

Aus der Universitäts-Hautklinik Tübingen

**Distribution and frequencies of BRAF mutations in patients
with advanced melanoma in Southern Germany**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Assi, geb. Jradi, Zeinab

2021

Dekan: Professor Dr. B. Pichler
1. Berichterstatter: Prof. Dr. T. Eigentler
2. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Möhle

Tag der Disputation: 14.04.2021

Ich danke meinen klinischen Betreuern, Prof. Claus Garbe und Prof. Dr. Thomas Eigentler, für ihre stets kontinuierliche Begleitung und Unterstützung durch die Phasen dieser Dissertation und darüber hinaus.

Prof. Dr. Thomas Eigentler möchte ich auch für seine statistische Anleitung zu den Auswertungen an der von mir erhobenen Datenerhebung und für seine kontinuierliche Unterstützung als Supervisor dieser Arbeit danken.

Diese Arbeit ist meiner Familie gewidmet...

"Geduld ist der Begleiter der Weisheit." ~ St. Augustinus

ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL

Ich, Zeinab Assi geb. Jradi, erkläre, dass die folgende Untersuchung und ihre gesamten Daten eine eigenständige Arbeit ohne fremde Hilfe war. Die Datenerhebung und -verarbeitung erfolgte ausschließlich durch mich. Die Datenkontrolle von externen Melanomzentren wurde ebenfalls von mir übernommen. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe von Prof.Dr. Thomas Eigentler durchgeführt, der diese Dissertation betreute. Die Diskussion wurde von mir geschrieben. Die Daten dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht als:

Eigentler T, Assi Z, Hassel JC, et al. Which melanoma patient carries a BRAF-mutation? A comparison of predictive models. Oncotarget. 2016;7(24):36130-36137. doi:10.18632/oncotarget.9143.

INHALTSVERZEICHNIS

Erklärung zum Eigenanteil.....	4
1. Einführung	8
1.1 Epidemiologie des Melanoms	8
1.2 Mutationen in der Onkogenese des Melanoms	14
1.3 Detektionsmethoden der BRAF-Mutation.....	29
1.4 Ziele der Arbeit	31
2. Methoden	33
2.1 Patienten und Proben.....	33
2.2 DNA Extraktion und Mutationsanalyse/ Sequenzierung – Testprotokolle 34	
2.3 Statistik.....	34
3. Ergebnisse	38
3.1 Allgemeine Patientenmerkmale.....	38
3.2 BRAF-Frequenz und -Verteilung	41
3.3 Korrelationen verschiedener Variablen.....	41
3.4 Vorhersage des BRAF-Status	45
3.4.1 Binäres logistisches Regressionsmodell ⁸³	45
3.4.2 Klassifizierungs- und Regressionsanalysen Bäume ⁸³	47
3.4.3 Random Forest Modellierung ⁸³	48
4. Diskussion und Schlussfolgerung.....	51
5. Zusammenfassung/Abstract.....	63
6. Literaturverzeichnis	64
7. Anhang	71

TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1: SEER 9 INZIDENZ & US-MORTALITÄT 1975-2012, ALLE BEVÖLKERUNGSGRUPPEN, BEIDE GESCHLECHTER. DIE RATEN SIND ALTERSSTANDARDISIERT (AUS DEM SURVEILLANCE, EPIDEMIOLOGY, AND END RESULTS (SEER) PROGRAMM DES NATIONAL CANCER INSTITUTE).	9
TABELLE 2: MELANOM-INZIDENZRATEN (PRO 100 000), ALTERSGERECHT, FÜR AUSGEWÄHLTE REGIONEN (QUELLE: VERÖFFENTLICHUNG DER INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC) BAND IX) ÜBER DIE KREBSINZIDENZ IN FÜNF KONTINENTEN.	10
TABELLE 3: BRAF-MUTATIONEN IN VERSCHIEDENEN ANALYSEVERSUCHEN IN FRÜHEREN STUDIEN.	25
TABELLE 4: PATIENTENMERKMALE	38
TABELLE 5: KONTINGENZTABELLEN VERSCHIEDENER VARIABLEN MIT VORHANDENSEIN ODER FEHLEN EINER BRAF-MUTATION, FISHER'S EXACT TEST AUF SIGNIFIKANZ.....	44
TABELLE 6: VERGLEICH VERSCHIEDENER PRÄDIKTIVER MODELLE	49
TABELLE 7: VERTEILUNG VERSCHIEDENER VARIABLEN IN BEZUG AUF DETAILLIERTEN BRAF-STATUS.....	71

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1: : ÜBERSICHT ÜBER AUSGEWÄHLTE PFADE UND MEDIKAMENTE, ENTNOMMEN AUS HELD, EIGENTLER ET AL., ONKOGENETIK DES MELANOMS: BASIS FÜR MOLEKULARE DIAGNOSE UND THERAPIE, 201015	17
ABBILDUNG 2: HÄUFIGKEIT DER BRAF-MUTATIONEN ENTSPRECHEND DEM ALTER (YOUNG:<45JAHRE, INTERMEDIATE: 45-59 JAHRE, OLD: ≥60 JAHRE, N=716, NICHT IMPUTIERT)	42
ABBILDUNG 3: FOREST PLOT, ODD RATIOS MIT 95% KONFIDENZINTERVALLEN DER VERSCHIEDENEN PRÄDIKTOREN FÜR DAS BINÄRE REGRESSIONSMODEL	46
ABBILDUNG 4: KALIBRIERPLOT FÜR DAS BINÄRE REGRESSIONSMODELL. BOOTSTRAP OVERFITTING-KORRIGIERTE KALIBRIERKURVENSCHÄTZUNG FÜR DAS RÜCKWÄRTS STEP-DOWN BINÄRE LOGISTIKMODELL BEI VORHANDENSEIN EINER BRAF-MUTATION SOWIE EIN RUG PLOT, DER DIE VERTEILUNG DES VORHERGESAGTEN STATUS ANZEIGT. LOESS SMOOTHEND NONPARAMETRIC CALIBRATION ESTIMATOR WIRD VERWENDET.	46
ABBILDUNG 5: FOREST PLOT, EFFEKTE DER VERSCHIEDENEN PRÄDIKTOREN FÜR DAS BINÄRE REGRESSIONSMODELL MIT 95% KONFIDENZINTERVALLEN.	47
ABBILDUNG 6: KLASSIFIKATIONS- UND REGRESSIONSPLOT (CART) ZUR VORHERSAGE DES VORHANDENSEINS EINER BRAF-MUTATION.....	48
ABBILDUNG 7: NOMOGRAMM ZUR VORHERSAGE DES VORHANDENSEINS EINER BRAF-MUTATION UNTER VERWENDUNG EINES ABWÄRTSMODELLS.	50
ABBILDUNG 8:VERGLEICH VON RANKINGS MIT MINIMALER TIEFE UND VARIABLER BEDEUTUNG (VIMP). DIE PUNKTE AUF DER ROT GESTRICHELTEN LINIE WERDEN GLEICHWERTIG BEWERTET, DIE PUNKTE DARUNTER HABEN EINEN HÖHEREN VIMP, DIE PUNKTE OBEN HABEN EINEN HÖHEREN WERT FÜR DIE MINIMALE TIEFE. SOWOHL DIE MINIMALE TIEFE ALS AUCH VIMP ZEIGEN DEN STARKEN ZUSAMMENHANG VON ALTER UND ART DER MELANOMVARIABLEN ZUR RANDOM FOREST VORHERSAGE.	73

1. EINFÜHRUNG

1.1 *Epidemiologie des Melanoms*

Das kutane Melanom gehört zu den Krebsarten mit den am schnellsten ansteigenden Inzidenzraten in der weißen Bevölkerung. Die jährliche Zunahme der Inzidenz variiert zwischen 3-7% pro Jahr für hellhäutige Kaukasier.¹ Dies entspricht einer Verdoppelung der Raten alle 10-20 Jahre.²

Die Krebsstatistiken in den Vereinigten Staaten und Europa zeigen eine Verdreifachung der Inzidenz zwischen 1970 und 2000: Statistiken in den USA haben 6 Fälle pro 100.000 und Jahr zu Beginn der 1970er Jahre und 18 Fälle pro 100.000 Einwohner und Jahr zu Beginn des Jahres 2000 ergeben. Die Inzidenzraten in Mitteleuropa stiegen im gleichen Zeitraum von 3 - 4 Fällen auf 10 - 15 Fällen pro 100.000 Einwohner und Jahr.³

Daten aus dem Surveillance, Epidemiology and End Results Programm (SEER) des National Cancer Institute⁴ deuten auf 73870 geschätzte neue Fälle (4,5% aller Krebsfälle) und 9940 erwartete Todesfälle durch Melanom (1,7% aller Krebstodesfälle) in den Vereinigten Staaten im Jahr 2015 hin. Von 2008-2012 lag die Zahl der neuen Fälle von Melanomen der Haut bei 21,6 pro 100.000 Männern und Frauen pro Jahr (altersbereinigt). Die Zahl der Todesfälle betrug 2,7 pro 100.000 Männer und Frauen pro Jahr. Basierend auf SEER-Daten wird das Melanom der Haut am häufigsten bei Menschen im Alter von 55-64 Jahren in den USA diagnostiziert. Es entwickelt sich hauptsächlich in der kaukasischen Bevölkerung. Die Inzidenzraten unter Schwarzen, Asiaten, Pazifikinselbewohnern, Indianern, Alaska-Indianern und hispanischen Bevölkerungsgruppen sind sehr niedrig. US-Daten deuten auf eine höhere Inzidenz bei Männern hin (28,2 Fälle pro 100 000 in allen Gruppen). Bei Frauen beträgt die Inzidenz laut SEER-Daten 16,8 Fälle pro 100 000. Die Raten für neue Melanomfälle der Haut sind in den letzten 10 Jahren durchschnittlich um 1,4% pro Jahr gestiegen. Die Sterberaten waren nach SEER-Daten im Zeitraum 2002-2012 stabil.⁴

Tabelle 1: SEER 9 Inzidenz & US-Mortalität 1975-2012, Alle Bevölkerungsgruppen, beide Geschlechter. Die Raten sind altersstandardisiert (aus dem Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Programm des National Cancer Institute).

Year	1975	1980	1985	1990	1995	1999	2003	2007
Relatives 5- Jahresüberleben	81.8%	83.9%	86.1%	89.2%	90.1%	92.3%	93.2%	93.2%

Für einen weltweiten vergleichenden Überblick über die Melanominzidenz ist es sinnvoll, einen Blick auf den jüngsten Band IX der Veröffentlichung der International Agency for Research on Cancer (IARC) über die Krebsinzidenz in fünf Kontinenten zu werfen. Es deckt den Zeitraum 1998-2002 ab und zeigt, dass die weltweit höchste registrierte Inzidenz von invasivem Hautmelanom mit 55,8/100 000/Jahr bei Männern und 41,1/100 000/Jahr bei Frauen - wie in der Vergangenheit - in Queensland, Australien liegt. Auch wenn die Inzidenzraten in Australien im Allgemeinen hoch sind, gibt es innerhalb des Landes deutliche Unterschiede. In Victoria zum Beispiel liegen die Inzidenzraten bei 27,3/10⁵ für Männer und 23,4/100 000 für Frauen. Auch in Neuseeland sind die Inzidenzraten mit 34,8/100 000 bzw. 31,4/100 000 pro Jahr für Männer und Frauen hoch.^{2,4,5}

Die Inzidenzraten in Europa variieren, betragen aber im Allgemeinen etwa ein Drittel der Raten in Australien. Die höchsten Inzidenzraten werden aus der Schweiz und den skandinavischen Ländern (z.B. Norwegen, Dänemark, Schweden) gemeldet. Europäische Länder weisen bei Frauen eine höhere Inzidenz auf als bei Männern, im Gegensatz zu Australien und Nordamerika.^{4,5} Obwohl die Melanominzidenzraten in osteuropäischen und baltischen Ländern wie Serbien, Weißrussland, Lettland, Litauen und Estland immer noch niedrig sind, wurde in letzter Zeit auch für diese Länder ein Anstieg der Melanominzidenz gemeldet.⁶

Italien zeigt ein Gefälle zwischen Nord und Süd, mit einer höheren Inzidenz in beiden Geschlechtern in Norditalien um Mailand und Turin im Vergleich zu Neapel.^{4,5} Mittelmeerländer weisen im Allgemeinen eine niedrigere Inzidenzrate für Melanome auf als die nordeuropäischen Länder. In den Ländern Mitteleuropas (wie z.B. Frankreich) sind die Raten innerhalb des Landes sehr unterschiedlich.

Im Jahr 2014 analysierte eine Studie von Arnold et al. Daten aus 29 europäischen Krebsregistern (Daten von 1990-2007). Die höchsten Inzidenzraten wurden für nördliche und nordwestliche Länder wie das Vereinigte Königreich, Irland und die Niederlande verzeichnet. Die niedrigsten Inzidenzraten wurden in Portugal und Spanien beobachtet, wobei das gleiche Gefälle zwischen Nord und Süd zur Ausprägung kam.⁷

Tabelle 2: Melanom-Inzidenzraten (pro 100 000), altersgerecht, für ausgewählte Regionen (Quelle: Veröffentlichung der International Agency for Research on Cancer (IARC) Band IX) über die Krebsinzidenz in fünf Kontinenten.

Land, Region	Männlich	weiblich
Australien, Queensland	55,8	41,1
Australien, Victoria	27,3	23,4
Neuseeland	34,8	31,4
Schweiz, Genf	18,5	19
Deutschland, München	12,7	11,5
Norwegen	14,2	14,6
Schweden	11,9	12,1
Dänemark	11,9	14,1
Serbien	3,8	3,6
Weißrussland	2,7	3,5
Lettland	3,2	4,2
Litauen	3,7	5,2
Estland	5,3	6,6
Italien, Turin	10,7	11,4
Italien, Neapel	3,9	3,4
USA, New York (Bundesstaat)	9,3	6,4
USA, California	15,2	10,3
USA, Florida	13,7	8,9

Kohortenstudien aus mehreren Ländern deuten darauf hin, dass sich der Trend zu steigenden Inzidenzraten in Zukunft mindestens für die nächsten 2 Jahrzehnte fortsetzen wird; daher wird mit einer weiteren Verdoppelung der Inzidenzraten gerechnet.³ In Europa ist in den nächsten Jahrzehnten mit einer Zunahme der Inzidenzraten auf 40-50/100 000 Einwohner/Jahr zu rechnen, da die Auswirkungen der laufenden Präventionsprogramme noch nicht so früh sichtbar sein dürften.⁷⁻⁹

Zwischen Inzidenz und Mortalität gibt es ein Divergenzmuster: Während die Inzidenzraten in den letzten 4 Jahrzehnten kontinuierlich gestiegen sind, zeigen die Mortalitätsraten des Melanoms nun eine Stabilisierung in den USA, Australien und auch in den europäischen Ländern. In den 1970er und 1980er Jahren stiegen die Sterblichkeitsraten leicht an, bis in den 1990er Jahren in vielen Ländern eine Abflachung der Sterblichkeitsraten zu beobachten war. Gleichzeitig wurde in den USA und Europa ein Rückgang der Breslow-Tumordicke berichtet, was sich auf eine Verbesserung des Überlebens durch eine verbesserte Früherkennung von dünneren kutanen Melanomen niederschlagen scheint.^{3,5,10}

Song et al. beschrieben die Überlebensraten bei Patienten mit inoperablem Stadium IIIB/C oder Stadium IV Melanom. Unter Verwendung von Daten aus der Datenbank Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) wurden zwischen 2004 und 2009 Patienten mit inoperablem Melanom im Stadium IIIB/C und Stadium IV (M1a, M1b, M1c) untersucht. Die insgesamt 1682 analysierten Patienten befanden sich zu 4,4% im Stadium IIIB/IIIC, zu 12,6% bei M1a, 17,4% bei M1b und 65,6% bei M1c. 68,0% waren männlich und 91,7% waren weiße Kaukasier. Patienten im Stadium IIIB/IIIC zeigten ein medianes Gesamtüberleben (OS) von 24,3 Monaten, mit einer Überlebensrate von 67,2% nach 1 Jahr, 42,9% nach 2 Jahren und 32,1% nach 3 Jahren. Für Patienten im Stadium M1a betrug das mediane Gesamtüberleben 22,3 Monate, 1 Jahres-, 2 Jahres- und 3 Jahre-Überlebensraten lagen bei 64,5%, 40,4% und 26,4%. Die Überlebensraten ändern sich dramatisch für Patienten im Stadium M1b mit einem Medianen Gesamtüberleben von 11,2 Monaten und 1 Jahres-, 2 Jahres- und 3

Jahres- Überlebensraten von 43,8%, 23,4% bzw. 13,8%. Für Patienten im Stadium M1c betrug des Mediane Gesamtüberleben 5,1 Monate und die Überlebensraten für 1 Jahr, 2 Jahre und 3 Jahre 22,3%, 8,9% und 4,7%.¹¹

Extrakutanes Melanom

Obwohl epidemiologische Informationen über das extrakutane Melanom in der Literatur selten zu finden sind, gibt es nur wenige Studien, die - wenn auch geographisch begrenzt - Hinweise auf die Entwicklung von Inzidenzraten und Überleben geben können.

In einer Studie, die Inzidenz und Überlebensrate von extrakutanen Melanomen für die Bevölkerung von British Columbia (BC) in Kanada analysierte, verwendeten Haiducu et al. (2014) Daten aus dem BC-Krebsregister von 01/1992 bis 12/2006. 922 primär extrakutane Melanome wurden erfasst, was 5,1% der gesamten Melanominzidenz entspricht. Okuläre Melanome hatten die höchste Inzidenzrate (pro 1 Million) von 10,6 bei Männern und 8,5 bei Frauen. Patienten mit extrakutanem Melanom waren bei der Diagnose in der Regel älter und hatten im Vergleich zu kutanen Melanomen schlechtere Überlebensraten. Die Fünf-Jahres-Überlebensraten für Patienten mit extrakutanem Melanom variierten deutlich zwischen 23,5% für genitale Läsionen und 87,0% für okuläre Fälle.¹²

Ihre Ergebnisse stimmen mit anderen Studien überein, z.B. einer Studie von Bishop et al., die Fälle von Haut- (CM), Augen- (OM), Schleimhaut- (MM) und leptomeningealem Melanomen unterschiedlicher anatomischer Herkunft analysierte, die zwischen 1988 und 2010 diagnostiziert und in der Datenbank Surveillance Epidemiology and End Results (SEER) erfasst wurden. Im Gegensatz zu CM fanden sie keine Hinweise auf eine Verbesserung des Überlebens bei OM und MM während des Studienzeitraums.¹³

Nach ähnlichen Untersuchungen zur Epidemiologie des extrakutanen Melanoms in den Niederlanden fanden Koomen et al. keine statistisch signifikanten Trends bei der Inzidenz des extrakutanen Melanoms, während bei der Inzidenz von CM

ein jährlicher Anstieg von 4,4% bei Männern und 3,6% bei Frauen festgestellt wurde.¹⁴

1.2 Mutationen in der Onkogenese des Melanoms

Krebs ist das Ergebnis einer Anhäufung mehrerer Faktoren oder Ereignisse im Laufe der Zeit - die Karzinogenese ist ein mehrstufiger Prozess¹⁵. Im Laufe der letzten Jahre der Krebsforschung konnten immer mehr Mutationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen identifiziert werden, die zumindest teilweise für die Entstehung von Malignomen verantwortlich zu sein scheinen.

Eine große Anzahl dieser Gene ist für die Regulation von Signalkaskaden verantwortlich, die den Weg eines extrazellulären Reizes von der äußeren Membran zum Zellkern verfolgen. Am bekanntesten und am besten erforscht ist in diesem Zusammenhang der MAP-Kinase-Signalweg (MAP = mitogen-activated protein).

Die Mitogen-aktivierten Protein- (MAP)- Kinasen umfassen eine Familie von allgegenwärtigen, prolifergesteuerten, protein-serine/Threoninkinasen, die an Signaltransduktionswegen teilnehmen. Diese Signaltransduktionswege steuern intrazelluläre Ereignisse, einschließlich akuter Reaktionen auf Hormone und größerer Änderungen in der Entwicklung von Organismen.¹⁶ Das gleiche Muster der Signalkaskade wird von mehr als einem Pfad verwendet.

Eine zentrale Rolle bei der Regulierung von Zellwachstum, Proliferation, Migration und Seneszenz¹⁷ nimmt der RAS-RAF-MEK-ERK-Pfad ein. Dieser Weg ist bei ~30% der Krebserkrankungen hyperaktiviert¹⁸, wobei aktivierende Mutationen in RAS bei etwa 15%-30% der Krebserkrankungen auftreten, und Mutationen in B-RAF bei etwa 7% der Krebserkrankungen zu finden sind.¹⁹

Obwohl Mutationen in diesem Signalweg eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung des Melanoms spielen, sind auch Inputs von anderen Signalkaskaden erforderlich. Der am besten untersuchte von ihnen ist PI3K/AKT. PI3K-Signale haben mehrere Funktionen, die das Zellüberleben, die Proliferation, das Wachstum und die Motilität regulieren. Sein Einfluss auf die Melanom-Entwicklung hat sich sowohl durch direkte Mutationen der beteiligten Gene (inaktivierende Mutationen oder Deletionen von PTEN,²⁰ aktivierende Mutationen von NRAS^{21,22} oder Überexpression von AKT²⁰) als auch indirekt durch Interaktion des MAPK-Weges mit dem PI3K/AKT-Weg an mehreren Stellen

gezeigt. Ein Beispiel ist die direkte Aktivierung von PI3K durch RAS.

Der RAS-RAF-MEK-ERK (MAPK)-Weg

Der RAS-RAF-MEK-ERK-Weg ist einer der am besten untersuchten Wege, der Wachstumsfaktoren mit Transkriptionsfaktoren verbindet und so einen Informationsfluss von der Zelloberfläche zum Kern ermöglicht. Dieser Weg der Informationsweiterleitung wird von der Zelle genutzt, um Zellwachstum, Proliferation, Migration und Seneszenz zu regulieren. Eine schematische Übersicht über die RAS-RAF-MEK-ERK- und die PI3K/AKT-Pfade ist in Abbildung 1 dargestellt.

Der RAS-RAF-MEK-ERK-Pfad ist eine Phosphorylierungskaskade und kann in eine membranöse und eine zytoplasmatische Phase unterteilt werden. Die Bindung des Wachstumsfaktors an die Rezeptor-Tyrosinkinase bewirkt deren Dimerisierung und die Auto-Phosphorylierung von Tyrosinresten. RAS, ein kleines GTP-Bindungsprotein, das auf der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran verankert ist, wird dann mit Hilfe des Adapters GRB2 und des Guaninnukleotid-Austauschfaktors (GEF) SOS (Son of Sevenless) aktiviert. GEFs erleichtern den zyklischen Prozess der GDP/GTP-Umwandlung. Da die intrinsische RAS-GTPase-Aktivität ineffizient zu sein scheint, sind diese zusätzlichen Moleküle notwendig, um den Prozess und die Bindung zu stabilisieren und zu beschleunigen. Einmal im aktiven GTP-gebundenen Zustand, koppelt RAS an RAF, mobilisiert das noch inaktive Protein vom Zytoplasma zur Zellmembran und rekrutiert die RAF-Kinasen (A-RAF, B-RAF und C-RAF oder RAF-1) - eine Familie von hochkonservierten Serin/Threoninkinasen.

RAS aktiviert die Serin/Threoninkinase-Funktion von RAF. Es folgt die Aktivierung von MEK und anschließend ERK durch Phosphorylierung. ERK verlagert sich dann in den Kern. Einmal aktiviert, phosphoryliert ERK1/ERK2 mehrere nukleäre und zytoplasmatische Effektorgene, die an verschiedenen Zellreaktionen wie Zellproliferation, Überleben, Differenzierung, Motilität und Angiogenese beteiligt sind.^{15,23,24}

Chong et al. (2003) und Roskoski et al. (2010) haben gezeigt, dass RAF auch von RAS-unabhängigen Aktivatoren aktiviert werden kann.^{25,26}

Darüber hinaus ist zu beachten, dass die RAS-Bindungsdomäne in vielen Effektoren zu finden ist und dass aktiviertes RAS-GTP eine hohe Affinität zu zahlreichen Downstream-Effektoren und anderen kleinen GTPasen wie Arfapatin oder Second Messenger-Systemen wie Adenylylcyclase aufweist.²⁴ Verschiedene Studien zeigten, dass RAS andere nachgelagerte Signalwege aktivieren kann, darunter PI3K- und Rac- und Rho-Proteine, die mit der Regulation des Zytoskeletts und der Invasivität von Tumorzellen verbunden sind. Auch der p38 MAPK-Weg und der stressaktivierte Proteinkinase-Pfad, c-Jun N-terminal[JNK] gehören dazu.^{24,27,28}

Eine negative Regulation des RAS-Weges kann über NF1 (Neurofibromin 1) erfolgen, das als Tumorsuppressor gilt. Unter physiologischen Bedingungen stimuliert es die GTPase-Aktivität von RAS, was zu seiner Akkumulation im GDP-gebundenen inaktiven Zustand führt. Das NF1-Gen wurde erstmals im Zusammenhang mit dem familiären Krebsyndrom Neurofibromatose Typ I (Vorkommen: 1 in 3500) beschrieben, einer Erkrankung, die durch inaktivierende Mutationen in NF1 gekennzeichnet ist, die zu multiplen Neurofibromen, hyperpigmentierten Hautmakulae (sogenannte Café-au-lait-Flecken), Sommersprossen und Iris- Hamartomen (Lisch-Knoten) führen.²⁹

Der Phosphoinositid-3-Kinase-(PI3K)-Signalweg

Der PI3K/AKT/mTor- Pfad reguliert das Zellüberleben, die Proliferation und das Wachstum. PI3K-Signalwege können auch Differenzierung und Motilität regulieren. Eine schematische Übersicht über den Weg ist in Abbildung 1 dargestellt.

PI3K wird durch Rezeptor-Tyrosinkinasen und RAS aktiviert. Anschließend phosphoryliert es Phosphatidylinositol (PIP₂) zu Phosphatidylinositoltriphosphat (PIP₃), das dann AKT aktiviert. An dieser Stelle erfolgt die Hemmung durch PTEN (Phosphatase und Tensinhomolog) durch Dephosphorylierung von AKT.³⁰

Phosphorylierte AKTs können eine Reihe von Effekten haben: (1) Es hemmt die Apoptose durch Phosphorylierung von BAD³¹, (2) Es aktiviert den Transkriptionsfaktor FOXO1 und die Transkription von Überlebensgenen, (3) Es aktiviert den Zellzyklus durch Hemmung der Glykogensynthasekinase 3 (GSK-3) und (4) beschleunigt das Zellwachstum über mTOR (mammalian target of Rapamycin).^{15,32}

mTOR beeinflusst die Gentranslation über S6K1 (S6 Kinase 1, Aktivator der Translation) und 4EBP1 (Inhibitor der Translation). Phosphoryliertes AKT hemmt den tuberösen Sklerosekomplex (TSC1 und TSC2) und beseitigt seine hemmende Wirkung auf mTOR.³³ TSC2 kann mTOR auch über andere Signalproteine aktivieren.

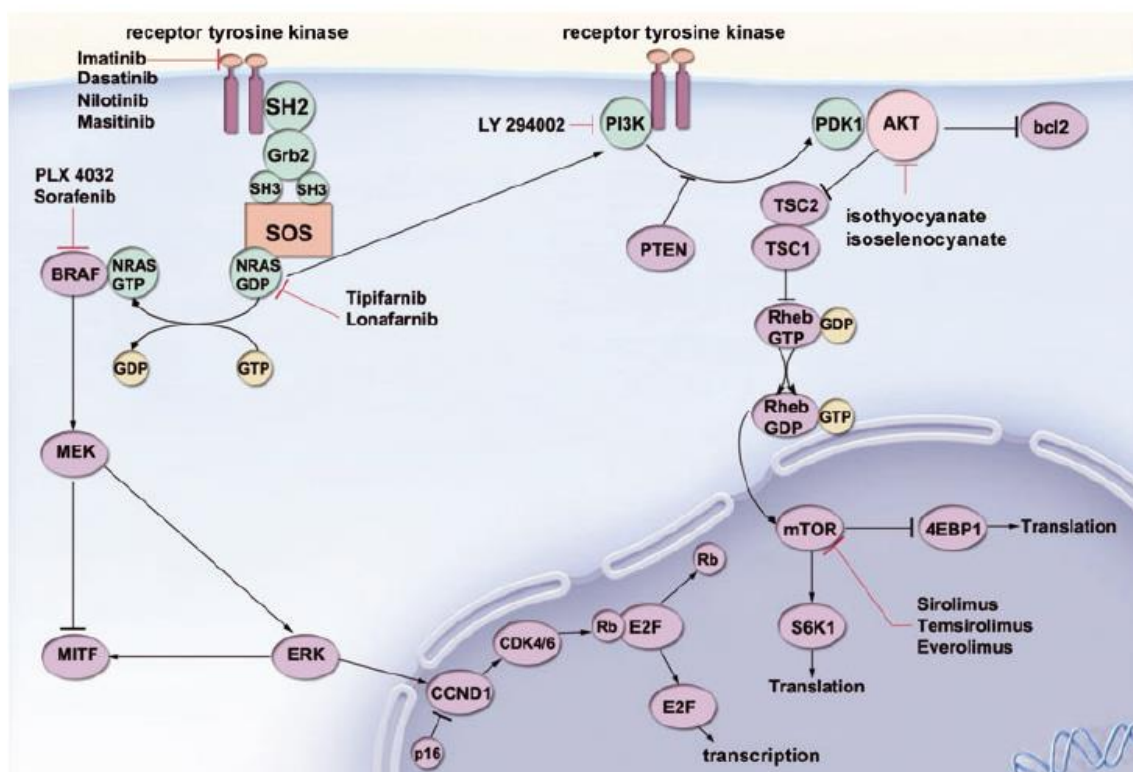


Abbildung 1: Übersicht über ausgewählte Pfade und Medikamente, entnommen aus Held, Eigentler et al., Onkogenetik des Melanoms: Basis für molekulare Diagnose und Therapie, 201015

Ihre Rolle bei der Onkogenese, insbesondere des Melanoms

Wie bereits erwähnt, haben sich somatische Mutationen im BRAF-Gen als relevant für eine Vielzahl von Krebsarten wie Darmkrebs, Papillarschilddrüsenkrebs, Brust- und Lungenkrebs erwiesen.^{34,35} Entweder NRAS oder BRAF ist in etwa 80% aller Hautmelanome und melanozytären Nävi mutiert.³⁶ Diese hohen Mutationsraten unterstreichen die Schlüsselrolle des RAS-RAF-MEK-ERK-Signalwegs für die Entwicklung des Melanoms.

Die Aktivierung von Onkogenen und die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen kann über eine Reihe von verschiedenen Mechanismen erfolgen, wie z.B. Punktmutationen, Translokationen, Deletionen, Duplikationen, Amplifikationen und epigenetische Effekte wie Promotor-Methylierung.¹⁵

Aber anstatt uns einen linearen Ursache-Wirkungs-Prozess vorzustellen, haben wir Schritt für Schritt verstanden, dass insbesondere die Karzinogenese und die Melanomgenese ein mehrstufiger und multifaktorieller Prozess ist. Unter Berufung auf wichtige Arbeiten auf diesem Gebiet wurde der Weg zur Krebsentstehung - soweit uns bis heute bekannt - sehr zutreffend beschrieben:

“Initial isolated mutations can accelerate cell growth, later leading to a series of defects in the genome resulting in increasing genetic instability. This results in the properties that are characteristic for solid tumors.³⁷ [Hanahan and Weinberg] These include separating growth from growth factor stimulation as well as inhibition of growth-inhibiting factors; the ability to invade and metastasize; unlimited replication potential; induction of angiogenesis; and blocking of apoptosis. In step-by-step development of the full malignant potential, increasing genetic instability leads to random errors in the genome³⁸ [Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers] and, due to an evolutionary selection process, to clonal proliferation of cells with advantageous aberrations [Goymer P., The evolution of cancer. Nature 2008].³⁹”

(Held, Eigentler et al., Oncogenetics of melanoma: basis for molecular diagnostics and therapy, 2010)¹⁵

So kann eine Reihe von Defekten, die komplexe Netzwerke von zentralen Signalwegen betreffen und genetische Instabilität verursachen, zu einem für die

bösartige Entwicklung typischen Zellverhalten führen. Natürliche Selektionsprozesse sollen dann die klonale Proliferation dieser Zellen verursachen.

Untersuchungen haben in der Vergangenheit gezeigt, dass die Aktivierung von Mutationen des BRAF-Gens z.B. in gutartigen melanozytären Nävi für eine bösartige Transformation nicht ausreichend ist⁴⁰ und dass für die Proliferation von Melanozyten eine Kombination mehrerer Wachstumsfaktoren erforderlich ist, da dies nur bei einer robusten und verlängerten Aktivierung von ERK auftreten kann.⁴¹⁻⁴³ Diese Daten deuten darauf hin, dass Melanomwachstum, -invasion und -metastasierung auf konstitutiv aktivierte ERK zurückzuführen sind, die offenbar durch übermäßige Wachstumsfaktoren durch autokrine Mechanismen und BRAF-Kinase-Aktivierung vermittelt werden.⁴⁴

So liegt die Bedeutung des RAS-RAF-MEK-ERK-Weges für die Melanogenese darin, nicht nur einen, sondern viele mögliche Schlüsselpunkte für die bösartige Entwicklung zusammenzuführen: eine sehr hohe Anzahl von aktivierenden Mutationen von BRAF und RAS, Verlust von Suppressorgenen und Inhibitoren wie NF-1, zusätzlicher Wachstumsfaktor-Einfluss und andere Kreuzregulierungsmechanismen, die teilweise verstanden oder noch vollständig zu ergründen sind.

Einige dieser Prozesse sind bereits im Detail untersucht worden:

Was passiert, wenn NRAS mutiert ist?

Aus der bekannten Funktion des RAS-Moleküls kann die Wirkung einer aktivierenden RAS-Mutation abgeleitet werden: Es bewirkt eine Stabilisierung in der GTP-gebundenen Form,^{15,24} auf die eine dauerhafte Aktivierung von BRAF und anschließend ERK folgt. Da es den Anschein hat, dass RAS andere nachgelagerte Signalwege wie PI3K und Rac- und Rho-Proteine aktivieren kann, die mit der Regulation des Zytoskeletts und der Invasivität von Tumorzellen verbunden sind,^{21,24,25} werden aktivierende RAS-Mutationen wahrscheinlich

einen sehr starken Einfluss auf die Entwicklung von Melanomen haben.

Was passiert, wenn BRAF mutiert ist?

Die Aktivierung von BRAF durch Mutation resultiert aus einer Konformationsänderung der Proteinstruktur, die durch Glutaminsäure verursacht wird. Diese wirkt als Phosphomimetikum zwischen den Phosphorylierungsstellen Thr598 und Ser601 und stört die Interaktion zwischen dem P-Loop und dem Aktivierungssegment des BRAF-Proteins. Auf diese Weise destabilisiert die BRAF V600E-Mutation die inaktive Form der BRAF-Kinase und verschiebt das Gleichgewicht in den konstitutiv aktiven Zustand.⁴⁵

Dies führt zu einer Aktivierung von ERK, ohne dass zuvor eine RAS-Aktivierung erforderlich ist. Dies würde dann unabhängig von Wachstumsfaktoren zu einer erhöhten mitotischen Aktivität führen.^{34,44}

Obwohl die meisten Nävi eine BRAF-Mutation beherbergen, durchlaufen sie nie eine bösartige Transformation und bleiben während des gesamten Lebens des Individuums wachstumsgehemmt. Es wurde beobachtet, dass die Einführung von onkogenem *BRAF* in primäre Melanozyten eine onkogeninduzierte Seneszenz (OIS) und keine Zellproliferation induzierte.⁴⁶

Eine eindeutige Aktivierung des MAPK-Weges kann das Zellwachstum in einer Vielzahl von normalen und Krebszellen unterdrücken, indem sie die zelluläre Seneszenz induziert.²⁴ Hier sind nachfolgende genetische Anomalien wie Verlust von p16INK4a oder Erhöhung der AKT3-Aktivität erforderlich, damit die alternden melanozytären Zellen wieder in den Zellzyklus eintreten können. Jüngste Studien zeigen, dass AKT3 und mutiertes V600E BRAF zusammenarbeiten, um die frühe Melanom-Entwicklung zu fördern; insbesondere scheint AKT3 V600E BRAF zu phosphorylieren, um seine Aktivität sowie die des nachgelagerten MAP-Kinase-Pfades zu verringern. Auf diesem Wege wird die Zellproliferation gefördert.^{43,47}

Garnett et al. und Wan et al. fanden 2004/2005 heraus, dass Mutationen im

BRAF-Gen eine Hyperaktivität des MAPK-Weges auf RAF1(CRAF)-abhängige Weise verursachen. Sie vermuteten, dass CRAF durch BRAF aktiviert wird, und zwar durch einen Mechanismus, der 14-3-3-Protein vermittelte Heterooligomerisierung und CRAF-Transphosphorylierung beinhaltet. Sie identifizierten so eine mögliche BRAF-CRAF-MEK-ERK-Kaskade.^{35,45}

In Zellen mit mutiertem BRAF finden wir hauptsächlich RAF-Monomere, während in Wildtypzellen Homo- und Heterodimere von BRAF und CRAF (BRAF-BRAF/CRAF-BRAF) nach RAS-Aktivierung zu finden sind.⁴⁸ Der Wirkmechanismus bei Hemmung von BRAF in Wildtyp-Zellen, wurde 2010 von Poulikakos und Kollegen ergründet. Bei der Aktivierung eines der Proteine im Dimer findet eine Transaktivierung des anderen Proteins im Dimer statt.^{49,50} Zusammen mit der Entdeckung der BRAF-CRAF-MEK-ERK-Kaskade würde dies eine Transaktivierung von ERK durch die Transaktivierung von BRAF sowie durch CRAF bedeuten, wenn BRAF bei Wildtyp-Melanom medikamentös gehemmt wird. Die Hemmung von BRAF bei Wildtyp-Patienten führt deshalb zu einer paradoxen Aktivierung des Weges.

Die Rolle von NF1

NF1 ist ein negativer Regulator des RAS-Weges und ein bekannter Tumorsuppressor. In früheren Arbeiten wurde seine Rolle für den Krebs im Zusammenhang mit der Neurofibromatose Typ 1 untersucht, der häufigsten erblichen neurokutanen Erkrankung, die mit einem erhöhten Risiko für bösartige Tumore von Gewebe aus neuronalen Kammzellen verbunden ist. Die Melanominzidenz ist bei der Neurofibromatose Typ 1 nicht erhöht - auch wenn die Melanozyten von neuronalen Kammzellen stammen. Im Jahr 2006 berichteten Rübben et al. über den Fall eines 15-jährigen Jungen mit Neurofibromatose Typ 1, der ein superfiziell spreitendes Melanom entwickelte und wiesen nach, dass bei diesem Patienten beide NF-1-Kopien inaktiviert waren.⁵¹

Im Jahr 2003 beobachteten Foster et al. einen klinischen Zusammenhang

zwischen Aderhautmelanom und Neurofibromatose Typ 1 und stellten die Hypothese auf, dass Mutationen des NF1-Gens gelegentlich eine Rolle bei der Pathogenese des Aderhautmelanoms spielen könnten.⁵²

Ishii et al. hatten bereits 2001 über den Fall eines 64-jährigen Mannes mit Neurofibromatose Typ 1 berichtet, der ein primäres malignes Melanom des Anus entwickelte. Die genetische Analyse des resezierten Tumors hatte den Verlust der Heterozygotie des NF1-Gens bestätigt.⁵³

In den letzten Jahren wurde die Rolle von NF1 für das Melanom von mehreren Arbeitsgruppen untersucht. Sie berichteten, dass der Verlust der NF1-Funktion die negative Regulierung von RAS freigibt, was zu einer erhöhten Signalisierung durch nachgeschaltete Signalwege einschließlich der PI3K/AKT- und MAPK-Kaskaden führt.

Eine Studie von Maertens und Kollegen beschreibt ein transgenes Mausmodell, in dem das mutierte BRAF und der NF1-Verlust zusammen dazu führen, die onkogeninduzierte Seneszenz zu unterdrücken und die Melanomentwicklung zu fördern.⁵⁴ Whittaker et al. identifizierten den NF1-Verlust als Schlüsselfaktor für die erworbene und intrinsische BRAF-Inhibitorresistenz.⁵⁵

In Maertens Studie unterdrückte die RAF-Aktivierung in Zellen, die die NF1-Funktion beibehielten, die RAS- und AKT-Signalisierung - ein Effekt, der mit Wachstumshemmung verbunden ist. Die Induktion von RAF in NF1-Null-Zellen hemmte RAS nicht, und sowohl die AKT-Signalisierung als auch die Proliferation wurden beibehalten. Sie mutmaßten somit, dass NF1-Mutationen die BRAF-induzierte Seneszenz unterdrücken und die Hyperproliferation der Melanozyten und die Melanomentwicklung fördern.⁵⁴

Infolgedessen wären NF1/BRAF-mutante Tumore resistent gegen BRAF-Inhibitoren, reagieren aber empfindlich auf die kombinierte Hemmung von mitogen-aktiviertem Protein/extrazellulärer signalregulierter Kinase- Kinase und mTOR. Darüber hinaus wurde berichtet, dass NF1 bei humanen Melanomen, die gleichzeitige BRAF-Mutationen aufweisen, mutiert oder unterdrückt wird, und dass die NF1-Ablation die Empfindlichkeit von Melanomzelllinien gegenüber

BRAF- Hemmern verringert. ^{54,56}

Der PI3K-Signalweg beim Melanom

Der PI3K-Signalweg wird in einer großen Anzahl von Melanomen aktiviert und seine Aktivierung spielt nachweislich eine Rolle bei der Verhinderung des Eintritts von Melanozyten in die onkogeninduzierte Seneszenz beim BRAF- vermittelten Melanom. ^{51,52}

Wie bereits erwähnt, hat sich gezeigt, dass sein Einfluss auf die Melanom-Entwicklung durch direkte Mutationen der beteiligten Gene (inaktivierende Mutationen oder Deletionen von PTEN,²⁰ aktivierende Mutationen von NRAS^{21,22} oder Überexpression von AKT²⁰), sowie indirekt durch Interaktion des MAPK-Pfades mit dem PI3K/AKT-Pfad an mehreren Stellen erfolgt. Ein Beispiel ist die direkte Aktivierung von PI3K durch RAS. Der Verlust des Tumorsuppressors PTEN führt zur Aktivierung von AKT, was auch zu einer erhöhten mTOR-Aktivierung führt. Eine direkte Aktivierung des PI3K-Weges durch Aktivierung von Mutationen der PI3K-Untereinheiten ist selten. ^{15,22}

Vredevelde et al. zeigten, dass die PTEN- Depletion oder die erhöhte Aktivierung der Proteinkinase B (AKT) die BRAF V600E-mutationsinduzierte Seneszenz in Fibroblasten und Melanozyten abbrach, was darauf hindeutet, dass die Aktivierung des PI3K-Pfades zur Progression von Nävi zum Melanom beiträgt. ⁵⁷

Therapierelevante Mutationen

In einem Versuch, eine umfassende Datenbank für Melanomgene aufzubauen, extrahierten Zhang et al. aus 682 PubMed- Abstracts bis zu 527 humane Melanomgene (422 proteinkodierende, 95 microRNAs und 10 lncRNAs). Die URL der Datenbank lautet: <http://bioinfo.ahu.edu.cn:8080/Melanoma/index.jsp> ⁵⁸ Sie enthält allgemeine Informationen über jedes Gen sowie Informationen über Expression, Methylierung, Wechselwirkungen, Pfade und Medikamente.

Auch das Cancer Genome Atlas Network (TCGA) hat in seinem jüngsten Bericht über Melanommutationen in "Cell" (2015) eine sehr hohe mittlere Mutationsrate

festgestellt: Sie berichten, dass es die höchste Anzahl unter allen Krebsarten ist, die bisher von TCGA analysiert wurden (16,8 Mutationen/Mb) sowie unter allen gleichartigen Ergebnissen aus anderen Melanom – und UV-induzierten Hautkrebsarten. 76% ihrer primären und 84% ihrer metastatischen Proben besaßen eine UV-Signatur, definiert als mehr als 60% C>T-Übergänge an Dipyrimidin-Stellen oder CC>TT-Mutationen mehr als 5% der gesamten Mutationslast. Unter den signifikant mutierten Genen, die sie fanden, waren zuvor beschriebene Melanom-Onkogene und Tumorsuppressoren wie BRAF, NRAS, CDKN2A, TP53 und PTEN, kürzlich identifizierte mutierte Gene (RAC1, MAP2K1, PPP6C und ARID2), sowie NF1, IDH1 und RB1. Es wurden 3 neue Kandidaten identifiziert: DDX3X (eine RNA-Helikase) und zwei Gene, die für ribosomale Proteine kodieren: MRPS31 und RPS27.

76% ihrer primären und 84% ihrer metastatischen Proben besaßen eine UV-Signatur, definiert als mehr als 60% C>T-Übergänge an Dipyrimidin-Stellen oder CC>TT-Mutationen in mehr als 5% der gesamten Mutationslast. Unter den signifikant mutierten Genen, die sie fanden, waren zuvor beschriebene Melanom-Onkogene und Tumorsuppressoren wie BRAF, NRAS, CDKN2A, TP53 und PTEN, kürzlich identifizierte mutierte Gene (RAC1, MAP2K1, PPP6C und ARID2), sowie NF1, IDH1 und RB1. Es wurden 3 neue relevante Gene identifiziert: DDX3X (eine RNA-Helikase) und zwei Gene, die für ribosomale Proteine kodieren: MRPS31 und RPS27.⁵⁹

Nicht alle Gene, die bisher mit dem Melanom in Verbindung gebracht wurden, sind aufgrund fehlender Targeting- Medikamente klinisch relevant. Es ist daher sinnvoll, sich die wichtigsten genauer anzusehen. So getan von TCGA, schufen sie einen Rahmen für die genomische Klassifikation in einen von vier Subtypen, basierend auf dem Muster der am weitesten verbreiteten signifikant mutierten Gene: mutierter BRAF, mutierter RAS, mutierter NF1 und Triple-WT (Wildtyp).⁵⁹

Mutationen im KIT-Gen, die sich bei akralem und mukosalem sowie uvealem Melanom am häufigsten gezeigt haben,^{60–63} sind unter Melanomen des Triple-WT-Subtyps zu finden. Es wurde gezeigt, dass sie beim kutanen Melanom selten

sind.⁶⁰ Die integrative Analyse ergab eine Anreicherung von KIT-Mutationen und fokalen Amplifikationen sowie komplexe strukturelle Neuordnungen als Merkmal dieses Subtyps.⁵⁹

Im Folgenden wird unter Verwendung der oben genannten Klassifikation die Rolle der derzeit therapierelevanten Mutationen beim Melanom näher beleuchtet.

B R A F

Seit dem ersten Bericht über somatische BRAF-Mutationen bei einer Vielzahl von Krebsarten von Davies et al. im Jahr 2002 haben mehrere Studien versucht, das Mutationsmuster des Melanoms zu ergründen. Davies berichtete, dass die BRAF-Mutation in 66% der malignen Melanome vorhanden sei,³⁴ was uns eine erste Vorstellung von der hohen Anzahl der BRAF- mutierten Melanome und damit von der Bedeutung dieses Gens als Haupttreiber für ihre Entwicklung und das Fortschreiten des Melanoms gibt.

Tabelle 3: BRAF-Mutationen in verschiedenen Analyseversuchen in früheren Studien.

BRAF mutiert (% der analysierten n)	BRAF V600E (% der BRAF mutierten)	seltene BRAF Mutationen (% der BRAF mutierten)	Autor, Journal, Jahr
66%			Davies et al., Nature, 2002
41% - 50%			Houben R et al., J Carcinog, 2004; Curtin JA et al., N Engl J Med, 2005
46% - 48%	73%-91%	7-20% V600K weniger häufige V600D und L597R	Colombino M et al., J Clin Oncol., 2012 Long GV et al., J Clin Oncol., 2011

			Menzies et al., Clin Cancer Res., 2012
41-59%	79%	(6-30% 12% V600K 5% V600R 4% V600M) ⁶¹	Rubinstein et al., JTM, 2010 Beadling et al., JMD, 2011 Long et al., CO, 2011 Lovly et al., PLoS One. 2012.
44,9%	82,1 % 75,4 %	seltene BRAF 20% Non pV600E 24,6 % pV600K 17,2%	Heinzerling et al., BJC, 2013 Greaves et al., JMD, 2013 ⁶⁴
52%	124/166 (74,7%)	V600K n=18 (10,8 %) V600R n=3 (1,8 %) K601 n=5 (3 %)	TCGA, The Cell, 2015

RAS

Die drei menschlichen RAS-Gene kodieren vier hochverwandte 188 bis 189 Aminosäureproteine, die als *H-RAS*, *N-RAS* und *K-RAS* (*K-RAS4A* und *K-RAS4B*) bezeichnet werden. RAS und RAS-ähnliche Proteine werden oft bei Krebserkrankungen dysreguliert, indem Mutationen von RAS- Isoformen oder deren Effektoren bei fast einem Drittel aller menschlichen Krebsarten aktiviert werden.^{24,65} NRAS ist das zweithäufigste mutierte Gen beim Melanom und tritt in etwa 40% der Fälle bei BRAF-Wildtyp-Melanomen auf.^{65,66}

RAS-Hotspot-Mutationen beinhalten Aminosäureveränderungen mit funktionellen Folgen für alle drei RAS-Familienmitglieder (N-, K- und H-RAS). TCGA fand insgesamt einen Anteil von 28% (n = 88) an somatischen NRAS-Mutationen in ihrer Studienkohorte. Von diesen hatten 86 Hot-Spot-Mutationen,

einschließlich Q61R (n = 35), Q61K (n = 28), Q61L (n = 11), Q61H (n = 4), 61_62QE > HK (n = 1), G12R/D/A (n = 4) und G13R/D (n = 3). Sie identifizierten auch weniger häufige Mutationen in anderen RAS-Familienmitgliedern, darunter vier Hot-Spot-HRAS (G13D, G13S und Q61K[n = 2]) und drei KRAS (G12D, G12R und Q61R) Mutationen; alle schlossen sich gegenseitig mit NRAS- und BRAF-V600- und K601-Mutationen aus.⁵⁹

Lee et al. berichteten in ihrer Meta-Analyse aus dem Jahr 2011 von einer NRAS-Mutationsrate von 41% beim kutanen Melanom. Sie berichteten, dass die Mutationen mit dem histologischen Subtyp und der Tumorlokalisation assoziiert seien, aber nicht mit Alter und Geschlecht. Sie fanden die NRAS-Mutation häufig bei Patienten mit nodulärem Melanom (OR=1-894; P<0-001) und bei Melanomen, die auf chronisch sonnengeschädigter Haut auftreten (OR=1-887; P=0.018).⁶⁷

NF1

Laut TCGA war das dritthäufigste signifikant mutierte Gen im MAPK-Pfad NF1, das in 14% der Proben mutiert war. Mehr als die Hälfte der Mutationen seien Loss-of-Function (LoF)-Ereignisse, darunter 27 Nonsense, 9 Spleißstellen und 4 Frame-Shift- Ereignisse aus 65 Mutationen. Der NF1-Subtyp (n = 28) hatte die höchste Mutationsprävalenz (39 Mutationen/Mb, mehr als doppelt so hoch wie die der anderen drei Subtypen). In ihrer Kohorte war NF1 in 38,7% der nicht-hot-spot BRAF/NRAS-Melanome (29/75) und in 70% der nicht-hot-spot BRAF/NRAS-Proben mit UV-Signatur mutiert (26/38). Sie berichteten, dass NF1-Mutationen antikorreliert waren mit Hot-Spot-BRAF-Mutationen (p = 1,9e9), aber nicht mit Hot-Spot-RAS-Mutationen.⁵⁹

Triple-negative

Die triple-negative Untergruppe wurde von TCGA als triple- Wildtypgruppe mit heterogenen Merkmalen definiert, die durch einen Mangel an Hot-Spot-BRAF-, N/H/KRAS- oder NF1-Mutationen gekennzeichnet ist. Sie identifizierten 11

weitere Gene mit wiederkehrenden Mutationen, darunter bekannte Treiber von Aderhautmelanomen -GNAQ (n = 1) und GNA11 (n = 2), KIT (n = 6) sowie CTNNB1 (n = 3) und EZH2 (n = 1).⁵⁹

Die Triple-Wildtyp-Subgruppe ist genetisch eine Gruppe mit hohen Kopiezahlen und komplexen Umlagerungen ohne UV-Signatur.⁵⁹

1.3 Detektionsmethoden der BRAF-Mutation

Da mit der Entwicklung spezifischer BRAF-Hemmer das Wissen über den BRAF-Status eines Melanompatienten für seine Behandlung unerlässlich geworden ist, haben Detektionsmethoden ihren Weg in die Routinediagnostik gefunden.

Das Mutationsprofil von Melanompatienten wird in der Regel durch Extraktion von DNA aus einem paraffineingebetteten Tumorgewebeblock durchgeführt, gefolgt von einer Sequenzierung nach der Sanger-Methode, Pyrosequenzierung oder Echtzeit-PCR. In den letzten Jahren wurde der immunhistochemisch unterstützte Nachweis des Vorliegens einer BRAF V600E-Mutation entwickelt und sogar nanomechanische Ansätze werden getestet.⁶⁸

DNA -Extraktion und Amplifikation

Um möglichst viele Tumorzellen zu erhalten, wird ein paraffineingebetteter Tumorgewebeblock von einem Pathologen oder Dermatologen mikrodisseziert. Nach Entparaffinisierung und Lyse, z.B. Digestion durch Proteinase K, wird ein Amplikon, das das BRAF-Codon enthält, durch einen Polymerase-Kettenreaktions(PCR)-Assay amplifiziert.

a) Sanger- Sequenzierung

Diese enzymbasierte Ketten-Terminierungsmethode wurde erstmals 1975 von Frederick Sanger und Alan Coulson entwickelt und gilt seit langem als Goldstandard für die DNA-Sequenzierung.

Nach Denaturierung der doppelsträngigen DNA zu Einzelsträngen werden Oligodesoxynukleotid- Primer zusätzlich zur DNA-Polymerase hinzugefügt. Diese katalysieren die Synthese komplementärer DNA-Stränge in 4 parallelen Mischungen. Diese Mischungen enthalten dNTPs und fluoreszenzmarkierte 2'-3'-Dideoxynukleotide (ddNTP) in niedriger Konzentration. Die Integration von ddNTP führt zu einem Stopp. Das Ergebnis ist eine Reihe von Syntheseprodukten unterschiedlicher Länge. Die Auswertung erfolgt durch

Elektrophorese in Polyacrylamid-Gel. ⁶⁹

b) Pyrosequenzierung

Die Pyrosequenzierung gehört zu den Sequenzierungsmethoden der nächsten Generation, da sie leicht automatisierbar ist. Die Methode wurde 1996 von Mostafa Ronaghi und Pal Nyren in Stockholm entwickelt.^{70,71}

Wie die Sanger-Sequenzierung basiert sie auf DNA-Polymerase zur Synthese von DNA-Komplementärsträngen.

Der Begriff Pyrosequenzierung stammt vom Pyrophosphat (Ppi), das bei der Integration eines komplementären Nukleotids freigesetzt wird. Pyrophosphat wird durch ATP-Sulfurylase in Adenosintriphosphat (ATP) überführt. Durch die Luziferase-Reaktion entsteht Oxyluiferin, eine leuchtende Substanz. Die Lichtintensität ist proportional zur Menge des gelösten ATP.

Die DNA wird mit Hilfe von Adaptern auf Beads geladen. Diese Beads ermöglichen es, DNA-Stränge mittels einer Scheibe mit Poren der Beadsgröße voneinander zu trennen. Lichtsignale werden erkannt, wenn ein komplementäres dNTP integriert ist.⁷⁰⁻⁷²

c) Echtzeit-PCR (z.B. COBAS ®)

Dieser Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktionsassay wurde entwickelt, um die V600E (1799T>A) Mutations-DNA aus formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeproben nachzuweisen.^{73,74}

Roche® gibt an, dass der cobas® BRAF-Mutationstest in präklinischen und klinischen Studien 97,3% positive Übereinstimmung beim Nachweis der BRAF V600E (1799 T>A)-Mutation hatte.⁷⁵

Inkonsistente Kreuzreaktivität mit anderen V600-Punktmutationen wie p.V600K, p.V600E(2) (c.1799_1800delinsAA), p.V600D (aber nicht mit p.V600R) wurde beobachtet.⁷⁶ Bei diesem Test liegen keine Informationen über die Art der nachgewiesenen Mutation vor.

d) Nachweis mittels Immunhistochemie

Ein Nachweis über das Vorhandensein einer medikamentös ansteuerbaren BRAF-Mutation ist in jüngster Zeit durch die Immunhistochemie möglich geworden. Die Abschnitte werden nach der Entparaffinisierung mit einem mutationsspezifischen Antikörper BRAF V600E gefärbt, der nach Herstellerangaben appliziert wird. Die immunpräparierten Objektträger werden unter einem Mikroskop bewertet.^{77,78}

e) Nanomechanischer Cantilever-Ansatz (Biosensor)

Im September 2016 schlossen Huber et al. eine klinische Vor-Studie mit Cantilever-Array-Sensoren ab, um eine BRAFV600E-Einzelpunktmutation unter Verwendung von Gesamt-RNA aus Biopsien von metastasiertem Melanom verschiedener Quellen (chirurgisches Material, das entweder gefroren oder mit Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet ist) nachzuweisen. Sie fanden heraus, dass die Methode schneller ist als die Standard-Sanger- oder Pyrosequenzierungsmethoden und vergleichbar empfindlich wie die Next-Generation-Sequenzierung. Sie berichten, dass die Verarbeitungszeit von der Biopsie bis zur Diagnose unter einem Tag liegt und dass sie keine PCR-Amplifikation, Sequenzierung und Markierungen erfordert.⁶⁸

1.4 Ziele der Arbeit

Seit dem ersten Bericht über die Frequenz von BRAF-Mutationen bei Melanomen und anderen Malignomen im Jahr 2002 sind die Entwicklungen in der Melanombehandlung so turbulent wie nie zuvor. Seit 2011 gab es mehrere neue Zulassungen in den USA und Europa, sowohl die Gruppe der zielgerichteten Therapien als auch die Immuntherapieoptionen erwiesen sich als wirksam mit Auswirkungen auf das Gesamtüberleben. Mit der Entwicklung spezifischer BRAF-Hemmer wie Vemurafenib und Dabrafenib haben wir effektive, aber auch teure Behandlungen für Patienten mit fortgeschrittenem Melanom gewonnen. Diese Entwicklung veranlasste einige, das Melanom als "auf dem Weg zur Heilung" zu bezeichnen,⁷⁹ während andere sie nüchterner bewerteten mit der

Aussage, wir müssten "noch lernen zu gehen".⁸⁰

Nicht nur aus finanziellen Gründen, sondern auch, weil BRAF-Hemmer für Patienten ohne eine medikamentös ansteuerbare Mutation durch eine paradoxe Aktivierung des MAPK-Weges schädlich sein könnten,^{49,50} ist der Nachweis einer BRAFV600-Mutation vor der Einleitung einer solchen Behandlung dringend erforderlich.

Ziel meiner Arbeit war es, weitere und besser fundierte Informationen über die Verteilung und Häufigkeit von BRAF-Mutationen zu erhalten.

Darüber hinaus haben wir versucht, die Existenz einer ansteuerbaren BRAF-Mutation vorherzusagen. Wir verglichen ein binäres logistisches Regressionsmodell, eine Klassifikations- und Regressionsanalyse (CART)⁸¹ und ein Random Forrest-Modell.⁸² *Ein solches Modell könnte für den Arzt hilfreich sein, da einerseits nicht immer Tumorgewebe für die Sequenzierung zur Verfügung steht und andererseits, die Sequenzierung von BRAF-Mutationen immer noch zeit- und kostenintensiv ist.*⁸³

2. METHODEN

2.1 *Patienten und Proben*

Wir haben die histologischen, klinischen und Mutationsbefunde von Patienten aus fünf großen dermatologischen Kliniken in Süddeutschland gesammelt, die auf die Behandlung von Melanompatienten spezialisiert sind:

- Die Universitätshautklinik, Zentrum für Dermatoonkologie, Universitätsklinikum Tübingen, Tübingen
- Die Klinik für Dermatologie und das Nationale Zentrum für Tumorerkrankungen, Universitätsklinikum Heidelberg, Heidelberg
- Die Abteilung für Dermatologie, Universitätsklinikum Erlangen, Erlangen
- Die Abteilung für Dermatologie und Allergologie, Klinikum Augsburg, Augsburg
- Die Abteilung für Dermatologie, Universität Regensburg, Regensburg

Die in dieser Studie verwendeten Tumorproben umfassen primäre Melanome und Metastasen verschiedener Lokalisationen.

Unter den Proben befand sich ein histologisch als Klarzellsarkom klassifiziertes Malignom. Dieses ist allgemein auch als „malignes Melanom der Weichteile“ bekannt und seine Klassifizierung als Sarkom oder Melanom ist aufgrund der hohen Ähnlichkeit mit dem Melanom in klinischen, pathologischen und molekularen Eigenschaften unklar.

Die klinischen Daten wurden manuell aus den Patientenakten erhoben oder, soweit verfügbar, aus den lokalen Zentralregistern für jeden Patienten entnommen.

Die folgenden klinischen Variablen wurden gesammelt: Geschlecht, Alter bei der Erstdiagnose, Art des Melanoms, Tumordicke nach Breslow, Vorhandensein von Ulzeration, Lokalisation und das Vorhandensein einer BRAF-Mutation. Alle Variablen wurden für die statistischen Modelle berücksichtigt. Potentiell medikamentös adressierbare BRAF-Mutationen (V600E, V600K, positiv, nicht spezifiziert, V600R, V600E2, V600D, V600G, 600M) wurden als abhängige

Variable ausgewählt. Fehlende Werte wurden imputiert.

2.2 DNA Extraktion und Mutationsanalyse/ Sequenzierung – Testprotokolle

Die DNA-Extraktion und Mutationsanalyse erfolgte nach den Routineverfahren der Institute Tübingen, Erlangen, Regensburg, Heidelberg und Augsburg. Der Mutationsnachweis erfolgte größtenteils mittels Pyrosequenzierung oder konventioneller Sanger-Sequenzierung. In Erlangen war die Pyrosequenzierung das Standardverfahren, in den Zentren Tübingen, Regensburg, Augsburg und Heidelberg wurde meist die konventionelle Sanger-Sequenzierung eingesetzt. In ausgewählten Fällen wurde der Mutationsstatus mit einem standardisierten Echtzeit-PCR-System (COBAS® 4800) von Roche® analysiert.⁷⁶

Fünzig Patienten hatten eine erste Analyse durch den Cobas-Test erhalten, da sie im Rahmen einer klinischen Studie, in der Cobas® vom zugewiesenen Zentrallabor verwendet wurde, mit der Therapie begannen. Diese wurden als BRAF-mutiert, aber nicht weiter bestimmbar, in die statistischen Analysen einbezogen.

2.3 Statistik

Die gesamte Population wurde während des Entwicklungsprozesses der Modelle verwendet; die prädiktive Leistung der Modelle wurde durch Bootstrapping-Verfahren mit einer Anzahl von jeweils 500 Wiederholungen validiert. Für die Analyse von Kontingenztabelle wurde Fishers Exact Test zur Gewichtung von Unterschieden verwendet. Für alle Tests wurden Werte von 0,05 oder niedriger als signifikant angesehen.

Alle Analysen wurden mit R Version 3.1.1.1,⁸⁴ rms package Version 4.4-0⁸⁵ und dem Caret-Paket Version 6.0-58⁸⁶ durchgeführt. Die Neuberechnung der Random Forests zur Bereitstellung grafischer Ausgabedaten erfolgte mit dem

randomForestSRC-Paket Version 1.6.⁸⁷ und die Darstellung (Plotting) erfolgte mit Funktionen des ggRandomForests-Pakets Version 1.2.0.⁸⁸

Modelle zur Vorhersage des BRAF-Status:

a- Binäres logistisches Regressionsmodell

Die binäre logistische Regression versucht, die Wahrscheinlichkeit und die Chancen eines bestimmten binären Ereignisses (medikamentös adressierbare Mutation vs. keine medikamentös adressierbare Mutation) in Abhängigkeit von den Werten der unabhängigen Variablen (gesammelte klinische Daten, s. oben) zu modellieren. Es kann die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines Ereignisses für eine zufällig ausgewählte Beobachtung im Vergleich zur Wahrscheinlichkeit, dass das Ereignis nicht eintritt, schätzen. Es kann auch den Einfluss einer Reihe von Variablen auf eine binäre Reaktionsvariable vorhersagen und Beobachtungen klassifizieren, indem es die Wahrscheinlichkeit schätzt, dass eine Beobachtung in einer bestimmten Kategorie ist.

Bei der einfachen linearen Regression prognostiziert eine Variable die andere. In Modellen der multiplen Regression wird mehr als eine unabhängige Variable berücksichtigt.^{82,89}

b- Klassifikations- und Regressionsbaum-Analyse (classification and regression tree CART)

Der Klassifizierungs- und Regressionsentscheidungsbaum ist ein wichtiges Werkzeug im Bereich des maschinellen Lernens und der prädiktiven Analytik. Es ist ein binäres rekursives Partitionierungsverfahren, das in der Lage ist, kontinuierliche und nominale Attribute als Ziele und Prädiktoren zu verarbeiten. Ein Entscheidungsbaum erstellt eine Art Flussdiagramm, das aus Knoten ("Blättern") und einer Reihe von Entscheidungen besteht, die basierend auf einem Knoten ("Zweigen") getroffen werden sollen, was zu einer hierarchischen Darstellung von Daten führt.

Ein Klassifikationsbaum hilft bei der Vorhersage einer kategorischen Variable, ein Regressionsbaum wird bei der Vorhersage einer kontinuierlichen Variable verwendet. Die Daten werden in ihrer Rohform behandelt. Beginnend im Wurzelknoten werden die Daten in zwei Zweige aufgeteilt, und jedes der Zweige wird in Unterzweige aufgeteilt. Bäume werden ohne die Verwendung einer Stopregel auf eine maximale Größe modelliert; der Prozess des Baumwachstums stoppt, wenn aufgrund fehlender Daten keines weiteren Splits möglich sind. Der maximal große Baum wird dann bis zur Wurzel zurückgeschnitten (getrennt durch Split). Die zu beschneidenden Splits sind diejenigen, die am wenigsten zur Gesamtperformance des Baums auf Trainingsdaten beitragen. Die beste Aufteilung sollte die Verunreinigung des Ergebnisses in den resultierenden Datenteilmengen minimieren. Der CART-Mechanismus soll nicht nur einen Baum produzieren, sondern eine Folge von verschachtelten, beschnittenen Bäumen, von denen jeder als optimaler Baum geeignet ist. Der "richtig dimensionierte" Baum wird identifiziert, indem die prädiktive Leistung jedes Baumes in der Schnittfolge anhand unabhängiger Testdaten bewertet wird.

Alles in allem ist es ein 3-stufiger Prozess des Baumwachstums, des Baumschnittes - das Entfernen der schwächsten Glieder im Baum, der Spalten, die am wenigsten zur Leistung des Baumes bei den Testdaten beitragen - und der Baumauswahl. ^{81,86,90}

c- Random Forest Modelle

Random Forest Modeling ist eine Klassifizierungs- und Regressionsmethode, die durch den Aufbau vieler einfacher unkorrelierter Entscheidungsbäume funktioniert. Kernbaustein ist ein von CART inspirierter Entscheidungsbaum. Die Sammlung von typischerweise 200 - 500 Entscheidungsbäumen liefert Vorhersagen.

Random Forests sind ein mächtiges Werkzeug, um kontinuierliche Variablen vorherzusagen und die Wahrscheinlichkeit abzuschätzen, dass ein bestimmtes Ergebnis eintritt. Die Ergebnisse können Ja/Nein oder eine von mehreren Möglichkeiten sein. Die Bäume werden entweder durch Mittelung oder

Abstimmung kombiniert.

Der wesentliche Unterschied zur klassischen CART-Analyse besteht in der zufälligen Auswahl von Daten und Variablen. Zufällige Teilmengen von Daten werden verwendet, um Entscheidungsbäume zu erstellen, und anstatt immer die beste Aufteilung zu wählen, wird auch der Splitter zufällig ausgewählt. Diese Zufälligkeit stellt sicher, dass die verschiedenen Bäume unterschiedlich sind und schafft einen "zufälligen Wald" von Bäumen. Je mehr Bäume die Vorhersage beeinflussen dürfen, desto genauer wird die Vorhersage sein, d.h. desto geringer ist die Fehlerquote. ^{82,87}

3. ERGEBNISSE

3.1 Allgemeine Patientenmerkmale

Für die Analyse standen Daten von 1170 Patienten zur Verfügung. Die Eigenschaften der Patienten sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Das Durchschnittsalter der Patienten lag bei 57 Jahren, das Durchschnittsalter beim Betreten des Stadiums IV bei 60,6 Jahren. 57,8% waren männlich und 42,2% weiblich. Die mittlere Tumordicke betrug 3,62 mm.

Tabelle 4: Patientenmerkmale

	N	%
Geschlecht		
Männlich	676	57.8
Weiblich	494	42.2
Alter [Mittelwert (sd)]	57.04 (14.53)	
Typ des Melanoms		
Akrolentiginös	78	6.7
Lentigo maligna	19	1.6
Unbekannter Primarius	118	10.1
Melanom auf einem Nävus	7	0.6
Mukosal	48	4.1
Nodular	225	19.2
Nicht klassifizierbar	75	6.4
Okular	15	1.3
Andere Typen	35	3.0

Superfiziell spreitend	243	20.8
Unbekannt	307	26.2
Tumordicke [Mittelwert (sd)]	3.62 (3.53)	
Lokalisation		
Rücken	212	18.1
Gesäß	14	1.2
Gesicht	67	5.7
Fuß	76	6.5
Hand	12	1.0
Kopf, außer Gesicht	84	7.2
Unterleib	25	2.1
Unterarm	12	1.0
Unterschenkel	89	7.6
Mukosal	21	1.8
Hals	25	2.1
Äußere Genitalregion	10	0.9
Thorax, Oberbauch	85	7.3
Oberarm mit Ellbogen	45	3.8
Oberschenkel (inkl. Knie)	70	6.0
Unbekannt	323	27.6
Ulzeration		
Vorhanden	334	28.5
Nicht vorhanden	346	29.6
Unbekannt	490	41.9

Alter bei Eintritt in Stadiums IV[Mittelwert (sd)]	60.56 (13.86)	
BRAF-Mutations-Status		
K601E	1	0.1
L597Q	1	0.1
L597R	1	0.1
L597S	1	0.1
positiv, nicht spezifiziert	50	4.3
V600D	2	0.2
V600E	380	32.5
V600E2	5	0.4
V600G	1	0.1
V600K	65	5.6
V600M	1	0.1
V600R	6	0.5
Wildtyp	656	56.1

3.2 BRAF-Frequenz und -Verteilung

514 Patienten (44%) trugen eine BRAF-Mutation und 656 (56%) Patientenproben waren nicht mutiert. Im Detail wurde bei 380 Patienten ein BRAF-V600E nachgewiesen, in der Häufigkeit gefolgt von 65 Patienten mit einer V600K-Mutation. 50 Patienten wurden mit dem COBAS 4800® RT-PCR-System als positiv für eine BRAF-Mutation eingestuft. Weitere Mutationen wurden in Einzelfällen nachgewiesen, darunter sechs V600R - (1,2%) und fünf V600E2-Mutationen (1% der mutierten, 0,4% aller Patienten). Außerdem waren zwei V600D-Mutationen (0,4%) und je eine von V600M, V600G, L597S, L597R, L597Q und 601K>K/E zu finden.

Es wurde der Zusammenhang zwischen verschiedenen Variablen und dem Vorhandensein oder Fehlen von mutiertem BRAF untersucht. Signifikante Unterschiede bei Vorhandensein von BRAF-Mutationen wurden für das Alter ($p < 0,001$, Abbildung 1), die Lokalisation des Primärtumors ($p < 0,001$), das Tumorstadium der Erstdiagnose ($p = 0,003$), die Art des Primärmelanoms ($p < 0,001$) und die Tumordicke ($p = 0,005$) berechnet. Die vollständigen Details sind in Tabelle 2 dargestellt. Tabelle 3 veranschaulicht zusätzlich die Verteilung aller Variablen gemäß den erfassten Mutationen.

3.3 Korrelationen verschiedener Variablen

Alterskorrelation ($p < 0,001$)

Um die Alterskorrelation zu analysieren, wurden die Patienten in Altersgruppen von jungen Patienten (>45 Jahre), Patienten mittleren Alters (45-60 Jahre) und älteren Patienten (>60 Jahre) unterteilt.

Wie in früheren Studien konnte ein klarer Zusammenhang zwischen Alter und Häufigkeit der BRAF-Mutation im Allgemeinen nachgewiesen werden, da selbst grafisch der Anstieg der BRAF-Frequenz mit abnehmendem Alter ersichtlich ist. Wir stellten eine Positivitätsrate von 67,1% für die junge Altersgruppe, eine Rate von 53,0% für die mittlere Altersgruppe und eine Rate von nur 27,0% für ältere Patienten fest.

Gleichzeitig nimmt die Häufigkeit des BRAF Wildtyps mit zunehmendem Alter zu. Der Unterschied in der Verteilung zwischen Wildtyp und BRAF-Mutation nimmt in der dritten Altersgruppe drastisch zu. Die Unterschiede in der BRAF-Frequenz zwischen den Altersgruppen waren signifikant ($p=0,001$).

Erwähnenswert ist, dass wir alle L579-Mutationen und die 601K>K/E-Mutation in der dritten Altersgruppe (>60 Jahre) gefunden haben, während die V600E2- und V600M-Mutationen nur in der jungen und mittleren (V600E2) Altersgruppe vertreten waren. Die häufigste V600E-Mutation scheint vor allem in jüngeren (76/152) und mittleren (91/249) Altersgruppen zu finden zu sein und wird mit zunehmendem Alter der Patienten (59/315) immer seltener. Die V600K-Mutation zeigt ein davon abweichendes Frequenzmuster, das einen leichten Höhepunkt in der mittleren Altersgruppe (16/249, 6,4%) zeigt und in der jüngeren Kohorte (6/152, 3,9%) sowie in der ältesten Altersgruppe (15/315, 4,8%) seltener wird.

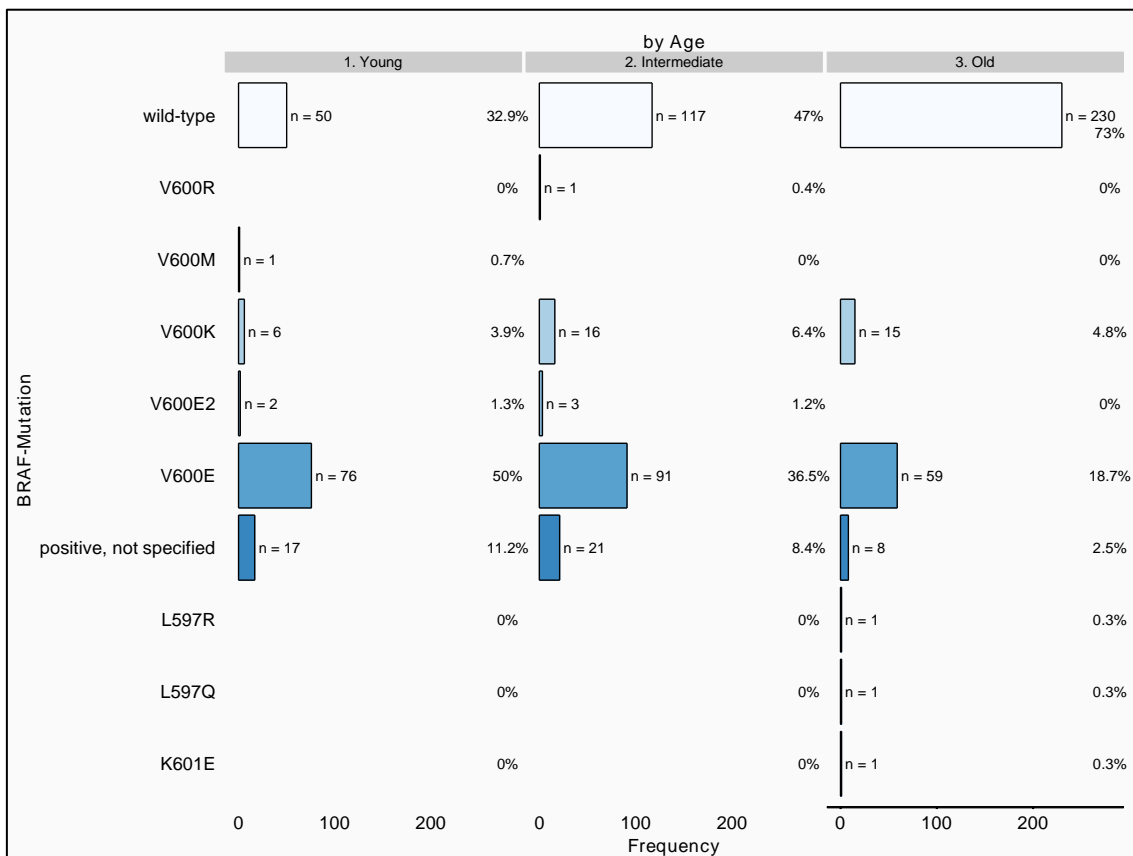


Abbildung 2: Häufigkeit der BRAF-Mutationen entsprechend dem Alter (Young: <45 Jahre, Intermediate: 45-59 Jahre, Old: ≥ 60 Jahre, n=716, nicht imputiert)

Korrelation zur primären Lokalisation ($p < 0,001$)

Wie erwartet, wurden bei Schleimhautmelanomen keine BRAF-Mutationen gefunden und nur 19 Proben aus der akralen Gruppe (4,5% aller BRAF-Mutationen) waren mutiert. Die Lokalisation mit den meisten BRAF-Mutationen war der Stamm (47,2% der BRAF-Mutationen), gefolgt von den Extremitäten (25,4%) und dem Kopf-Hals-Bereich (18,7%). Die Stammregion zeigte die größte Vielfalt an BRAF-Mutationen. Die meisten der seltenen BRAF-Mutationen wurden dort gefunden. Im Vergleich zum V600E-Subtyp erwies sich der V600K im Kopf-Hals-Bereich als dominanter, während die V600E-Mutation am Rumpf und an den Extremitäten dominierte.

Korrelation zur Tumordicke ($p = 0,005$)

Die mittlere Dicke für BRAF- mutierte Tumore betrug 3,30 mm, während wir für nicht-mutierte Melanome eine mittlere Dicke von 3,69 mm fanden. Dünnere Tumore waren eher mutiert als dickere. Teilt man die Tumordicke in zwei Gruppen (dünne Läsionen mit ≤ 2 mm und dickere Tumore > 2 mm), findet man 53% der BRAF- Mutationen in der ≤ 2 mm-Gruppe.

Die Verteilung von V600E und -L zeigte keinen nennenswerten Unterschied. Unter den dünnen Tumoren fanden wir die folgenden seltenen Mutationen: eine V600R, eine V600M, eine V600G, 2 mal V600E2, eine L597S und eine L597R. Unter den dicken Tumoren fanden wir 4 mal V600R, 2 mal V600E2 und je eine L597Q und K601E.

Tabelle 5: Kontingenztabellen verschiedener Variablen mit Vorhandensein oder Fehlen einer BRAF-Mutation, Fisher's Exact Test auf Signifikanz

BRAF-Mutation			
	Wildtyp	Mutiert	p
N	656	514	
Geschlecht = Männlich (%)	378 (57.7)	298 (58.0)	0.974
Geschlecht = weiblich (%)	278 (42.3)	216 (42.0)	
Alter (Mittelwert (sd))	61.31 (13.57)	51.73 (13.94)	<0.001
Lokalisierung (%)			<0.001
Akral	69 (15.0)	19 (4.7)	
Extremitäten	117 (25.4)	107 (26.5)	
Kopf/Hals	101 (21.9)	79 (19.6)	
Mukosal	20 (4.3)	0 (0.0)	
Rumpf	154 (33.4)	199 (49.3)	
Stadium (%)			0.003
I	47 (16.7)	63 (26.5)	
II	94 (33.3)	49 (20.6)	
III	107 (37.9)	92 (38.7)	
IV	34 (12.1)	34 (14.3)	
Typ (%)			<0.001
ALM	63 (13.2)	15 (3.9)	
LMM	14 (2.9)	5 (1.3)	
MM auf Naevus	2 (0.4)	5 (1.3)	
Mukosal	46 (9.7)	2 (0.5)	

NM	112 (23.5)	113 (29.2)	
Nicht klassifizierbar	33 (6.9)	42 (10.9)	
Okular	12 (2.5)	3 (0.8)	
Sonstiges	21 (4.4)	14 (3.6)	
SSM	108 (22.7)	135 (34.9)	
Unbekannter Primarius	65 (13.7)	53 (13.7)	
Dicke (Mittelwert (sd))	3.94 (3.69)	3.24 (3.30)	0.005
Ulzeration = vorhanden(%)	198 (52.2)	136 (45.2)	0.080
Ulzeration = Abwesend(%)	181 (47.8)	165 (54.8)	

3.4 Vorhersage des BRAF-Status

3.4.1 Binäres logistisches Regressionsmodell⁸³

Die Wald-ANOVA-Berechnung unseres binären Regressionsmodells ergab Alter ($c^2=41.85$, $df=1$, $p<0.001$), Art des primären Melanoms ($c^2=38.68$, $df=9$, $p<0.001$), Lokalisation des primären Melanoms ($c^2=20.70$, $df=4$, $p=0.0004$) und Stadium der Erkrankung bei Primärdiagnose ($c^2=9.18$, $df=3$, $p<0.270$) als signifikante prädiktive Faktoren. Die anderen Faktoren wie Geschlecht ($c^2=0.83$, $df=1$, $p=0.3626$), Dicke des primären Melanoms ($c^2=1.75$, $df=1$, $p=0.1863$) und Ulzeration ($c^2=3.57$, $df=1$, $p=0.0588$) waren nicht signifikant. Abbildung 2 stellt den entsprechenden Forest plot der Odds ratios für das Modell dar. Die ergänzende Abbildung 1 zeigt den entsprechenden Forest plot der Effekte des Modells. Die Genauigkeit der Vorhersage des richtigen BRAF-Status betrug 0,6538 (95% CI: 0,6258-0,6811) mit einer Sensitivität von 0,7683 und einer

Spezifität von 0,5078 (Tabelle 3).⁸³ Wir haben zusätzlich ein Nomogramm für unser Modell berechnet, das in Abbildung 3 dargestellt ist. Ein entsprechendes Kalibrierungsdiagramm ist als ergänzende Abbildung 2 zu sehen.

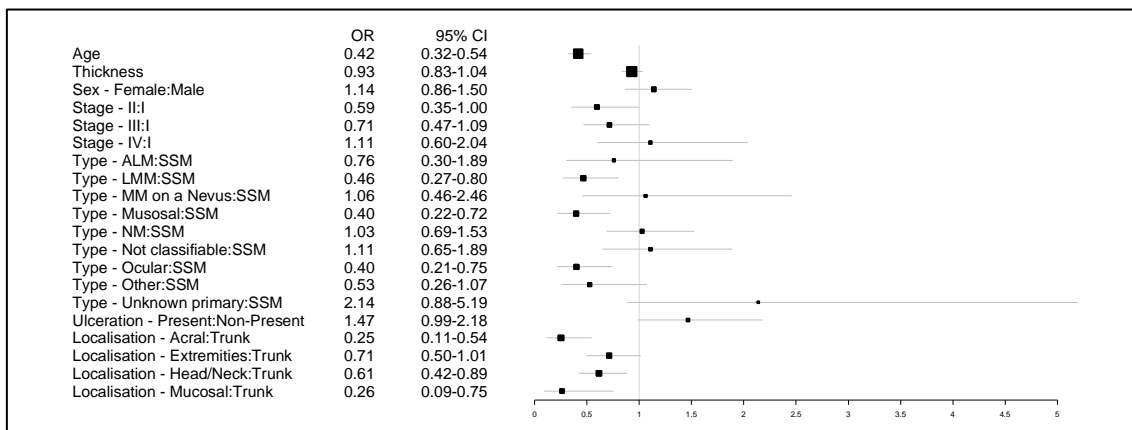


Abbildung 3: Forest plot, Odd Ratios mit 95% Konfidenzintervallen der verschiedenen Prädiktoren für das binäre Regressionsmodell

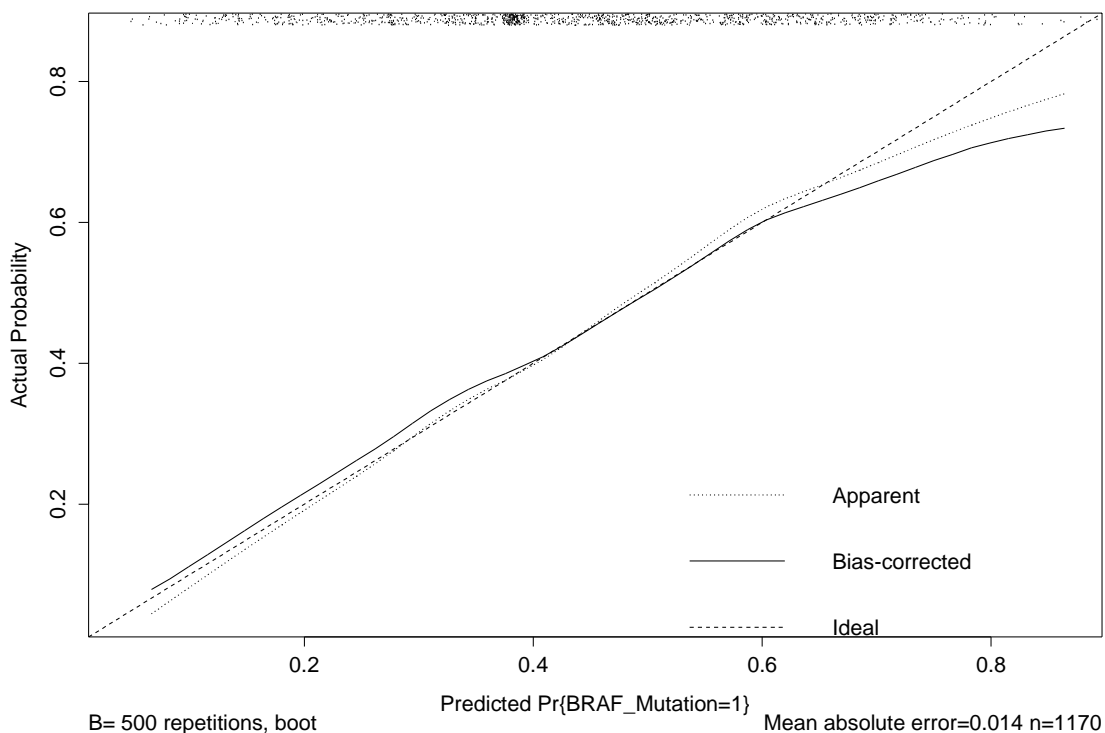


Abbildung 4: Kalibrierplot für das binäre Regressionsmodell. Bootstrap overfitting-korrigierte Kalibrierkurvenschätzung für das rückwärts step-down binäre Logistikmodell bei Vorhandensein einer BRAF-Mutation sowie ein Rug plot, der die Verteilung des vorhergesagten Status anzeigt. Loess smoothing nonparametric calibration estimator wird verwendet.

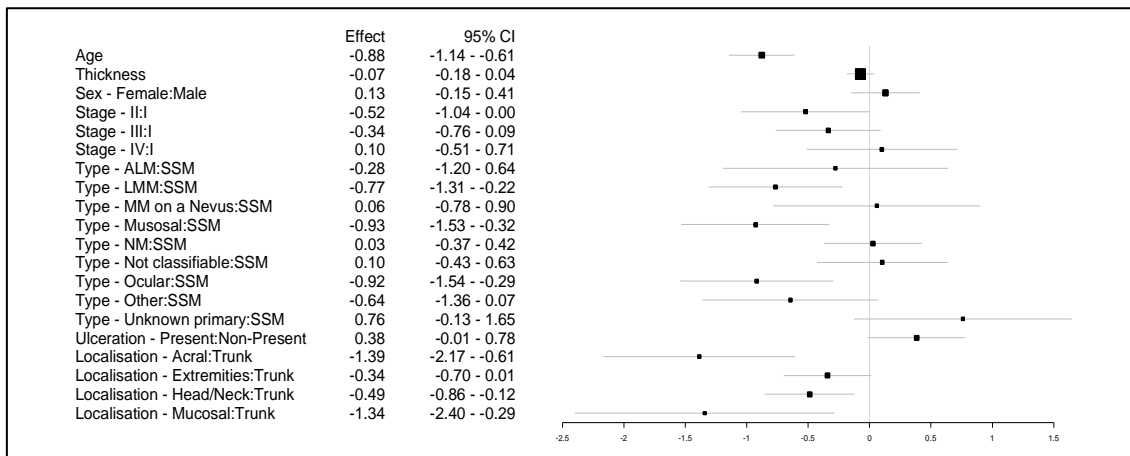


Abbildung 5: Forest plot, Effekte der verschiedenen Prädiktoren für das binäre Regressionsmodell mit 95% Konfidenzintervallen.

3.4.2 Klassifizierungs- und Regressionsanalysen Bäume⁸³

Der Entscheidungsbaum unserer CART-Analyse, der auf alle 1170 Fälle abgewendet wurde, ergab die folgende Struktur: Der erste Knoten teilt sich bei einem Alter ≥ 58 Jahre, was zeigt, dass bei Patienten ab 58 Jahren die Wahrscheinlichkeit, eine BRAF-Mutation zu tragen, auf 32% sinkt. Der zweite Knoten teilt sich nach der Art des primären Melanoms. Patienten mit einem superfiziell spreitenden Melanom, nodulärem Melanom, Melanom auf Nävus, mit einem nicht klassifizierbaren Melanom oder einem unbekanntem Primarius haben eine Wahrscheinlichkeit von 63%, eine BRAF-Mutation zu tragen. Der dritte Knoten teilt sich bei einem Alter ≥ 44 Jahre. Patienten ab 44 Jahren, die an einem akrolentiginösen Melanom, Lentigo maligna Melanom, Schleimhaut- oder einem okulären Melanom leiden, haben eine Wahrscheinlichkeit von nur 22%, eine BRAF-Mutation zu tragen. Die Wahrscheinlichkeit, dass Patienten, die jünger als 44 Jahre sind und eine Tumordicke von weniger als 0,62 mm aufweisen, eine BRAF-Mutation tragen, beträgt 35%. Bei Patienten mit einem Melanom von 0,62 mm Dicke oder mehr, beträgt die Wahrscheinlichkeit 62%. Eine Visualisierung des Baumes ist in der ergänzenden Abbildung 3 dargestellt. Die Genauigkeit der

Vorhersage des korrekten BRAF-Status betrug 0,6581 (95% CI: 0,6301-0,6853) mit einer Sensitivität von 0,7576 und einer Spezifität von 0,5311 (Tabelle 3).⁸³

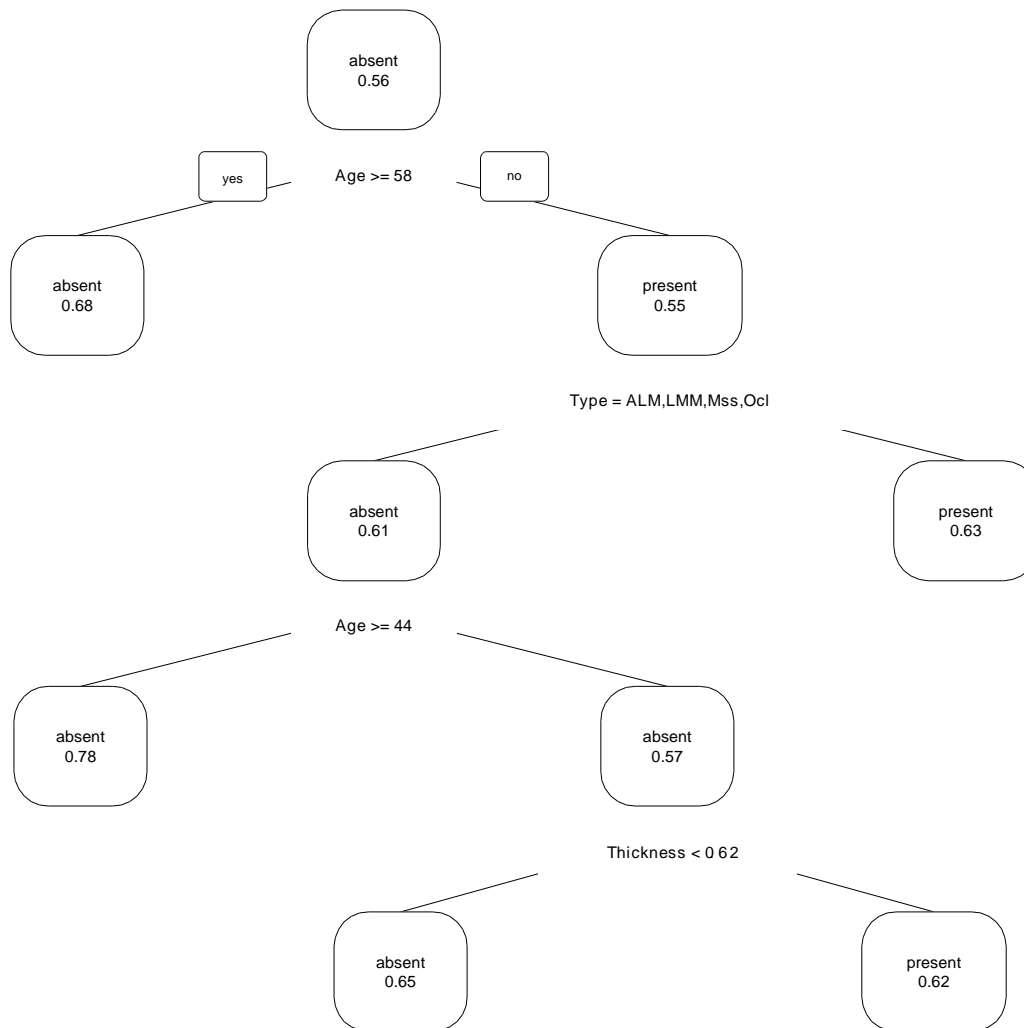


Abbildung 6: Klassifikations- und Regressionsplot (CART) zur Vorhersage des Vorhandenseins einer BRAF-Mutation

3.4.3 Random Forest Modellierung⁸³

Schließlich haben wir ein Random Forest Modell mit dem Standardsatz von 1000 Bäumen, fünf Kandidatenvariablen für jeden Split mit Stoppkriterium bei den

meisten Beobachtungen innerhalb jedes Endknotens durchgeführt. Die ergänzende Abbildung 4 veranschaulicht einen Vergleich der Rankings der minimalen Tiefe und der Bedeutung der Variablen. Sowohl die minimale Tiefe als auch die Bedeutung der Variable deuten auf einen starken Zusammenhang zwischen Alter und Art der Melanomvariablen und der Forestvorhersage hin. Die Genauigkeit der Vorhersage des korrekten BRAF-Status in diesem Modell betrug 0,7171 (95% CI: 0,6903-0,7428) mit einer Sensitivität von 0,8445 und einer Spezifität von 0,55545 (Tabelle 3).⁸³

Tabelle 6: Vergleich verschiedener prädiktiver Modelle

<i>Model</i>	<i>Accuracy</i>	<i>Accuracy (95% CI)</i>	<i>No Information Rate</i>	<i>Kappa</i>	<i>Mcnemar's Test P-Value</i>	<i>Sensitivity</i>	<i>Specificity</i>
<i>Binary logistic regression</i>	0.6538	0.6258 - 0.6811	0.5607	0.2821	<0.001	0.7683	0.5078
<i>Classification and regression tree</i>	0.6581	0.6301 - 0.6853	0.5607	0.2938	<0.001	0.7576	0.5311
<i>Random Forest</i>	0.7171	0.6903 - 0.7428	0.5607	0.4099	<0.001	0.8445	0.5545

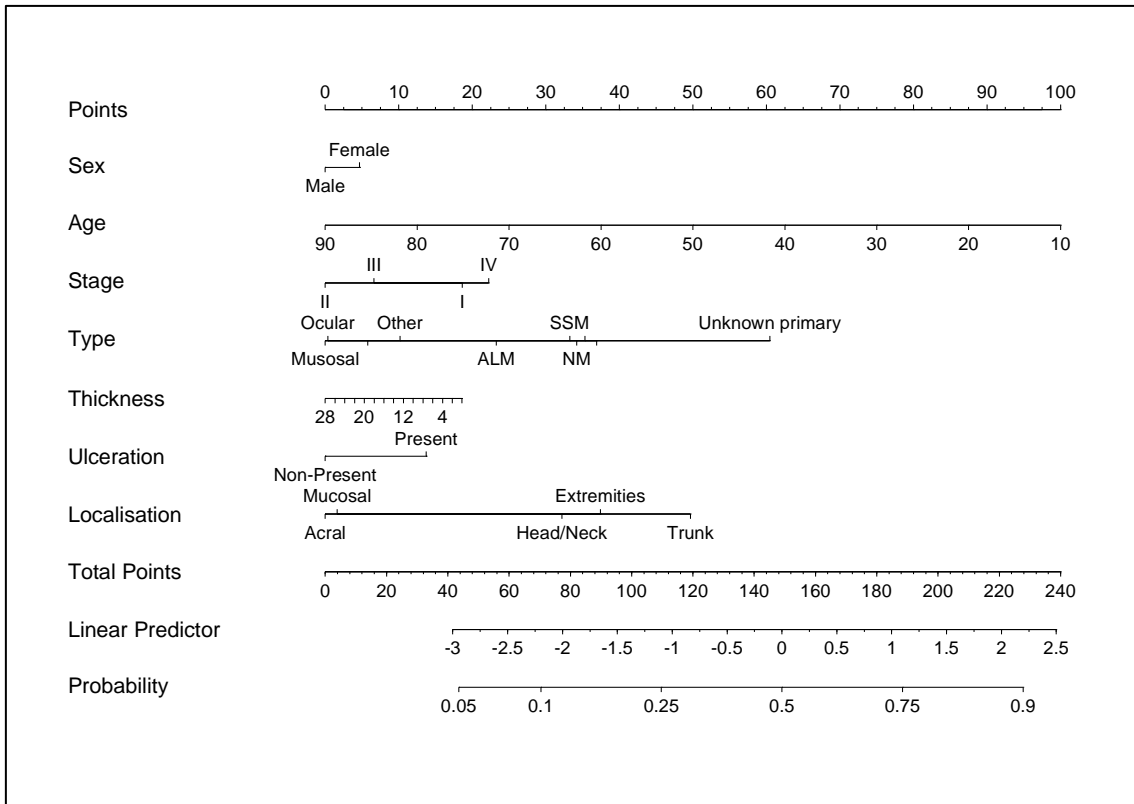


Abbildung 7: Nomogramm zur Vorhersage des Vorhandenseins einer BRAF-Mutation unter Verwendung eines Abwärtsmodells.

4. DISKUSSION UND SCHLUSSFOLGERUNG

Was die Häufigkeit von BRAF-Mutationen im Allgemeinen betrifft, so bestätigt unsere Analyse von 1170 Patienten früher berichtete Ergebnisse. Die Rate BRAF-mutierter Patienten von 43,9% liegt sehr nahe an der Rate, die in den letzten Jahren im Rahmen von Studien mit kleineren Patientenzahlen gefunden wurde. Die in den Jahren 2010 - 2012 gefundenen Zahlen (Rubinstein et al., 2010, Beadling et al. 2011, Long et al., 2011, Lovly et al., 2012) bewegten sich um ~ 45 %. Im Jahr 2013 fanden Heinzerling et al. eine Rate von 44,9% der BRAF- mutierten Melanome in einer Patientenpopulation von n= 187.⁹¹ Die jüngste Studie des Cancer Genome Atlas Network (TCGA) ergab eine höhere Rate von bis zu 52% BRAF-mutierter Patienten in einer Population von 318 Patienten.⁵⁹ Unsere Daten bestätigen eher die zwischen 2010 und 2014 gefundenen Zahlen. Da sich auch frühere Studien aus unserer süddeutschen Region um 45% bewegen⁹¹, kann dies auf regionale Unterschiede zurückzuführen sein, die durch die lokale Sonnenintensität oder das unterschiedliche Verhalten gegenüber dem Sonnenlicht in den verschiedenen Altersgruppen beeinflusst werden.

In allen bisherigen Berichten war die V600E-BRAF-Mutation vorherrschend (73-91% der BRAF- mutierten Patienten). Seltene BRAF-Mutationen zeigten eine Verteilung wie folgt: 6-30% aller BRAF-Mutationen stellten Variantenmutationen dar, die sich vom häufigeren V600E-Genotyp unterschieden.^{61-63,91} Unter den BRAF V600 Mutationen fanden Lovly et al. 79%, 12%, 5% und 4% als V600E, V600K, V600R und V600M.⁹²

Der TCGA bestätigte diese Ergebnisse teilweise mit Raten von 74,7%, 10,8% und 1,8% für V600E, V600K und V600R. Ihre Ergebnisse zeigten, dass die zweithäufigste BRAF-Mutationsgruppe (abgesehen von den V600-Mutationen) auf dem K601-Rest zu finden sein könnte.

Über das gleichzeitige Auftreten von Mutationen berichtete die TCGA, dass - wie in früheren Berichten (Pollock et al., 2003) - sowohl BRAF V600 als auch K601 Hot-Spot-Mutationen antikorreliert mit Hot-Spot-NRAS-Mutationen waren. Im Gegensatz dazu traten BRAF-Nicht-Hot-Spot-Mutationen (einschließlich acht

Exon-11-Mutationen) zusammen mit RAS (N/H/K) Hot-Spot- und NF1-Mutationen auf.⁵⁹

Die Verteilung der verschiedenen Mutationssubtypen, die durch die Analyse unserer Daten zum Vorschein kam, bestätigt ebenfalls die Dominanz der V600E-Mutation: 73,9 % erwiesen sich als V600E-Mutationen. 12,6 % waren V600K-Mutationen und nur wenige V600R-Mutationen (1,2%) und V600E2-Mutationen (1%) konnten gefunden werden. In einer großen Kohorte wie der unseren, beweist dies die Seltenheit dieser Mutationen. Es impliziert sogar, dass sie viel seltener sind als gedacht - zumindest in Süddeutschland.

Was die V600-Subgruppen betrifft, so stimmen unsere Ergebnisse eher mit den TGCA-Ergebnissen überein, da die V600R und -M-Mutationen in Lovlys Arbeit in höheren Raten gefunden wurden. Keine dieser Analysen unterschied die V600E2 - Mutation, die wir in 1% der Fälle fanden. Wir fanden nur 2 V600D-Mutationen (0,4%) und je eine von V600M, V600G, L597S, L597R, L597Q und 601K>K/E. Dies steht im Widerspruch zu den TCGA-Befunden, bei denen die zweithäufigste BRAF-Mutationsgruppe (abgesehen von den V600-Mutationen) auf dem K601-Rest vermutet wurde. Unsere Daten deuten darauf hin, dass die zweithäufigste BRAF-Mutation bei L597 auftritt.

In einem Abstract für das ASCO-Meeting 2018 (American Society of Clinical Oncology) und durch persönliche Kommunikation haben wir neue Informationen über seltene BRAF-Mutationen und über deren Reaktion auf BRAF- und MEK-Hemmer. Jessica Hassel und Kollegen untersuchten eine Gruppe von 71 aktivierenden BRAF-Mutationen unter Ausschluss von BRAF V600E und K. Sie fanden 58% (41 Patienten) mit seltenen V600-Mutationen, während 42% (30 Patienten) eine nicht-V600-Mutation aufwiesen.⁹³ V600R war die häufigste Mutation und wurde bei 30 Patienten gefunden. Nur 4 hatten einen V600D-Genotyp. Bei der Non-V600-Gruppe zeigten 10 Patienten eine K601E und 6 eine L597Q/S-Mutation.⁹³

Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen unserer Analysen sowie mit Lovly et al. und dem TGCA überein.^{59,92} Wie als Verbindungsglied zwischen unseren und den TGCA-Daten, fanden die Kollegen hier K601- und L597-

Mutationen als die häufigsten nicht-V600-Mutationen.^{59,93}

Versucht man das Vorhandensein einer medikamentös ansteuerbaren BRAF-Mutation mit klinischen Daten zu korrelieren, ist schnell zu erkennen, dass das **Alter** der Patienten sowie der **Subtyp** des Melanoms die 2 ausschlaggebendsten Faktoren darstellen. Auch unsere drei getesteten Vorhersagemodelle ergaben diese 2 Faktoren als die wichtigsten prädiktiven Variablen.

In Bezug auf die **Alterskorrelation** fanden Bauer und Kollegen ähnliche Ergebnisse bei 544 Patienten aus Europa, den USA und Australien.⁹⁴ Sie zeigten eine unabhängige Korrelation von BRAF mit dem Alter, der anatomischen Lage des Primärtumors und dem Grad der solaren Elastose. Für die europäische Kohorte generierten Bauer und Kollegen vier verschiedene Altersgruppen (\leq 45Y, 46-60Y, 61-70Y und >70Y). Der Hauptunterschied wurde für die Gruppen der Patienten im Alter von 46-60 Jahren und 61-70 Jahren mit einem Prozentsatz von 60,6% gegenüber 38,5% für das Vorhandensein einer BRAF-Mutation berechnet.^{83,94} Unsere CART-Analyse ergab das Alter von 58 Jahren als optimale Diskriminierungsstufe.⁸³

Auch frühere Studien haben Trends in der Altersverteilung der BRAF-Mutation festgestellt: In einer Kohorte von 302 Patienten, die ein Melanom mit aktivierenden BRAF-Mutationen hatten, berichteten Bucheit et al. über eine V600K-Mutationsrate von 24%, mit statistisch signifikanten Unterschieden in Bezug auf Medianalter (60,0 vs. 44,7 Jahre), männliches Geschlecht und Stammlage im Vergleich zu Patienten mit der V600E-Mutation.⁹⁵ Menzies et al. entdeckten einen ähnlichen Trend zwischen V600E- und Nicht-V600E-Mutationen, wobei Nicht-V600E-Mutationen bei weniger als 20% der Patienten unter 50 Jahren und mehr als 40% bei Patienten ab 70 Jahren gefunden wurden. Sie berichteten auch über eine abnehmende Inzidenz von BRAF-Mutationen pro Lebensjahrzehnt. Insgesamt 25% der Tumore von Patienten ab 70 Jahren hatten eine Mutation, während die Tumore von Patienten unter 30 Jahren fast durchgängig die BRAF-Mutation besaßen.⁹⁶

Wie in unseren und mehreren anderen Studien, darunter die von Bauer und

Kollegen, gezeigt wurde, nimmt die Häufigkeit von BRAF V600-Mutationen mit dem Alter ab, die Häufigkeit von BRAF-Wildtypen nimmt mit dem Alter zu.⁹⁴ Der größte Repräsentant dieser V600-Mutationen, die V600E-Mutation, scheint vor allem in jüngeren (76/152) und mittleren (91/249) Altersgruppen zu finden zu sein und wird mit zunehmendem Alter der Patienten (59/315) immer seltener. Auffallend ist, dass wir alle L579-Mutationen und die 601K>K/E-Mutation in der Gruppe hohen Alters gefunden haben, während die V600E2- und V600M-Mutationen nur in der jungen und mittleren (V600E2) Altersgruppe vertreten waren. Die V600K-Mutation zeigt ein davon abweichendes Frequenzmuster, das einen leichten Höhepunkt in der mittleren Altersgruppe (16/249, 6,4%) zeigt und in der jüngeren Kohorte (6/152, 3,9%) sowie in der Gruppe hohen Alters (15/315, 4,8%) seltener wird.

Auf der Grundlage unserer Daten stellen wir die Hypothese auf, dass eine Korrelation der in unserer Analyse zweithäufigsten BRAF-Mutation L597 mit dem Alter von >50 Jahren besteht. Auch Menzies et al. hatten im Jahr 2012 zu Nicht-V600E-Genotypen berichtet, dass die Häufigkeit von Nicht-V600E-Genotypen (einschließlich V600K) mit zunehmendem Alter zunahm.^{95,96} In ihrer Analyse stellten Nicht-V600E-Genotypen <20% bei Patienten <50 Jahre und >40% in diesen ≥70 Jahren dar.

Die V600E - Mutation tritt häufig auf intermittierend sonnenexponierter Haut auf und wird am häufigsten beim superfiziell spreitenden Melanom gefunden, während nicht-V600E-Mutationen häufiger an chronisch sonnenexponierten Stellen wie Kopf und Hals auftreten.^{67,95-97}

Neben Alter und solarer Elastose als Zeichen des chronischen Sonnenschadens - der in dieser Studie nicht beurteilt werden konnte - fanden Bauer et al. heraus, dass die **Lokalisation des Primärtumors** auch unabhängig mit BRAF-Mutationen korreliert ist.⁹⁴ Wie bereits oben erwähnt und durch die in dieser Studie verwendeten statistischen Modelle bestätigt, wurde festgestellt, dass die Lokalisation mit der höchsten Anzahl von BRAF-Mutationen der Stamm (47,2% der BRAF-Mutationen) ist, gefolgt von den Extremitäten (25,4%) und dem Kopf/Halsbereich (18,7%). Stamm und untere Extremitäten waren hier auch die

anatomischen Stellen mit der höchsten Anzahl von BRAF-Mutationen.

Auch aus der klinischen Erfahrung ist bekannt, dass Melanome dieser chronisch sonnenexponierten Haut an Kopf und Hals eher bei Patienten höheren Alters auftreten.

Unsere Daten zeigten den Stamm-Bereich auch als den Bereich, der die größte Vielfalt an BRAF-Mutationen aufwies. Die meisten der seltenen BRAF-Mutationen wurden dort gefunden - ein möglicher Hinweis darauf, dass sie ebenfalls nicht mit chronischer Sonneneinstrahlung in Verbindung gebracht werden können, wie die V600E- und im Gegensatz zur V600K-Mutation.

In unserem binären Regressionsmodell war die Lokalisation die dritthöchste Variable. Unsere Daten bestätigen so, dass die Wahrscheinlichkeit, eine BRAF-Mutation zu tragen, am höchsten ist, wenn sich das Melanom auf dem Stamm befindet. Beim Melanom in akraler Lokalisation in sonnenexponierten Bereichen wie Kopf und Hals sinkt die Odds Ratio des Tragens eines BRAF-mutierten Melanoms auf 0,25 in akraler Lokalisation und 0,61 in der Kopf- und Halsregion.⁸³

Wie in der Arbeit von Bauer und Kollegen zeigten auch andere frühere Berichte und Daten bereits einen Unterschied in der Art der Mutationen, die bei intermittierend sonnenexponierten oder nicht sonnenexponierten und chronisch sonnenexponierten Hautarealen zu finden sind: V600E treten häufig bei intermittierend sonnenexponierter Haut auf und sind am häufigsten beim oberflächlich verlaufenden Melanom zu finden, während Nicht-V600E-Mutationen häufiger bei chronisch sonnenexponierten Bereichen wie Kopf und Hals auftreten.^{67,94-96} Unsere Daten bestätigen diese Aussage, denn im Vergleich zum V600E-Subtyp erwies sich der V600K im Kopf-Hals-Bereich als dominanter, während der V600E im Rumpf und in den Extremitäten dominierte. Menzies et al. bewerteten den Grad der kumulativen sonneninduzierten Schädigung an der Primärtumorstelle für 138 von 253 primären kutanen Melanomen in histopathologischen Schnitten und fanden ebenfalls heraus, dass ein höherer Grad der kumulativen sonneninduzierten Schädigung mit V600K aber nicht mit V600E-Melanom korreliert war ($P = 0,002$).⁹⁶

Menzies et al. gaben an, dass kumulative sonneninduzierte Schäden (CSD) im

primären kutanen Melanom und im höheren Alter mit V600K BRAF-Mutationen verbunden sind.⁹⁶ Hier unterscheiden sich unsere Ergebnisse, da wir keinen eindeutigen Zusammenhang der V600K-Mutation mit dem Alter fanden, obwohl auch andere Berichte diesen Zusammenhang sahen.⁹⁵ Unsere Daten bestätigen lediglich ihren Zusammenhang mit chronisch sonnenexponierten Bereichen wie dem Kopf- und Halsbereich.

Auch Lee et al.⁶⁷ berichteten 2011 über eine Meta-Analyse, in der sie zeigten, dass sich die Häufigkeit von BRAF- und NRAS-Mutationen in kutanen Melanomen je nach histologischem Typ und Tumorlage basierend auf dem Grad der Sonneneinstrahlung unterscheidet. Sie fanden heraus, dass die BRAF-Mutation häufig bei Patienten mit oberflächlich spreitendem Melanom (tOR=2-021; P<0-001) und bei Melanomen, die bei nicht-chronischer sonnengeschädigter Haut auftreten (OR=2-043; P=0-001), nachgewiesen wurde.⁶⁷

Der **histologische Subtyp** des Melanoms erwies sich als eine weitere wichtige Variable, die mit dem Vorhandensein einer BRAF-Mutation korreliert. Dies wurde auch in allen drei Modellierungsansätzen bestätigt, was diese Variable zu einem wichtigen prädiktiven Wert macht. Long et al. hatten in einer Kohorte von 197 Patienten mit fortgeschrittenem Melanom herausgefunden, dass Melanome mit der höchsten Frequenz von BRAF V600-Mutationen oberflächliche oder noduläre Melanome sind.⁹⁸ Dies bestätigt unsere Ergebnisse, da wir festgestellt haben, dass oberflächliche (34,9%) und noduläre Melanome (29,2%) die am häufigsten mutierten sind. Die Wahrscheinlichkeit, dass Patienten eine BRAF V600-Mutation aufweisen, nimmt bei akrolentiginösem, okulärem oder mukosalem Melanom dramatisch ab.^{64,83,98}

Histologischer Subtyp und Lokalisation des primären Melanoms sind allerdings klinisch stark miteinander verbunden, so dass diese statistische Unabhängigkeit mit kritischem Auge zu betrachten ist und evtl. als klinisch nicht sinnvoll erachtet werden muss.⁸³

Das **Anfangsstadium der Erkrankung** war nur in unserem binären logistischen

Regressionsmodell relevant, während die **Tumordicke** im Random Forest Modell höher eingestuft wurde.⁸³ Die Korrelation zur Tumordicke zeigte eine allmählich abnehmende BRAF-Frequenz mit zunehmender Tumordicke. Für beide Faktoren wurden in der Literatur unterschiedliche prognostische Wirkungswerte angegeben.^{64,99}

Eine weitere aktuelle Meta-Analyse von Kim et al. im Juni 2015 bestätigte, dass die BRAF-Mutation mit jüngerem Alter (OR = 1.734; P < .001), Stammlage (OR = 2.272; P < .001), nicht-chronisch sonnengeschädigter Haut (OR = 2.833; P < .001), superfiziell spreitendem Melanom (OR = 2.081; P < .001) und fortgeschrittenem Melanomstadium (OR = 1.551; P = .003) verbunden war.¹⁰⁰

Weniger BRAF-Mutationen bei dickeren Melanomen könnten die Erfahrung widerspiegeln, dass dickere Melanome tendenziell andere Melanom-Subtypen wie z.B. noduläre Melanome sein könnten, die nicht so oft BRAF-Mutationen aufweisen wie das superfiziell spreitende Melanom.

Passend zur klinischen Erfahrung, dass dickere Tumore eine größere Ulzerationstendenz aufweisen, fanden wir eine höhere BRAF-Mutationsrate bei nicht ulzerierten (47,7%), verglichen mit ulzerierten (40,7%) Tumoren.

Fazit

Durch die Zusammenführung von Daten aus 5 Melanomzentren konnten wir eine große Population von über eintausend Patienten auf BRAF-Mutationen und deren Korrelation mit klinischen Merkmalen analysieren. Da wir eine große Anzahl von Patienten aus einer relativ kleinen Region analysiert haben, konnten wir die Inzidenz des BRAF-mutierten Melanoms in der Region Süddeutschland mit 43,9% sehr genau angeben.

Was die Frequenzen der BRAF - Subtypen betrifft, so konnten wir die zuvor gemeldeten Daten insbesondere für BRAF V600E und BRAF V600K bestätigen. 1% der BRAF-Mutationen in unserer Kohorte waren V600E2-Mutationen und unsere Daten deuten darauf hin, dass die zweithäufigste BRAF-Mutation bei L597 auftritt.

Wir konnten auch die bereits bekannte Alterskorrelation mit weniger BRAF-

Mutationen bestätigen, je älter die Patienten sind. Wir wussten, dass BRAF mit zunehmendem Alter des Patienten seltener wird, aber wir konnten die Information hinzufügen, dass das Alter von 58 Jahren das optimale Diskriminierungsalter ist. Dies ändert jedoch nichts an der Art und Weise, wie Patienten über 58 Jahre diagnostisch behandelt werden würden. Die BRAF-Mutationsraten über diesem Alter sind immer noch relativ hoch.

Die V600K-Mutation in unserer Studie zeigte ein anderes Muster als in der Literatur: Wir fanden einen leichten Höhepunkt in der mittleren Altersgruppe (16/249, 6,4%), der in der jüngeren Kohorte (6/152, 3,9%) sowie in der Gruppe höheren Alters (15/315, 4,8%) seltener wurde.

Interessanterweise fanden wir eine Korrelation der zweithäufigsten BRAF-Mutation L597 mit dem Alter von >50 Jahren, wobei die "klassische" BRAF-Mutation V600 weniger vorhanden ist. Die Stammregion zeigte die größte Vielfalt an BRAF-Mutationen. Die meisten der seltenen BRAF-Mutationen wurden dort gefunden - ein möglicher Hinweis darauf, dass sie ebenfalls nicht mit chronischer Sonneneinstrahlung in Verbindung gebracht werden können, wie die V600E- und im Gegensatz zur V600K-Mutation.

Die Korrelation zur Tumordicke zeigte eine allmählich abnehmende BRAF-Frequenz mit zunehmender Tumordicke. Wir fanden weniger BRAF-Mutationen bei dickeren Melanomen und konnten auch zeigen, dass ulzerierte Melanome weniger wahrscheinlich eine BRAF-Mutation aufweisen.

Wir konnten die Existenz von mutationsspezifischen klinischen Unterschieden zwischen den BRAF-Genotypen bei Patienten mit Melanom bestätigen - diesmal in einer großen Population, indem wir neue Informationen über die Häufigkeit von Nicht-Hotspot-Mutationen und über deren klinische Merkmale hinzufügen konnten.

Auf der Grundlage dieser Informationen haben wir versucht, den BRAF-Status von Patienten mit modernen prädiktiven Methoden vorherzusagen. Die Daten haben jedoch gezeigt, dass der aktuelle Wissensstand noch nicht ausreicht, um die Existenz einer zielgerichteten BRAF-Mutation vorhersagen zu können. Trotz der verwendeten intelligenten Methoden waren die Ergebnisse in Sensitivität und

Spezifität nicht akzeptabel und sind daher klinisch nicht nutzbar.

Die Vorhersagegenauigkeit war mithilfe des Random Forest Modells mit 0,71 am besten und am niedrigsten im binären Regressionsmodell mit 0,65. Während die Sensitivität (wahrheitsgetreue Vorhersage von Patienten, die eine BRAF-Mutation tragen) mit 0,84 (Random Forest) akzeptabel sein kann, ist die Spezifität (wahrheitsgetreue Vorhersage von Patienten, die keine BRAF-Mutation tragen) mit 0,55 unannehmbar niedrig. Im letzteren Fall würden wir die Patienten fälschlicherweise als BRAF-negativ einstufen und ihnen eine wirksame Behandlung verweigern.⁸³

Daher müssen wir zu dem Schluss kommen, dass das Mutationsprofiling durch Sequenzierung oder Immunhistochemie immer noch als Standard der Versorgung angesehen werden muss.⁸³

Möglicherweise werden in Zukunft neue Ansätze für den Nachweis der BRAF-Mutation wie der von Huber et al.⁶⁸ getestete nanomechanische Cantilever-Ansatz (Biosensor) in die Reihe der Detektionsmöglichkeiten aufgenommen.

Implikationen für weitere Untersuchungen

Da es sich beim malignen Melanom um eine der aggressivsten und dynamischsten Krebsarten handelt, die wir kennen, ist es im Hinblick auf das Verbessern von Outcome und Überleben dieser Patienten notwendig, so viel wie möglich auf der Grundlage klinischer Informationen vorherzusehen. Individuelle Behandlungsentscheidungen können effektiver getroffen werden und die Kontrolle der Krankheit wird umso einfacher, je mehr wir über die verschiedenen Genotypen und die damit verbundenen klinischen Merkmale und möglichen Krankheitsverläufe wissen.

Die Identifizierung koexistierender Mutationen - wie z.B. des NF1-Status von Patienten - wird in naher Zukunft eine größere Rolle spielen, da diese Mutationen nachweislich zu schlechteren Ergebnissen und Resistenzen gegen die Behandlung führen. In diesen Fällen könnten die Patienten von einer Kombinationstherapie in größerem Maße profitieren.

Weitere Erkenntnisse über das gleichzeitige Auftreten verschiedener Mutationen und die klinischen Merkmale des Genotyps würden es uns ermöglichen, eine besser personalisierte, zielgerichtete Therapie für Melanompatienten anzubieten.

Unsere Daten unterstreichen noch einmal die Bedeutung der Verwendung von Mutationsdetektionstechniken, die empfindlich genug sind, um auch Nicht-Hotspot-Mutationen zu erkennen. Insbesondere da wir gesehen haben, dass es Grund zu der Annahme gibt, dass sie sich in Bezug auf klinische Merkmale und Ansprechen auf die Therapie deutlich unterscheiden.

BRAF-, NRAS- und NF1-Mutationen werden weiterhin eine wichtige Rolle spielen, aber es ist offensichtlich, dass die Entdeckung der Biomarker gerade erst begonnen hat. Immer mehr Berichte über neue Biomarker aus dem Tumorgewebe, der Mikro-Umgebung des Tumors oder dem peripheren Blut - insbesondere auch als Versuch der Vorhersage des Therapieansprechens auf Immun-Checkpoint-Inhibitoren - erscheinen momentan regelmäßig^{104–108}: Neuere Biomarker müssen in Zusammenhang mit den bereits bekannten untersucht und so ein Tumorprofil bestenfalls mit daraus ableitbaren Eigenschaften und Therapiemöglichkeiten erstellt werden.

Zusätzliche Schwierigkeiten und Fragen wirft der Begriff der intratumoralen und intertumoralen Heterogenität auf.

2017 beschrieben Tomasz et al. In „Translational Oncology“ die unterschiedlichen Ebenen der inter- und intratumoralen Heterogenität.¹⁰⁹ Ist der Primarius nicht BRAF-mutiert, so trifft dies nicht unbedingt auf jede seiner Metastasen zu und umgekehrt. Denkbar ist, dass dies nicht nur für die uns bekannten Mutationen zutrifft, sondern auch auf alle Weiteren. Auch Teile eines Tumors können sich vom restlichen Tumor in ihrem Genotyp unterscheiden. Dies hat zur Folge, dass auch die Therapie nicht auf alle Tumore eines einzigen Individuums dieselbe Wirkung hat und es so zu einem widersprüchlichen Therapieansprechen kommen kann. Mögliche Lösungen für solche Fälle könnten wie die neuesten Kombinations-Therapieansätze aussehen:

PD1- und CTLA4-Inhibitoren bewiesen in den letzten wenigen Jahren ihren großen Nutzen in Bezug auf den Behandlungserfolg von Krebspatienten,

insbesondere mit malignem Melanom. Neueste Behandlungsansätze beinhalten die kombinierte oder sequentielle Anwendung von Immuncheckpoint-Inhibitoren und BRAF-/ MEK-Inhibitoren, z.B. im Sinne einer Triple-Therapie bei BRAF-positiven Patienten. In Kombination mit operativen Verfahren ist so eine stark verbesserte Kontrolle der Krankheit im Vergleich zu früheren Jahren möglich.

Sowohl die Notwendigkeit der Identifikation weiterer Biomarker und der klonalen Zusammensetzung eines Tumors, als auch die mit jedem neuen Biomarker immer deutlicher werdende intra- und intertumorale Heterogenität geben mehr als je zuvor den Weg zur personalisierten Therapie vor.

Bereits seit Jahren wurde der Anfang mit der Einführung interdisziplinärer Tumorkonferenzen gemacht, weitergehen muss es mit der Entwicklung einer Routine zur Profilerstellung der Tumore – nicht nur in Bezug auf BRAF, NRAS und NF1– zunächst durch Gewichtung und Einordnung der durch die neuen Möglichkeiten der leistungsfähigen Genexpressionsanalysen gefundenen Genotypen und Biomarker.

Einschränkungen der Studie

Trotz einer großen Population von über eintausend Patienten fanden wir nur sehr wenige seltene Mutationen, die zeigen, dass sie - zumindest in Süddeutschland - noch seltener sind als bisher angenommen. Leider führt dies automatisch zu Schwierigkeiten, zuverlässige Aussagen über ihre tatsächliche Verteilung zu treffen.

Darüber hinaus scheint es - nach den jüngsten Berichten über Mutationen beim Melanom und Mechanismen der Therapieresistenz - eine Einschränkung der Studie zu sein, dass der NF1-Mutationsstatus nicht bewertet wurde. Dies hätte einen noch besseren Überblick über die mit dem MAPK-Weg verbundenen Mutationen beim Melanom mit Informationen über die Häufigkeit von NF1 und

Koexistenz mit BRAF und NRAS gegeben.

Weiterhin kann eine evtl. vorhandene Tumorerogenität zwischen Primarius und Metastasen unsere Ergebnisse in geringem Maße verfälscht haben, da das Material Tumorproben beider Gruppen umfasste.

5. ZUSAMMENFASSUNG/ABSTRACT

Hintergrund: Bei Patienten mit fortgeschrittenem Melanom gilt die Analyse des Vorhandenseins einer BRAF-Mutation als obligatorisch, bevor eine teure Behandlung mit BRAF/MEK-Inhibitoren eingeleitet wird. Manchmal ist es jedoch schwierig, eine solche Analyse durchzuführen, wenn kein archivierbares Tumorgewebe vorhanden ist und frisches Gewebe entnommen werden muss.

Methoden: Wir sammelten den klinischen und mutationsbedingten Status von 1170 Patienten mit fortgeschrittenem Melanom und etablierten drei verschiedene prädiktive Modelle (binäre logistische Regression, Klassifikations- und Regressionsbäume, zufälliger Wald), um den BRAF-Status vorherzusagen.

Ergebnisse: 514 von 1170 Patienten (44%) trugen eine BRAF-Mutation. Alle Modelle zeigten Alter und histologischen Subtyp des Melanoms als die beiden wichtigsten prädiktiven Variablen. Die Genauigkeit lag zwischen 0,65-0,71 und war damit am besten im zufälligen Waldmodell. Die Empfindlichkeit lag bei 0,76-0,84, wiederum am besten im Zufallswaldmodell. Die Spezifität war in allen Modellen im Bereich von 0,51-0,55 gering.

Fazit: Mit Hilfe modernster statistischer Modelle konnten wir BRAF-Mutationen nicht in einem akzeptablen Umfang vorhersagen. Die Analyse des Mutationsstatus durch Sequenzierung oder Immunhistochemie ist weiterhin als Standard der Versorgung anzusehen.⁸³

Schlüsselworte:

Fortgeschrittenes Melanom, BRAF, Prädiktive Modelle, binäre logistische Regression, Klassifikations- und Regressionsbäume, Random Forest

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Diepgen TL, Mahler V. The epidemiology of skin cancer. *Br J Dermatol*. 2002;146 Suppl:1-6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11966724>. Accessed June 1, 2015.
2. Garbe C, McLeod GR, Buettner PG. Time trends of cutaneous melanoma in Queensland, Australia and Central Europe. *Cancer*. 2000;89(6):1269-1278. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11002222>. Accessed June 1, 2015.
3. Garbe C, Leiter U. Melanoma epidemiology and trends. *Clin Dermatol*. 2009;27(1):3-9. doi:10.1016/j.clindermatol.2008.09.001.
4. IARC Publications - PDFs online - Cancer Epidemiology - Cancer Incidence in Five Continents Vol. IX. <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/epi/sp160/>. Accessed June 1, 2015.
5. Mackie RM, Hauschild A, Eggermont AMM. Epidemiology of invasive cutaneous melanoma. *Ann Oncol*. 2009;20 Suppl 6:vi1-7. doi:10.1093/annonc/mdp252.
6. Karim-Kos HE, de Vries E, Soerjomataram I, Lemmens V, Siesling S, Coebergh JWW. Recent trends of cancer in Europe: a combined approach of incidence, survival and mortality for 17 cancer sites since the 1990s. *Eur J Cancer*. 2008;44(10):1345-1389. doi:10.1016/j.ejca.2007.12.015.
7. Arnold M, Holterhues C, Hollestein LM, et al. Trends in incidence and predictions of cutaneous melanoma across Europe up to 2015. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2014;28(9):1170-1178. doi:10.1111/jdv.12236.
8. de Vries E, van de Poll-Franse L V, Louwman WJ, de Gruijl FR, Coebergh JWW. Predictions of skin cancer incidence in the Netherlands up to 2015. *Br J Dermatol*. 2005;152(3):481-488. doi:10.1111/j.1365-2133.2005.06386.x.
9. Diffey BL. The future incidence of cutaneous melanoma within the UK. *Br J Dermatol*. 2004;151(4):868-872. doi:10.1111/j.1365-2133.2004.06216.x.
10. Leiter U, Eigentler T, Garbe C. Epidemiology of skin cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2014;810:120-140. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25207363>. Accessed May 29, 2015.
11. Song X, Zhao Z, Barber B, Farr AM, Ivanov B, Novich M. Overall survival in patients with metastatic melanoma. *Curr Med Res Opin*. 2015;31(5):987-991. doi:10.1185/03007995.2015.1021904.
12. Haiducu ML, Hinek A, Astanehe A, Lee TK, Kalia S. Extracutaneous melanoma epidemiology in British Columbia. *Melanoma Res*. 2014;24(4):377-380. doi:10.1097/CMR.0000000000000075.
13. Bishop KD, Olszewski AJ. Epidemiology and survival outcomes of ocular and mucosal melanomas: a population-based analysis. *Int J Cancer*. 2014;134(12):2961-2971. doi:10.1002/ijc.28625.
14. Koomen ER, de Vries E, van Kempen LC, et al. Epidemiology of extracutaneous melanoma in the Netherlands. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010;19(6):1453-1459. doi:10.1158/1055-9965.EPI-09-1267.
15. Held L, Eigentler TK, Meier F, et al. Oncogenetics of melanoma: basis for molecular diagnostics and therapy. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2011;9(7):510-516. doi:10.1111/j.1610-0387.2011.07603.x.
16. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev*. 2001;22(2):153-183. doi:10.1210/edrv.22.2.0428.
17. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1773(8):1263-1284. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.10.001.

18. Hoshino R, Chatani Y, Yamori T, et al. Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. *Oncogene*. 1999;18(3):813-822. doi:10.1038/sj.onc.1202367.
19. Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res*. 1989;49(17):4682-4689. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2547513>. Accessed May 11, 2015.
20. Madhunapantula S V, Robertson GP. The PTEN-AKT3 signaling cascade as a therapeutic target in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2009;22(4):400-419. doi:10.1111/j.1755-148X.2009.00585.x.
21. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med*. 2005;353(20):2135-2147. doi:10.1056/NEJMoa050092.
22. Curtin JA, Stark MS, Pinkel D, Hayward NK, Bastian BC. PI3-kinase subunits are infrequent somatic targets in melanoma. *J Invest Dermatol*. 2006;126(7):1660-1663. doi:10.1038/sj.jid.5700311.
23. Mebratu Y, Tesfaigzi Y. How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer? *Cell Cycle*. 2009;8(8):1168-1175. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2728430&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed August 12, 2015.
24. Santarpia L, Lippman SM, El-Naggar AK. Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*. 2012;16(1):103-119. doi:10.1517/14728222.2011.645805.
25. Chong H, Vikis HG, Guan K-L. Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell Signal*. 2003;15(5):463-469. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12639709>. Accessed October 20, 2015.
26. Roskoski R. RAF protein-serine/threonine kinases: structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;399(3):313-317. doi:10.1016/j.bbrc.2010.07.092.
27. Pulverer BJ, Kyriakis JM, Avruch J, Nikolakaki E, Woodgett JR. Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature*. 1991;353(6345):670-674. doi:10.1038/353670a0.
28. Binétry B, Smeal T, Karin M. Ha-Ras augments c-Jun activity and stimulates phosphorylation of its activation domain. *Nature*. 1991;351(6322):122-127. doi:10.1038/351122a0.
29. Cichowski K, Jacks T. NF1 tumor suppressor gene function: narrowing the GAP. *Cell*. 2001;104(4):593-604. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11239415>. Accessed October 20, 2015.
30. Salmena L, Carracedo A, Pandolfi PP. Tenets of PTEN Tumor Suppression. *Cell*. 2008;133(3):403-414. doi:10.1016/j.cell.2008.04.013.
31. Datta SR, Dudek H, Xu T, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell- intrinsic death machinery. *Cell*. 1997;91(2):231-241. doi:10.1016/S0092-8674(00)80405-5.
32. Shaw RJ, Cantley LC. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature*. 2006;441(7092):424-430. doi:10.1038/nature04869.
33. Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan K-L. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol*. 2002;4(9):648-657. doi:10.1038/ncb839.
34. Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002;417(6892):949-954. doi:10.1038/nature00766.
35. Garnett MJ, Marais R. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell*. 2004;6(4):313-319. doi:10.1016/j.ccr.2004.09.022.
36. *Dermatology: 3rd Edition* | Jean Bolognia, Joseph Jorizzo, Julie Schaffer | ISBN 9780723435716. <http://store.elsevier.com/Dermatology-2-Volume-Set/Jean->

- Bologna/isbn-9780723435716/. Accessed October 19, 2015.
37. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674.
 38. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature*. 1998;396(6712):643-649. doi:10.1038/25292.
 39. Goymer P. The Evolution of Cancer. *Nature*. 2008;454(August):1047-1048. doi:10.1111/ecc.12259.
 40. Yazdi AS, Palmedo G, Flaig MJ, et al. Mutations of the BRAF gene in benign and malignant melanocytic lesions. *J Invest Dermatol*. 2003;121(5):1160-1162. doi:10.1046/j.1523-1747.2003.12559.x.
 41. Böhm M, Moellmann G, Cheng E, et al. Identification of p90RSK as the probable CREB-Ser133 kinase in human melanocytes. *Cell Growth Differ*. 1995;6(3):291-302. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7540859>. Accessed October 21, 2015.
 42. Marshall CJ. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*. 1995;80(2):179-185. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7834738>. Accessed September 9, 2015.
 43. Bello DM, Ariyan CE, Carvajal RD. Melanoma mutagenesis and aberrant cell signaling. *Cancer Control*. 2013;20(4):261-281.
 44. Satyamoorthy K, Li G, Gerrero MR, et al. Constitutive mitogen-activated protein kinase activation in melanoma is mediated by both BRAF mutations and autocrine growth factor stimulation. *Cancer Res*. 2003;63(4):756-759. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12591721>. Accessed October 20, 2015.
 45. Wan PTC, Garnett MJ, Roe SM, et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*. 2004;116(6):855-867. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15035987>. Accessed August 28, 2015.
 46. Michaloglou C, Vredeveld LCW, Soengas MS, et al. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature*. 2005;436(7051):720-724. doi:10.1038/nature03890.
 47. Cheung M, Sharma A, Madhunapantula S V, Robertson GP. Akt3 and mutant V600E B-Raf cooperate to promote early melanoma development. *Cancer Res*. 2008;68(9):3429-3439. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5867.
 48. Spagnolo F, Ghiorzo P, Orgiano L, et al. BRAF-mutant melanoma: treatment approaches, resistance mechanisms, and diagnostic strategies. *Onco Targets Ther*. 2015;8:157-168. doi:10.2147/OTT.S39096.
 49. Poulikakos PI, Zhang C, Bollag G, Shokat KM, Rosen N. RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature*. 2010;464(7287):427-430. doi:10.1038/nature08902.
 50. Hatzivassiliou G, Song K, Yen I, et al. LETTERS RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature*. 2010;464(7287):431-435. doi:10.1038/nature08833.
 51. Rübber A, Bausch B, Nikkels A. Somatic deletion of the NF1 gene in a neurofibromatosis type 1-associated malignant melanoma demonstrated by digital PCR. *Mol Cancer*. 2006;5:36. doi:10.1186/1476-4598-5-36.
 52. Foster WJ. Status of the NF1 Tumor Suppressor Locus in Uveal Melanoma. *Arch Ophthalmol*. 2003;121(9):1311. doi:10.1001/archoph.121.9.1311.
 53. Ishii S, Han S, Shiiba K, et al. Allelic loss of the NF1 gene in anal malignant melanoma in a patient with neurofibromatosis type 1. *Int J Clin Oncol*. 2001;6(4):201-204. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11706558>. Accessed October 14, 2015.
 54. Maertens O, Johnson B, Hollstein P, et al. Elucidating distinct roles for NF1 in melanomagenesis. *Cancer Discov*. 2013;3(3):338-349. doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0313.

55. Whittaker SR, Theurillat J-P, Van Allen E, et al. A genome-scale RNA interference screen implicates NF1 loss in resistance to RAF inhibition. *Cancer Discov.* 2013;3(3):350-362. doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0470.
56. Gibney GT, Smalley KSM. An unholy alliance: cooperation between BRAF and NF1 in melanoma development and BRAF inhibitor resistance. *Cancer Discov.* 2013;3(3):260-263. doi:10.1158/2159-8290.CD-13-0017.
57. Vredeveld LCW, Possik PA, Smit MA, et al. Abrogation of BRAFV600E-induced senescence by PI3K pathway activation contributes to melanomagenesis. *Genes Dev.* 2012;26(10):1055-1069. doi:10.1101/gad.187252.112.
58. Zhang D, Zhu R, Zhang H, Zheng C-H, Xia J. MGDB: a comprehensive database of genes involved in melanoma. *Database (Oxford)*. 2015;2015. doi:10.1093/database/bav097.
59. TCGA. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell*. 2015;161(7):1681-1696. doi:10.1016/j.cell.2015.05.044.
60. Handolias D, Salemi R, Murray W, et al. Mutations in KIT occur at low frequency in melanomas arising from anatomical sites associated with chronic and intermittent sun exposure. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2010;23(2):210-215. doi:10.1111/j.1755-148X.2010.00671.x.
61. Godshalk SE, Paranjape T, Nallur S, et al. A Variant in a MicroRNA complementary site in the 3' UTR of the KIT oncogene increases risk of acral melanoma. *Oncogene*. 2011;30(13):1542-1550. doi:10.1038/onc.2010.536.
62. Smalley KSM, Sondak VK, Weber JS. c-KIT signaling as the driving oncogenic event in sub-groups of melanomas. *Histol Histopathol.* 2009;24(5):643-650. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19283671>. Accessed October 14, 2015.
63. All-Ericsson C, Girnita L, Müller-Brunotte A, et al. c-Kit-dependent growth of uveal melanoma cells: a potential therapeutic target? *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45(7):2075-2082. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15223779>. Accessed October 14, 2015.
64. Greaves WO, Verma S, Patel KP, et al. Frequency and spectrum of BRAF mutations in a retrospective, single-institution study of 1112 cases of melanoma. *J Mol Diagnostics.* 2013;15(2):220-226. doi:10.1016/j.jmoldx.2012.10.002.
65. Bos JL. ras Oncogenes in human cancer: A review. *Cancer Res.* 1989;49(17):4682-4689. doi:citeulike-article-id:689123.
66. Omholt K, Platz A, Kanter L, Ringborg U, Hansson J. NRAS and BRAF Mutations Arise Early during Melanoma Pathogenesis and Are Preserved throughout Tumor Progression. *Clin Cancer Res.* 2003;9(17):6483-6488.
67. Lee J-H, Choi J-W, Kim Y-S. Frequencies of BRAF and NRAS mutations are different in histological types and sites of origin of cutaneous melanoma: a meta-analysis. *Br J Dermatol.* 2011;164(4):776-784. doi:10.1111/j.1365-2133.2010.10185.x.
68. Huber F, Lang HP, Glatz K, Rimoldi D, Meyer E, Gerber C. Fast Diagnostics of BRAF Mutations in Biopsies from Malignant Melanoma. *Nano Lett.* 2016;16(9):5373-5377. doi:10.1021/acs.nanolett.6b01513.
69. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol.* 1975;94(3):441-448. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1100841>. Accessed January 23, 2017.
70. Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlén M, Nyrén P. Real-Time DNA Sequencing Using Detection of Pyrophosphate Release. *Anal Biochem.* 1996;242(1):84-89. doi:10.1006/abio.1996.0432.
71. Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlén M, Nyrén P. Real-Time DNA Sequencing Using Detection of Pyrophosphate Release. *Anal Biochem.* 1996;242(1):84-89. doi:10.1006/abio.1996.0432.
72. Ronaghi M, Uhlén M, Nyrén P. PyroSequencing: A {DNA} sequencing method

- based on real-time pyrophosphate detection. *Science* (80-). 1998;281:363-365. doi:10.1126/science.281.5375.363.
73. Halait H, DeMartin K, Shah S, et al. Analytical Performance of a Real-time PCR-based Assay for V600 Mutations in the BRAF Gene, Used as the Companion Diagnostic Test for the Novel BRAF Inhibitor Vemurafenib in Metastatic Melanoma. *Diagnostic Mol Pathol*. 2012;21(1):1-8. doi:10.1097/PDM.0b013e31823b216f.
 74. Jurkowska M, Gos A, Ptaszyński K, et al. Comparison between two widely used laboratory methods in BRAF V600 mutation detection in a large cohort of clinical samples of cutaneous melanoma metastases to the lymph nodes. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(7):8487-8493. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26339422>. Accessed January 23, 2017.
 75. Diagnostics R. <https://molecular.roche.com/assays/cobas-4800-braf-v600-mutation-test/>.
 76. Qu K, Pan Q, Zhang X, et al. Detection of BRAF V600 mutations in metastatic melanoma: comparison of the Cobas 4800 and Sanger sequencing assays. *J Mol Diagn*. 2013;15(6):790-795. doi:10.1016/j.jmoldx.2013.07.003.
 77. Long G V., Wilmott JS, Capper D, et al. Immunohistochemistry Is Highly Sensitive and Specific for the Detection of V600E BRAF Mutation in Melanoma. *Am J Surg Pathol*. 2013;37(1):61-65. doi:10.1097/PAS.0b013e31826485c0.
 78. Schirosi L, Strippoli S, Gaudio F, et al. Is immunohistochemistry of BRAF V600E useful as a screening tool and during progression disease of melanoma patients? *BMC Cancer*. 2016;16(1):905. doi:10.1186/s12885-016-2951-4.
 79. Systemic Therapy of Metastatic Melanoma: On the Road to Cure | Cancer Network. February 2015. <http://www.cancernetwork.com/oncology-journal/systemic-therapy-metastatic-melanoma-road-cure>. Accessed May 23, 2015.
 80. Have We Won the Race in the Treatment of Advanced Melanoma? | Cancer Network. February 2015. <http://www.cancernetwork.com/oncology-journal/have-we-won-race-treatment-advanced-melanoma-or-are-we-just-learning-walk>. Accessed May 21, 2015.
 81. Breiman L, Friedman JH, Olshen RA, Stone CJ. *Classification and Regression Trees*. Vol 19.; 1984. doi:10.1371/journal.pone.0015807.
 82. Breiman L. Random forests. *Mach Learn*. 2001;45(1):5-32. doi:10.1023/A:1010933404324.
 83. Eigentler T, Assi Z, Hassel JCJC, et al. Which melanoma patient carries a BRAF-mutation? A comparison of predictive models. *Oncotarget*. 2016;7(24):36130-36137. doi:10.18632/oncotarget.9143.
 84. R Core Team. R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. *R Found Stat Comput Vienna, Austria URL <http://wwwR-project.org/>*. 2014:R Foundation for Statistical Computing.
 85. Harrell FE. *Regression Modeling Strategies*. Vol 64.; 2015. doi:10.1007/978-1-4757-3462-1.
 86. Kuhn M, Wing J, Weston S, Williams A, Keefer C, Engelhardt A. Caret: Classification and Regression Training. <https://CranR-ProjectOrg/Package=Caret>. 2012. doi:10.1053/j.sodo.2009.03.002.
 87. Ishwaran H, Ishwaran H, Kogalur UB, Kogalur UB. Random Survival Forests for R. *October*. 2007;7(October):25-31. doi:10.1214/08-AOAS169.
 88. J E. ggRandomForests: Visually Exploring Random Forests. 2015.
 89. Harrell FE. *Regression Modeling Strategies. With Applications to Linear Models, Logistic and Ordinal Regression, and Survival Analysis.*; 2015. doi:10.1007/978-3-319-19425-7_1.
 90. Wu X, Kumar V. *The Top Ten Algorithms in Data Mining.*; 2009.

- doi:10.1007/s10115-007-0114-2.
91. Heinzerling L, Baiter M, Kühnapfel S, et al. Mutation landscape in melanoma patients clinical implications of heterogeneity of BRAF mutations. *Br J Cancer*. 2013;109(November):1-9. doi:10.1038/bjc.2013.622.
 92. Lovly CM, Dahlman KB, Fohn LE, et al. Routine multiplex mutational profiling of melanomas enables enrollment in genotype-driven therapeutic trials. *PLoS One*. 2012;7(4):e35309. doi:10.1371/journal.pone.0035309.
 93. Hassel JC, Menzer C, Menzies AM, et al. BRAF/MEK inhibition in melanoma patients with rare BRAF mutations. *J Clin Oncol*. 2018;36(15_suppl):9542. doi:10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.9542.
 94. Bauer J, Büttner P, Murali R, et al. BRAF mutations in cutaneous melanoma are independently associated with age, anatomic site of the primary tumor, and the degree of solar elastosis at the primary tumor site. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2011;24(2):345-351. doi:10.1111/j.1755-148X.2011.00837.x.
 95. Bucheit AD, Syklawer E, Jakob JA, et al. Clinical characteristics and outcomes with specific BRAF and NRAS mutations in patients with metastatic melanoma. *Cancer*. 2013;119(21):3821-3829. doi:10.1002/cncr.28306.
 96. Menzies AM, Haydu LE, Visintin L, et al. Distinguishing clinicopathologic features of patients with V600E and V600K BRAF-mutant metastatic melanoma. *Clin Cancer Res*. 2012;18(12):3242-3249. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-0052.
 97. Sasaki Y, Niu C, Makino R, et al. BRAF point mutations in primary melanoma show different prevalences by subtype. *J Invest Dermatol*. 2004;123(1):177-183. doi:10.1111/j.0022-202X.2004.22722.x.
 98. Long G V, Menzies AM, Nagrial AM, et al. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. *J Clin Oncol*. 2011;29(10):1239-1246. doi:10.1200/JCO.2010.32.4327.
 99. Long G V., Menzies AM, Nagrial AM, et al. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. *J Clin Oncol*. 2011;29(10):1239-1246. doi:10.1200/JCO.2010.32.4327.
 100. Kim SY, Kim SN, Hahn HJ, Lee YW, Choe YB, Ahn KJ. Metaanalysis of BRAF mutations and clinicopathologic characteristics in primary melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 2015;72(6):1036-46.e2. doi:10.1016/j.jaad.2015.02.1113.
 101. Rubinstein JC, Sznol M, Pavlick AC, et al. *Incidence of the V600K Mutation among Melanoma Patients with BRAF Mutations, and Potential Therapeutic Response to the Specific BRAF Inhibitor PLX4032*. *Journal of translational medicine* 8, 67 (2010). doi:10.1186/1479-5876-8-67.
 102. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med*. 2011;364:2507-2516. doi:10.1056/NEJMoa1103782.
 103. Hauschild A, Grob JJ, Demidov L V., et al. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: A multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet*. 2012;380(9839):358-365. doi:10.1016/S0140-6736(12)60868-X.
 104. Eisenstein A, Gonzalez EC, Raghunathan R, et al. Emerging Biomarkers in Cutaneous Melanoma. *Mol Diagnosis Ther*. 2018. doi:10.1007/s40291-018-0318-z.
 105. Axelrod ML, Johnson DB, Balko JM. Emerging biomarkers for cancer immunotherapy in melanoma. *Semin Cancer Biol*. 2018. doi:10.1016/j.semcancer.2017.09.004.
 106. Alegre E, Sammamed M, Fernández-Landázuri S, Zubiri L, González Á. Circulating Biomarkers in Malignant Melanoma. In: *Advances in Clinical Chemistry*. ; 2015. doi:10.1016/bs.acc.2014.12.002.
 107. Gibney GT, Weiner LM, Atkins MB. Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *Lancet Oncol*. 2016. doi:10.1016/S1470-

- 2045(16)30406-5.
108. Lim SY, Lee JH, Diefenbach RJ, Kefford RF, Rizos H. Liquid biomarkers in melanoma: Detection and discovery. *Mol Cancer*. 2018. doi:10.1186/s12943-018-0757-5.
 109. Grzywa TM, Paskal W, Włodarski PK. Intratumor and Intertumor Heterogeneity in Melanoma. *Transl Oncol*. 2017. doi:10.1016/j.tranon.2017.09.007.

7. ANHANG

Tabelle 7: Verteilung verschiedener Variablen in Bezug auf detaillierten BRAF-Status

	Wild-type	V600E	V600K	positive, not specified	V600R	V600E2	V600D	V600G	V600M	K601E	L597Q	L597R	L597S
N	656	380	65	50	6	5	2	1	1	1	1	1	1
Sex = Male (%)	378 (55.9)	210 (31.1)	44 (6.5)	31 (4.6)	4 (0.6)	3 (0.4)	1 (0.1)	1 (0.1)	1 (0.1)	1 (0.1)	1 (0.1)	0 (0.0)	1 (0.1)
Sex = Female (%)	278 (56.3)	170 (34.4)	21 (4.3)	19 (3.8)	2 (0.4)	2 (0.4)	1 (0.2)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.2)	0 (0.0)
Age (mean (sd))	61.31 (13.57)	50.85 (14.35)	58.97 (12.23)	50.07 (11.90)	55.00 (NA)	45.80 (7.50)			37.00 (NA)	74.00 (NA)	61.00 (NA)	67.00 (NA)	
Localisation (%)													
Acral	69 (78.4)	16 (18.2)	0 (0.0)	3 (3.4)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)		0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)		
Extremities	117 (52.2)	83 (37.1)	9 (4.0)	13 (5.8)	0 (0.0)	2 (0.9)	0 (0.0)		0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)		
Head/Neck	101 (56.1)	46 (25.6)	29 (16.1)	3 (1.7)	1 (0.6)	0 (0.0)	0 (0.0)		0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)		
Mucosal	20 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)		0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)		
Trunk	154 (43.6)	149 (42.1)	18 (5.1)	22 (6.2)	3 (0.8)	3 (0.8)	1 (0.3)		1 (0.3)	1 (0.3)	1 (0.3)		
Stage (%)													
I	47 (42.7)	43 (39.1)	4 (3.6)	14 (12.7)	0 (0.0)	1 (0.9)			1 (0.9)	0 (0.0)			
II	94 (65.7)	31 (21.7)	7 (4.9)	8 (5.6)	1 (0.7)	1 (0.7)			0 (0.0)	1 (0.7)			
III	107 (53.8)	61 (30.7)	12 (6.0)	18 (9.0)	0 (0.0)	1 (0.5)			0 (0.0)	0 (0.0)			
IV	34 (50.0)	27 (39.8)	3 (4.4)	4 (5.9)	0 (0.0)	0 (0.0)			0 (0.0)	0 (0.0)			
Type (%)													
ALM	63 (80.7)	12 (15.4)	1 (1.3)	2 (2.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

LMM	14 (73.7)	3 (15.8)	1 (5.2)	1 (5.2)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
MM on a Ne- vus	2 (28.6)	5 (71.4)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Mucosal	46 (95.8)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (2.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (2.1.0)	0 (0.0)
NM	112 (49.8)	80 (35.7)	18 (8.0)	10 (4.4)	2 (0.9)	2 (0.9)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.4)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Not classifica- ble	33 (44.9)	35 (46.7)	4 (5.3)	2 (2.7)	0 (0.0)	1 (1.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Ocular	12 (80.0)	3 (20.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Other	21 (60.0)	13 (37.1)	1 (2.9)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
SSM	108 (44.6)	93 (38.4)	15 (6.2)	20 (8.3)	1 (0.4)	2 (0.8)	0 (0.0)	1 (0.4)	1 (0.4)	0 (0.0)	1 (0.4)	0 (0.0)	1 (0.4)
Unknown pri- mary	65 (55.1)	40 (33.9)	4 (3.4)	8 (6.8)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.8)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Thickness (mean (sd))	3.94 (3.69)	3.34 (3.56)	3.42 (2.93)	2.66 (2.14)	3.41 (1.58)	2.98 (2.99)		2.00 (NA)	0.50 (NA)	3.00 (NA)	2.10 (NA)	0.50 (NA)	0.85 (NA)
Ulceration = Present (%)	198 (59.3)	95 (28.4)	20 (6.0)	14 (4.2)	5 (1.5)	1 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)
Ulceration = Absent (%)	181 (52.3)	117 (33.8)	22 (6.4)	20 (5.8)	1 (0.3)	3 (0.9)	0	0	1 (0.3)	1 (0.3)	0	0	0

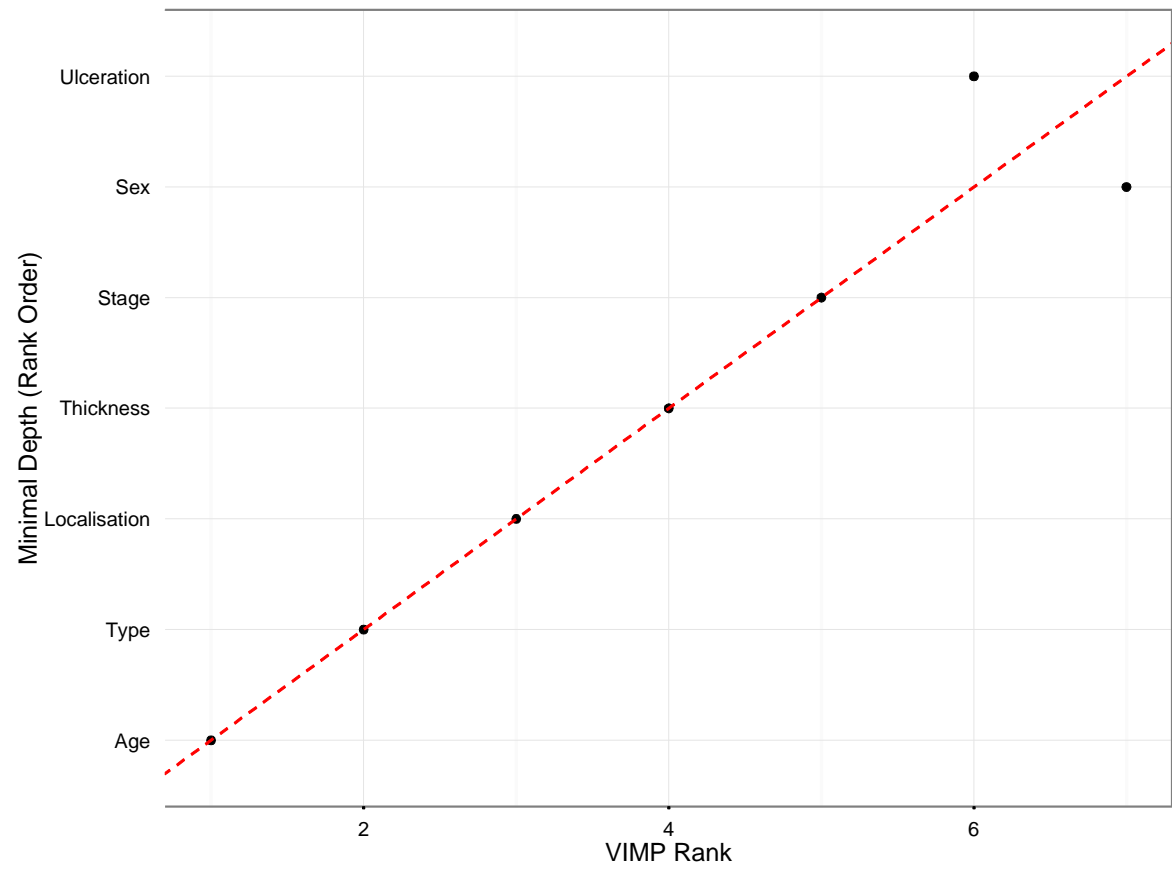


Abbildung 8: Vergleich von Rankings mit "minimal Depth" und "variable Importance" (VIMP). Die Punkte auf der rot gestrichelten Linie werden gleichwertig bewertet, die Punkte darunter haben einen höheren VIMP, die Punkte oben haben einen höheren Wert für minimal Depth. Sowohl minimal Depth als auch VIMP zeigen den starken Zusammenhang von Alter und Art der Melanomvariablen zur Forest Vorhersage.