRV had high aa sequence diversity from the known members of the betaretrovirus species. BSHRV represents a potential novel betaretrovirus species but its proteins had the closest relationship to the corresponding proteins of mouse mammary tumor virus (MMTV) betaretrovirus. MMTV is an important prototype member of the betaretroviruses associated with tumors in mice. In this context, the determination of a novel sequence relative of MMTV-like betaretrovirus in a novel mammal host species increases the knowledge of the sequence diversity of these retroviruses. It would be worth considering this betaretrovirus sequence variant in screening primer design for PCR in human and animal prevalence studies in the future.

There are several important open questions related to BSHRV. Based on the methods used in this study the endogenous retrovirus nature, the DNA copy number(s) in the host genome and the integration site(s)

remains unknown in either the tumor or the germ-line. The viral particle nature and the transmission mode(s) of the potential exogenous form of BSHRV virions are also undetermined. Functional analysis of BSHRV by RNA expression in different tissues, electron microscopy and Southern blotting with specific probes maybe brings us closer to the answers. BSHRV or BSHTV-like complete betaretrovirus sequences have not been reported from hamsters and could not be identified in the available assembled genome databases of hamsters. Further study is required to determine the prevalence and biological significance – including in tumorigenesis - of BSHRV and BSHRV-like betaretroviruses in different genetic lineages of hamsters and other mammals.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.103995>.

Funding

This work was financially supported by a grant from the Hungarian Scientific Research Fund (OTKA/NKFIH K111615).

Author agreement/declaration

All authors have seen and approved the final version of the manuscript being submitted. They warrant that the article is the authors' original work, hasn't received prior publication and isn't under consideration for publication elsewhere.

Declaration of Competing Interest

No conflicts exist.

Acknowledgements

Á.B. and P.P. are supported by the János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences.

References

- Axel, R., Schlom, J., Spiegelman, S., 1972. Presence in human breast cancer of RNA homologous to mouse mammary tumour virus RNA. *Nature* 235 (5332), 32–36.
- Bassini, R.H., Simons, P.J., Chesterman, F.C., Harvey, J.J., 1968. Murine sarcoma virus (Harvey): characteristics of focus formation in mouse embryo cell cultures, and virus production by hamster tumor cells. *Int. J. Cancer* 3 (2), 265–272.
- Bittner, J.J., 1936. Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice. *Science* 84 (2172), 162.
- Boros, A., Pankovics, P., Knowles, N.J., Reuter, G., 2012. Natural interspecies recombinant bovine/porcine enterovirus in sheep. *J. Gen. Virol.* 93 (9), 1941–1951 Pt.
- Bowman, E.H., Pathak, V.K., Hu, W.S., 1996. Efficient initiation and strand transfer of polypurine tract-primed plus-strand DNA prevent strand transfer of internally initiated plus-strand DNA. *J. Virol.* 70 (3), 1687–1694.
- Braoudaki, M., Tzortzatou-Stathopoulou, F., 2011. Tumorigenesis related to retroviral infections. *J. Infect. Dev. Ctries.* 5 (11), 751–758.
- Buchfink, B., Xie, C., Huson, D.H., 2015. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nat. Methods* 12, 59–60.
- Callahan, R., Smith, G.H., 2008. Common integration sites for MMTV in viral induced mouse mammary tumors. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 13 (3), 309–321.
- Coffin, J.M., 1992. Superantigens and endogenous retroviruses: a confluence of puzzles. *Science* 255 (5043), 411–413.
- Cohen, J.C., Varmus, H.E., 1979. Endogenous mammary tumour virus DNA varies among wild mice and segregates during inbreeding. *Nature* 278 (5703), 418–423.
- Das, A.T., Klaver, B., Berkhout, B., 1995. Reduced replication of human immunodeficiency virus type 1 mutants that use reverse transcription primers other than the natural tRNS3 Lys. *J. Virol.* 69 (5), 3090–3097.
- Deng, X., Naccache, S.N., Ng, T., Federman, S., Li, L., Chiu, C.Y., Delwart, E.L., 2015. An ensemble strategy that significantly improves de novo assembly of microbial genomes from metagenomic next-generation sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 43, e46.
- Dudley, J., 2011. *Retroviruses and insights into cancer*, 1 ed. Springer, New York.
- Ellerman, V., Bang, O., 1908. Experimentelle Leukämie bei Hühnern. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt.* 46, 595–609.
- Feller, W.F., Chopra, H.C., 1969. Studies of human milk in relation to the possible viral etiology of breast cancer. *Cancer* 24 (6), 1250–1254.
- Garcia-Montojo, M., Doucet-O'Hare, T., Henderson, L., Nath, A., 2018. Human endogenous retrovirus-K (HML-2): a comprehensive review. *Crit. Rev. Microbiol.* 44, 715–738.
- Gonzalez-Cao, M., Iduma, P., Karachaliou, N., Santaripa, M., Blanco, J., Rosell, R., 2016. Human endogenous retroviruses and cancer. *Cancer Biol. Med.* 13 (4), 483–488.
- Guntaka, R.V., 1993. Transcription termination and polyadenylation in retroviruses. *Microbiol. Rev.* 57 (3), 511–521.
- Hayward, J.A., Tachedjian, M., Cui, J., Field, H., Holmes, E.C., Wang, L.F., Tachedjian, G., 2013. Identification of diverse full-length endogenous betaretroviruses in megabats and microbats. *Retrovirology* 10, 35.
- Hohn, O., Hanke, K., Bannert, N., 2013. HERV-K(HML-2), the best preserve family of HERVs: endogenization, expression, and implications in health and disease. *Front. Oncol.* 3, 246.
- ICTV, 2011. 9th Report. *Retroviridae*. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/reverse-transcribing-dna-and-rna-viruses-2011/w/rt_viruses/161/retroviridae (accessed on 18.12.2018).
- Jelinek, F., Felsberg, J., Mestan, M., 2013. Familial incidence of mammary gland tumours in the Djungarian hamster (*Phodopus sungarus*): a case report. *Vet. Med.* 58, 442–448.
- Kassiotis, G., 2014. Endogenous retroviruses and the development of cancer. *J. Immunol.* 192 (4), 1343–1349.
- Kassiotis, G., Stoye, J.P., 2017. Making a virtue of necessity: the pleiotropic role of human endogenous retroviruses in cancer. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* 372 (1732).
- Katz, E., Lareef, M.H., Rassa, J.C., Grande, S.M., King, L.B., Russo, J., Ross, S.R., Monroe, J.G., 2005. MMTV Env encodes an ITAM responsible for transformation of mammary epithelial cells in three-dimensional culture. *J. Exp. Med.* 201 (3), 431–439.
- Kelloff, G., Huebner, R.J., Lee, Y.K., Toni, R., Gilden, R., 1970. Hamster-tropic sarcomagenic and nonsarcomagenic viruses derived from hamster tumors induced by the gross pseudotype of Moloney sarcoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 65 (2), 310–317.
- Keydar, I., Ohno, T., Nayak, R., Sweet, R., Simoni, F., Weiss, F., Karby, S., Mesa-Tejada, R., Spiegelman, S., 1984. Properties of retrovirus-like particles produced by a human breast carcinoma cell line: immunological relationship with mouse mammary tumor virus proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81 (13), 4188–4192.
- Kondo, H., Onuma, M., Shibuya, H., Sato, T., 2008. Spontaneous tumors in domestic hamsters. *Vet. Pathol.* 45 (5), 674–680.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., et al., 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409 (6822), 860–921.
- Langmead, B., Salzberg, S.L., 2012. Fast gapped-read alignment with bowtie 2. *Nat. Methods* 9, 357–359.
- Lawson, J.S., Glenn, W.K., Salmons, B., Ye, Y., Heng, B., Moody, P., Johal, H., Rawlinson, W.D., Delprado, W., Lutze-Mann, L., et al., 2010. Mouse mammary tumor virus-like sequences in human breast cancer. *Cancer Res.* 70 (9), 3576–3585.
- Liu, Y.G., Whittier, R.F., 1995. Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics* 25 (3), 674–681.
- Liu, B., Wang, Y., Melana, S.M., Pelisson, I., Najfeld, V., Holland, J.F., Pogo, B.G., 2001. Identification of a proviral structure in human breast cancer. *Cancer Res.* 61 (4), 1754–1759.
- Martins, H., Villesen, P., 2011. Improved integration time estimation of endogenous retroviruses with phylogenetic data. *PLoS One* 6, e14745.
- Mesa-Tejada, R., Oster, M.W., Fenoglio, C.M., Magidson, J., Spiegelman, S., 1982. Diagnosis of primary breast carcinoma through immunohistochemical detection of antigen related to mouse mammary tumor virus in metastatic lesions: a report of two cases. *Cancer* 49 (2), 261–268.
- Phan, T.G., Vo, N.P., Boros, A., Pankovics, P., Reuter, G., Li, O.T., Wang, C., Deng, X., Poon, L.L., Delwart, E., 2013. The viruses of wild pigeon droppings. *PLoS One* 8 (9), e72787.
- Ross, S.R., 2008. MMTV infectious cycle and the contribution of virus-encoded proteins to transformation of mammary tissue. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 13 (3), 299–307.
- Ross, S.R., 2010. Mouse mammary tumor virus molecular biology and oncogenesis. *Viruses* 2 (9), 2000–2012.
- Rous, P., 1911. A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *J. Exp. Med.* 13 (4), 397–411.
- Russell, P., Gregerson, D.S., Albert, D.M., Reid, T.W., 1979. Characteristics of a retrovirus associated with a hamster melanoma. *J. Gen. Virol.* 43 (2), 317–326.
- Seifarth, W., Frank, O., Zeilfelder, U., Spiess, B., Greenwood, A.D., Hehlmann, R., Leib-Mosch, C., 2005. Comprehensive analysis of human endogenous retrovirus transcriptional activity in human tissues with a retrovirus-specific microarray. *J. Virol.* 79 (1), 341–352.
- Somers, K.D., May, J.T., Kit, S., McCormick, K.J., Hatch, G.G., Stenback, W.A., Trentin, J.J., 1973. Biochemical properties of a defective hamster C-type oncornavirus. *Intervirology* 1 (1), 11–18.
- Spiegelman, S., Burny, A., Das, M.R., Keydar, J., Schlom, J., Travnicek, M., Watson, K., 1970. Characterization of the products of DNA-directed DNA polymerases in oncogenic RNA viruses. *Nature* 227 (5258), 563–567.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30 (12), 2725–2729.
- Tikhonenko, A.T., Polotskaya, A.V., Vassetzky III, N.S., Golovkina, T.V., Gudkov, A.V., 1995. Long terminal repeats of dwarf hamster endogenous retrovirus are highly diverged and do not maintain efficient transcription. *Virology* 181 (1), 367–370.
- Tipples, G.A., Ma, M.M., Fischer, K.P., Bain, V.G., Kneteman, N.M., Tyrrell, D.L., 1996. Mutation in HBV RNA-dependent DNA polymerase confers resistance to lamivudine in vivo. *Hepatology* 24 (3), 714–717.
- Vasetskii, N.S., 1994. Analysis of the sequence of the endogenous Djungarian hamster provirus (MRS-Ps) related to the murine mammary cancer virus. *Mol. Biol. (Mosk)* 28 (4), 900–908.
- Verma, I.M., Meuth, N.L., Fan, H., Baltimore, D., 1974. Hamster leukemia virus: lack of endogenous DNA synthesis and unique structure of its DNA polymerase. *J. Virol.* 13 (5), 1075–1082.

- Victoria, J.G., Kapoor, A., Li, L., Blinkova, O., Slikas, B., Wang, C., Naeem, A., Zaidi, S., Delwart, E., 2009. Metagenomic analyses of viruses in stool samples from children with acute flaccid paralysis. *J. Virol.* 83 (9), 4642–4651.
- Wang, Y., Holland, J.F., Bleiweiss, I.J., Melana, S., Liu, X., Pelisson, I., Cantarella, A., Stellrecht, K., Mani, S., Pogo, B.G., 1995. Detection of mammary tumor virus env gene-like sequences in human breast cancer. *Cancer Res.* 55 (22), 5173–5179.
- Ye, J., McGinnis, S., Madden, T.L., 2006. BLAST: improvements for better sequence analysis. *Nucleic Acids Res.* 34, W6–W9.
- Young, G.R., Stoye, J.P., Kassiotis, G., 2013. Are human endogenous retroviruses pathogenic? An approach to testing the hypothesis. *Bioessays* 35 (9), 794–803.