

Figure 3

Genome organization of Merkel cell carcinoma. The wild-type Merkel cell polyomavirus genome is 5,387 bp long and contains a noncoding regulatory region (NCRR), from which the virus bidirectionally encodes for early and late proteins. In addition to the early and late transcriptional promoters, the NCRR also contains the viral origin (*red*), which can be mapped to 71 bp of contiguous sequence recognized by the large tumor antigen (LT). LT, small T antigen (sT), and 57-kT antigen constitute the gene products of the early region. Viral protein 1 (VP1) and VP2 are late proteins required for capsid formation and viral replication.

Serology & Prevalence

- ◆ Like other human polyomaviruses, MCPyV is highly prevalent in the healthy population, with up to 60–70% of adults showing serum reactivity against the VP1 protein.
- ◆ Primary infection is thought to occur in early childhood and is likely to be clinically inapparent.
- ◆ Patients with MCPyV-positive MCC exhibit higher anti-body titers than those with tumors that are negative for the virus. Considering that integrated viral genomes in MCC tissues are replication defective, this observation supports the hypothesis that increased viral replication precedes tumorigenesis, likely as a result of a loss of efficient immune surveillance in immunosuppressed or elderly individuals.
- ◆ In contrast to VP1 specific antibodies, seroreactivity against early gene products can only be detected in rare cases and at very low levels in the general population. However, patients with virus positive MCC demonstrate high T-Antigen titers, suggesting that LT levels during natural MCPyV infection are tightly regulated to avoid immune recognition.

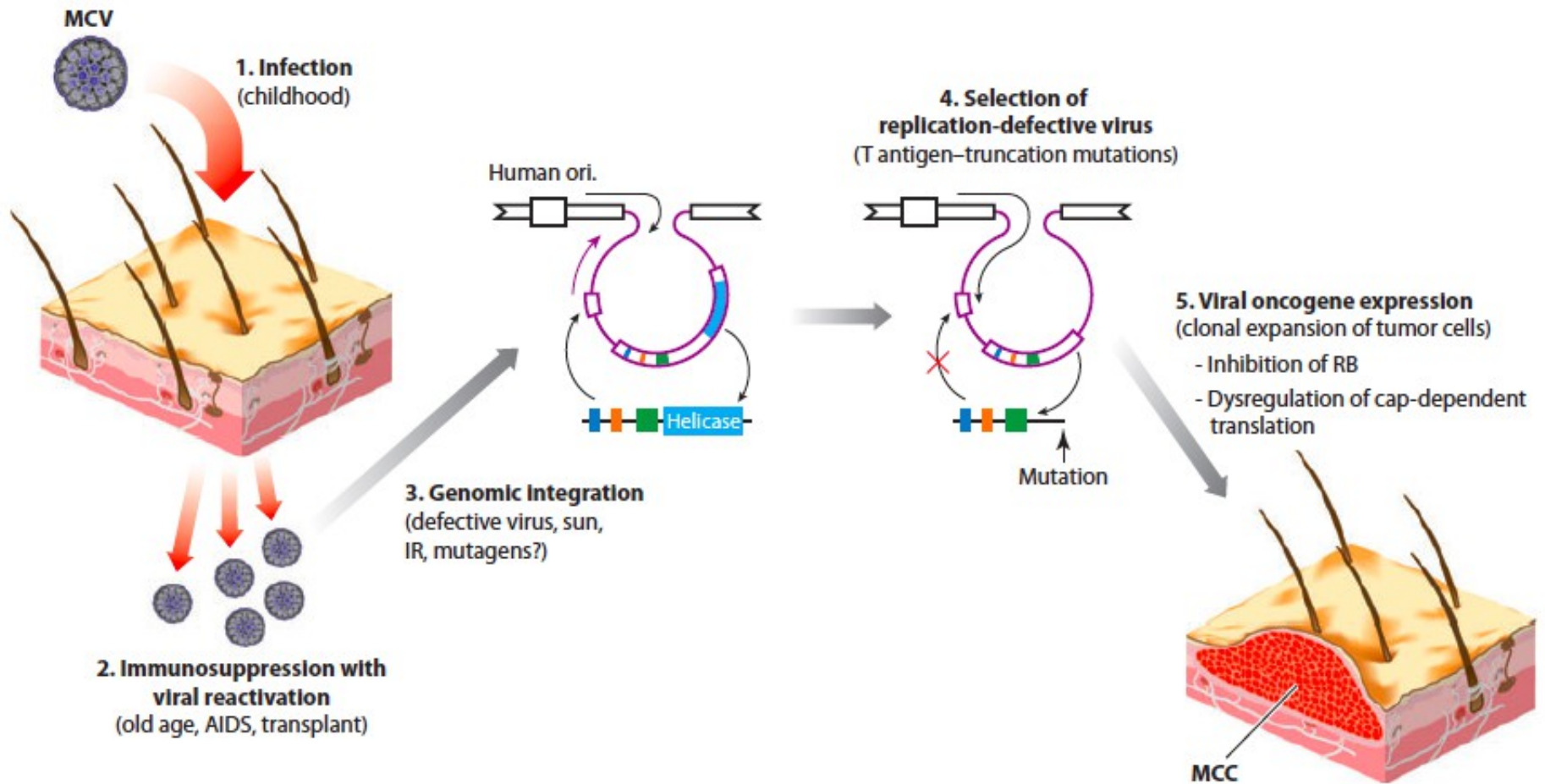


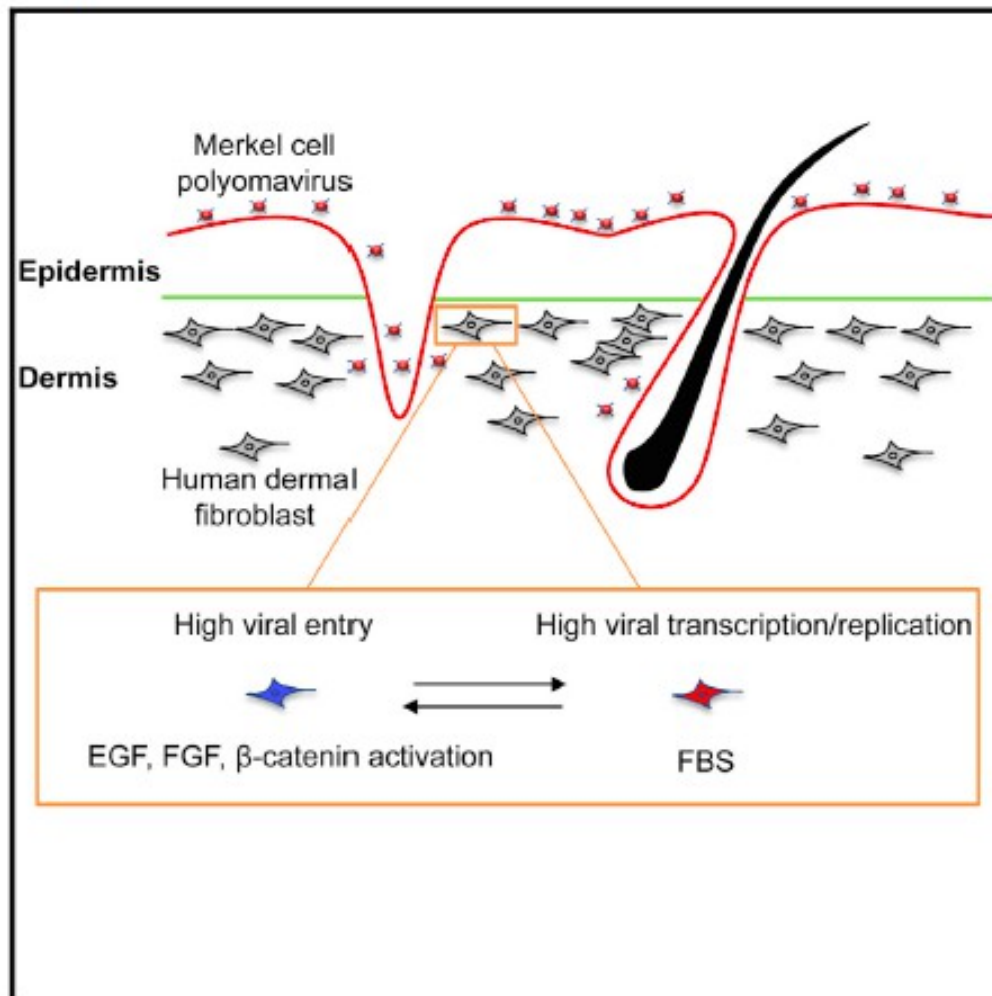
Figure 7

Steps in the molecular evolution of Merkel cell carcinoma (MCC). (1) Merkel cell polyomavirus (MCV) infection is common in the general population and is acquired in early childhood. It is an easily detected component of the normal skin flora. (2) In the setting of decreased immune competence (either iatrogenically induced or age related), reactivation of MCV may occur, as has been observed with other human polyomaviruses. (3) Such a burst of infective virus production can facilitate viral integration in susceptible Merkel cells. (4) Selection pressure is predicted to occur against Merkel cells infected with replication-competent viruses as a result of cell lysis. (5) The expression of MCV tumor antigens (T antigens) in cells with integrated virus harboring T antigen-truncation mutations provides proliferative signals that lead to MCC.

Cell Host & Microbe

Identifying the Target Cells and Mechanisms of Merkel Cell Polyomavirus Infection

Graphical Abstract



Authors

Wei Liu, Ruifeng Yang,
Aimee S. Payne, ..., Xiaowei Xu,
Christopher B. Buck, Jianxin You

Correspondence

jianyou@mail.med.upenn.edu

In Brief

Merkel cell polyomavirus (MCPyV) infection can lead to Merkel cell carcinoma, a lethal skin cancer. Liu et al. identify dermal fibroblasts as the target of productive MCPyV infection in human skin. This study establishes a cell culture model and identifies a kinase inhibitor as a potential therapeutic agent against MCPyV.

MCC negativo per MCPyV

- CK20 -
- Basso titolo anticorpale dell'antigene T
- Elevata instabilità genomica
- Presenza di mutazioni associate a danno UV:
 - Sostituzione C>T
 - Sostituzione CC>TT
- Mutazioni nei geni oncosoppressori:
 - APC, TET2, BAP1, TP53, RB1, NOTCH
- Mutazione di geni regolatori del ciclo cellulare e della cromatina
- Elevata espressione delle subunità TERT della telomerasi

versus

MCC positivo per MCPyV

- 80% CK20 +
- Elevato titolo anticorpale dell'antigene Large T
- Espressione di una forma tronca dell'antigene Large T
- Sostituzione CC>TT
- Poche mutazioni di geni cellulari legate a danno UV
- Elevato grado di TIL (linfociti T infiltranti)
- Elevato livello del ligando PD-L1

- **Morfologia simile**
- **Alcune mutazioni dei geni oncosoppressori**

Protocollo di monitoraggio diagnostico e prognostico del carcinoma a cellule di Merkel (MCC).

Proponenti:

Azienda Ospedaliero-Universitaria Maggiore della Carità

Servizio di Anatomia Patologica

Prof. Renzo Boldorini renzo.boldorini@med.uniupo.it 0321-3733979

Università del Piemonte Orientale

Laboratorio di Virologia molecolare

Prof.ssa Marisa Gariglio marisa.gariglio@med.uniupo.it 0321-660649/686

Obiettivi:

Valutare la presenza, carica virale e lo stato di integrazione/mutazione del virus (MCV) nel tumore e sulla cute del paziente (non-lesionale)

Valutare la risposta anticorpale dell'individuo che ha sviluppato questo tumore e le variazioni nel tempo

Definire l'assetto genetico del tumore con targeted sequencing o whole exome sequencing (solo se disponibile pezzo fresco congelato)

Creare una banca dati su base regionale da utilizzare per la messa a punto di nuovi protocolli diagnostici/prognostici

All'intervento (prima diagnosi) raccogliere i seguenti campioni:

- Foto clinica della lesione
- Provetta di sangue senza anticoagulante da conservare a 4°C
- Provetta di sangue con anticoagulante da conservare per confronto in analisi genetica rispetto al DNA tumorale (10 ml) da congelare a – 20°C
- Tamponi cutanei dal braccio (regione deltoide): sfregare lievemente 5x5 cm di cute con tamponi cotonati sterili (es. cotton fioc o altri disponibili per diagnostica) per un paio di di volte con almeno 3 tamponi diversi. Riporre tutti i tamponi in una provetta sterile tagliando il bastoncino in eccesso con forbici. I tamponi vanno riposti nelle provette a secco e conservati a 4°C
- Tessuto “fresco” da congelare a -80° C nel più breve tempo possibile
- Sezioni di tessuto in bianco dal blocchetto fissato e paraffinato, spessore 4-5 mm su vetrini SuperFrost UltraPlus (almeno 10)
- Raccolta dati clinici del paziente compilando apposito modulo che verrà fornito dai proponenti

Nel follow up è necessario:

- aggiornare il data base con le informazioni cliniche
- registrare l'eventuale comparsa di metastasi inviando se disponibili le sezioni dalle sedi metastatiche fissate in formalina e paraffinate come descritto alla prima diagnosi
- un prelievo di sangue in provetta senza anticoagulante a distanza di almeno 6-12 mesi, da ripetere sempre a intervallo di circa un anno
- registrare l'eventuale decesso del paziente e le cause

Indagini che verranno svolte dai proponenti presso il Servizio di Anatomia Patologica e il laboratorio di Virologia molecolare- Novara

- Sangue. Valutazione della risposta anticorpale diretta contro MCV
- Tamponi cutanei. Determinazione della presenza di MCV DNA nei tamponi cutanei con PCR qualitativa e conteggio del numero di copie con PCR quantitativa real time
- Sezioni di tessuto fissato e paraffinato: indagini in immunoistochimica e immunofluorescenza per la valutazione di: espressione degli antigeni virali -proteine oncogeniche precoci Large T, small T e proteina del capsid virale VP1; espressione di proteine cellulari (es. CK20, S100, Synaptofisina, neurofilamenti, Pax 5, NSE etc). Valutazione della presenza di infezione da MCV con tecnica FISH (fluorescent in situ hybridization); valutazione e quantificazione della presenza di sequenze genomiche virali con metodica real-time PCR; sequenziamento degli amplificati per caratterizzazione genetica del virus a confronto con il genoma virale identificato nei tamponi cutanei.
- Tessuto congelato: estrazione del DNA genomico e, se il materiale è sufficiente, anche di RNA e proteine. DNA genomico verrà utilizzato per indagini in PCR e real time PCR per valutare la presenza di MCV e la carica virale. Il genoma di MCV amplificato in PCR verrà sequenziato per la definizione del genotipo e di eventuali mutazioni. Lo stato di integrazione del virus verrà valutato in PCR. Compatibilmente con i fondi disponibili, il DNA di questi tumori verrà analizzato anche in whole genome sequencing per la caratterizzazione genetica dei tumori.