

Diana Mai
Dr. med.

Untersuchung von kutanen und anorektalen Melanomen auf das Vorhandensein humaner Papillomviren

Geboren am 16.08.1978 in Heidelberg
Staatsexamen am 11.05.2005 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Dermatologie
Doktorvater: Prof. Dr. med. Martin Deichmann

Zervix-, Vulva-, Penis- und Analkarzinome sind häufig assoziiert mit bestimmten Typen humaner Papillomaviren (HPV). Einzelfall-Berichte ließen vermuten, dass auch bei kutanen oder anorektalen Melanomen eine HPV-Infektion vorliegen könnte.

Ziel der vorliegenden Arbeit war daher der Nachweis von HPV-DNA bzw. -Proteinen in kutanen oder anorektalen Melanomen.

Untersucht wurden in Paraffin eingebettete Operations-Resektate von 23 kutanen Melanom-Primärtumoren, 13 Metastasen kutaner Melanome, 16 anorektalen Melanomen und 2 Lymphknoten-Metastasen zwei verschiedener anorektaler Melanome. Alle Melanom-Gewebe wurden mit der Immunhistochemie mit einem Antikörper gegen High risk-HPV-Typen (HPV 16, 18, 33, 39, 45 und 56) und einem spezifischen Antikörper gegen HPV 16 und HPV 18 gescreent. Positiv für den HPV-high-risk-Antikörper zeigte sich nur ein anorektales Melanom. Die zu diesem Primärtumor gehörende Lymphknoten-Metastase zeigte Signale mit dem HPV 16/18-spezifischen Antikörper, der das HPV-Kapsidprotein L1 nukleär detektiert.

Die Ergebnisse dieser beiden immunhistochemisch HPV-positiven Gewebe ließen sich mittels In-situ-Hybridisierung verifizieren: Unter Verwendung einer High risk-HPV-DNA-Sonde, die die HPV-Typen 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 und 70 erfasst, zeigte sich sowohl in wenigen Melanom-Zellen des anorektalen Melanoms als auch in der zu diesem Fall gehörenden Lymphknoten-Metastase ein als positiv zu wertendes Ergebnis in Form von distinkten, solitär über das Gewebe verteilten, punktförmigen Kernsignalen.

In der konventionellen HPV-PCR mit degenerativen Primern mit anschließender Sequenzierung gelang im anorektalen Primär-Melanom kein HPV-DNA-Nachweis. In der dazugehörigen Lymphknoten-Metastase konnte mittels PCR mit degenerativen Primern keine DNA von HPV-16 oder HPV-18 nachgewiesen werden. In dem umgebenden gesunden Gewebe in Nachbarschaft zu dieser Lymphknoten-Metastase konnte ein DNA-Fragment identifiziert werden, das einem Teil der DNA-Sequenz des von einer anderen Arbeitsgruppe beschriebenen EV-Typ-artigen HPV novel EV Lee-SH (= HPV AF019978) entspricht.

In einem Tumorknoten eines kutanen Melanoms war die Immunreaktion auf das L1-Kapsidprotein der High risk-HPV-Typen ausschließlich granulär im Zytoplasma lokalisiert und wurde daher als unspezifische Reaktion gewertet. In der parallel dazu erfolgten In-situ-Hybridisierung mit der High risk-HPV-DNA-Sonde gelang kein HPV-Nachweis. Stattdessen ließ sich unter Verwendung einer Low risk-HPV-DNA-Sonde, die die HPV-Typen 6, 11, 42, 43 und 44 detektiert, ein isoliert positives Zellareal im Randbereich des Tumors darstellen. Die durchgeführte konventionelle PCR mit degenerativen Primern und nachfolgender Klonierung und Sequenzierung erbrachte den Nachweis eines DNA-Fragmentes von HPV 76 in diesem Tumorgewebe.

In drei weiteren immunhistochemisch negativen kutanen Primär-Melanomen konnten wir mit nested-PCR DNA-Fragmente von HPV 16, HPV IA06 und HPV X21 identifizieren. Bei den beiden Letztgenannten handelt es sich um kürzlich von anderen Arbeitsgruppen beschriebene HPV-DNA-Fragmente, die – ebenso wie das in der Lymphknoten-Metastase eines anorektalen Melanoms gefundene DNA-Fragment von HPV AF019978 – innerhalb der kutanen Papillomaviren der Gruppe B1 zugeordnet werden und hier erstmalig in kutanen Melanomen nachgewiesen wurden.

In den übrigen Gewebeproben fand sich kein Nachweis von HPV.

Zur morphologischen Lokalisation von PCR-Amplifikaten und der hierdurch angestrebten Zuordnung von HPV-DNA zu Tumor- oder sonstigen Zellen wurde die Etablierung der In-situ-PCR angestrebt. Diese konnte sich jedoch aufgrund falsch-positiver Signale bzw. durch Zerstörung der Gewebemorphologie nicht als Untersuchungsmethode für kutane und anorektale Melanome bewähren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass wir in einzelnen Melanom-Gewebeproben auf DNA- bzw. auf Protein-Ebene Hinweise für eine Infektion mit HPV finden konnten. Die Ergebnisse der von uns verwandten Nachweisverfahren waren jedoch für die einzelne Gewebeprobe nicht immer konkordant, was möglicherweise an der Vielzahl der HPV-Typen und ihrer Nachweisbarkeit liegt. Erfreulicherweise gelang uns in mehreren den Melanomen benachbarten gesunden Hautarealen der Nachweis von DNA-Fragmenten mit Homologie zu neuen HPV-Sequenzen, die kürzlich von anderen Arbeitsgruppen beschrieben wurden. Dass HPV bei kutanen oder anorektalen Melanomen ätiologisch eine entscheidende Rolle spielen könnten, halten wir aufgrund unserer Ergebnisse für nicht wahrscheinlich.