

Aus dem
Department für Diagnostische Labormedizin der Universität
Tübingen
Institut für medizinische Genetik und angewandte Genomik

**Umfassende genetische Charakterisierung von
Stadium II Melanomen**

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

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

vorgelegt von

Lindner, Elena Sophia

2023

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. O. Rieß
2. Berichterstatter: Professorin Dr. U. Leiter-Stöppke

Tag der Disputation 04.05.2023

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis.....	VI
Verzeichnis ergänzender Daten im Anhang.....	VII
1 Einleitung	1
1.1 Eigenschaften maligner Tumoren.....	1
1.1.1 Treiber- und Passenger-Mutationen	2
1.1.2 Tumormutationslast (TMB)	3
1.1.3 Aneuploidie und chromosomale Instabilität (CIN).....	4
1.2 Next Generation Sequencing (NGS)	6
1.3 Malignes Melanom	10
1.3.1 Epidemiologie	10
1.3.2 Pathogenese	11
1.3.3 Klassifikation.....	16
1.3.4 Therapie.....	18
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	21
2 Material und Methoden	23
2.1 Patientenkohorte	23
2.2 Pathologie.....	24
2.3 Next Generation Sequencing	24
2.4 Bioinformatische Analyse	25
2.4.1 Prozessierung der Rohdaten	25
2.4.2 Qualitätskontrolle	26
2.4.3 Ausschlusskriterien	26
2.4.4 Berechnung der TMB.....	27
2.4.5 Molekulare Subtypen	29
2.4.6 Identifizierung potenzieller Treibergene.....	29
2.4.7 <i>TERT</i> Promoter Mutationen	31
2.4.8 Somatische Kopienzahlveränderungen	32
2.4.9 GISTIC Analyse	33
2.4.10 Aneuploidie-Score	34
2.4.11 Mutational Signatures	34
2.5 Statistische Auswertung	35

3	Ergebnisse	37
3.1	Qualitätsparameter der Sequenzierung	37
3.2	Patientencharakteristika	37
3.3	Histologie	38
3.4	Molekulare Subtypen	40
3.5	Tumormutationslast	46
3.6	Mutational Signatures	50
3.7	Single Nucleotide Variants	54
3.7.1	Potenzielle Treibergene	54
3.7.2	<i>TERT</i> Promoter Mutationen	59
3.8	Somatische Kopienzahlveränderungen	60
3.9	Überlebensanalysen	68
4	Diskussion	77
4.1	Methodik und potenzielle Fehlerquellen	77
4.1.1	Eigenschaften der verwendeten Gewebeproben	77
4.1.2	Berechnung der TMB	78
4.1.3	Identifizierung potenzieller Treibergene	80
4.1.4	Aneuploidie als Surrogatmarker für CIN	82
4.2	Besonderheiten der Stadium II Kohorte	84
4.2.1	Anteile der molekularen Subtypen und Histologien	84
4.2.2	Höhe der TMB	86
4.3	Eigenschaften der Histologien und molekularen Subtypen	87
4.3.1	Unterschiede bei TMB und UV-Exposition	87
4.3.2	Häufigkeit der <i>TERT</i> Promoter Mutationen	90
4.4	Treibergene des Melanoms im Stadium II	93
4.4.1	Überschneidung zu Melanomen höherer Stadien	93
4.4.2	Unterschiede zwischen den molekularen Subtypen	95
4.4.3	<i>KIT</i> Mutationen als mögliche Therapietargets im Stadium II	97
4.4.4	<i>CBL</i> als potenzieller Tumortreiber des malignen Melanoms	98
4.4.5	Assoziation detektierter Treibergene mit der UV-Signatur	103
4.5	SCNAs des Melanoms im Stadium II	105
4.5.1	Aberrationen ganzer Chromosomenarme	105
4.5.2	Fokale SCNAs und potenzielle Treibergene	107
4.6	Einflussfaktoren des Outcomes von Stadium II Melanomen	112
4.6.1	Histologie	114
4.6.2	Molekulare Subtypen	115

4.6.3	Tumormutationslast	117
4.6.4	<i>TERT</i> Promoter Mutationen	120
4.6.5	Aneuploidie.....	121
4.6.6	Mutationen und SCNAs potenzieller Treibergene	125
4.7	Schlussfolgerung	128
5	Zusammenfassung	133
	Literaturverzeichnis	135
	Anhang	158
	Erklärungen zum Eigenanteil	174
	Veröffentlichungen	176
	Danksagung	177

Abkürzungsverzeichnis

Allgemeine Abkürzungen

AJCC	American Joint Committee on Cancer
ALM	akrolentiginöses Melanom
BAF	B-allele frequency
BH	Benjamini-Hochberg
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CIN	chromosomale Instabilität
CMMR	Central Malignant Melanoma Registry
CN	Copy-number
CNV	Copy-number variation
CSD	chronic sun-induced damage
CT	Computertomographie
DFS	krankheitsfreies Überleben
DNA	Desoxyribonukleinsäure, deoxyribonucleic acid
FDR	False-discovery rate
FFPE	Formalin-fixed paraffin-embedded
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
gDNA	genomische DNA
GISTIC	Genomic Identification of Significant Targets in Cancer
HR	Hazard Ratio
IGV	Integrative Genomics Viewer
IQR	Interquartilsabstand
KI	Konfidenzintervall
LMM	Lentigo-maligna-Melanom
LoF	Loss-of-Function
LOH	Loss of Heterozygosity
M	Fernmetastasen
MAF	Mutation Annotation Format
Mb	Megabase
mm	Millimeter
MRT	Magnetresonanztomographie
MSS	melanomspezifisches Überleben
N	Nodalstatus
nCIN	numerische chromosomale Instabilität
ng	Nanogramm
NGS	Next Generation Sequencing
NM	noduläres Melanom
NSCLC	nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom
OR	Odds Ratio
OS	Gesamtüberleben
PET	Positronenemissionstomographie
PFS	progressionsfreies Überleben

QC	Qualitätskontrolle
RFS	rezidivfreies Überleben
sCIN	strukturelle chromosomale Instabilität
SCNA	Somatic copy-number alteration
SNV	Single-nucleotide variant
SSM	superfiziell spreitendes Melanom
T	Tumordicke
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TEMMB	Tumor exonic missense mutational burden
TPS	Targeted Panel Sequencing
Triple-WT	Triple-Wildtyp
UKT	Universitätsklinikum Tübingen
UVR	UV radiation – UV-Strahlung
WES	Whole Exome Sequencing
WGS	Whole Genome Sequencing

Abkürzungen von Gen- und Protein-Namen

ADAMTS18	ADAM Metallopeptidase With Thrombospondin Type 1 Motif 18
ANK3	Ankyrin 3
AR	Androgen Receptor
ARID1B	AT-rich interaction domain 1B
ARID2	AT-rich interaction domain 2
BRAF	v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B
C10orf40	Chromosome 10 open reading frame 40
C9orf53	Chromosome 9 open reading frame 53
CARM1	Coactivator Associated Arginine Methyltransferase 1
CAST	Calpastatin
CBL	Cbl proto-oncogene B, Casitas B-lineage lymphoma
CCND1	Cyclin D1
CDC27	Cell Division Cycle 27
CDK4	Cyclin dependent kinase 4
CDKN2A	Cyclin dependent kinase inhibitor 2A
COL3A1	Collagen Type III Alpha 1 Chain
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4
CYP3A5	Cytochrome P450 Family 3 Subfamily A Member 5
DICER1	Dicer 1, Ribonuclease III
EGF	Epidermal growth factor
EP300	Histone acetyltransferase p300
EPHA3	EPH Receptor A3
ETS	E26 transformation-specific
FGF10	Fibroblast growth factor 10
FGF19	Fibroblast growth factor 19
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HRAS	Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
KIT	KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase

KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LAG-3	lymphocyte-activation gene 3
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MC1R	Melanocortin-1-Rezeptor
MDM2	Mouse double minute 2 homolog
MECOM	MDS1 and EVI1 complex locus
MEK, MAP2K1	Mitogen-activated protein kinase kinase
MIR1281	MicroRNA 1281
MITF	Mikrophthalmie-assoziiertes Transkriptionsfaktor
MSH	Melanozyten-stimulierendes Hormon
MYC	bHLH transcription factor
NF1	Neurofibromin 1
NOTCH2	Neurogenic locus notch homolog protein 2
NRAS	Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog
NUP98	Nucleoporin 98 And 96 Precursor
ORAOV1	Oral cancer overexpressed 1
PD-1	Programmed death 1
PD-L1	Programmed death-ligand 1
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PPP6C	Serine/threonine-protein phosphatase 6 catalytic subunit
PREX2	Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphate Dependent Rac Exchange Factor 2
PTEN	Phosphatase And Tensin Homolog
PTPRC	Protein tyrosine phosphatase receptor type C
RAC1	Rac family small GTPase 1
RBX1	RING-box protein 1
RPL5	Ribosomal Protein L5
RPTOR	Regulatory associated protein of MTOR complex 1
SF3B1	Splicing Factor 3b Subunit 1
TCF12	Transcription Factor 12
TERT	Telomerase reverse transcriptase
TET2	Tet Methylcytosine Dioxygenase 2
TOP2A	DNA Topoisomerase II Alpha
TP53	Tumor protein p53

Einbuchstabencodes der Aminosäuren

A	Alanin
R	Arginin
N	Asparagin
D	Asparaginsäure
C	Cystein
Q	Glutamin
E	Glutaminsäure
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
L	Leucin
K	Lysin
M	Methionin
F	Phenylalanin
P	Prolin
S	Serin
T	Threonin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin
V	Valin

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Relevante Signalwege der Melanomagenese.	15
Abbildung 2: Filterkriterien der initialen 290 Stadium II Patienten mit verfügbaren Gewebeblöcken.	27
Abbildung 3: Darstellung der Verteilung von BRAF V600 (n = 58) und NRAS Q61 und G13 (n = 50) Hotspot-Mutationen auf die verschiedenen Aminosäureaustausche.	41
Abbildung 4: Verteilung somatischer Mutationen auf den Genen BRAF, NRAS und NF1.	42
Abbildung 5: Anteil der molekularen Subtypen an den verschiedenen Histologien und Tumorlokalisationen.	45
Abbildung 6: Korrelation der über das Panel berechneten TMB-Werte mit der Gesamtzahl nicht-synonymer, kodierender Varianten in TCGA Stadium II Melanomen.	47
Abbildung 7: Vergleich der TMB-Werte zwischen den Tumoren dieser Studie (n = 193) und den TCGA Stadium II Melanomen (n = 138).	47
Abbildung 8: Vergleich der TMB-Werte in Stadium II Melanomen zwischen verschiedenen molekularen Subtypen, Histologien und Lokalisationen.	49
Abbildung 9: Anteil der verschiedenen Mutational Signatures an den detektierten Mutationen der einzelnen Tumorproben.	51
Abbildung 10: Mutationscluster des Gens CBL.	55
Abbildung 11: Oncoplot der wichtigsten Patientencharakteristika sowie der SNVs und CNVs ausgewählter Gene.	57
Abbildung 12: Vergleich des von SCNAs betroffenen Anteils am gesamten Genom zwischen den molekularen Subtypen.	61
Abbildung 13: Darstellung des Copy-number (CN) Profils der Stadium II Melanomkohorte.	62
Abbildung 14: GISTIC Ergebnisse der Gesamtkohorte.	67
Abbildung 15: Kaplan-Meier Überlebenskurven für ausgewählte Faktoren.	73
Abbildung 16: Kaplan-Meier Überlebenskurven in Abhängigkeit des Deletionsstatus der GISTIC Region 11q23.1	75

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Staging des malignen Melanoms nach AJCC im Zusammenhang mit der TMN-Klassifikation (Gershenwald et al., 2017). Die Stadien I, III und IV sind vereinfacht dargestellt. Das Stadium II ist aufgrund der Relevanz für diese Arbeit hervorgehoben.	16
Tabelle 2: Klinische Charakteristika der Patienten mit Tumoren verschiedener Histologien sowie der gesamten Kohorte.....	39
Tabelle 3: Klinische Charakteristika der Patienten mit Tumoren unterschiedlicher molekularer Subtypen und der gesamten Kohorte.....	44
Tabelle 4: Anzahl und Anteil der Tumoren mit und ohne eine Dominanz der Signatur 7 aufgegliedert nach dem vorliegenden molekularen Subtyp.....	51
Tabelle 5: Anzahl und Anteil der Tumoren mit und ohne eine Dominanz der Signatur 7 aufgegliedert nach der vorliegenden Histologie.	51
Tabelle 6: Zusammenhang zwischen dem Mutationsstatus der nominierten Treibergene und dem Vorherrschen der UV-Signatur in der jeweiligen Probe.....	53
Tabelle 7: Anteil der Proben in der Gesamtkohorte und in den molekularen Subtypen, die von einer nicht-synonymen, kodierenden Mutation in den nominierten Treibergenen betroffenen waren. ...	58
Tabelle 8: <i>TERT</i> Promoter Hotspot-Mutationen der Gesamtkohorte (n = 111), aufgegliedert nach ihrer Lokalisation auf Chromosom 5.....	59
Tabelle 9: Häufigkeit der Hotspot-Mutationen des <i>TERT</i> Promoters in den molekularen Subtypen (n = 111).	60
Tabelle 10: Der Anteil der von Amplifikationen und Deletionen ausgewählter Gene betroffenen Tumoren in der Gesamtkohorte und den molekularen Subtypen.....	65
Tabelle 11: Univariate Cox-Analysen ausgewählter klinischer Faktoren sowie der TMB, des molekularen Subtyps, des <i>TERT</i> Promoter Status und der Aneuploidie.....	71
Tabelle 12: Multivariate Cox-Analysen für RFS und OS (n = 190).	76

Verzeichnis ergänzender Daten im Anhang

Supplement 1: Angereicherte Gene des verwendeten Sequenzierpanels.	158
Supplement 2: Angereicherte Promoter-Regionen des verwendeten Sequenzierpanels.....	160
Supplement 3: Liste der Tumorsuppressorgene für deren Mutationen bei der Berechnung der TMB korrigiert wurde, um eine Überschätzung der Werte zu vermeiden.	161
Supplement 4: Nominierte Treibergene in der Gesamtkohorte und den molekularen Subtypen sowie deren signifikante q-Werte in der Analyse mittels MutSigCV, OncodriveCLUST und OncodriveFM.....	162
Supplement 5: Mutationscluster der Gene <i>PPP6C</i> , <i>CDKN2A</i> und <i>TP53</i> , die einen q-Wert < 0,01 in der OncodriveCLUST-Analyse der Gesamtkohorte aufwiesen.....	163
Supplement 6: Detektierte <i>CBL</i> Mutationen des kodierenden Bereichs.	164
Supplement 7: Detektierte <i>KIT</i> Mutationen des kodierenden Bereichs. Synonyme Mutationen wurden nicht angegeben.	165
Supplement 8: GISTIC Ergebnisse der molekularen Subtypen.....	170
Supplement 9: Univariate Cox-Analysen in Abhängigkeit des Mutationsstatus der in der Gesamtkohorte nominierten Treibergene, die in mindestens 5 % der Tumoren von einer kodierenden, nicht-synonymen Mutation betroffen waren.	171
Supplement 10: Begrenzungen der fünf deletierten Regionen mit den kleinsten q-Werten in GISTIC.....	172
Supplement 11: Univariate Cox-Analysen für die fünf deletierten Regionen, die in der GISTIC Analyse die kleinsten q-Werte aufwiesen.	172
Supplement 12: Liste der Gene, die auf dem Wide-Peak der von GISTIC als deletiert detektierten Region 11q23.1 lokalisiert waren.	173

1 Einleitung

1.1 Eigenschaften maligner Tumoren

Krebszellen haben typische Eigenschaften, die sie von normalen Körperzellen unterscheiden. Diese werden auch als *Hallmarks of Cancer* bezeichnet. Hierzu zählen unter anderem die unkontrollierte Zellteilung ohne die Beachtung äußerer Signale, die Resistenz gegen Apoptose und ein unbegrenztes Teilungspotential. Außerdem induzieren maligne Tumoren die Angiogenese, also die Neubildung von Gefäßen, haben einen veränderten Energiestoffwechsel und können über variable Mechanismen einer Immunantwort entfliehen. Des Weiteren besitzen sie die Fähigkeit, invasiv in das umliegende Gewebe einzuwachsen und Metastasen auszubilden. (Hanahan und Weinberg, 2000; Hanahan und Weinberg, 2011)

Diesen tumorspezifischen Eigenschaften liegen genetische Veränderungen der Desoxyribonukleinsäure (DNA) zugrunde, die verschiedene zelluläre Signalwege betreffen. Deren physiologische Aufgabe ist es, die natürliche Gewebemöostase aufrechtzuerhalten. Die Mechanismen, wie es zu krebsspezifischen Veränderungen kommt, sind vielfältig. Neben dem Austausch einzelner Basen, was auch als Single-nucleotide variant (SNV) bezeichnet wird, können auch Deletionen und Amplifikationen von Teilen des Genoms vorliegen. Es wird zwischen Deletionen und Amplifikationen kleiner Genabschnitte (Indels), einzelner oder mehrerer Gene (Somatic copy-number alterations, SCNAs; Copy-number variations, CNVs) und ganzer Chromosomenarme (Aneuploidie) unterschieden. Außerdem können auch Genfusionen und epigenetische Mechanismen eine Rolle spielen. Diese Schäden der DNA können einerseits angeboren sein und gehen so mit einem von Geburt an erhöhten Krebsrisiko einher, das auch an die Nachkommen vererbt werden kann, oder sie werden im Laufe des Lebens erworben. Bei Letzteren sind die wichtigsten Einflussfaktoren zum einen das Lebensalter, da sich mit einer zunehmenden Anzahl an Zellteilungen zufällige Fehler im Genom ansammeln, und zum anderen äußere Einflüsse. Hierzu zählen beispielsweise die Exposition mit mutagener Strahlung oder Umweltgiften. (Stratton et al., 2009)

1.1.1 Treiber- und Passenger-Mutationen

Die Entstehung maligner Tumoren stellt einen evolutionären Prozess dar. Genetische Veränderungen können dabei einer positiven oder negativen Selektion unterliegen. Bei der Analyse somatischer Mutationen wird zwischen Treibermutationen und Passenger-Mutationen unterschieden. Treibermutationen sind Alterationen, die der Zelle einen Wachstumsvorteil bringen und damit während der Krebsentstehung oder -progression positiv selektiert werden. Im Gegensatz dazu tragen Passenger-Mutationen nicht kausal zur Krebsentwicklung bei und bringen der Zelle daher keinen Selektionsvorteil (Stratton et al., 2009). Sie können jedoch die Bildung von Neoepitopen zur Folge haben und damit zur Immunogenität eines Tumors beitragen (Chen und Mellman, 2017). Außerdem machen sie in der Regel den größten Anteil der Mutationen in entarteten Zellen aus (Greenman et al., 2007; Stratton et al., 2009).

Die von Treibermutationen betroffenen Gene werden als Treibergene bezeichnet. Bei Treibergenen wird wiederum zwischen Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen unterschieden. Protoonkogene kodieren für Proteine, die sich beispielsweise positiv auf die Zellteilung und das Überleben der Zelle auswirken und deren Überaktivität daher zur Krebsentstehung beitragen kann. Sind diese Gene in Krebszellen von Gain-of-Function-Mutationen betroffen, so werden sie als Onkogene bezeichnet. Bei Gain-of-Function-Mutationen handelt es sich in den meisten Fällen um sogenannte Missense-Mutationen (Bailey et al., 2018), bei denen eine Aminosäure durch eine andere ausgetauscht wird. Im Gegensatz dazu bilden Tumorsuppressorgene Genprodukte, die beispielsweise durch Herabregulation des Zellwachstums oder Induktion von Apoptose in geschädigten Zellen der Krebsentstehung entgegenwirken. Diese Gene weisen in Krebszellen häufig sogenannte Loss-of-Function- (LoF) Mutationen auf, die zu einem Funktionsverlust des kodierten Proteins führen. Da von jedem Gen zwei Allele vorhanden sind, müssen für einen vollständigen Funktionsverlust in der Regel beide Allele betroffen sein (Knudson, 1971; Knudson, 2001). Bei LoF-Mutationen handelt es sich vor allem um Frameshift- oder Nonsense-Mutationen, die zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation führen (Bailey et al., 2018).

Die häufig von Mutationen betroffenen Treibergene sowie die Anzahl somatischer Mutationen im Tumorgewebe unterschieden sich grundlegend zwischen Tumoren verschiedener Entitäten. Auch Tumoren, die von denselben Zellen ausgehen und sich klinisch und histologisch sehr ähnlich sind, können dennoch eine ausgeprägte molekulare Vielfalt aufweisen. (Bailey et al., 2018; Chalmers et al., 2017; Kandoth et al., 2013)

1.1.2 Tumormutationslast (TMB)

Die Tumormutationslast wurde ursprünglich als Anzahl der nicht-synonymen SNVs pro Megabase (Mb) des kodierenden Tumorgenoms definiert (Melendez et al., 2018). Eine hohe TMB geht demnach mit einem großen Unterschied der analysierten Tumor-DNA zur DNA normaler Körperzellen einher. Daher kann die TMB zur Abschätzung der Anzahl potenzieller Neoantigene eines Tumors herangezogen werden, die eine Erkennung der Krebszellen durch das Immunsystem ermöglichen (Rizvi et al., 2015; Rooney et al., 2015; Schumacher und Schreiber, 2015; Van Allen et al., 2015). Aufgrund dessen wird die TMB als prädiktiver Biomarker für das Ansprechen von Immuncheckpoint-Inhibitoren diskutiert (Arora et al., 2019) (siehe auch Kapitel 1.3.4.2).

Diese Annahme wird durch ein gutes Ansprechen von Tumorentitäten, die für eine hohe Mutationslast bekannt sind, auf Immuntherapeutika unterstützt (Brahmer et al., 2012). Zu diesen Tumorentitäten zählen beispielsweise das maligne Melanom oder das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom (NSCLC) (Chalmers et al., 2017; Vogelstein et al., 2013). Für die jeweiligen Krebsarten wurde außerdem eine Assoziation zwischen einer hohen TMB im Tumor und einem verbesserten Ansprechen auf Immuncheckpoint-Inhibitoren beschrieben (Rizvi et al., 2015; Snyder et al., 2014). Bisher war es jedoch nicht möglich, das Therapieansprechen anhand der TMB sicher vorherzusagen oder sogar einen prädiktiven Cutoff dafür einzuführen (Rizvi et al., 2018; Snyder et al., 2014; Van Allen et al., 2015).

1.1.3 Aneuploidie und chromosomale Instabilität (CIN)

Aneuploidie wird als eine von der Norm abweichende Anzahl ganzer Chromosomen beziehungsweise (bzw.) Chromosomenteile in der Zelle definiert (Turajlic et al., 2019). Hiervon muss die Polyploidie abgegrenzt werden, die zu einer Vermehrung des gesamten Chromosomensatzes führt (Storchova und Pellman, 2004). Im Gegensatz zu SNVs hat die Aneuploidie genetische Alterationen zur Folge, die größere Teile des Genoms betreffen. Das resultiert in der veränderten Expression einer höheren Zahl von Genen (Turajlic et al., 2019). Mit ungefähr 90 % ist der Großteil solider Malignome von Aneuploidie betroffen (Taylor et al., 2018; Weaver und Cleveland, 2006), was die Aneuploide zu einem zentralen Merkmal von Krebszellen macht. Bereits vor mehr als 100 Jahren schrieb Boveri (1914) der Aneuploidie eine mögliche Rolle bei der Tumorentwicklung zu.

Die chromosomale Instabilität (CIN) bezeichnet eine erhöhte Rate an Chromosomenverlusten und -zugewinnen bei der Zellteilung (McGranahan et al., 2012). Sie wird daher als wichtigster, der Aneuploidie zugrundeliegender Mechanismus betrachtet (Lengauer et al., 1997). Auf molekularer Ebene spielt eine fehlerhafte Trennung der Schwesterchromatiden in der Anaphase, beispielsweise durch De-regulation des Spindelkontrollpunktes während der Mitose, eine Rolle (Kops et al., 2005). Dies hat eine ungleiche Verteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen zur Folge. Ein Merkmal chromosomaler Instabilität ist, dass sich diese fehlerhafte Aufteilung genetischen Materials bei der Zellteilung wiederholt. Dadurch kommt es zu einer heterogenen bzw. subklonalen Aneuploidie im Tumor (Heng et al., 2013; Lengauer et al., 1998). Es muss jedoch beachtet werden, dass CIN nur eine mögliche Ursache der Aneuploidie im Tumor darstellt. Das Vorliegen einer Aneuploidie ist daher nicht zwangsläufig auf eine chromosomale Instabilität zurückzuführen (Gordon et al., 2012; Lengauer et al., 1997; McGranahan et al., 2012).

McGranahan et al. (2012) unterschieden zwei verschiedene Formen chromosomaler Instabilität: die numerische CIN (nCIN) und die strukturelle CIN (sCIN). Die nCIN stellt, wie oben beschrieben, das Resultat einer fehlerhaften Verteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen während der Mitose dar und resultiert in einer Aneuploidie. Die sCIN hat eine generelle strukturelle Instabilität des Genoms

zur Folge und äußert sich zum Beispiel in reziproken und nicht-reziproken Translokationen, Amplifikationen, Deletionen sowie Insertionen (Bayani et al., 2007). In der Regel sind chromosomal instabile Tumorzellen immer sowohl von numerischen als auch von strukturellen Veränderungen betroffen (McGranahan et al., 2012).

Für die Aneuploidie wurden komplexe Effekte auf die zelluläre Fitness beobachtet. In *in vitro* Studien ging sie beispielsweise mit einer verlangsamten Zellproliferation einher (Williams et al., 2008). Entsprechendes wurde auch für chromosomal instabile Krebszellen beobachtet, wo die Störung des mitotischen Checkpoints zum Zelltod führte (Kops et al., 2004; Kops et al., 2005). Als potenzieller Therapieansatz sowie prognostischer Marker ist die Erforschung von CIN und Aneuploidie daher auch von klinischem Interesse.

Als Erklärung dieser phänotypischen Veränderungen kann die Gen-Dosis-Hypothese dienen. Diese besagt, dass Aneuploidie zur gleichzeitigen Dosisveränderung einer großen Zahl an Genen führt, was wiederum in Dysbalancen wichtiger Proteine und Signalwege resultiert. Folgen sind unter anderem proteotoxischer Stress sowie eine Veränderung des Zellmetabolismus. Letzteres geht mit einem erhöhten Energiebedarf einher und kann damit die zelluläre Fitness negativ beeinflussen. (Sheltzer und Amon, 2011)

Auf der anderen Seite werden der Aneuploidie unter bestimmten Umständen positive Auswirkungen auf die zelluläre Fitness zugeschrieben (Ben-David und Amon, 2019; Sheltzer und Amon, 2011). Ein Erklärungsansatz hierfür sieht tumorfördernde Effekte wie beispielsweise Amplifikationen mutierter Onkogene und den Verlust von Tumorsuppressorgenen sowie die Zunahme genomischer Instabilität als ursächlich an (Gordon et al., 2012). Die Tatsache, dass Deletionen und Amplifikationen bestimmter Chromosomen für einige Krebsarten charakteristisch sind (Taylor et al., 2018), legt eine positive Selektion dieser Alterationen als Treiber der Tumorgenese nahe, was die genannte Hypothese wiederum bestärkt (Ben-David und Amon, 2019; Davoli et al., 2013).

Dieses Phänomen, dass sich Aneuploidie sowohl positiv als auch negativ auf die zelluläre Fitness auswirken kann, wird als das Aneuploidie-Paradoxon bezeichnet (Sheltzer und Amon, 2011).

1.2 Next Generation Sequencing (NGS)

Über die Sequenzierung der DNA kann die Abfolge der Basen im DNA-Molekül bestimmt werden, was einen Rückschluss auf die Primärstruktur des kodierten Proteins erlaubt. Im klinischen Alltag wird das NGS verwendet, um Variationen von Gensequenzen zu detektieren. Zwei Bereiche sind dabei von besonderer Wichtigkeit. Einerseits dient das NGS der Identifikation sogenannter Keimbahnmutationen, die als Auslöser oder Risikofaktoren für verschiedene genetische Erkrankungen fungieren können. Keimbahnmutationen sind Mutationen, die in allen Körperzellen eines Individuums zu finden sind und daher an die Nachkommen vererbt werden können (Holinski-Feder, 2017). Diese Keimbahnmutationen müssen jedoch nicht vererbt sein, sondern können auch *de novo* entstehen. Andererseits wird die DNA-Sequenzierung häufig dazu verwendet, somatische Mutationen in malignen Tumoren zu identifizieren. Somatische Mutationen sind erworbene Mutationen, die nur einzelne oder Gruppen von Zellen betreffen und nicht an die nachfolgende Generation vererbt werden können (Holinski-Feder, 2017). Für die Identifikation somatischer Mutationen in malignen Tumoren wird meist sowohl Tumor- als auch Normalgewebe desselben Patienten¹ sequenziert. Die beiden Ergebnisse werden anschließend bioinformatisch auf Unterschiede verglichen. So können Treibergene nominiert werden, die Aufschluss über die Entstehung der Krankheit geben oder als Therapietargets zielgerichteter Krebstherapien fungieren können (Shendure et al., 2017). An dieser Stelle ist das Projekt *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) zu nennen. Dieses Projekt hat sich die umfangreiche Analyse molekularer Veränderungen und deren funktionelle Bedeutung in verschiedenen Tumorentitäten zum Ziel gesetzt (The Cancer Genome Atlas Research Network et al., 2013).

Die ersten Methoden zur Sequenzierung der DNA waren die chemische Methode nach Maxam und Gilbert (Maxam und Gilbert, 1977) und die Sanger-Sequenzierung. Hierbei konnte sich Letztere langfristig durchsetzen. Sie wurde erstmals 1977 durch Sanger und Coulson beschrieben (Sanger et al., 1977) und ist auch

¹ In dieser Arbeit wird aus Gründen der besseren Lesbarkeit ausschließlich die männliche Form verwendet. Sie bezieht sich auf Personen aller Geschlechter.

als Didesoxymethode oder Kettenabbruch-Synthese bekannt. Der zu sequenzierenden DNA werden neben Primern, der DNA-Polymerase und den vier verschiedenen Nukleotiden auch radioaktiv markierte oder später fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide zugegeben. Diesen Didesoxynukleotiden fehlt die 3'-OH-Gruppe, wodurch es beim zufälligen Einbau in die DNA zu einem Kettenabbruch kommt. So entstehen DNA-Fragmente verschiedener Länge, die ein markiertes Didesoxynukleotid am Ende tragen. Diese Fragmente werden mittels Gelelektrophorese der Länge nach aufgetrennt und die radioaktiven Signale können mit Hilfe eines Röntgenfilms visualisiert werden. Beim Einsatz von radioaktiv markierten Didesoxynukleotiden werden vier verschiedene Reaktionsansätze benötigt, zu denen je nur eine der vier radioaktiven Basen hinzugegeben wird. Seit der Verwendung von fluoreszierenden Nukleotiden ist ein Reaktionsansatz ausreichend, da jede Base mit einem anderen Farbstoff markiert werden kann. Über die Länge der Fragmente und das ausgelesene Farbsignal kann die Information über die vorliegende Base an der jeweiligen Position der DNA generiert werden. (Sanger et al., 1977; Shendure und Ji, 2008)

Die Sanger-Sequenzierung wird zunehmend durch das Next Generation Sequencing (NGS) abgelöst. Das NGS ermöglicht die parallele Sequenzierung einer großen Zahl von DNA-Molekülen, auch verschiedener Personen, in einem Lauf. Die verfügbaren Technologien werden damit zunehmend zeit- und kosteneffektiver. Die Funktionsweise des NGS soll an dieser Stelle anhand der Illumina Plattform (Illumina, San Diego, CA, USA) dargestellt werden, da diese in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung kam.

Vor Beginn der Sequenzierung muss die DNA vorbereitet werden. Dieser Prozess wird als Library Preparation bezeichnet. Hierzu wird die DNA fragmentiert, denaturiert und mit Adapter-DNA-Sequenzen versehen. Diese Adapter-Sequenzen werden mit Oligonukleotiden hybridisiert, die auf einer Flow Cell gebunden sind, wo später der Sequenziervorgang stattfinden wird. Anschließend wird für jedes der DNA-Fragmente auf der Flow Cell eine Kopie erstellt und das ursprüngliche Molekül wird ausgewaschen. Um während der Sequenzierung ein starkes Signal zu erhalten, werden die Kopien der DNA-Moleküle mittels Bridge-Amplifikation vervielfältigt. Das führt zur Bildung von Bereichen auf der Flow Cell, die viele Kopien des gleichen DNA-Fragments enthalten, sogenannten Clustern.

Außerdem wird jedes Template-Molekül mit einem Barcode, einer probenspezifischen Basensequenz, versehen. Das stellt sicher, dass die Sequenzierdaten der einzelnen DNA-Moleküle dem richtigen Patienten zugeordnet werden können. (Buermans und den Dunnen, 2014; Goodwin et al., 2016)

Der eigentliche Sequenziervorgang wird als Sequencing-by-Synthesis bezeichnet. Hierfür werden, ähnlich wie bei der Sanger-Sequenzierung, fluoreszenzmarkierte Nukleotide mit einer blockierten 3'-OH-Gruppe verwendet, deren Einbau zum Kettenabbruch führt. Die übrigen Nukleotide werden vorübergehend entfernt und die Farben, die von den Fluoreszenzfarbstoffen der einzelnen Cluster ausgehen, werden aufgezeichnet. Aus der registrierten Farbe kann auf die eingebaute Base rückgeschlossen werden. Anschließend kommt es zur Abspaltung der blockierenden und der fluoreszierenden Gruppe, wodurch ein weiteres Nukleotid gebunden werden kann. Dieser Prozess wird viele Male wiederholt. (Goodwin et al., 2016)

Auf diese Weise wird die Basensequenz für jedes der DNA-Moleküle ermittelt, was jeweils einen Read produziert. Häufig wird die Sequenzierung als Paired-End Sequencing durchgeführt. Das bedeutet, dass die DNA-Moleküle von beiden Enden ausgehend sequenziert werden. Die so entstehenden Reads können je nach Länge der Template-DNA überlappen, was für das spätere Alignment von Vorteil ist. (Goodwin et al., 2016)

Wichtige Qualitätsparameter des NGS sind die Depth und die Coverage. Die Depth, oder auch Sequenziertiefe, bezeichnet die Anzahl der Reads, die eine bestimmte Basenposition abdecken. Je höher diese Anzahl, desto wahrscheinlicher ist es, dass die Base an dieser Stelle richtig detektiert wurde. Die Coverage ist als die horizontale Abdeckung der Zielregion definiert. Sie gibt an, welcher Anteil der Target Region mit einer bestimmten Tiefe sequenziert wurde. (Goodwin et al., 2016)

Das NGS produziert Rohdaten, die mittels bioinformatischer Analysen in auswertbare Daten umgewandelt werden müssen. Während der Sequenzierung erfolgt die Transformation aufgezeichneter Signale in Informationen über die jeweils vorliegende Base. Diese werden zu Reads zusammengesetzt. Jeder detektierten Base wird zusätzlich ein Qualitätsscore zugewiesen. Anschließend werden die einzelnen Reads mit einem Referenz-Genom verglichen, um deren

Position zu ermitteln. So können sie zu einer langen Sequenz zusammengesetzt werden. Dieser Prozess wird als Alignment oder Mapping bezeichnet. Des Weiteren werden sogenannte Duplicate-Reads als Artefakte detektiert und herausgefiltert. Falls Tumor- und Normalgewebe desselben Patienten sequenziert wurde, muss das Alignment für beide Proben separat durchgeführt werden. Anschließend kommt es zum Variant-Calling. Dabei werden die Unterschiede zwischen dem Referenzgenom und dem sequenzierten Genom analysiert. Im Fall der Tumorsequenzierung wird das somatische Tumorgenom mit dem Keimbahn-genom verglichen. Zum Schluss werden die detektierten Varianten annotiert. Bei der Annotation werden den einzelnen Alterationen Informationen über deren biologische Signifikanz zugeordnet. (Oliver et al., 2015)

Mittels NGS können neben SNVs auch Indels sowie strukturelle Varianten detektiert werden. Für die Identifikation von CNVs sind zusätzliche Algorithmen notwendig. Das relativ neue Long-Read Sequencing, das sich durch eine wesentlich größere Länge der generierten Reads vom standardmäßig verwendeten Short-Read Sequencing unterscheidet, ist hierfür besser geeignet. (Mason-Suares et al., 2016)

Je nach Fragestellung können verschiedene Zielregionen für das NGS gewählt werden, die gegebenenfalls vor Beginn der Sequenzierung mit sogenannten Baits angereichert werden müssen. Dieser Schritt wird als Target Enrichment oder Targeted Capture bezeichnet. Es kann entweder das gesamte Genom (Whole Genome Sequencing, WGS), das gesamte Exom (Whole Exome Sequencing, WES) oder nur eine bestimmte Target Region (Targeted Panel Sequencing, TPS) sequenziert werden. Jede dieser Methoden hat Vor- und Nachteile. Beim WGS und WES kann eine größere Zahl von Genen beurteilt werden, jedoch ist die erreichte Sequenziertiefe meist schlechter und die Kosten der Sequenzierung sind höher. Dem gegenüber ist das TPS kostengünstiger und es wird in der Regel eine bessere Coverage der Target Region erreicht (Oliver et al., 2015). Allerdings muss bereits im Voraus eine Auswahl an Genen festgelegt werden, über die anschließend eine Aussage gemacht werden kann. (Goodwin et al., 2016; Hodges et al., 2007)

1.3 Malignes Melanom

Das maligne Melanom ist ein bösartiger Tumor, der von Melanozyten ausgeht. Melanozyten sind Zellen, die während der Entwicklung aus der Neuralleiste hervorgehen (Mort et al., 2015) und vor allem in der Basalschicht der Epidermis zu finden sind. Neben der Epidermis kommen sie unter anderem auch in der Uvea des Auges, den Schleimhäuten sowie den Meningen vor.

Kommt es durch UV-Strahlung zu einer DNA-Schädigung der Keratinozyten, so schütten Melanozyten den Botenstoff Melanozyten-stimulierendes Hormon (MSH) aus. MSH bindet den Melanocortin-1-Rezeptor (MC1R) von Melanozyten und regt auf diese Weise die Synthese des Pigments Melanin in den Zellen an. Dieses wird an die Keratinozyten abgegeben (Costin und Hearing, 2007), wo es die DNA vor weiterer Schädigung schützt, indem es zur Streuung und Absorption von UV-Strahlung beiträgt (Kaidbey et al., 1979).

1.3.1 Epidemiologie

Ungefähr 4,5 % der Krebsneuerkrankungen gehen in Deutschland auf das maligne Melanom zurück. Bei Betrachtung der relativen Krebshäufigkeit nach Geschlecht lag das Melanom im Jahr 2018 auf Platz vier der Frauen und Platz fünf der Männer. 2018 betrug die standardisierte Inzidenz 18,9 pro 100.000 für Frauen und 20,2 pro 100.000 für Männer. (Zentrum für Krebsregisterdaten, 2021)

Die Inzidenz des malignen Melanoms unterlag in hellhäutigen Populationen Ende des 20. Jahrhunderts einer stetigen Zunahme (Garbe und Blum, 2001; Jemal et al., 2001). Nach Einführung des Hautkrebsscreenings im Jahr 2008 kam es in Deutschland, durch eine frühzeitige Diagnosestellung, vorübergehend zu einem sprunghaften Anstieg der altersstandardisierten Erkrankungsrate. Seit 2012 blieben die Erkrankungsraten bei Männern zunächst konstant und waren bei den Frauen leicht rückläufig. (Zentrum für Krebsregisterdaten, 2021)

Das maligne Melanom weist, verglichen mit den anderen malignen Tumoren der Haut, die ungünstigste Prognose auf (Gordon, 2013; Lazar, 2018). In der Regel kommt es frühzeitig zu einer lymphogenen oder hämatogenen Metastasierung, die fast jedes Organ des Körpers betreffen kann (Hauswirth, 2016). Wird der

Tumor vor der Streuung entdeckt, so ist die Prognose mit einer 10-Jahres-Überlebensrate zwischen 98 % im Stadium IA sowie 75 % im Stadium II vergleichsweise gut (Gershenwald et al., 2017). Mehr als 80 % der Tumoren werden in den Stadien I oder II, ohne Anzeichen einer Metastasierung, diagnostiziert (Zentrum für Krebsregisterdaten, 2021). Bei Vorliegen einer Fernmetastasierung ermittelten Balch et al. (2009) hingegen 1-Jahres-Überlebensraten zwischen 33 % und 62 %. Durch die Anwendung neuer Therapeutika, kann jedoch aktuell von einer deutlich besseren Prognose im Stadium IV ausgegangen werden (Gershenwald et al., 2017).

1.3.2 Pathogenese

1.3.2.1 Ultraviolettstrahlung (UVR)

In epidemiologischen Studien wurde die UVR als wichtiger Risikofaktor für die Entstehung des kutanen Melanoms identifiziert (Houghton und Viola, 1981). Es wird zwischen UVA mit einer Wellenlänge zwischen 320 und 400 nm, UVB mit 290 bis 320 nm und dem kurzwelligen UVC mit 200 bis 290 nm unterschieden. Bei Zunahme der Wellenlänge nimmt die Energie der Strahlung und damit deren schädliche Effekte auf das Erbgut ab. UVC wird allerdings fast vollständig vom Ozon der Erdatmosphäre absorbiert, weshalb vor allem der UVB-Strahlung ein hoher mutagener Effekt zugeschrieben wird. (Garibyan und Fisher, 2010)

UVB führt hauptsächlich zu zwei verschiedenen Klassen von DNA-Schäden: den Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren und den 6-4-Photoprodukten (Holinski-Feder, 2017). Dabei kommt es zur Ausbildung kovalenter Bindungen zwischen benachbarten Pyrimidinbasen. In der Regel werden diese Schäden durch Enzyme des Nukleotid-Exzisions-Reparatursystems korrigiert (Goodsell, 2001). Ist dies jedoch nicht der Fall, kann es zur Deamination von Cytosin- oder 5'-Methylcytosin-Basen kommen. Das hat wiederum einen Basenaustausch zu Uracil bzw. Thymin zur Folge. Ein hoher Anteil an C>T Transitionen ist somit charakteristisch für das kutane Melanom und wird auch als UV-Signatur bezeichnet (Brash et al., 1991). (Ikehata und Ono, 2011; Pfeifer et al., 2005)

Die genauen Mechanismen, wie UV-Strahlung zur Melanomentstehung beiträgt, sind allerdings bis heute nicht abschließend geklärt. Da viele der bekannten

Treibermutationen nicht durch C>T-Transitionen verursacht sind (Hodis et al., 2012), werden in der Literatur auch alternative Wirkungsweisen der UVR diskutiert. Beispielsweise könnte durch UVA hervorgerufener oxidativer Stress oder die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies eine Rolle spielen (Venza et al., 2015). Im Gegensatz zum kutanen Melanom entstehen nach aktuellem Stand der Forschung das akrale sowie das mukosale und uveale Melanom UV-unabhängig (Ossio et al., 2017). Dies ist bereits aufgrund der sonnengeschützten subungualen, palmoplantaren, mukosalen und uvealen Lokalisationen naheliegend.

1.3.2.2 Genetische Veranlagung

Ungefähr 5-10 % der Melanomerkrankungen sind auf eine hereditäre Ursache zurückzuführen. Es wurden genetische Merkmale identifiziert, die mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung eines Melanoms assoziiert sind. Dazu gehören unter anderem rote Haare, helle Haut und Sommersprossen (Bliss et al., 1995). Diese Eigenschaften sind mit Polymorphismen des *MC1R* Gens assoziiert (Valverde et al., 1995). Das Gen codiert für den Melanocortin-1-Rezeptor, dessen Stimulation durch den Liganden MSH zu einer Produktion des schwarzbraunen Pigments Eumelanin führt. Einige Polymorphismen des *MC1R* Gens haben jedoch die Bildung von Phäomelanin, einem gelbroten Pigment, zur Folge, das schlechter vor UV-Strahlung schützt als Eumelanin. Diese Veränderungen gehen daher mit einer erhöhten Anfälligkeit der DNA für UV-Schäden einher und weisen eine geringe Penetranz für die Entwicklung eines Melanoms auf. (Bender et al., 2016; Palmer et al., 2000)

Im Gegensatz dazu erhöhten Veränderungen einiger anderer Gene das Melanomrisiko sehr stark und mit einer hohen Penetranz (Bishop et al., 2002). Das Gen *CDKN2A* ist hierbei am bedeutsamsten. Bei *CDKN2A* handelt es sich um ein Tumorsuppressorgen, das in ungefähr 40 % aller Melanom-Familien von einer Keimbahnmutation betroffen ist (Goldstein et al., 2007; Hussussian et al., 1994; Kamb et al., 1994). Außerdem ist das Protoonkogen *CDK4* zu nennen, das im Vergleich zu *CDKN2A* wesentlich seltener von Keimbahnmutationen betroffen ist (Zuo et al., 1996). Für beide Gene wurden ebenfalls somatische Alterationen beschrieben (Akbari et al., 2015; Curtin et al., 2005).

1.3.2.3 Somatische Treibermutationen

Das maligne Melanom zeichnet sich im Vergleich zu anderen soliden Tumoren durch eine sehr hohe TMB aus (Chalmers et al., 2017). Wie bei den meisten Tumorentitäten handelt es sich allerdings nur bei einem kleinen Teil dieser Mutationen um Tumortreiber (Greenman et al., 2007; Stratton et al., 2009).

Heutzutage werden potenzielle Treibergene meist über WES-Daten großer Tumorkohorten ermittelt. Somatische Mutationen werden dabei auf verschiedene Signale positiver Selektion analysiert. Die größten Melanom-Studien dieser Art wurden von TCGA (Akbari et al., 2015), durch das Broad Institute (Hodis et al., 2012) und von der Yale Universität (Krauthammer et al., 2012) durchgeführt. Die Rolle nominierter Gene muss anschließend in funktionellen Studien untersucht und verifiziert werden.

An dieser Stelle soll lediglich auf die wichtigsten Melanom-Gene eingegangen werden. Abbildung 1 gibt einen vereinfachten Überblick über die Rolle einiger Genprodukte in ausgewählten und für diese Arbeit relevanten Signalwegen.

BRAF (Davies et al., 2002) und *NRAS* (Padua et al., 1984) stellen aktuell die bekanntesten Treibergene des malignen Melanoms dar. Bei beiden handelt es sich um Protoonkogene, die häufig von aktivierenden Hotspot-Mutationen betroffen sind. Ungefähr 50 % der Melanome tragen eine Mutation im V600-Codon des *BRAF* Gens, meist V600E (Akbari et al., 2015). Das Gen *NRAS* weist in ungefähr 25 % der Fälle aktivierende Mutationen in den Codons G12, G13 und Q61 auf, wobei Letzteres beim Melanom am häufigsten betroffen ist (Akbari et al., 2015). In der Regel schließen sich Hotspot-Mutationen dieser beiden Gene gegenseitig aus (Hodis et al., 2012). Hodis et al. (2012) beschrieben, dass Tumoren ohne *BRAF* und *NRAS* Hotspot-Mutationen besonders häufig von trunkierenden Varianten im Tumorsuppressorgen *NF1* betroffen sind.

BRAF und *NRAS* Hotspot-Mutationen sowie *NF1* LoF-Mutationen führen zu einer Überaktivität des MAPK-Signalwegs (MAPK: Mitogen-activated protein kinase), der in Abbildung 1 vereinfacht dargestellt ist (Davies et al., 2002; Vigil et al., 2010; Wan et al., 2004). Dieser Signalweg spielt bei der Melanomagenese eine zentrale Rolle. Insgesamt sind mehr als 90 % der Tumoren von mindestens einer Mutation in einem Gen des Signalwegs betroffen (Sanchez-Vega et al., 2018). Aufgrund dieser großen Bedeutung für die Melanomentstehung entwickelten Akbari et al.

(2015) ein molekulares Klassifikationssystem zur Einteilung der Melanome, anhand von Mutationen der drei genannten Gene (Kapitel 1.3.3.3).

Das Protoonkogen *KIT*, auch *c-KIT* genannt, ist ein weiteres Gen, das im malignen Melanom häufig von Mutationen oder Amplifikationen betroffen ist (Curtin et al., 2006). Das Gen kodiert für eine Rezeptor-Tyrosinkinase (Yarden et al., 1987). Durch Bindung des Stammzellfaktors an den Rezeptor kommt es zu einer Dimerisierung, was wiederum eine Phosphorylierung der intrazellulären Abschnitte von *KIT* zur Folge hat (Lev et al., 1992). Daraus resultiert eine Aktivierung zellulärer Signalwege, unter anderem des MAPK- und des PI3K-Signalwegs (Reddy et al., 2017). Bestimmte Mutationen, wie beispielsweise K642E, führen zu einer konstitutiven Phosphorylierung und damit ligandenunabhängigen Aktivierung der Rezeptor-Tyrosinkinase (Isozaki et al., 2000; Lux et al., 2000). Auch Amplifikationen des *KIT* Gens werden im malignen Melanom häufig beobachtet (Curtin et al., 2006). Alterationen des Gens kommen insgesamt besonders häufig in Tumoren vor, die keine *BRAF*, *RAS* oder *NF1* Mutationen aufweisen (Akbari et al., 2015). Außerdem sind vor allem akrale und mukosale Melanome sowie Tumoren auf chronisch-sonnengeschädigter Haut betroffen (Curtin et al., 2006).

Neben Mutationen, die den kodierenden Bereich eines Gens betreffen, können auch Varianten regulatorischer Bereiche zur Tumorentstehung beitragen. Das prominenteste Beispiel im Fall des malignen Melanoms sind Hotspot-Mutationen im Promoter des *TERT* Gens. Huang et al. (2013) beschrieben zwei Mutations-hotspots in den Positionen 1.295.228 (228) und 1.295.250 (250) auf Chromosom 5. Horn et al. (2013) entdeckten zusätzlich Tandem-Mutationen der Hotspots 1.295.228/9 (228/9) sowie 1.295.242/3 (242/3). Das *TERT* Gen kodiert für die katalytische Untereinheit der Telomerase. Hierbei handelt es sich um ein Enzym, das die Telomere an den Chromosomenenden aufrechterhält, was für das Teilungspotential der Krebszelle von großer Bedeutung ist. Durch die genannten Hotspot-Mutationen entstehen neue Bindungsmotive für ETS-Transkriptionsfaktoren (Horn et al., 2013; Huang et al., 2013). Huang et al. (2013) beobachteten einen zwei- bis vierfachen Anstieg der transkriptionellen Aktivität beim Vorliegen einer C228T oder C250T Variante im Tumor. In der Regel tragen Tumoren ausschließlich Mutationen in einem der Hotspots (Huang et al., 2013).

Einleitung - Malignes Melanom

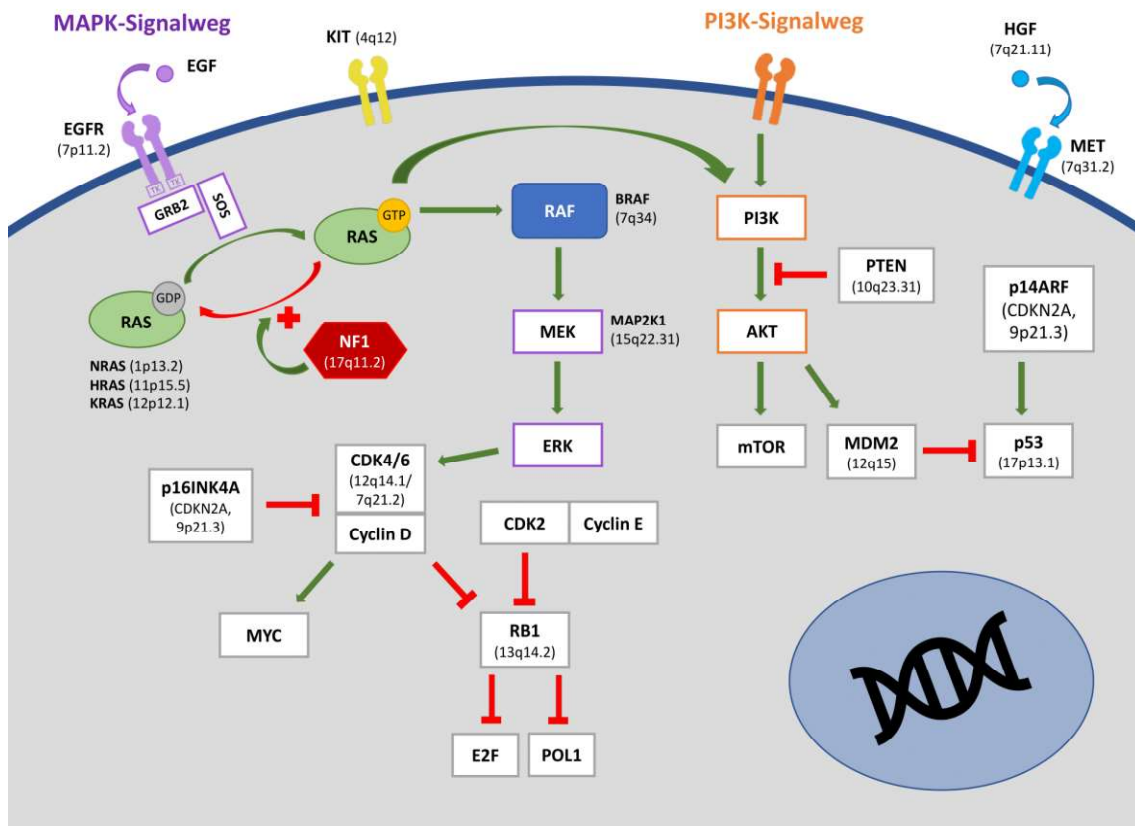


Abbildung 1: **Relevante Signalwege der Melanomagenese.**

Stark vereinfachte Darstellung einiger Signalwege, die bei der Entstehung des malignen Melanoms eine Rolle spielen. Für manche Proteine ist der Genlocus in Klammern angegeben. Orientiert an Sullivan et al. (2013).

1.3.3 Klassifikation

1.3.3.1 Staging

Wie für solide Tumoren üblich, wird das maligne Melanom nach dem TNM-System klassifiziert. Die aktuelle *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) Stadieneinteilung wird in Tabelle 1 dargestellt.

Für die T-Klassifikation werden in den Stadien I und II sowohl die Ausdehnung des Primärtumors als auch das Vorliegen einer Ulzeration berücksichtigt, da diese Merkmale die wichtigsten prognostischen Faktoren darstellen. Im Stadium I spielt außerdem die Mitoserate eine Rolle. Die Stadien I und II beinhalten Tumoren, für die keine Metastasierung nachgewiesen werden kann. Im Stadium III liegt bereits eine lokale Metastasierung, in Form von In-Transit-, (Mikro-)Satelliten- und/oder Lymphknotenmetastasen, vor. Ab dem Stadium IV handelt es sich um eine fernmetastasierte Erkrankung. Das Staging dient als Grundlage für die Prognoseabschätzung und Therapieentscheidung. (Gershenwald et al., 2017)

Tabelle 1: Staging des malignen Melanoms nach AJCC im Zusammenhang mit der TMN-Klassifikation (Gershenwald et al., 2017). Die Stadien I, III und IV sind vereinfacht dargestellt. Das Stadium II ist aufgrund der Relevanz für diese Arbeit hervorgehoben.

Stadium	T			N	M
	Bezeichnung	Dicke	Ulzeration		
I	T1	≤ 1 mm	Ja/Nein	N0	M0
	T2 a	> 1 – 2 mm	Nein		
IIA	T2 b	> 1 – 2 mm	Ja	N0	M0
	T3 a	> 2 – 4 mm	Nein		
IIB	T3 b	> 2 – 4 mm	Ja		
	T4 a	> 4 mm	Nein		
IIC	T4 b	> 4 mm	Ja		
III	alle			ab N1	M0
IV	alle			alle	M1

T = Tumordicke (Dicke und Ulzerationsverhalten der verschiedenen T-Stadien sind angegeben)

N = Nodalstatus

M = Fernmetastasen

mm = Millimeter

1.3.3.2 Histologische Klassifikation

Kutane Melanome werden in vier klassische Histologien eingeteilt (Clark et al., 1969). Das superfiziell spreitende Melanom (SSM) zeichnet sich durch ein langsames horizontales Wachstum aus. Klinisch stellt es sich in der Regel als flache Erhabenheit mit unregelmäßiger Begrenzung und variabler Pigmentierung dar. Das noduläre Melanom (NM) imponiert meist als knotiger, dunkel pigmentierter Tumor mit schnellem Wachstum in vertikaler Ebene. NM sind häufig exulzeriert und neigen zur Blutung. Das Lentigo-maligna-Melanom (LMM) betrifft vorwiegend ältere Individuen und entsteht auf sonnenexponierten Hautarealen. Oft geht es aus einem Lentigo-maligna, einem in-situ Melanom, hervor. Ähnlich wie das SSM zeigt das LMM ein langsames horizontales Wachstum. Das akrolentiginöse Melanom (ALM) tritt, wie der Name bereits nahelegt, an den Akren auf. Dort ist es meist palmoplantar oder subungual lokalisiert. In dunkelhäutigen Populationen macht diese Histologie im Vergleich zu den anderen Histologien einen großen Anteil der Melanome aus (Clark et al., 1986; Coleman et al., 1980). (Hauswirth, 2016; Hegyi und Zelger, 2012; Ossio et al., 2017)

Mit ungefähr 60 % stellt das SSM in der deutschen Bevölkerung die am häufigsten beobachtete Histologie dar. Das NM macht circa (ca.) 20 % der Melanome aus, gefolgt von LMM und ALM Tumoren, die in etwa 10 % bzw. 5 % der Fälle beobachtet werden (Garbe und Leiter, 2009).

1.3.3.3 Molekulare Subtypen

Anhand von Treibermutationen im MAPK-Signalweg wurden durch TCGA vier molekulare Subtypen des malignen Melanoms definiert: *BRAF*, *RAS*, *NF1* und Triple-Wildtyp (Triple-WT). Für die Einteilung werden die typischen Hotspot-Mutationen im Gen *BRAF* und den drei *RAS* Genen *NRAS*, *HRAS* und *KRAS* herangezogen (Kapitel 1.3.2.3). Falls keine der genannten Mutationen vorliegt, das *NF1* Gen jedoch von einer Mutation betroffen ist, wird der Tumor dem *NF1* Subtyp zugeordnet. Andernfalls wird er als Triple-WT klassifiziert. (Akbari et al., 2015)

1.3.4 Therapie

In diesem Abschnitt soll ein vereinfachter Überblick über die Therapieoptionen des malignen Melanoms gegeben werden. Hierfür wurden im Wesentlichen die aktuelle deutsche S3 Leitlinie (Leitlinienprogramm Onkologie, 2020) sowie die Konsensempfehlungen der *European Society For Medical Oncology* (Keilholz et al., 2020; Michielin et al., 2020) herangezogen.

Bei Verdacht auf ein malignes Melanom sollte in erster Linie eine Exzision mit kleinem Sicherheitsabstand durchgeführt werden. Nach der pathologischen Diagnosesicherung sollte eine radikale Nachresektion erfolgen. Hierfür werden, in Abhängigkeit der Tumordicke, Sicherheitsabstände von 1 cm oder 2 cm empfohlen (Sladden et al., 2009). Bei einer Tumordicke ab 1 mm sollte zusätzlich eine Entfernung des Wächterlymphknotens erfolgen, um vorhandene Mikrometastasen zu entdecken (Valsecchi et al., 2011). Bereits bei einer geringeren Tumordicke sollte eine Biopsie des Wächterlymphknotens individuell mit dem Patienten diskutiert werden (Michielin et al., 2020). Dies ist für das korrekte Staging von besonderer Relevanz. Die Indikation für eine komplette Lymphknotendisektion bei Vorliegen von Metastasen im Wächterlymphknoten ist vor dem Hintergrund neuerer Studienergebnisse (Faries et al., 2017; Leiter et al., 2019) kritisch zu stellen. Neue Daten weisen außerdem auf einen Überlebensvorteil durch den adjuvanten Einsatz des PD1-Inhibitors Pembrolizumab in den Stadien IIB und IIC hin (Luke et al., 2022). Aufgrund eines hohen Rezidivrisikos sollte ab dem Stadium IIC eine weitere Ausbreitungsdiagnostik mittels CT, PET-CT oder MRT des gesamten Körpers sowie einer MRT des Kopfes durchgeführt werden. (Leitlinienprogramm Onkologie, 2020)

Auch in den Stadien IIIB, IIIC und IIID sollte eine adjuvante Immuntherapie mit einem Anti-PD-1-Antikörper angeboten werden (Eggermont et al., 2021). Falls der Tumor eine *BRAF* V600 Mutation trägt, sollte dem Patienten alternativ eine adjuvante Kombinationstherapie mit Dabrafenib plus Trametinib angeboten werden (Long et al., 2017). Die Datenlage für das Stadium IIIA ist bezüglich einer routinemäßigen adjuvanten Therapie jedoch aktuell unzureichend (Michielin et al., 2020). Auf die Funktionsweise der Immuncheckpoint-Inhibitoren und Signaltransduktions-Inhibitoren wird in den Abschnitten 1.3.4.1 und 1.3.4.2 genauer

eingegangen. Bei Vorliegen klinisch detektierter Lymphknotenmetastasen im operablen Stadium III ist außerdem eine radikale Lymphadenektomie zu empfehlen (Michielin et al., 2020).

Im Falle einer Fernmetastasierung (Stadium IV) sollte zuerst die Operabilität der Metastasen evaluiert werden. Eine Operation sollte in Betracht gezogen werden, falls eine vollständige Resektion technisch machbar ist. Im Anschluss sollte eine adjuvante systemische Kombinationstherapie mit Nivolumab und Ipilimumab erfolgen (Michielin et al., 2020; Zimmer et al., 2020). Bei Vorliegen einer *BRAF* V600 Mutation ist die Datenlage hinsichtlich des überlegenen systemischen Therapieregimes bisher unzureichend (Michielin et al., 2020).

Falls die Resektion der Metastasen nicht in Frage kommt, sollte stattdessen eine Systemtherapie erfolgen. Bei Fehlen einer *BRAF* V600 Mutation im Tumor sowie Vorliegen aggressiver Tumoreigenschaften sollte eine Kombinationstherapie mit Nivolumab und Ipilimumab bevorzugt werden (Wolchok et al., 2022). Alternativ, vor allem bei Fehlen aggressiver Tumoreigenschaften, kann Nivolumab in Kombination mit Relatlimab, einem LAG-3-Inhibitor (Tawbi et al., 2022) oder eine Monotherapie mit einem Immuncheckpointinhibitor zur Anwendung kommen. Liegt im Tumor eine V600E oder V600K Mutation des *BRAF* Gens vor, so kann alternativ eine kombinierte *BRAF*- und *MEK*-Inhibitor-Therapie mit Dabrafenib plus Trametinib (Flaherty et al., 2012b; Long et al., 2015), Encorafenib plus Binimetinib (Dummer et al., 2018) oder Vemurafenib plus Cobimetinib (Ascierto et al., 2016; Larkin et al., 2014) erfolgen. Immuntherapien führen, im Gegensatz zu den zielgerichteten Therapien, im Allgemeinen häufiger zu einem dauerhaften, jedoch initial verzögerten Ansprechen (Keilholz et al., 2020). Neue Daten weisen, bei Vorliegen einer der genannten *BRAF* Mutationen, auf ein länger andauerndes Ansprechen auf die Immuncheckpointinhibition gegenüber der *BRAF/MEK*-Inhibition hin, vor allem bei Notwendigkeit eines Wechsels des Therapieregimes im Verlauf (Atkins et al., 2022). In Ausnahmefällen kann bei Vorliegen einer *KIT*-Inhibitor-sensitiven *KIT* Mutation die Off-Label-Anwendung eines *cKIT*-Inhibitors wie Imatinib in Erwägung gezogen werden oder es kann eine Monochemotherapie mit Dacarbazin erfolgen (Leitlinienprogramm Onkologie, 2020).

1.3.4.1 Signaltransduktions-Inhibitoren

Die Tumorthherapie mit Signaltransduktions-Inhibitoren gehört zu den zielgerichteten Krebstherapien. Hierfür werden Substanzen eingesetzt, die in gestörte Signalwege der Krebszelle eingreifen können. Der Vorteil der Signaltransduktions-Inhibitoren im Vergleich zu klassischen Chemotherapeutika besteht darin, dass sie theoretisch selektiv in Zellen wirken, die von spezifischen Veränderungen betroffen sind (Tsai et al., 2008). Das bedeutet jedoch auch, dass Patienten mit entsprechenden molekularen Veränderungen in der Regel vor Therapiebeginn identifiziert werden müssen. Die Sequenzierung des Tumorgenoms spielt hierfür im klinischen Alltag eine zentrale Rolle.

Für die Therapie des malignen Melanos kommen aktuell die BRAF-Inhibitoren Vemurafenib, Dabrafenib und Encorafenib zum Einsatz, welche die Kinase BRAF kompetitiv zu Adenosintriphosphat binden (Dummer et al., 2018; Holderfield et al., 2014). Das geschieht bevorzugt im aktivierten Zustand, weshalb diese Substanzen nur für die Varianten V600E und V600K des *BRAF* Gens zugelassen sind, die mit einer konstitutiven Aktivierung der kodierten Kinase einhergehen (Davies et al., 2002; Holderfield et al., 2014). Die Bindung führt zu einer Hemmung des MAPK-Signalwegs (Abbildung 1), was wiederum in einem reduzierten Tumorwachstum resultieren kann (Flaherty et al., 2012a). Vemurafenib führt in ca. 80 % der *BRAF*-V600E-mutierten Melanome zu einer partiellen oder vollständigen Tumorregression (Flaherty et al., 2010). In *RAS*-mutierten oder *BRAF*-WT Tumoren kann es hingegen zu einer paradoxen *RAS*-abhängigen Überaktivierung des MAPK-Signalwegs kommen (Hatzivassiliou et al., 2010).

Empfohlen wird eine Kombinationstherapie von BRAF-Inhibitoren und MEK-Inhibitoren, wie Trametinib, Cobimetinib oder Binimetinib (Dummer et al., 2018; Larkin et al., 2014; Long et al., 2015). Diese soll einer Resistenzentwicklung des Tumors vorbeugen (Corcoran et al., 2010; Diaz et al., 2012; Emery et al., 2009), die häufig und zum Teil bereits sehr früh unter der Therapie auftritt (Flaherty et al., 2010). Auf diese Weise kann ein langfristig verbessertes Überleben erreicht werden (Long et al., 2018). Als Gründe für die Entwicklung von Resistenzen werden unter anderem die Amplifikation des *BRAF* Gens (Corcoran et al., 2010), ein Erwerb bestimmter *MEK* Mutationen (Emery et al., 2009), erhöhte CRAF Level (Montagut et al., 2008) oder *NRAS* Mutationen (Nazarian et al., 2010) diskutiert.

Trotz der selektiven Wirkung und der im Allgemeinen guten Verträglichkeit dieser Wirkstoffe, kann es zu Nebenwirkungen kommen. Diese betreffen vor allem die Haut. Neben Photosensitivität, Hautausschlägen und der Entwicklung von Keratoakanthomen sowie Plattenepithelkarzinomen wurden auch Fatigue, Arthralgien und Diarrhoe als unerwünschte Arzneimittelwirkungen beschrieben (Anforth et al., 2013; Chapman et al., 2011).

1.3.4.2 Immuntherapie

Eine Reaktion des Immunsystems wird in der Regel durch körperfremde Antigene ausgelöst. Krebszellen, die sich unter anderem durch somatische Mutationen von gesunden Körperzellen unterscheiden, können daher potenziell vom Immunsystem erkannt und bekämpft werden (Schumacher und Schreiber, 2015). Maligne Tumoren verfügen jedoch über diverse Mechanismen, um der körpereigenen Immunantwort zu entgehen (Pardoll, 2012). Das Ziel der Immuntherapie ist die Blockade sogenannter Immuncheckpoints. Dazu wurden monoklonale Antikörper entwickelt, die gegen Programmed death 1 (PD-1), dessen Liganden PD-L1 und Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) gerichtet sind (Pardoll, 2012). Diese Checkpointblockade hat eine Entfesselung von T-Zellen zur Folge, die in der Lage sind, den Tumor zu bekämpfen (Topalian et al., 2016).

In Deutschland sind aktuell die PD-1-Antikörper Nivolumab und Pembrolizumab sowie der CTLA-4-Blocker Ipilimumab für die Therapie des malignen Melanoms zugelassen. PD-1-Blocker sollten aufgrund der klinischen Überlegenheit zur Monotherapie oder in Kombination mit Ipilimumab verwendet werden (Larkin et al., 2015; Robert et al., 2015). Typische Nebenwirkungen der Immuntherapie sind Autoimmunreaktionen, die prinzipiell jedes Gewebe betreffen können. Es wurden beispielsweise Vitiligo, Diarrhoe und Enterokolitis, Hepatitis, Pneumonitis, Hypophysitis, Thyreoiditis sowie Polyarthritits beobachtet (Michot et al., 2016).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Für diese Arbeit wurde Tumor- und Normalgewebe einer Kohorte aus 193 Melanompatienten im Stadium II mittels NGS sequenziert. Das Ziel war eine

umfassende genetische Charakterisierung dieser Tumoren, da in der Literatur bisher keine Stadium II Melanom-Kohorte in einer vergleichbaren Größe beschrieben wurde.

Es sollte evaluiert werden, welche klinischen, histopathologischen und vor allem genetischen Attribute Melanome im lokalisierten Stadium II aufweisen und inwieweit sich diese von früheren Beobachtungen in metastasierten Tumoren höherer Stadien unterscheiden. Diese Unterschiede könnten mitunter auf Veränderungen hinweisen, die mit einer Metastasierung im Zusammenhang stehen.

Ein Schwerpunkt der Arbeit lag dabei auf der Identifikation von Treibergenen. Die Kenntnis der Treibergene und deren Signalwege erlaubt ein besseres Verständnis der Mechanismen, die bei der Tumorentstehung und -progression eine Rolle spielen (Stratton et al., 2009). Außerdem können Treibermutationen auch als Therapietargets für zielgerichtete Therapien dienen. Hotspot-Mutationen des Gens *BRAF* stellen beispielsweise prädiktive Faktoren für das Ansprechen von BRAF-Inhibitoren dar (Flaherty et al., 2010; Holderfield et al., 2014). Da das Vorliegen dieser Mutationen, neben *RAS* Hotspot-Mutationen und Varianten des *NF1* Gens, von Akbani et al. (2015) zur Einteilung der Melanome in molekulare Subtypen herangezogen wurde, lag in der Arbeit besonderes Augenmerk auf den Eigenschaften und Unterschieden dieser Subtypen.

Es stellte sich außerdem die Frage, welche Faktoren im Stadium II das Überleben und die Metastasierungstendenz von Melanomen maßgeblich beeinflussen. Die Kenntnis hierüber könnte die Identifikation von Hochrisikopatienten bereits im frühen Tumorstadium ermöglichen. Aktuell werden Stadium II Melanome uniform mittels Tumorexzision therapiert (Leitlinienprogramm Onkologie, 2020). Neue Daten zeigten für die Stadien IIB und IIC außerdem einen Überlebensvorteil durch eine adjuvante systemische Therapie mit Pembrolizumab (Luke et al., 2022). Durch die Identifikation von Faktoren, die mit einem hohen Risiko für ein Rezidiv einhergehen, könnte die Tumorthherapie weiter optimiert werden. Daher ist die Frage nach den Risikofaktoren für ein vermindertes rezidivfreies Überleben (RFS) und Gesamtüberleben (OS) auch aus klinischer Sicht von großer Relevanz.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkohorte

Für die Studie geeignete Patienten wurden anhand von Daten aus dem *German Central Melanoma Registry* (CMMR) identifiziert. Die verwendeten Gewebeproben stammten aus der Histopathologie der Universitäts-Hautklinik in Tübingen. Alle Patienten hatten sich schriftlich damit einverstanden erklärt, dass deren Daten zu wissenschaftlichen Zwecken verwendet werden dürfen. Personenbezogene Daten wurden pseudonymisiert und Name sowie Geburtsdatum wurden nicht erfasst. Insgesamt lagen für die Auswertung klinische Informationen über das Alter zum Diagnosezeitpunkt, das Datum der Diagnose, das Geschlecht, OS und RFS der Patienten sowie zu Lokalisation, Histologie, Tumorstadium, Tumordicke, Ulzerations- und Regressionsstatus der Tumoren vor. Die Follow-up Zeit wurde als die Zeit zwischen der Erstdiagnose und dem letzten Follow-Up oder dem Tod definiert. Die Datenerhebung hierfür wurde im April 2019 abgeschlossen. Für die Berechnung des OS wurden alle dokumentierten Tode als Events angesehen, unabhängig von der Todesursache. Das RFS wurde als die Zeit zwischen der Erstdiagnose und jeglicher Form eines Rezidivs der Melanom-Erkrankung definiert.

Es erfolgte eine Beratung sowie die Zustimmung zur Durchführung der Studie durch die Ethik-Kommission der medizinischen Fakultät und des Universitätsklinikums Tübingen (UKT) (Projekt-Nummern: 062/2019BO2, 396/2019BO2). Die Studie wurde durch Novartis (Basel, Schweiz) finanziert.

Das CMMR wurde nach Patienten durchsucht, bei denen seit Beginn des Jahres 2000 ein malignes Melanom im Stadium II diagnostiziert worden war. Dieser Zeitraum wurde gewählt, da seit 2000 bei jedem Stadium II Patienten neben der Exzision des Tumors zusätzlich eine Biopsie des Wächterlymphknotens durchgeführt wurde. Der Status des Wächterlymphknotens ist für die Unterscheidung zwischen Stadium II und Stadium III Tumoren relevant (Gershenwald et al., 2017). Die CMMR Abfrage ergab 1163 Stadium II Melanompatienten, die die Diagnose zwischen 2000 und 2018 erhalten hatten. Die Therapie war leitlinien- und stadiengerecht mittels Tumorexzision und in einigen Fällen einer zusätzlichen

adjuvanten Interferon-Therapie erfolgt (Leitlinienprogramm Onkologie, 2020). Die Information, welche Patienten zusätzlich eine adjuvante Therapie erhalten hatten, lag für die Auswertung nicht vor. Von den im CMMR registrierten Patienten war nur Tumorgewebe verfügbar, falls die Tumorexzision am UKT stattgefunden hatte. Insgesamt wurden somit 290 Patienten mit vorhandenem Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten (FFPE) Tumorgewebe identifiziert.

2.2 Pathologie

Die Gewebelöcke wurden am Department für Pathologie und Neuropathologie des UKT von einem Dermatopathologen im HE-Schnitt begutachtet. Anschließend erfolgte eine Mikrodissektion zur Trennung von Tumor- und Normalgewebe. Auf diese Weise wurde die Gewinnung von Normal- und Tumor-DNA aus dem vorhandenen Gewebelöck ermöglicht. Die genomische DNA (gDNA) für das NGS wurde aus 8 µm dicken Paraffinschnitten isoliert. Dafür kamen das Maxwell® RSC DNA FFPE Kit und das Maxwell® RSC Instrument (Promega, Madison, WI, USA) zum Einsatz. Von 31 der 290 identifizierten Patienten konnte kein Tumor- oder Normalgewebe aus dem Gewebelöck gewonnen werden und in 39 Fällen war nicht ausreichend DNA für die Sequenzierung verfügbar (Abbildung 2). Daher wurden diese Proben nicht in die weitere Analyse aufgenommen.

2.3 Next Generation Sequencing

Die Sequenzierung der Proben mittels NGS wurde am Institut für Medizinische Genetik und angewandte Genomik des UKT durchgeführt. Für die Library Construction wurden 200 ng gDNA verwendet. Diese wurde mittels Covaris Ultrasonication (LE220 Focused-ultrasonicator, Covaris, Woburn, MA, USA) auf eine Größe von 150-200 Basenpaaren (bp) fragmentiert. Das Hybrid-Capture wurde mit dem SureSelect^{XT} Low Input Target Enrichment System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) durchgeführt. Zur Anreicherung der Zielregion für das Targeted Sequencing diente ein maßgeschneidertes Bait-Set. Damit wurden 693 Gene (Supplement 1) sowie sieben Promoter Regionen (Supplement 2) und ausgewählte Fusionsstellen angereichert. Die Library Construction erfolgte

gemäß den Angaben des Herstellers. Dies schlug für acht Proben fehl, weshalb die entsprechenden Patienten nicht in die weitere Auswertung eingeschlossen werden konnten (Abbildung 2). Das NGS wurde mit dem NovaSeq 6000 oder dem NextSeq 500 (Illumina, San Diego, CA, USA) im Paired-End Modus, gemäß den Angaben des Herstellers, durchgeführt. Die Funktionsweise des NGS wurde bereits im Kapitel 1.2 beschrieben. Zwei Proben mussten aufgrund von Problemen bei der Sequenzierung ausgeschlossen werden (Abbildung 2). Insgesamt wurde daher von 210 Patienten sowohl Tumor- als auch Normalgewebe erfolgreich sequenziert.

2.4 Bioinformatische Analyse

2.4.1 Prozessierung der Rohdaten

Die NGS-Rohdaten wurden mit der hausinternen megSAP Pipeline, Version 0.1-1143-gd053876 (IMGAG, <https://github.com/imgag/megSAP>) und dem ngs-bits Package (IMGAG, <https://github.com/imgag/ngs-bits>) verarbeitet. Für das Adapter Trimming wurde das Tool SeqPurge (Sturm et al., 2016) verwendet. Das Alignment auf das humane Referenzgenom (GRCh37) wurde mit BWA-MEM, Version 0.7.17-r1188 (Li und Durbin, 2009) durchgeführt. Duplikate wurden mit dem Algorithmus Samblaster, Version 0.1.24 (Faust und Hall, 2014) annotiert und entfernt. Für das Trimming der überlappenden Reads kam BamClipOverlap (IMGAG, <https://github.com/imgag/ngs-bits/blob/master/doc/tools/BamClipOverlap.md>) zum Einsatz. Anschließend wurde das lokale Realignment der Reads auf die Target Region mit Hilfe von ABRA2, Version 2.19 (Mose et al., 2014) realisiert. Für Variant Calling und Variant Annotation dienten Strelka2 (Kim et al., 2018) und VEP, Version v95 (McLaren et al., 2016).

2.4.2 Qualitätskontrolle

Für die Qualitätskontrolle (QC) der Sequenzierung wurde QC Tools als Teil des ngs-bits Package (IMGAG, <https://github.com/imgag/ngs-bits>) verwendet. Hierbei diente ReadQC als Teil von SeqPurge (Sturm et al., 2016) der Kontrolle der Raw Reads (FASTQ-File), MappingQC der Analyse der Mapped Reads (BAM-File) und VariantQC der Überprüfung von Variantenlisten (VCF-File). Außerdem kam aufgrund der Sequenzierung von Tumor- und Normalproben zusätzlich der Algorithmus SomaticQC (Schroeder et al., 2017) zur Anwendung.

Um eine hohe Qualität der Varianten sicherzustellen, wurden Filterkriterien festgelegt. Es wurden ausschließlich Varianten in die Analyse aufgenommen, die eine Sequenziertiefe von mindestens 20 x sowohl im Tumor- als auch im Normalgewebe aufwiesen. Zusätzlich mussten diese mit einer Allelfrequenz von mindestens 5 % und mindestens drei Reads im Tumor vorhanden sein. Aufgrund einer zum Teil schlechten Abdeckung der entsprechenden Region, wurde die Analyse von Hotspot-Mutationen des *TERT* Promoters unabhängig von den erläuterten Filterkriterien manuell durchgeführt. Die Vorgehensweise ist im Abschnitt 2.4.7 dargestellt.

2.4.3 Ausschlusskriterien

Um eine möglichst hohe Qualität der Daten zu gewährleisten, wurden anhand der QC Parameter einige Ausschlusskriterien formuliert. Probenpaare, von denen mindestens eine Probe eine mediane Sequenziertiefe von weniger als 20x aufwies, wurden ausgeschlossen (n = 6). Gleiches galt für Probenpaare mit einer 20x Coverage unter 80 % (n = 9). Außerdem mussten zwei Proben ausgeschlossen werden, bei denen tumorspezifische DNA im Normalgewebe detektiert wurde. Damit blieben schlussendlich 193 Patienten für die endgültige Auswertung (Abbildung 2).

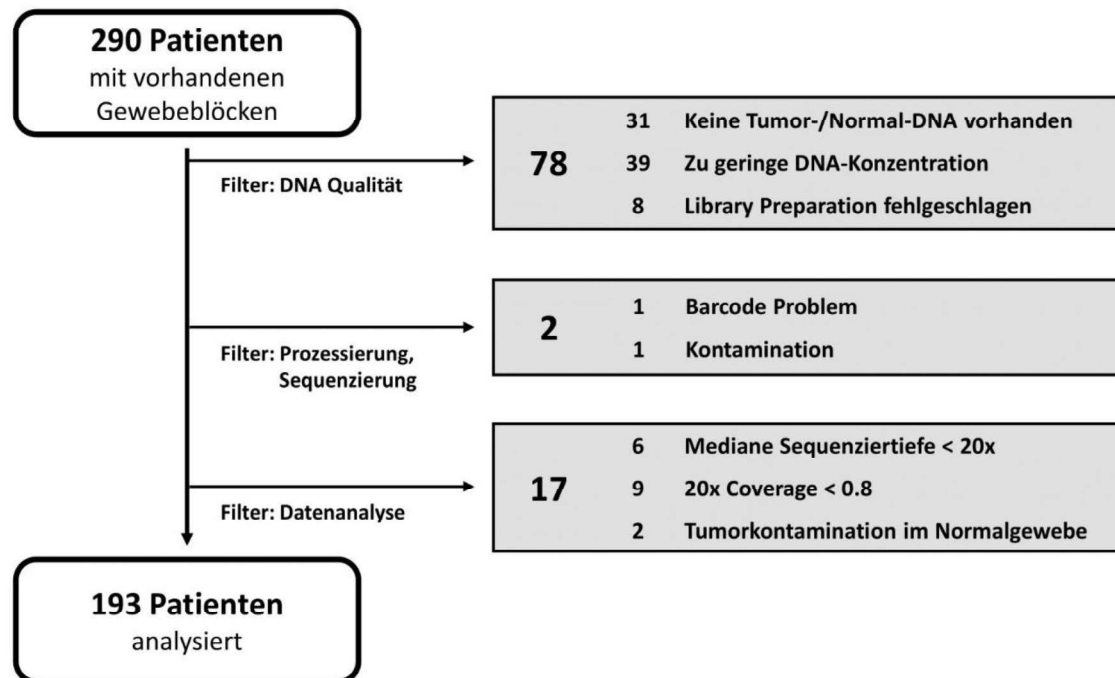


Abbildung 2: Filterkriterien der initialen 290 Stadium II Patienten mit verfügbaren Gewebeblöcken.

Die Abfrage des CMMR ergab 290 Stadium II Melanompatienten, deren Tumor im Zeitraum zwischen 2000 und 2018 diagnostiziert wurde und für die am UKT Gewebeblöcke verfügbar waren. Die Abbildung zeigt die angewendeten Ausschlusskriterien. Für 78 Patienten war eine Sequenzierung mittels NGS aufgrund einer geringen DNA-Qualität nicht möglich. Die Sequenzierung von Tumor- und Normalgewebe war für 210 der übrigen 212 Probenpaare erfolgreich. Davon mussten jedoch wiederum 17 aufgrund der genannten Filterkriterien bei der Datenanalyse ausgeschlossen werden. Schlussendlich wurden 193 Patienten der Auswertung zugeführt.

2.4.4 Berechnung der TMB

Für die Berechnung der TMB wurden exonische Varianten berücksichtigt, für die, die im Abschnitt 2.4.2 genannte Qualitätskriterien zutrafen. Klassischerweise werden für die TMB-Berechnung ausschließlich nicht-synonyme somatische SNVs verwendet (Rizvi et al., 2015). Aufgrund der Sequenzierung eines Genpanels wurden wie von Chalmers et al. (2017) auch kleine Insertionen und Deletionen (Indels) von einer Größe bis 25-30 bp sowie synonyme Varianten in die Berechnung einbezogen. Obwohl Letztere keine Neoantigene bilden, kann davon ausgegangen werden, dass der zugrundeliegende Mutationsprozess auch an

anderen Stellen des Genoms zu nicht-synonymen Mutationen führte (Chalmers et al., 2017). Daher wurden sie bei der Berechnung ebenfalls berücksichtigt. Mutationen in den Genen HLA-A und HLA-B wurden von der Berechnung ausgenommen und die Panel-Größe wurde dafür korrigiert. Für die Panelsequenzierung werden in der Regel vor allem bekannte und potenzielle Treibergene gewählt. Um eine Überschätzung der TMB zu vermeiden, wurde die Berechnung auch dafür adjustiert, indem somatische Mutationen in einigen Tumorsuppressorgenen zuerst von der Gesamtzahl der Mutationen abgezogen und später wieder hinzugerechnet wurden. Eine Liste der berücksichtigten Gene ist im Anhang zu finden (Supplement 3). Die für die Berechnung verwendete Größe des exonischen Targetbereichs, abzüglich der genannten Tumorsuppressorgene, lag bei 2,58 Mb. Die Mutationslast wurde anschließend auf die Größe des Exoms (45.05 Mb) hochgerechnet. Damit ergibt sich die folgende Formel:

$$TMB = \frac{\left(\frac{\text{Somatische Var.} - \text{Var. in TSGs}}{\text{Größe Target}} \times \text{Größe Exom} \right) + \text{Var. in TSGs}}{\text{Größe Exom}}$$

Var. = Varianten

TSGs = Tumorsuppressorgene

Zur Validierung der TMB-Berechnung wurden online veröffentlichte TCGA WES-Daten von Melanompatienten im Stadium II verwendet (Akbari et al., 2015; GDC Data Portal). Für diese Tumoren wurde die Tumormutationslast ebenfalls nach der beschriebenen Methode berechnet. Für die Berechnung wurden ausschließlich Mutationen berücksichtigt, die Gene der Target Region des in dieser Studie verwendeten Panels betrafen. Außerdem wurde zum Vergleich die Gesamtzahl der nicht-synonymen, kodierenden Mutationen für die WES-Daten jeder TCGA Probe ermittelt.

2.4.5 Molekulare Subtypen

Die Patienten wurden, wie von TCGA vorgeschlagen (Akbari et al., 2015), in vier genetische Subtypen unterteilt. Die Zuteilung erfolgte manuell. Patienten mit einer *BRAF* Mutation in den Positionen V600 oder K601 wurden dem *BRAF* Subtyp zugeordnet. Tumoren mit *NRAS*, *KRAS* und *HRAS* Mutationen in den Codons Q61, G12 oder G13 wurden als *RAS*-positiv klassifiziert. Falls keine der genannten Varianten vorlag, wurde überprüft, ob das *NF1* Gen von einer Mutation betroffen war. Traf dies zu, so wurde der Tumor dem *NF1* Subtyp zugeordnet. Falls keine der genannten Mutationen detektiert wurde, erfolgte die Zuteilung des Tumors zum Subtyp Triple-WT (Akbari et al., 2015).

Alle *NF1* Mutationen wurden zusätzlich dahingehend analysiert, ob sie mit einem Funktionsverlust des Proteins (LoF) einhergehen. Dafür kamen die Tools ClinVar (Landrum et al., 2013; Landrum et al., 2018) für Frameshift- und Nonsense-Mutationen, COSMIC (Tate et al., 2018) für Missense-Mutationen sowie Alamut (Interactive Biosoftware, Rouen, Frankreich) für Splice-Site-Mutationen zum Einsatz.

2.4.6 Identifizierung potenzieller Treibergene

Treibergene anhand von Signalen positiver Selektion zu detektieren, ist eine weit verbreitete Herangehensweise (Akbari et al., 2015; Hodis et al., 2012). Diesem Ansatz liegt die Annahme zugrunde, dass Treibermutationen, im Gegensatz zu Passenger-Mutationen, der Zelle einen Wachstumsvorteil bringen und daher nicht zufällig über das Genom verteilt sind (Porta-Pardo et al., 2017). Um NGS-Daten auf Signale der positiven Selektion zu untersuchen, wurde eine Vielzahl bioinformatischer Algorithmen entwickelt, von denen drei in dieser Studie verwendet wurden. Die Entscheidung, Algorithmen zu kombinieren, resultiert daraus, dass jedes der drei Tools in der Lage ist, unterschiedliche Signale positiver Selektion zu erkennen. Wie von Tamborero et al. (2013) empfohlen, kamen MutSigCV, OncodriveCLUST und OncodriveFM für diese Analyse zum Einsatz. Die Funktionsweise der genannten Algorithmen soll an dieser Stelle kurz erläutert werden. In allen Fällen wurde ein Mutation Annotation Format (MAF) File

verwendet, das sämtliche Varianten aller Patienten enthält, welche die im Abschnitt 2.4.2 genannten Filterkriterien erfüllten.

MutSigCV zielt darauf ab, Treibergene aufgrund einer relativen Häufung von Mutationen zu identifizieren. Da sich die Mutationsraten verschiedener Tumorarten sowie einzelner Patienten und verschiedener Abschnitte des Genoms stark unterscheiden, sind falsch positive Ergebnisse bei einer solchen Herangehensweise grundsätzlich sehr wahrscheinlich. Um dies zu verhindern, wird die Mutationslast mit einem individuellen Hintergrundmodell verglichen. Dafür werden einerseits Mutationsrate und -spektrum des einzelnen Patienten ermittelt. Andererseits wird anhand des Replikationszeitpunktes und der Genexpression ein für das Gen spezifisches Hintergrundmodell erstellt. Damit wird dem Überschätzen der Signifikanz mutierter Gene entgegengewirkt. (Lawrence et al., 2013)

OncodriveCLUST nutzt aus, dass sich Treibermutationen oftmals in spezifischen Positionen, sogenannten Clustern oder Hotspots, eines Gens häufen. Das trifft vor allem auf Gain-of-Function-Mutationen zu, die in der Regel Onkogene betreffen (Tamborero et al., 2013). Im Fall des malignen Melanoms sind die relevantesten Beispiele der *BRAF* V600/K601 Hotspot sowie die *NRAS* Q61 und G12/G13 Hotspots (Akbari et al., 2015). Für jedes Cluster wird ein Score berechnet, der Werte zwischen 0 und 1 annehmen kann. Ein Wert von 1 bedeutet, dass alle Mutationen eines Gens in nur einer einzigen Position lokalisiert sind. Anschließend werden die Werte zu einem sogenannten Gene-Cluster Score für das jeweilige Gen addiert. Um die Mutationsheterogenität des Genoms zu neutralisieren und damit falsch positive Ergebnisse zu vermeiden, wird mithilfe von synonymen Mutationen ein Hintergrundmodell erstellt, da diese theoretisch keinem Selektionsdruck unterliegen. (Tamborero et al., 2013)

Im Gegensatz zu den anderen beiden Algorithmen basiert OncodriveFM nicht auf der Häufigkeit bestimmter Mutationen in der Kohorte. Stattdessen liegt die Annahme zugrunde, dass Treibergene besonders häufig von Varianten mit hoher funktioneller Auswirkung betroffen sind. OncodriveFM greift auf drei andere Anwendungen zurück: PolyPhen2 (Adzhubei et al., 2010), SIFT (Kumar et al., 2009; Ng und Henikoff, 2003) und MutationAssessor (Reva et al., 2007; Reva et al., 2011). Mithilfe dieser drei Algorithmen wird jeder Mutation jeweils ein Functional-

Impact (FI) Score zugewiesen, anhand dessen wiederum ein Mittelwert für das jeweilige Gen berechnet wird. Dieser berechnete Score wird anschließend mit einer Hintergrundverteilung verglichen. Weil OncodriveFM die positive Selektion nicht über die Anzahl der Mutationen in einem Gen misst, können auch Treiber-gene identifiziert werden, die nur in wenigen Tumoren der Kohorte von Mutationen betroffen sind. (Gonzalez-Perez und Lopez-Bigas, 2012)

Da jeweils alle sequenzierten Gene betrachtet werden, ist die Korrektur für multiples Testen bereits in die einzelnen Algorithmen integriert (Gonzalez-Perez und Lopez-Bigas, 2012; Lawrence et al., 2013; Tamborero et al., 2013). Es wurden Signifikanzniveaus von 0,05 für OncodriveFM und OncodriveCLUST sowie, analog zum Vorgehen von Akbani et al. (2015), ein Signifikanzniveau von 0,1 für MutSigCV festgelegt (Akbani et al., 2015; Lawrence et al., 2013). Alle drei Algorithmen wurden mittels lokaler Versionen auf den Servern der Uniklinik Tübingen ausgeführt. Analysen erfolgten sowohl für die gesamte Kohorte als auch einzeln für jeden der vier molekularen Subtypen. Damit wurde sichergestellt, dass auch Treibergene, die nur in den einzelnen Subtypen eine Rolle spielen, identifiziert werden konnten. In jeder dieser insgesamt fünf Kohorten wurden Gene als signifikant angesehen, falls sie in mindestens zwei der drei Algorithmen signifikante q-Werte aufwiesen.

2.4.7 *TERT* Promoter Mutationen

Da die Anreicherung des *TERT* Promoters nicht immer gelingt, wurden die in der Literatur beschriebenen Hotspot-Positionen (Horn et al., 2013; Huang et al., 2013) manuell auf Sequenziertiefe und vorliegende Basen in den Tumor- und Normalproben begutachtet. Alle Proben, bei denen sowohl im Tumor als auch im Normalgewebe die fünf Positionen mit einer Tiefe von mindestens 20x abgedeckt waren, wurden in die weitere Analyse aufgenommen. Proben, bei denen mindestens eine Position in Tumor- oder Normalgewebe eine Tiefe von unter 10x aufwies, wurden ausgeschlossen. Alle übrigen Proben wurden manuell zugeordnet. Lag eine glaubhafte Variante mit einer Allelfrequenz von mindestens 5 % und mindestens drei Reads im Tumorgewebe vor, so wurde die Probe eingeschlossen. Andernfalls wurde sie ausgeschlossen, da aufgrund der geringen Tiefe eine

verlässliche Aussage über das Vorliegen von Mutationen nicht sicher möglich war. Diese Vorgehensweise führt allerdings zu einer Überschätzung der Mutationsfrequenz. Das wurde in Kauf genommen, um die Kohortengröße möglichst hoch zu halten und damit eine repräsentativere Abbildung der Verteilung von Mutationen auf die einzelnen Hotspots zu erreichen.

2.4.8 Somatische Kopienzahlveränderungen

Für die Detektion somatischer Kopienzahlveränderungen (SCNAs) in den einzelnen Proben wurde das Tool ClinCNV, Version 1.16 (Demidov und Ossowski, 2019) verwendet. ClinCNV analysiert den Copy-number (CN) Status einer Region mit Hilfe von Informationen über die Sequenziertiefe und die B-allele frequency (BAF). Die Berechnung der BAF erfolgt mit Hilfe heterozygoter Keimbahnvarianten. Der Anteil der Reads dieser verschiedenen Varianten im Tumorgewebe an der Sequenziertiefe der jeweiligen Position wird hierfür herangezogen. Ist eine heterozygote Basenposition im Tumor nicht von SCNAs betroffen, so wäre eine BAF von 0,5 bzw. 50 % zu erwarten. Bei der einfachen Amplifikation eines Allels läge die BAF theoretisch bei 67 % oder 33 %, je nachdem welches Allel betroffen ist. ClinCNV kann über die Analyse von off-target Reads auch beim TPS eine Aussage über das gesamte Genom treffen. (Demidov und Ossowski, 2019)

ClinCNV berechnet False-discovery rates (FDRs) jeweils für die detektierten CNVs und die analysierten Proben (Demidov und Ossowski, 2019). Neun Proben wiesen bei der Analyse eine FDR über dem festgelegten Grenzwert von 5 % auf. Für sechs dieser Proben war jedoch eine manuelle Analyse möglich. Hierfür wurden diploide Regionen mit Hilfe des Integrative Genomics Viewer (IGV) (Robinson et al., 2011; Robinson et al., 2017) identifiziert und deren Koordinaten für die Analyse der CNVs verwendet. Die übrigen drei Proben mussten für alle weiteren SCNA Analysen ausgeschlossen werden.

Die CN-Werte wurden für Reinheit und Heterogenität der Probe korrigiert, um Integer CN-Werte zu erhalten. Die Amplifikation eines Gens wurde angenommen, falls es im Tumor eine Integer CN ≥ 4 aufwies. Bei einer Integer CN von 1

wurde das Gen als heterozygot deletiert angesehen. Eine homozygote Deletion wurde wiederum bei einer integer CN von 0 angenommen.

2.4.9 GISTIC Analyse

Die CNV-Daten der Melanomkohorte wurden mit GISTIC, Version 2.0.23 (GISTIC: Genomic Identification of Significant Targets in Cancer) auf Signale positiver Selektion analysiert, um SCNAs mit einer potenziellen Treiberrolle zu nominieren (Beroukhim et al., 2007; Mermel et al., 2011). Der Algorithmus detektiert Regionen, die häufiger deletiert oder amplifiziert sind, als durch Zufall zu erwarten wäre. Dabei wird auch die Amplitude der Alterationen berücksichtigt. Für homozygote Deletionen und hochgradige Amplifikationen wird beispielsweise ein größerer Effekt angenommen. Bei der Analyse spielen zwei Schritte eine wesentliche Rolle. Zuerst wird ein G-Score für die Aberrationen berechnet, der die Häufigkeit und die Amplitude der Veränderung berücksichtigt. Im Anschluss berechnet der Algorithmus p-Werte für die detektierten Aberrationen, die mittels der FDR-Methode für multiples Testen korrigiert werden. Für signifikante Veränderungen wird nachfolgend eine sogenannte Peak-Region definiert. Diese Peak-Region enthält meist mehrere Gene, wodurch ein Rückschluss auf die Treiberrolle eines einzelnen Gens in aller Regel nicht möglich ist. (Beroukhim et al., 2007; Mermel et al., 2011)

Die Analyse wurde erneut sowohl für die gesamte Kohorte als auch separat für die einzelnen Subtypen durchgeführt. Außerdem wurden, anders als für die Analyse einzelner Gene (Kapitel 2.4.8), keine Cutoffs für Amplifikationen und Deletionen verwendet. Das Signifikanzniveau wurde, wie im Algorithmus voreingestellt, auf 0,25 festgelegt (Hodis et al., 2012; Mermel et al., 2011). GISTIC benennt die detektierten Regionen nach ihrem Peak. Daher sind die genomischen Regionen häufig wesentlich größer, als durch ihre Bezeichnung suggeriert. Der Einfachheit halber wird in der vorliegenden Arbeit jeweils die von GISTIC ausgegebene Bezeichnung verwendet. Relevant ist jedoch, welche Gene laut dem Algorithmus auf dem Wide-Peak der Region lokalisiert sind und wie dessen eigentliche Begrenzungen sind.

2.4.10 Aneuploidie-Score

Die Aneuploidie wird klassischerweise als der Verlust oder Zugewinn ganzer Chromosomen oder Chromosomenarme definiert (Santaguida und Amon, 2015; Taylor et al., 2018). Für die Berechnung des Aneuploidie-Scores wurden daher lediglich Deletionen und Amplifikationen herangezogen, die insgesamt mindestens 80 % eines Chromosomenarmes betrafen. Es wurden, anders als für die Analyse einzelner Gene (Kapitel 2.4.8), keine speziellen Cutoffs für das Vorliegen von SCNAs verwendet. Die kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen 13, 14, 15, 21 und 22 wurden aufgrund der geringen Größe wie von Taylor et al. (2018) nicht berücksichtigt. Die Gonosomen wurden ebenfalls nicht in die Berechnung aufgenommen. Dem Chromosomenarm wurde im Fall einer Amplifikation eine 1, bei einer Deletion eine -1 zugeordnet. Der Aneuploidie-Score ergab sich aus der Summe veränderter Chromosomenarme. Dieser konnte somit Werte zwischen 0 und 39 annehmen.

2.4.11 Mutational Signatures

Mit Hilfe bioinformatischer Algorithmen ist es möglich, anhand des Musters somatischer Mutationen im Tumor, auf den zugrundeliegenden Mutationsprozess zu schließen (Alexandrov et al., 2013b; Nik-Zainal et al., 2012). Auf diese Weise kann die Rolle verschiedener Karzinogene oder DNA-Reparaturprozesse bei der Tumorentstehung ermittelt werden (Nik-Zainal et al., 2012). Der Algorithmus analysiert hierfür die Häufigkeit einzelner Basenaustausche einer Probe und deren Kontext im Trinukleotid (Nik-Zainal et al., 2012).

Die Analyse wurde mit dem R Package *deconstructSigs* (Rosenthal, 2016) für jede einzelne Probe durchgeführt. Es wurden ausschließlich Signaturen ausgegeben, die mindestens 5 % der Mutationen in einer Probe ausmachten.

Für das Melanom ist die Signatur 7 von besonderer Bedeutung, da diese mit einer Schädigung der DNA durch UV-Strahlung in Verbindung gebracht wird (Alexandrov et al., 2013a). Typisch für UV-Mutationen sind C>T und CC>TT Transitionen, die Dipyrimidine betreffen (Ikehata und Ono, 2011; Pfeifer et al., 2005). Daher wurden alle Melanome der Kohorte danach eingeteilt, ob die UV-Signatur 7 in der jeweiligen Probe dominant war. Eine Probe wurde als Signatur

7 positiv gewertet, falls die Signatur 7, verglichen mit den anderen Signaturen, den größten Anteil zu den im Tumorgewebe beobachteten Mutationen beitrug. Alle anderen Tumoren wurden als Signatur 7 negativ bewertet. In zwei Tumoren wurden keine somatischen Mutationen detektiert. Diese wurden ebenfalls als Signatur 7 negativ angesehen, da eine UV-Mutagenese in der Regel mit einer erhöhten Mutationslast einhergeht.

2.5 Statistische Auswertung

Alle statistischen Tests wurden mit der statistischen Programmiersprache R, Version: 4.1.1 (R Core Team, 2019) und RStudio (RStudio Team, 2019) durchgeführt. Folgende R Packages wurden für die Auswertung zur Hilfe genommen: *ggplot2* (Wickham et al., 2016), *survival* (Therneau und Grambsch, 2000; Therneau, 2019), *survminer* (Kassambara et al., 2019), *deconstructSigs* (Rosenthal, 2016), *ComplexHeatmap* (Gu et al., 2016), *dplyr* (Wickham et al., 2019), *ggrepel* (Slowikowski, 2019), *reshape2* (Wickham, 2007), *tidyverse* (Wickham, 2017), *caret* (Kuhn, 2019), *leaps* (Lumley, 2017), *purrr* (Henry und Wickham, 2019a), *tibble* (Müller und Wickham, 2019), *readr* (Wickham et al., 2018), *tidyr* (Wickham und Henry, 2019), *magrittr* (Bache und Wickham, 2014), *data.table* (Dowle und Srinivasan, 2019), *openxlsx* (Schauberger und Walker, 2020), *rlang* (Henry und Wickham, 2019b), *circlize* (Gu, 2014), *scales* (Wickham, 2018), *colorspace* (Zeileis et al., 2019), *GetoptLong* (Gu, 2020), *RColorBrewer* (Neuwirth, 2014), *BSgenome.Hsapiens.UCSC.hg19* (The Bioconductor Dev Team, 2014), *BiocManager* (Morgan, 2019),

Falls nicht anders angegeben, wurden p-Werte unter dem Signifikanzniveau von 0,05 als statistisch signifikant betrachtet. Für multiples Testen wurde mit dem Verfahren nach Benjamini-Hochberg (BH) korrigiert. In den verwendeten Algorithmen zur Analyse der Treibergene und SCNAs war die Korrektur für multiples Testen bereits integriert und wurde daher nicht erneut vorgenommen.

Kontingenztafeln wurden mit dem Exakten Test nach Fisher oder dem Chi-Quadrat-Test ausgewertet. Für 2x2 Tafeln kam der Exakte Test nach Fisher zum Einsatz. Für größere Tafeln wurde in der Regel der Chi-Quadrat-Test verwendet,

falls alle Felder mindestens fünf Beobachtungen aufwiesen. Andernfalls wurde ebenfalls der Exakte Test nach Fisher genutzt.

Der Shapiro-Wilk-Test wurde verwendet, um auf das Vorliegen einer Normalverteilung zu prüfen. Die TMB und das Patientenalter wurden als nicht normalverteilt angesehen, weshalb nicht-parametrisches Testverfahren zum Einsatz kamen. Zum Vergleich zweier Gruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test herangezogen, bei mehr als zwei Gruppen der Kruskal-Wallis-Test. Die Korrelation der TMB-Werte (Kapitel 3.5) wurde mit Hilfe des Spearman'schen Rangkorrelationskoeffizienten (Spearman'sches Rho) analysiert.

Die Überlebensanalysen wurden anhand des Cox Proportional-Hazards Modells sowie des Kaplan-Meier Schätzers durchgeführt. Für univariate und multivariate Cox-Regressionen kam das R Package *survival* (Therneau und Grambsch, 2000; Therneau, 2019) zum Einsatz. Mit Hilfe der Funktion *cox.zph()* des Packages wurde außerdem getestet, ob die Proportional Hazard Assumption der einzelnen Modelle erfüllt war.

Abbildung 1 und Abbildung 2 wurden in Microsoft PowerPoint (Version 2003) erstellt, Abbildung 3 mittels Microsoft Excel (Version 2003). Für die Lollipop-Plots in Abbildung 4, Abbildung 10 und Supplement 5 wurde die Anwendung Mutation-Mapper von cBioportal verwendet (Cerami et al., 2012; Gao et al., 2013).

Für die übrigen Abbildungen kam das R Package *ggplot2* (Wickham et al., 2016) zum Einsatz. Zur Erstellung der Heatmap in Abbildung 9 und des Oncoplots in Abbildung 11 wurde zusätzlich das R Package *complexHeatmap* (Gu et al., 2016) verwendet. Für die Kaplan-Meier Überlebenskurven in Abbildung 15 diente, neben *ggplot2*, das R Package *survminer* (Kassambara et al., 2019). Falls im Nachhinein Beschriftungen hinzugefügt wurden, kam das Programm Microsoft Paint (Version 1.0) zum Einsatz.

In dieser Arbeit wird gemäß der deutschen Konvention das Komma (,) als Dezimaltrennzeichen verwendet. Die Abbildungen enthalten jedoch den Punkt (.) als Dezimaltrennzeichen, gemäß der englischsprachigen Konvention.

3 Ergebnisse

3.1 Qualitätsparameter der Sequenzierung

Bei der Sequenzierung wurde für die in die Auswertung eingeschlossenen Proben eine durchschnittliche Tiefe der Target Region von 604 x im Tumorgewebe und 518 x im Normalgewebe erreicht. Die 100 x Coverage der Target Region lag bei einem Mittelwert von 86,7 % im Tumorgewebe und 82,9 % im Normalgewebe.

3.2 Patientencharakteristika

Einen Überblick über die klinischen Daten der gesamten Kohorte liefert die erste Spalte der Tabelle 2. Auf Zusammenhänge der klinischen Charakteristika mit der Histologie und den molekularen Subtypen der untersuchten Tumoren wird in späteren Abschnitten gesondert eingegangen.

Die eingeschlossenen Patienten waren zum Diagnosezeitpunkt zwischen 24 und 92 Jahre alt, wobei der Median bei 72 Jahren lag. Mit einem Anteil von 61,1 % (n = 118) war der Großteil der Kohorte männlich. Die meisten Patienten wurden im Tumorstadium IIA diagnostiziert (42,0 %, n = 81). Im Stadium IIB erhielten 33,7 % (n = 65) der Patienten die Diagnose, im Stadium IIC 24,4 % (n = 47). Insgesamt wiesen 63,2 % (n = 122) der Melanome eine Ulzeration auf. Außerdem wurde bei 14,0 % (n = 27) eine Tumorregression beobachtet. 28,5 % (n = 55) der Tumoren waren am Kopf oder Hals lokalisiert. In 26,9 % (n = 52) der Fälle war der Rumpf betroffen. Obere und untere Extremität waren in 10,9 % (n = 21) bzw. 33,7 % (n = 65) Manifestationsort der Krebserkrankung. Bezüglich der histologischen Klassifikation wurden 36,8 % (n = 71) der Melanome der Histologie SSM zugeordnet und 24,4 % (n = 47) dem Typ NM. 17,1 % (n = 33) wurden als ALM klassifiziert und 10,4 % (n = 20) als LMM. 22 Tumoren (11,4 %) konnten keiner dieser Kategorien sicher zugeordnet werden.

3.3 Histologie

Die Zusammenhänge zwischen der Histologie und den klinischen und pathologischen Charakteristika werden in Tabelle 2 dargestellt. Daten der Patienten, deren Tumoren keiner der vier Histologien zugeordnet werden konnten, wurden nicht gesondert betrachtet. Sie sind jedoch in der ersten Spalte berücksichtigt.

Signifikante Unterschiede zwischen den histologischen Typen ergaben sich für die TMB ($p = 2 \times 10^{-16}$), die Lokalisation ($p = 0,0005$), die Tumorregression ($p = 0,046$) und die Anzahl verstorbener Patienten ($p = 0,037$). Auf die TMB und die Überlebensanalysen wird an späterer Stelle gesondert eingegangen.

SSM Patienten zeigten mit einem Median von 69 Jahren das geringste Alter zum Zeitpunkt der Diagnose, LMM Patienten mit 75,5 Jahren das höchste. Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.

LMM Tumoren waren in 100 % der Fälle im Kopf- und Halsbereich lokalisiert. ALM waren ausschließlich auf die Extremitäten beschränkt, wobei mit 90,9 % ein Großteil der Tumoren auf die untere Extremität entfiel. SSM traten besonders häufig am Rumpf auf (47,9 %).

Bezüglich der Tumorstadien wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Histologien festgestellt ($p = 0,10$). Auffällig war jedoch, dass NM und ALM häufiger in einem fortgeschritteneren Stadium diagnostiziert wurden als SSM und LMM. Bei Letzteren entfielen hingegen jeweils mindestens 50 % der Tumoren auf das frühe Stadium IIA. SSM waren außerdem besonders häufig von einer Tumorregression betroffen (26,8 %).

Tabelle 2: Klinische Charakteristika der Patienten mit Tumoren verschiedener Histologien sowie der gesamten Kohorte.

	alle	SSM	NM	LMM	ALM	p-Wert
	193	71 (36,8 %)	47 (24,4 %)	20 (10,4 %)	33 (17,1 %)	
Alter [Jahre] (Median (IQR))	72,0 (60,0 - 80,0)	69,0 (56,0 - 78,5)	72,0 (61,0 - 81,0)	75,5 (71,8 - 81,0)	72,0 (65,0 - 78,0)	0,091
TMB [var/Mb] (Median (IQR))	14,3 (4,3 - 40,2)	13,4 (6,7 - 23,0)	22,5 (12,4 - 42,8)	87,9 (71,8 - 103)	1,5 (1,0 - 2,4)	2×10⁻¹⁶
Geschlecht						0,80 [#]
männlich	118 (61,1 %)	43 (60,6 %)	27 (57,4 %)	11 (55,0 %)	17 (51,5 %)	
weiblich	75 (38,9 %)	28 (39,4 %)	20 (42,6 %)	9 (45,0 %)	16 (48,5 %)	
Lokalisation						0,0005
Kopf/Hals	55 (28,5 %)	8 (11,3 %)	14 (29,8 %)	20 (100,0 %)	0 (0,0 %)	
Rumpf	52 (26,9 %)	34 (47,9 %)	13 (27,7 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	
Obere Extremität	21 (10,9 %)	9 (12,7 %)	8 (17,0 %)	0 (0,0 %)	3 (9,1 %)	
Untere Extremität	65 (33,7 %)	20 (28,2 %)	12 (25,5 %)	0 (0,0 %)	30 (90,9 %)	
Stadium						0,10
IIA	81 (42,0 %)	36 (50,7 %)	14 (29,8 %)	11 (55,0 %)	13 (39,4 %)	
IIB	65 (33,7 %)	20 (28,2 %)	17 (36,2 %)	8 (40,0 %)	11 (33,3 %)	
IIC	47 (24,4 %)	15 (21,1 %)	16 (34,0 %)	1 (5,0 %)	9 (27,3 %)	
Tumordicke						0,052
T2	28 (14,5 %)	14 (19,7 %)	3 (6,4 %)	3 (15,0 %)	7 (21,2 %)	
T3	100 (51,8 %)	39 (54,9 %)	25 (53,2 %)	15 (75,0 %)	14 (42,4 %)	
T4	65 (33,7 %)	18 (25,4 %)	19 (40,4 %)	2 (10,0 %)	12 (36,4 %)	
Ulzeration						0,54 [#]
nein	71 (36,8 %)	25 (35,2 %)	14 (29,8 %)	9 (45,0 %)	9 (27,3 %)	
ja	122 (63,2 %)	46 (64,8 %)	33 (70,2 %)	11 (55,0 %)	24 (72,7 %)	
Regression						0,046
nein	136 (70,5 %)	52 (73,2 %)	41 (87,2 %)	12 (60,0 %)	20 (60,6 %)	
ja	27 (14,0 %)	19 (26,8 %)	4 (8,5 %)	1 (5,0 %)	2 (6,1 %)	
NA [°]	30 (15,5 %)	0 (0,0 %)	2 (4,3 %)	7 (35,0 %)	11 (33,3 %)	
Rezidiv						0,35 [#]
nein	139 (72,0 %)	53 (74,6 %)	34 (72,3 %)	14 (70,0 %)	19 (57,6 %)	
ja	54 (28,0 %)	18 (25,4 %)	13 (27,7 %)	6 (30,0 %)	14 (42,4 %)	
Tod						0,037
nein	152 (78,8 %)	62 (87,3 %)	32 (68,1 %)	17 (85,0 %)	23 (69,7 %)	
ja	41 (21,2 %)	9 (12,7 %)	15 (31,9 %)	3 (15,0 %)	10 (30,3 %)	

[°] nicht in der Kontingenztafel für den statistischen Test enthalten
[#] Chi-Quadrat-Test
IQR: Interquartilsabstand

3.4 Molekulare Subtypen

Die 193 Tumoren der Kohorte wurden in vier molekularen Subtypen eingeteilt. Den größten Anteil machte mit 30,1 % der *BRAF* Subtyp aus. An zweiter Stelle folgte der *RAS* Subtyp mit 28,0 % der Tumoren. Die kleinsten Anteile an der Kohorte hatten die Subtypen Triple-WT und *NF1* mit 23,8 % bzw. 18,1 %.

Die Verteilung der *BRAF* Hotspot-Mutationen wird in Abbildung 3 und Abbildung 4 dargestellt. In 42 Tumoren (72,4 %), die dem *BRAF* Subtyp zugeordnet wurden, lag eine *BRAF* V600E Mutation vor. Die zweithäufigste Hotspot-Mutation war die *BRAF* V600K Variante, die in 13 Fällen (22,4 %) beobachtet wurde, gefolgt von den Aminosäuresubstitutionen V600R in zwei Tumoren (3,4 %) und V600D in einer Probe (1,7 %). Das Basentriplett K601 war in der Kohorte nicht von Punktmutationen betroffen, jedoch wurde in einem Tumor mit V600E Mutation zusätzlich eine K601_W604 Deletion beobachtet. Außerdem wurden in einem Fall zusätzlich zu einer V600E Mutationen eine P751S Mutation detektiert. Des Weiteren waren elf Tumoren von einer Missense-Mutation ohne gleichzeitige Hotspot-Mutation im *BRAF* Gen betroffen. Diese Proben wurden daher nicht dem *BRAF* Subtyp zugeordnet. Hiervon entfielen zwei auf das G469 Triplett (G469A, G469R). Außerdem war jeweils ein Tumor von einer Nonsense-Mutation (Q709*), von einer Splice-Site-Mutation (609-3C>T), von einer kleinen In-Frame-Deletion (N486_P490del) sowie von einer synonymen Mutation betroffen (S616=).

Dem *RAS* Subtyp wurden 54 Proben zugeteilt, von denen 50 Tumoren *NRAS* Mutationen trugen (Abbildung 3, Abbildung 4). Mit 96 % war im größten Teil der Fälle das Q61-Codon betroffen. Die übrigen 4 % der Hotspot-Mutationen entfielen auf das G13-Codon. Die häufigste Q61-Variante war der Aminosäureaustausch durch Arginin (R), gefolgt von Lysin (K), Leucin (L) und Histidin (H). *NRAS* Hotspot-Mutationen kamen in der Kohorte nie zusammen mit *BRAF* Hotspot-Mutationen in derselben Probe vor (Exakter Test nach Fisher: $p = 5 \times 10^{-10}$). Die übrigen vier *RAS* Tumoren waren von Mutationen in den Genen *HRAS* oder *KRAS* betroffen. Für *KRAS* wurde die Variante G12E beobachtet. *HRAS* war in drei Fällen von einer Hotspot-Mutation betroffen und zeigte jeweils eine G12D, G13V oder Q61R Variante.

Insgesamt trugen 46 Tumoren kodierende oder Splice-Site-Mutationen des *NF1* Gens. Sieben dieser Tumoren wiesen jedoch zusätzlich eine *NRAS* Hotspot-Mutation und vier eine *BRAF* Hotspot-Mutation auf, wodurch sie jeweils dem *RAS* bzw. *BRAF* Subtyp zugeordnet wurden. Somit wurden nur die übrigen 35 Proben der *NF1* Subgruppe zugewiesen. Abbildung 4 zeigt, dass die kodierenden *NF1* Mutationen im Gegensatz zu den *BRAF* und *NRAS* Mutationen nicht gehäuft in Clustern vorkamen, sondern über das gesamte Gen verteilt waren. Von den 46 *NF1*-mutierten Tumoren wurde in 34 (70,8 %) Fällen mindestens eine Variante als wahrscheinliche LoF-Mutation klassifiziert. Unter den Tumoren des *NF1* Subtyps machten LoF-Mutationen mit 88,6 % (n = 31) einen größeren Anteil aus. Von den Melanomen, die eine *NF1* Mutation trugen, jedoch dem *BRAF* Subtyp zugeordnet wurden, war keines von einer LoF-Mutation des *NF1* Gens betroffen ($p = 1 \times 10^{-6}$, Exakter Test nach Fisher). Unter den sieben *NF1*-mutierten Tumoren des *RAS* Subtyps zeigten wiederum drei eine LoF-Mutation.

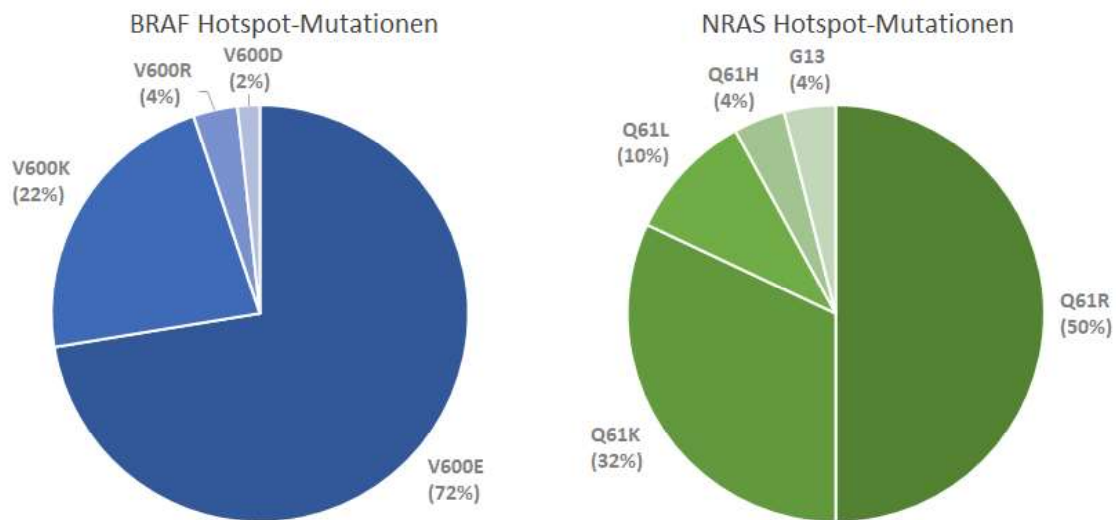


Abbildung 3: Darstellung der Verteilung von BRAF V600 (n = 58) und NRAS Q61 und G13 (n = 50) Hotspot-Mutationen auf die verschiedenen Aminosäureaustausche.

Tumor- und Normal-Probenpaare von Melanompatienten im Stadium II wurden mittels NGS sequenziert (n = 193). Mutations-Hotspots der Gene *BRAF* und *NRAS* wurden in den analysierten Proben manuell ausgewertet. Die Diagramme zeigen den Anteil der detektierten Varianten an der Gesamtzahl der *BRAF* V600 bzw. *NRAS* G13 und G61 Hotspot-Mutationen.

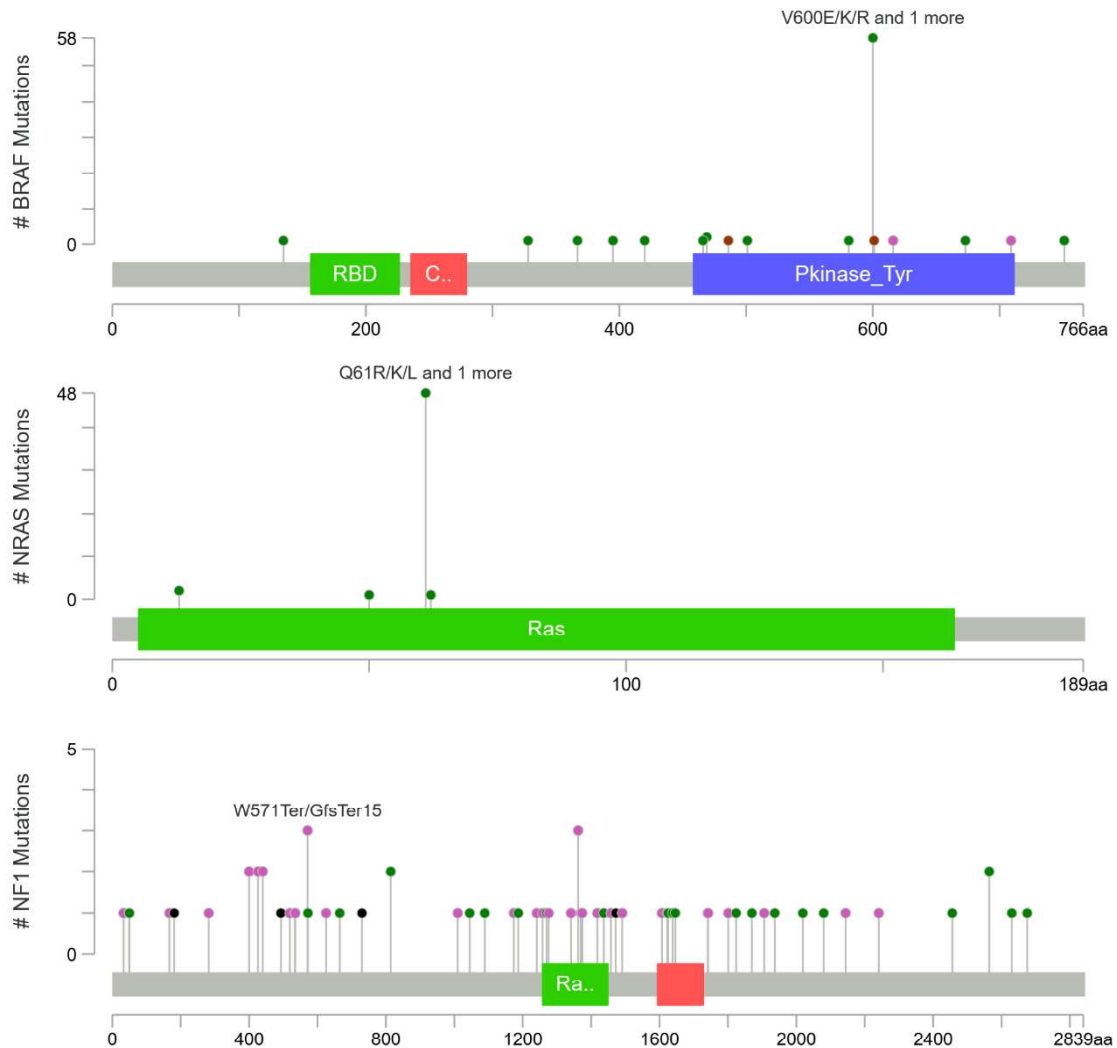


Abbildung 4: Verteilung somatischer Mutationen auf den Genen BRAF, NRAS und NF1.

Tumor- und Normal-Probenpaare von Melanompatienten im Stadium II wurden mittels NGS sequenziert (n = 193). Lollipop-Plots für die drei Gene *BRAF*, *NRAS* und *NF1* wurden mit der Anwendung MutationMapper von cBioportal (Cerami et al., 2012; Gao et al., 2013) erstellt. Die x-Achse zeigt die Aminosäureposition auf dem Gen. Die Höhe der Lollipops stellt die Häufigkeit dar, mit der Varianten an der jeweiligen Position detektiert wurden. War ein Aminosäuretriplett von zwei Mutationen betroffen, so wurden diese zu einem Aminosäureaustausch zusammengefasst. Missense-Mutationen sind grün, trunkierende Mutationen (Nonsense, Nonstop, Frameshift-Deletion, Frameshift-Insertion, Splice-Site) schwarz, In-Frame-Deletionen und -Insertionen braun und alle anderen Mutationstypen pink dargestellt. *NF1* Mutationen waren über das gesamte Gen verteilt. *NRAS* Mutationen clusterten im Aminosäure-Codon Q61 (n = 48). Auf dem *BRAF* Gen konzentrierten sich die Mutationen besonders auf das Codon V600 (n = 58).

Tabelle 3 gibt einen Überblick über die klinischen Charakteristika in Abhängigkeit der molekularen Subtypen. Es wurden signifikante Unterschiede im Hinblick auf Alter ($p = 0,0001$), TMB ($p = 1 \times 10^{-12}$), Histologie ($p = 0,0005$), Tumorlokalisation ($p = 0,0005$) und Rezidivrate ($p = 0,044$) beobachtet. Die TMB sowie das Überleben werden jeweils in einem eigenen Kapitel gesondert behandelt.

Das mediane Alter der *NF1* Patienten lag mit 78 Jahren über dem der Gesamtkohorte von 72 Jahren (Mann-Whitney-U-Test: $p = 0,001$), das der *BRAF* Patienten war mit 63 Jahren signifikant niedriger (Mann-Whitney-U-Test: $p = 8 \times 10^{-5}$). Der Anteil der molekularen Subtypen an den verschiedenen Histologien wird in Abbildung 5A veranschaulicht. Beim SSM und NM stellten die Subtypen *BRAF* (43,7 % bzw. 38,3 %) und *RAS* (40,8 % bzw. 29,8 %) die beiden größten Gruppen dar. In keiner anderen Histologie waren diese Subtypen so stark vertreten. Die Histologie LMM wurde hingegen von *NF1* (50,0 %) sowie Triple-WT Tumoren (40,0 %) dominiert. Mit 57,6 % wurden mehr als die Hälfte der ALM als Triple-WT klassifiziert.

Die Verteilung von Tumoren der molekularen Subtypen auf die verschiedenen Lokalisationen kann Abbildung 5B entnommen werden. Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs gehörten in 43,6 % der Fälle dem Subtyp *NF1* an. Dieser Subtyp machte jedoch an Tumoren des Rumpfes und der unteren Extremität, mit jeweils weniger als 10 %, nur einen sehr kleinen Anteil aus. Am Rumpf lokalisierte Tumoren trugen hingegen meistens *BRAF* oder *RAS* Hotspot-Mutationen. Tumoren der unteren Extremität wurden häufig als Triple-WT (38,5 %) klassifiziert.

Das Tumorstadium bei Diagnose unterschied sich nicht signifikant zwischen den Subtypen. Dennoch fiel auf, dass im *RAS* Subtyp 53,7 % der Melanome, und damit mehr als in jedem anderen Subtyp, im frühen Stadium IIA diagnostiziert wurden. *BRAF* Tumoren zeigten mit 20,7 % vergleichsweise oft eine histologische Regression. Diesbezüglich bestanden jedoch ebenfalls keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 3: Klinische Charakteristika der Patienten mit Tumoren unterschiedlicher molekularer Subtypen und der gesamten Kohorte.

	alle	<i>BRAF</i>	<i>RAS</i>	<i>NF1</i>	Triple-WT	p-Wert
	193	58 (30,1 %)	54 (28,0 %)	35 (18,1 %)	46 (23,8 %)	
Alter [Jahre] (Median (IQR))	72 (60,0 - 80,0)	63,5 (50,5 - 75,8)	72,5 (61,0 - 78,8)	78 (72,0 - 83,5)	71,5 (62,5 - 82,5)	0,0001
TMB [var/Mb] (Median (IQR))	14,3 (4,3 - 40,2)	11,5 (6,2 - 22,7)	17,2 (6,3 - 24,6)	74,7 (46,7 - 98,7)	3,1 (1,4 - 14,4)	1×10⁻¹²
Geschlecht						0,51 [#]
männlich	118 (61,1 %)	39 (67,2 %)	30 (55,6 %)	23 (65,7 %)	26 (56,5 %)	
weiblich	75 (38,9 %)	19 (32,8 %)	24 (44,4 %)	12 (34,3 %)	20 (43,5 %)	
Histologie						0,0005
SSM	71 (36,8 %)	31 (53,4 %)	29 (53,7 %)	5 (14,3 %)	6 (13,0 %)	
NM	47 (24,4 %)	18 (31,0 %)	14 (25,9 %)	10 (28,6 %)	5 (10,9 %)	
LMM	20 (10,4 %)	1 (1,7 %)	1 (1,9 %)	10 (28,6 %)	8 (17,4 %)	
ALM	33 (17,1 %)	5 (8,6 %)	7 (13,0 %)	2 (5,7 %)	19 (41,3 %)	
Andere/Unbek.°	22 (11,4 %)	3 (5,2 %)	3 (5,6 %)	8 (22,9 %)	8 (17,4 %)	
Lokalisation						0,0005
Kopf/Hals	55 (28,5 %)	12 (20,7 %)	8 (14,8 %)	24 (68,6 %)	11 (23,9 %)	
Rumpf	52 (26,9 %)	24 (41,4 %)	18 (33,3 %)	4 (11,4 %)	6 (13,0 %)	
Obere Extremität	21 (10,9 %)	5 (8,6 %)	8 (14,8 %)	4 (11,4 %)	4 (8,7 %)	
Untere Extremität	65 (33,7 %)	17 (29,3 %)	20 (37,0 %)	3 (8,6 %)	25 (54,3 %)	
Stadium						0,60 [#]
IIA	81 (42,0 %)	23 (39,7 %)	29 (53,7 %)	13 (37,1 %)	16 (34,8 %)	
IIB	65 (33,7 %)	20 (34,5 %)	14 (25,9 %)	13 (37,1 %)	18 (39,1 %)	
IIC	47 (24,4 %)	15 (25,9 %)	11 (20,4 %)	9 (25,7 %)	12 (26,1 %)	
Tumordicke						0,73 [#]
T2	28 (14,5 %)	8 (13,8 %)	10 (18,5 %)	5 (14,3 %)	5 (10,9 %)	
T3	100 (51,8 %)	29 (50,0 %)	31 (57,4 %)	17 (48,6 %)	23 (50,0 %)	
T4	65 (33,7 %)	21 (36,2 %)	13 (24,1 %)	13 (37,1 %)	18 (39,1 %)	
Ulzeration						0,98 [#]
nein	71 (36,8 %)	21 (36,2 %)	21 (38,9 %)	12 (34,3 %)	17 (37,0 %)	
ja	122 (63,2 %)	37 (63,8 %)	33 (61,1 %)	23 (65,7 %)	29 (63,0 %)	
Regression						0,76
nein	136 (70,5 %)	45 (77,6 %)	43 (79,6 %)	19 (54,3 %)	29 (63,0 %)	
ja	27 (14,0 %)	12 (20,7 %)	7 (13,0 %)	3 (8,6 %)	5 (10,9 %)	
NA°	30 (15,5 %)	1 (1,7 %)	4 (7,4 %)	13 (37,1 %)	12 (26,1 %)	
Rezidiv						0,044
nein	139 (72,0 %)	41 (70,7 %)	39 (72,2 %)	31 (88,6 %)	28 (60,9 %)	
ja	54 (28,0 %)	17 (29,3 %)	15 (27,8 %)	4 (11,4 %)	18 (39,1 %)	
Tod						0,34 [#]
nein	152 (78,8 %)	50 (86,2 %)	42 (77,8 %)	27 (77,1 %)	33 (71,7 %)	
ja	41 (21,2 %)	8 (13,8 %)	12 (22,2 %)	8 (22,9 %)	13 (28,3 %)	

° nicht in der Kontingenztafel für den statistischen Test enthalten
Chi-Quadrat-Test
Unbek. = unbekannt

Ergebnisse - Molekulare Subtypen

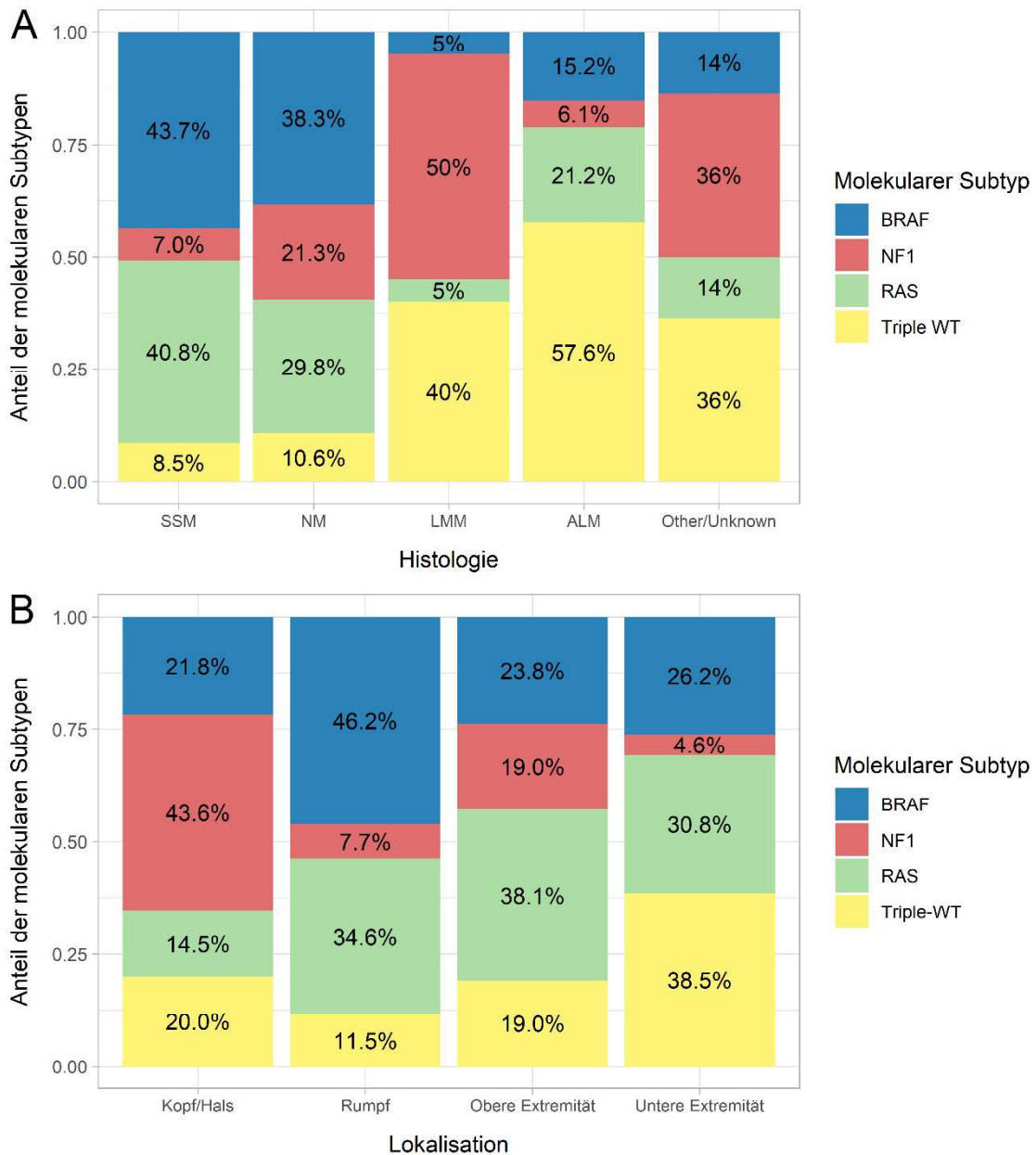


Abbildung 5: Anteil der molekularen Subtypen an den verschiedenen Histologien und Tumorlokalisationen.

Die Tumoren der Kohorte ($n = 193$) wurden durch manuelle Auswertung der NGS-Daten den molekularen Subtypen zugeordnet. Hierfür wurden Hotspot-Mutationen der Gene *BRAF* ($n = 58$) und *RAS* ($n = 54$) sowie *NF1* Mutationen ($n = 35$) berücksichtigt (Akbari et al., 2015). Die Abbildungen illustrieren die Anteile dieser Subtypen an den Tumoren der verschiedenen Histologien (A) und Lokalisationen (B). Triple-WT Melanome dominierten die Histologie ALM sowie die Tumoren der unteren Extremität. Der *NF1* Subtyp fand sich besonders häufig in ALM sowie Tumoren der unteren Extremität. SSM = superfiziell spreitendes Melanom, NM = noduläres Melanom, LMM = Lentigo-maligna-Melanom, ALM = akrolentiginöses Melanom.

3.5 Tumormutationslast

Um die Berechnungsmethode für die TMB zu evaluieren wurde, wie in Kapitel 2.4.4 beschrieben, die TCGA Melanom-Kohorte zu Hilfe genommen. Die TCGA Kohorte lieferte WES-Daten von 138 Stadium II Patienten. Abbildung 6 stellt die Korrelation der, mit der Tübinger Berechnungsweise ermittelten, TMB mit der Gesamtzahl an nicht-synonymen, kodierenden Varianten dar, die im WES detektiert wurden. Die Werte waren signifikant miteinander korreliert (Spearman: $p < 2 \times 10^{-16}$, Rho = 0,98).

Da für die Stadium II TCGA Kohorte und die Tübinger Kohorte die gleiche TMB-Berechnungsweise angewendet wurde, ist die Verteilung der Werte zwischen den Kohorten in Abbildung 7 direkt vergleichbar. Der Median lag bei 12,6 var/Mb (IQR: 5,0 – 22,4 var/Mb) in der TCGA Kohorte und bei 14,3 var/Mb (IQR: 4,3 – 40,2 var/Mb) in der Tübinger Kohorte. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kohorten ($p = 0,14$, Mann-Whitney-U-Test).

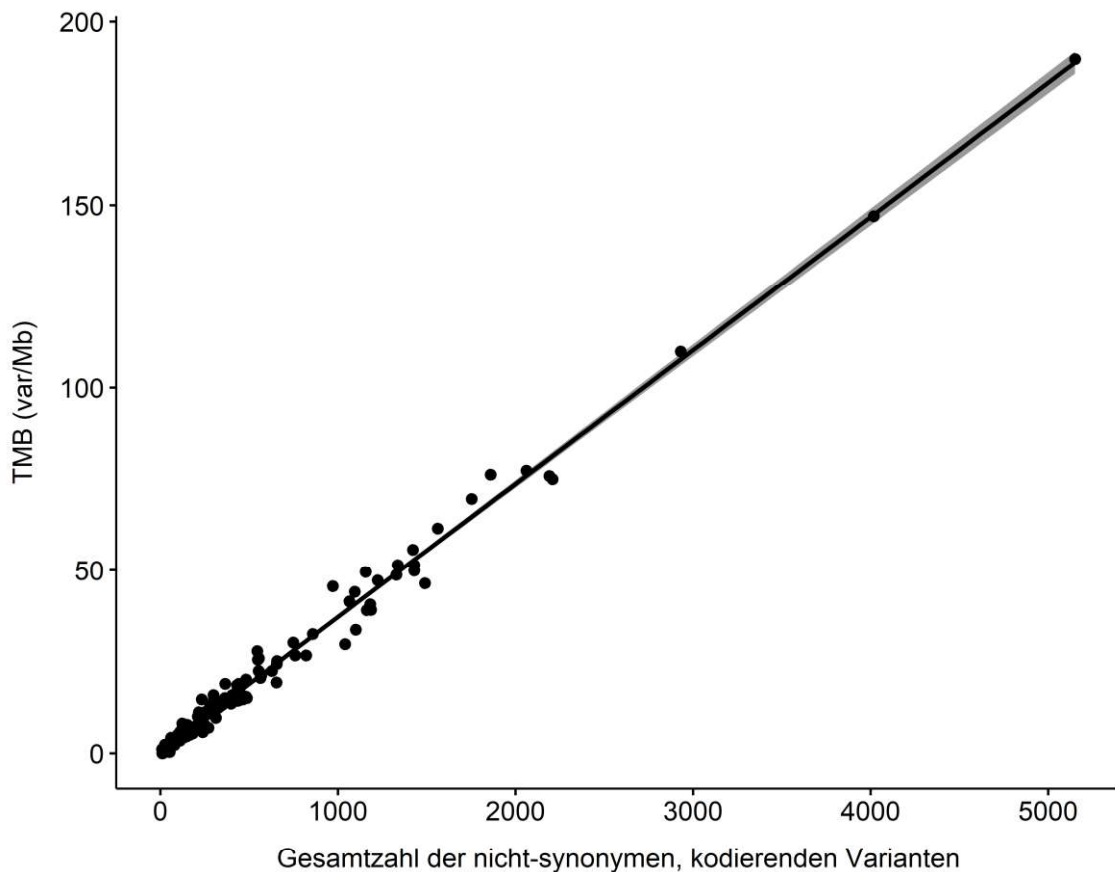


Abbildung 6: **Korrelation der über das Panel berechneten TMB-Werte mit der Gesamtzahl nicht-synonymer, kodierender Varianten in TCGA Stadium II Melanomen.**

Für die Analyse wurden TCGA WES-Daten von Stadium II Melanomen verwendet. Um die Tübinger Berechnungsweise zu evaluieren, wurden die Ergebnisse der TMB-Berechnung anhand der Target Region des für diese Studie verwendeten Genpanels mit der Gesamtzahl der nicht-synonymen und kodierenden Varianten des gesamten Genoms verglichen. Die Korrelation der Werte wurde nach Spearman berechnet und war mit $R = 0,98$ ($p < 2 \times 10^{-16}$) sehr hoch.

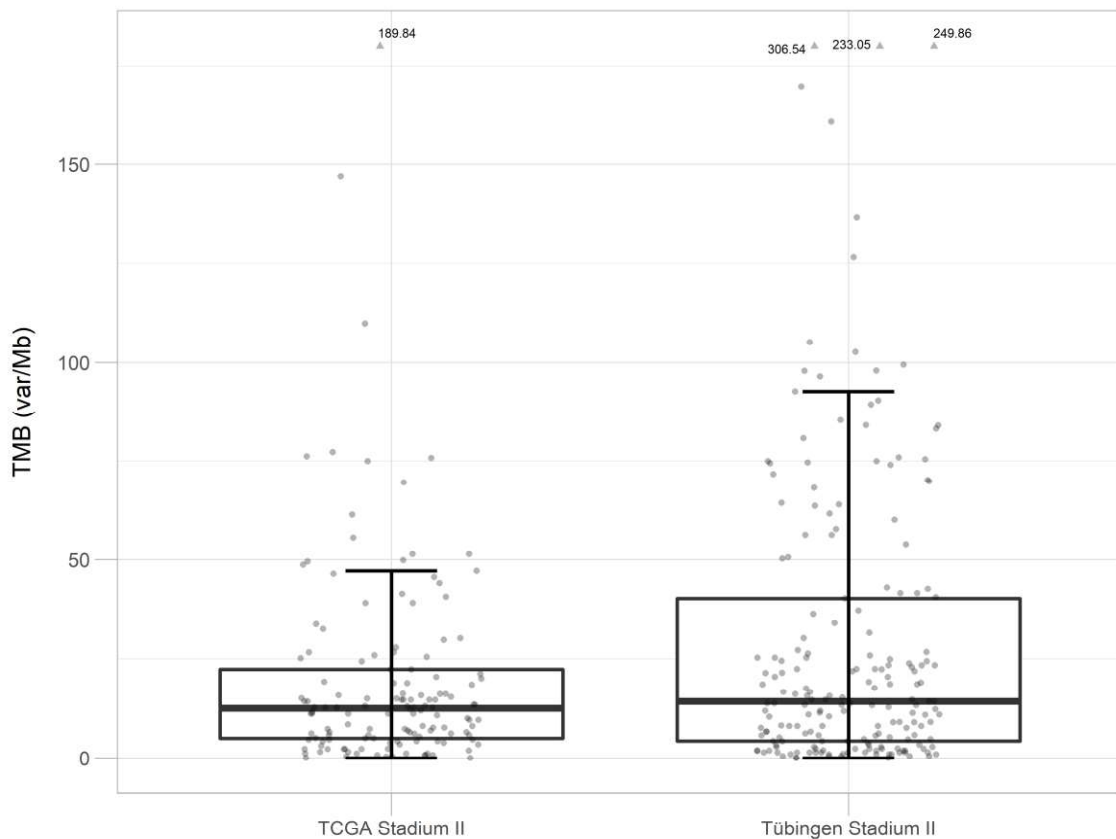


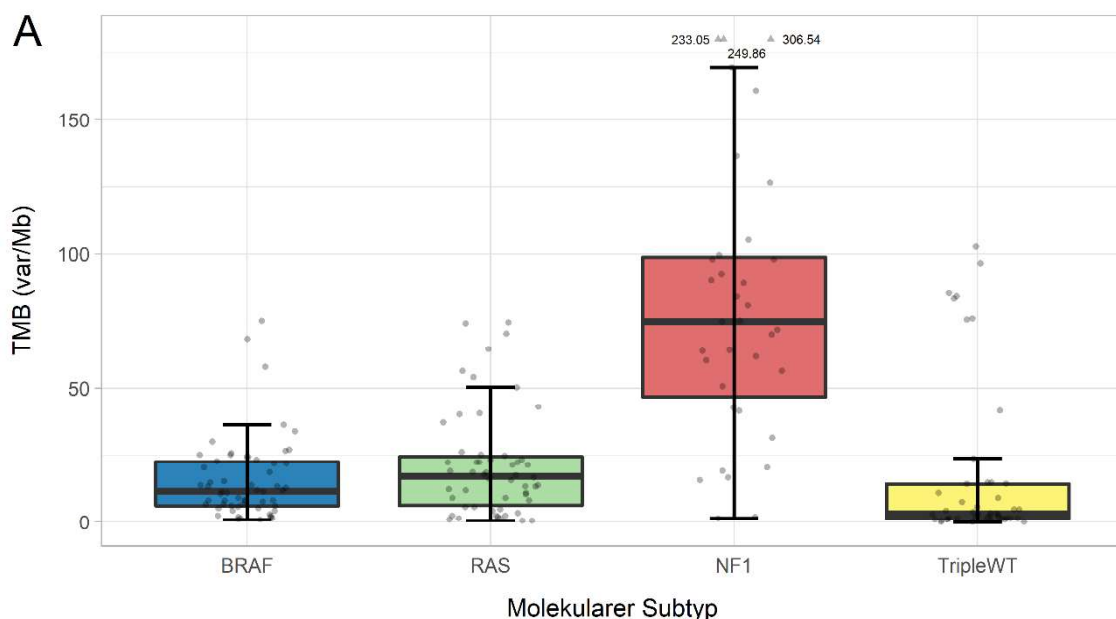
Abbildung 7: **Vergleich der TMB-Werte zwischen den Tumoren dieser Studie (n = 193) und den TCGA Stadium II Melanomen (n = 138).**

TMB-Werte der Tübinger und TCGA Stadium II Melanom-Kohorten wurden verglichen. Die Berechnung der TMB-Werte für die TCGA WES-Daten wurde analog zur Berechnungsweise der hier vorliegenden Studie (Tübinger Kohorte) durchgeführt. Dafür wurden ausschließlich Varianten der Gene berücksichtigt, die auch auf dem sequenzierten Genpanel der Tübinger Kohorte vorhanden waren. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kohorten (Mann-Whitney-U-Test: $p = 0,14$).

Zwischen den molekularen Subtypen zeigten sich signifikante Unterschiede der TMB-Werte (Abbildung 8A, $p = 1 \times 10^{-12}$). Der *NF1* Subtyp wies mit einem Median von 74,7 var/Mb die signifikant höchste Tumormutationslast auf (Mann-Whitney-U-Test: $p = 3 \times 10^{-12}$). Die geringste TMB fand sich mit einem Median von 3,1 var/Mb in Triple-WT Tumoren (Mann-Whitney-U-Test: $p = 4 \times 10^{-6}$). In Abbildung 8A sind unter den Triple-WT Melanomen acht Ausreißer zu erkennen, die eine Mutationslast von über 40 var/Mb aufwiesen. Diese hatten die Lokalisation im Kopf-Hals-Bereich gemeinsam. Es handelte sich außerdem bei sechs der acht Tumoren um LMM. Des Weiteren wurde in fünf dieser Tumoren eine Missense-Mutation des *KIT* Gens detektiert.

Auch Melanome verschiedener Histologien unterschieden sich signifikant hinsichtlich ihrer TMB ($p = < 2 \times 10^{-16}$) (Abbildung 8B). Tumoren der Histologie ALM zeigten dabei mit 1,5 var/MB den kleinsten Median (Mann-Whitney-U-Test: $p = 2 \times 10^{-15}$). Vor allem ist auch das geringe Maximum der TMB in ALM von 6,7 var/Mb hervorzuheben. LMM Tumoren wiesen demgegenüber mit 87,9 var/Mb die höchste mediane TMB auf (Mann-Whitney-U-Test: $p = 3 \times 10^{-7}$).

Abbildung 8C stellt die TMB-Verteilung in Abhängigkeit der Tumorlokalisierung dar. Tumoren im Kopf- und Halsbereich waren dabei mit einem Median von 71,7 var/Mb insgesamt von der höchsten TMB betroffen (Mann-Whitney-U-Test: $p = 2 \times 10^{-13}$). Die niedrigsten Werte wurde im Bereich der unteren Extremität beobachtet (Median = 4,3 var/Mb, Mann-Whitney-U-Test: $p = 3 \times 10^{-12}$).



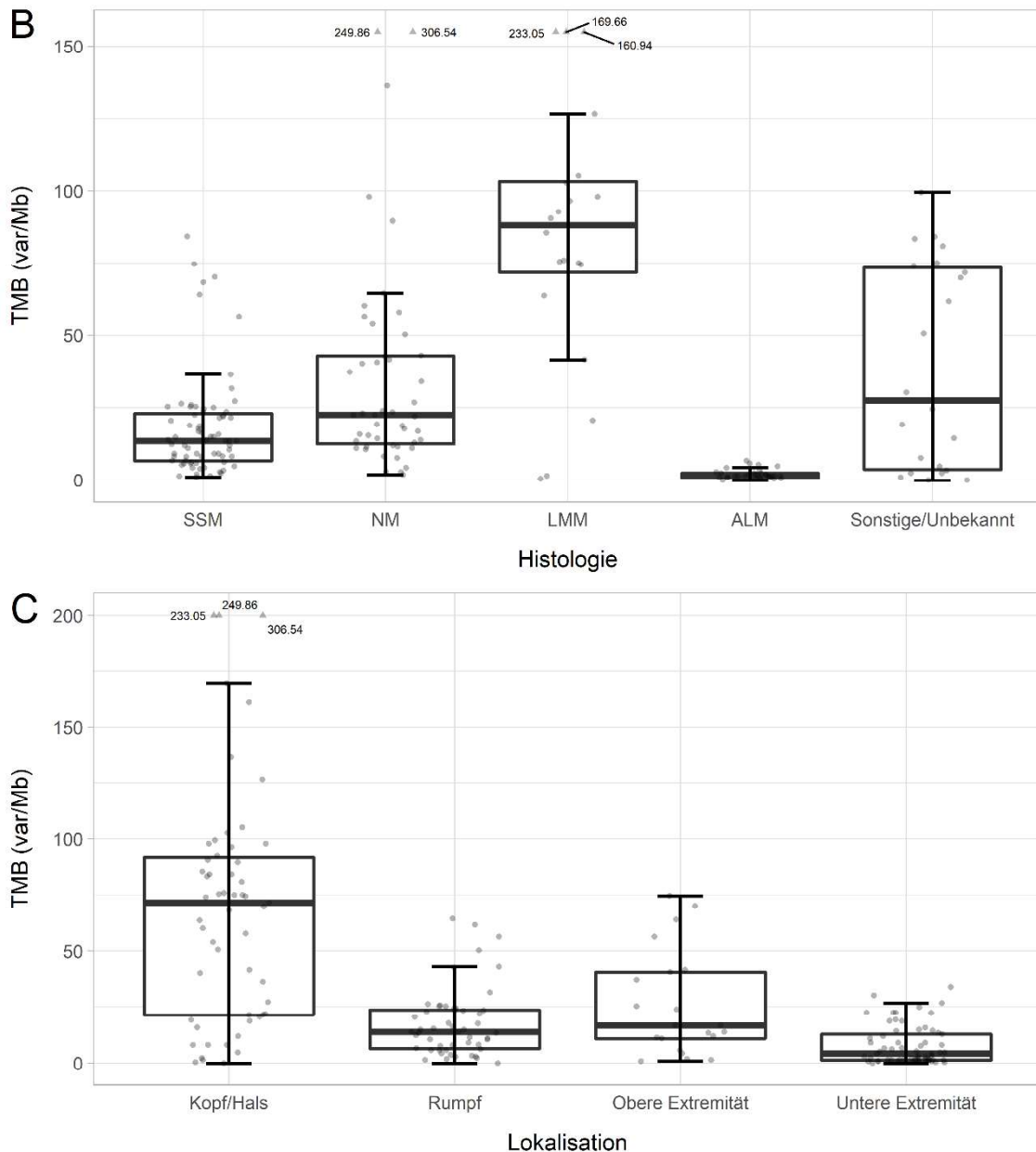


Abbildung 8: Vergleich der TMB-Werte in Stadium II Melanomen zwischen verschiedenen molekularen Subtypen, Histologien und Lokalisationen.

Die TMB-Werte wurden anhand der NGS-Daten des sequenzierten Genpanels berechnet. Die Boxplots stellen die TMB-Werte für Tumoren der verschiedenen molekularen Subtypen (A), Histologien (B) und Lokalisationen (C) gegenüber. Einige Datenpunkte wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit abgeschnitten und als Dreiecke dargestellt. Die Beschriftung gibt den TMB-Wert dieser Proben wieder. Zur statistischen Testung der Unterschiede zwischen den Gruppen wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Es bestanden für alle drei Variablen signifikante Unterschiede (Molekularer Subtyp: $p = 1 \times 10^{-12}$, Histologie: $p < 2 \times 10^{-16}$, Lokalisation: $p = 2 \times 10^{-15}$). SSM = superfiziell spreitendes Melanom, NM = noduläres Melanom, LMM = Lentigo-maligna-Melanom, ALM = akrolentiginöses Melanom.

3.6 Mutational Signatures

Für alle Proben, auch für solche mit nur sehr wenigen Mutationen, wurden die Signaturen der zugrundeliegenden Mutationsprozesse ermittelt. Hierbei wurden ausschließlich Signaturen berücksichtigt, die mindestens 5 % der detektierten Mutationen eines Tumors zugrunde lagen. Der Anteil der 30 verschiedenen Signaturen am Mutationsspektrum der Proben ist in Abbildung 9 dargestellt. Die Proben sind nach den molekularen Subtypen angeordnet und innerhalb dieser aufsteigend nach der Mutationslast sortiert. Die beiden dominantesten Signaturen stellten Signatur 7 und Signatur 1 dar, wobei Signatur 7 insgesamt den größten Einfluss hatte. Diese Beobachtung traf vor allem auf Tumoren mit einer hohen TMB zu. In Proben, die nur eine kleine Zahl an Mutationen aufwiesen, war der Beitrag entsprechend geringer. Andere Signaturen, die nur in einer oder wenigen Proben einen großen Anteil der Mutationen ausmachten, wurden zusammen mit einer niedrigen TMB beobachtet. Dabei machte Signatur 3 beispielsweise in zwei Melanomen mindestens 50 % der Mutationen aus, Signatur 15 in drei Tumoren.

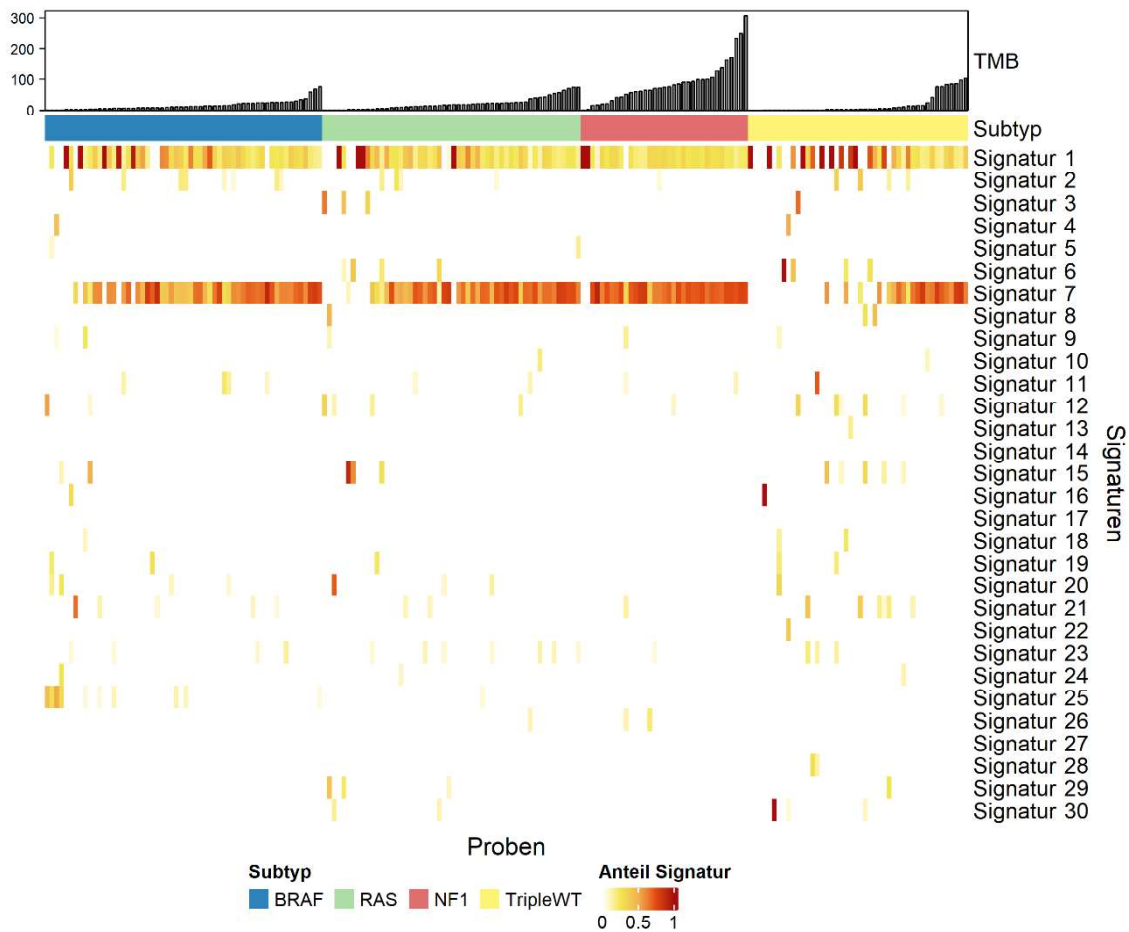


Abbildung 9: Anteil der verschiedenen Mutational Signatures an den detektierten Mutationen der einzelnen Tumorproben.

Die Mutational Signatures wurden für jede der 193 sequenzierten Proben mit dem R Package DeconstructSigs (Rosenthal, 2016) analysiert. Signatures, die in der jeweiligen Probe mindestens 5 % der detektierten Mutationen ausmachten, wurden berücksichtigt. Die Proben sind nach der Zugehörigkeit zu den molekularen Subtypen angeordnet. Oben im Graphen ist die jeweilige TMB der Probe abgebildet. Die Heatmap stellt den Anteil der Signatures an den Mutationen der einzelnen Proben dar. In allen Subtypen waren vor allem die Signatures 1 und 7 dominant. Besonders in Proben mit geringer TMB dominierten häufig andere Signatures als die UV-Signatur 7.

Der Anteil der einzelnen Proben mit und ohne Dominanz der Signatur 7 in den verschiedenen molekularen Subtypen kann Tabelle 4 entnommen werden. Der Beitrag der UV-Signatur war im NF1 Subtyp mit 94,3 % am größten. Triple-WT Tumoren wurden hingegen nur zu 41,3 % als Signatur 7 positiv gewertet. Der *BRAF* und der *RAS* Subtyp lagen mit 65,5 % bzw. 68,5 % dazwischen.

Tabelle 4: Anzahl und Anteil der Tumoren mit und ohne eine Dominanz der Signatur 7 aufgegliedert nach dem vorliegenden molekularen Subtyp.

	<i>BRAF</i>	<i>RAS</i>	<i>NF1</i>	Triple-WT
Gesamt	58	54	35	46
Signatur 7 positiv	38 (65,5 %)	37 (68,5 %)	33 (94,3 %)	19 (41,3 %)
Signatur 7 negativ	20 (34,5 %)	17 (31,5 %)	2 (5,7 %)	27 (58,7 %)

Die gleiche Analyse wurde für die verschiedenen Histologien durchgeführt. Das Ergebnis ist in Tabelle 5 dargestellt. LMM und NM Tumoren waren mit 90,0 % bzw. 87,2 % besonders häufig Signatur 7 positiv. ALM Tumoren wiesen hingegen lediglich in 6,1 % der Fälle eine Dominanz der UV-Signatur auf.

Tabelle 5: Anzahl und Anteil der Tumoren mit und ohne eine Dominanz der Signatur 7 aufgegliedert nach der vorliegenden Histologie.

	SSM	NM	LMM	ALM
Gesamt	71	47	20	33
Signatur 7 positiv	51 (71,8 %)	41 (87,2 %)	18 (90,0 %)	2 (6,1 %)
Signatur 7 negativ	20 (28,2 %)	6 (12,8 %)	2 (10,0 %)	31 (93,9 %)

Des Weiteren wurde untersucht, ob das Vorliegen kodierender Varianten in den detektierten Treibergenen (Kapitel 3.7.1, Supplement 4) mit der Dominanz einer UV-Signatur in der jeweiligen Probe assoziiert war.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 dargestellt. Als statistischer Test wurde der Exakte Test nach Fisher verwendet. Die p-Werte wurden mit Hilfe des Verfahrens nach Benjamini-Hochberg für multiples Testen korrigiert. 15 der 29 Gene zeigten p-Werte unter dem Signifikanzniveau von 0,05. Die Anordnung in Tabelle 6 erfolgte nach aufsteigendem p-Wert. Auffällig ist, dass unter den Tumoren, die keine Dominanz der Signatur 7 aufwiesen, insgesamt nur wenige von Mutationen in den aufgeführten Genen betroffen waren. Lediglich für die Gene *BRAF*, *NRAS* und *KIT* war der Anteil an Signatur 7 negativen Proben, die von einer Mutation betroffen waren, vergleichsweise hoch. Mutationen dieser drei Gene waren außerdem nicht signifikant mit dem Vorherrschen der Signatur 7 assoziiert.

Als Gene mit besonders niedrigen p-Werten müssen *ADAMTS18*, *MECOM*, *COL3A1*, *TET2*, *EPHA3* und *CDKN2A* hervorgehoben werden ($p < 0,001$). Ebenfalls geringe p-Werte ($p < 0,005$) wurden für die Gene *ARID2*, *PTPRC*, *HGF*, *NF1* und *TP53* ermittelt.

Tabelle 6: Zusammenhang zwischen dem Mutationsstatus der nominierten Treibergene und dem Vorherrschen der UV-Signatur in der jeweiligen Probe.

Gen	s7+, m+	s7-, m+	s7+, m-	s7-, m-	OR (95% KI)	p-Wert
<i>ADAMTS18</i>	44	2	83	64	16,78 (4,11 - 148,2)	1×10⁻⁶
<i>MECOM</i>	35	0	92	66	Inf (6,12 - Inf)	1×10⁻⁶
<i>COL3A1</i>	45	2	82	64	17,37 (4,26 - 153,3)	1×10⁻⁶
<i>TET2</i>	30	0	97	66	Inf (4,94 - Inf)	9×10⁻⁶
<i>EPHA3</i>	27	0	100	66	Inf (4,28 - Inf)	3×10⁻⁵
<i>CDKN2A</i>	28	1	99	65	18,22 (2,86 - 760,4)	0,0002
<i>ARID2</i>	18	0	109	66	Inf (2,54 - Inf)	0,0016
<i>PTPRC</i>	23	1	104	65	14,26 (2,21 - 599,5)	0,0016
<i>HGF</i>	17	0	110	66	Inf (2,36 - Inf)	0,0024
<i>NF1</i>	33	4	94	62	5,40 (1,79 - 22,03)	0,0024
<i>TP53</i>	21	1	106	65	12,77 (1,96 - 539,3)	0,0035
<i>DICER1</i>	18	1	109	65	10,65 (1,61 - 453,1)	0,010
<i>CBL</i>	16	1	111	65	9,30 (1,38 - 398,2)	0,017
<i>CBLB</i>	15	1	112	65	8,64 (1,27 - 371,4)	0,026
<i>NUP98</i>	14	1	113	65	8,00 (1,17 - 345,1)	0,042
<i>CYP3A5</i>	7	0	120	66	Inf (0,76 - Inf)	0,17
<i>TCF12</i>	6	0	121	66	Inf (0,62 - Inf)	0,17
<i>MAP2K1</i>	12	2	115	64	3,32 (0,71 - 31,48)	0,22
<i>AR</i>	12	2	115	64	3,32 (0,71 - 31,48)	0,22
<i>PPP6C</i>	9	1	118	65	4,93 (0,66 - 220,4)	0,24
<i>NRAS</i>	37	14	90	52	1,52 (0,72 - 3,35)	0,40
<i>RPL5</i>	4	0	123	66	Inf (0,34 - Inf)	0,40
<i>BRAF</i>	48	20	79	46	1,40 (0,71 - 2,80)	0,432
<i>CDC27</i>	6	1	121	65	3,21 (0,38 - 150,4)	0,51
<i>TOP2A</i>	8	2	119	64	2,14 (0,41 - 21,31)	0,58
<i>CARM1</i>	3	0	124	66	Inf (0,21 - Inf)	0,59
<i>CAST</i>	3	0	124	66	Inf (0,21 - Inf)	0,59
<i>PTEN</i>	6	3	121	63	1,04 (0,21 - 6,65)	1
<i>KIT</i>	11	5	116	61	1,16 (0,35 - 4,44)	1

m = Mutation im genannten Gen

s7 = UV-Signatur

+ = vorhanden/positiv

- = nicht vorhanden/negativ

OR = Odds Ratio

Inf = infinite, unendlich

3.7 Single Nucleotide Variants

3.7.1 Potenzielle Treibergene

Die Algorithmen OncodriveCLUST, OncodriveFM und MutSigCV wurden auf die NGS-Daten der gesamten Kohorte sowie der einzelnen molekularen Subtypen angewendet. Ein Gen wurde als potenzielles Treibergen nominiert, falls es in einer dieser analysierten Kohorten in mindestens zwei Algorithmen als signifikant erkannt wurde. Die Übersicht der Gene sowie deren signifikante q-Werte in den verschiedenen Algorithmen und Kohorten ist in Supplement 4 zu finden.

In der Gesamtkohorte wurde die größte Anzahl potenzieller Treiber identifiziert. Für sieben Gene ergaben sich in allen drei Algorithmen signifikante q-Werte. Dabei handelte es sich um *BRAF*, *NRAS*, *CDKN2A*, *TP53*, *CBL*, *MAP2K1* und *PPP6C*. Lollipop-Plots, die die Verteilung der Mutationen eines Gens darstellen, sind für *PPP6C*, *CDKN2A* und *TP53* im Anhang zu finden (Supplement 5). Abbildung 10 zeigt, dass Mutationen des Gens *CBL* auf zwei Cluster konzentriert waren. Eines betraf in erster Linie die Aminosäuren Q367 und Y371 und damit die Linker-Region des Proteins. Das zweite Cluster betraf die Positionen P417 und F418 und war daher, wie in Abbildung 10 dargestellt, in der Zink-Finger Domäne von *CBL* lokalisiert. Bei den Mutationen dieser beiden Hotspots handelte es sich ausschließlich um Missense-Mutationen. Die in der Kohorte detektierten *CBL* Mutationen sind in Supplement 6 aufgelistet.

15 weitere Gene wurden in der Gesamtkohorte von mindestens zwei Algorithmen detektiert: *ARID2*, *HGF*, *NF1*, *ADAMTS18*, *CARM1*, *CAST*, *CDC27*, *CYP3A5*, *DICER1*, *NUP98*, *PTEN*, *RPL5*, *TCF12*, *TET2* und *TOP2A*. Außerdem wiesen unter anderem *RAC1* ($q = 7 \times 10^{-7}$, OncodriveCLUST), *PREX2* ($q = 2 \times 10^{-9}$, OncodriveFM) und *SF3B1* ($q = 3 \times 10^{-8}$, OncodriveFM) in jeweils einem Algorithmus sehr kleine q-Werte auf. Da für diese Gene allerdings nur jeweils ein Algorithmus ein signifikantes Ergebnis generierte, wurden sie nicht als Treiber nominiert.

Im *BRAF* Subtyp wurden vier potenzielle Treibergene identifiziert. Hierzu zählte zum einen das *BRAF* Gen. Das liegt nahe, da der Subtyp auf einer Auswahl von Proben mit *BRAF* Hotspot-Mutation basiert. Des Weiteren waren die drei Gene *MECOM*, *CDKN2A* und *PTPRC* in jeweils zwei Tools signifikant. Der *BRAF*

Subtyp stellte die einzige Patientengruppe dar, in der *MECOM* und *PTPRC* als potenzielle Treiber klassifiziert wurden.

Im *RAS* Subtyp wurden sechs Gene als mögliche Tumortreiber identifiziert. *NRAS* und *CDKN2A* waren hierbei in drei Algorithmen signifikant, *ARID2*, *PPP6C* *COL3A1* und *EPHA3* in zwei.

Im Subtyp *NF1* wurden die sechs Gene *NF1*, *CDKN2A*, *TP53*, *CBL*, *HGF*, *CBLB* und *AR* als Treiber nominiert, wobei *CDKN2A* in allen drei Algorithmen signifikante q-Werte aufwies. Obwohl *HGF* in der OncodriveCLUST Analyse nicht signifikant war, zeigten vier der 17 Tumoren, die in der Gesamtkohorte von einer kodierenden Mutation des Gens betroffen waren, die Variante E199K. *CBLB* wurde ausschließlich im Subtyp *NF1* als Treiber nominiert. Lediglich in der Gesamtkohorte generierte MutSigCV ebenfalls einen signifikanten q-Wert für dieses Gen ($q = 3 \times 10^{-9}$).

In Triple-WT Melanomen wurden die Gene *KIT*, *BRAF*, *CBL* und *COL3A1* durch jeweils zwei Algorithmen detektiert. *KIT* wies in keinem Algorithmus einer anderen Kohorte einen signifikanten q-Wert auf. Supplement 7 gibt einen Überblick über die in der Kohorte beobachteten *KIT* Mutationen.

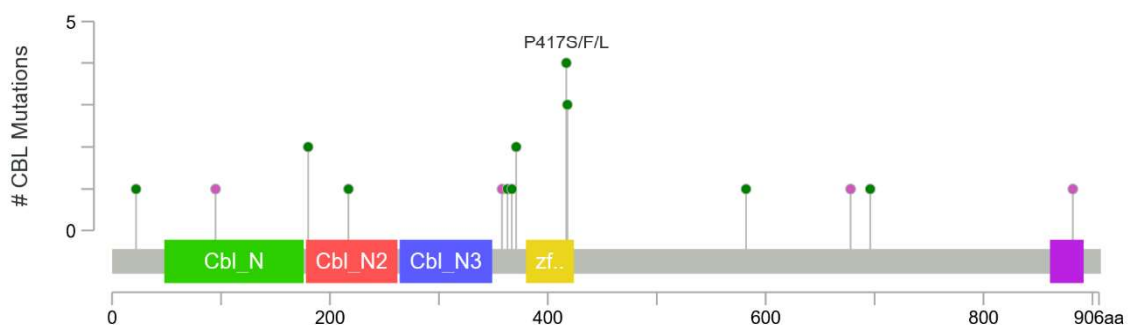


Abbildung 10: Mutationscluster des Gens *CBL*.

Tumor- und Normal-Probenpaare von Melanompatienten im Stadium II wurden mittels NGS sequenziert ($n = 193$). Der Lollipop-Plot stellt die Positionen detektiert Mutationen des Gens *CBL* in der Kohorte dar. Zur Erstellung der Grafik wurde die Anwendung MutationMapper von cBioportal (Cerami et al., 2012; Gao et al., 2013) verwendet. Die x-Achse zeigt die Aminosäureposition auf dem Gen. Die Höhe der Lollipops gibt die Anzahl der Mutationen an der jeweiligen Position wieder. Missense-Mutationen sind grün, trunkierende Mutationen (Nonsense, Nonstop, Frameshift-Deletion, Frameshift-Insertion, Splice-Site) schwarz, In-Frame-Deletionen und -Insertionen braun und alle anderen Mutationstypen pink dargestellt. Es zeigten sich zwei Mutationscluster. Davon betraf eines vor allem die Aminosäuren Q367 und Y371 und ein zweites in erster Linie die Positionen P417 und F418.

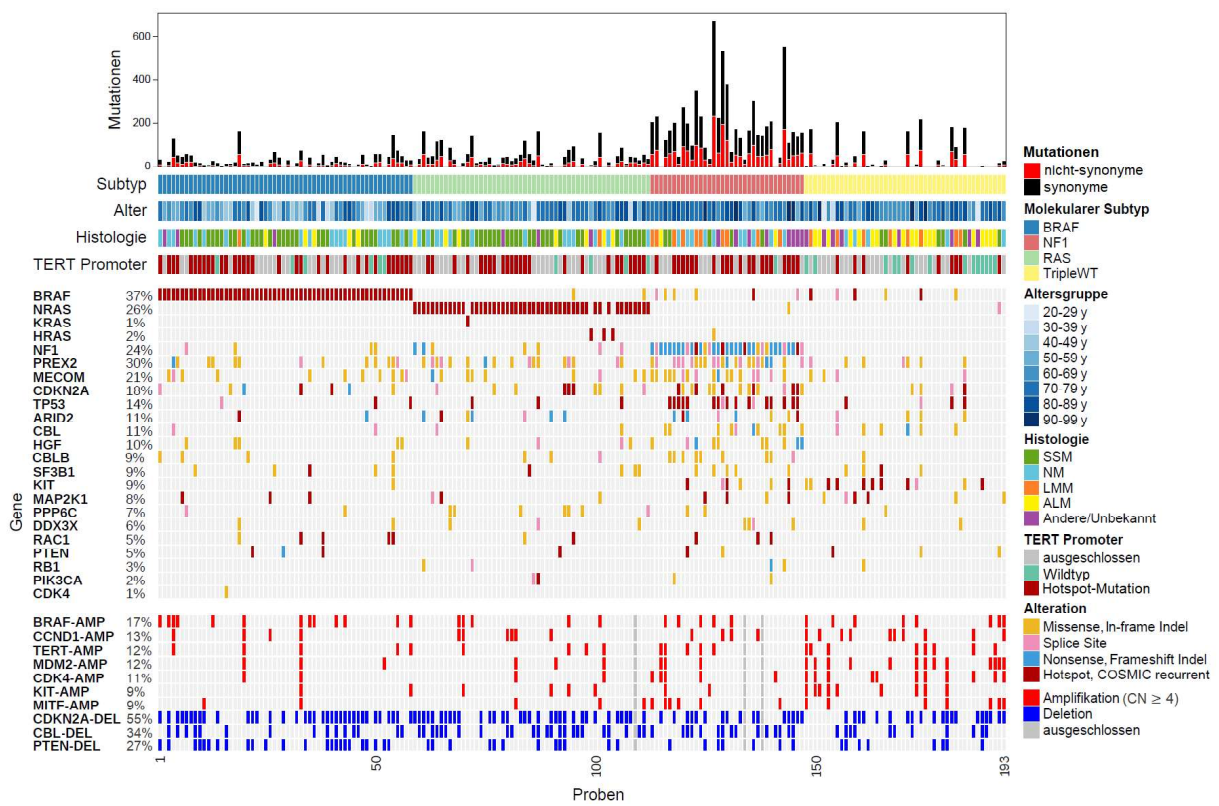


Abbildung 11: Oncoplot der wichtigsten Patientencharakteristika sowie der SNVs und CNVs ausgewählter Gene.

Der Oncoplot fasst die wichtigsten klinischen und molekularen Veränderungen der analysierten Stadium II Melanom-Kohorte (n = 193) zusammen. Jede Spalte der Abbildung steht für einen Patienten bzw. dessen Tumor, jede Zeile stellt ein Gen oder ein klinisches Charakteristikum dar. Die Proben wurden anhand der molekularen Subtypen sortiert. Während die Zeilen in der Grafikmitte Genmutationen markieren, geben die Zeilen im unteren Grafikteil das Vorliegen von Amplifikationen oder Deletionen wieder. AMP = Amplifikation, DEL = Deletion, y = Jahre, SSM = superfiziell spreitendes Melanom, NM = noduläres Melanom, LMM = Lentigo-maligna-Melanom, ALM = akrolentiginöses Melanom.

Neben den Signalen der positiven Selektion ist auch der Anteil, der von Mutationen in den nominierten Treibergenen betroffenen Tumoren, an den verschiedenen Subtypen für die Interpretation der Ergebnisse von Interesse. Dieser ist Tabelle 7 zu entnehmen. Es wurden alle nicht-synonymen, kodierenden Varianten der jeweiligen Gene berücksichtigt. Von den identifizierten Treibergenen waren *BRAF*, *NRAS*, *COL3A1*, *ADAMTS18* und *NF1* in der Kohorte am häufigsten mutiert. Ein Großteil der Gene wies im *NF1* Subtyp den höchsten Anteil mutierter Tumoren auf. Triple-WT Melanome zeigten hingegen im Vergleich sehr geringe Mutationszahlen. Ausnahmen hiervon stellten unter anderem das *KIT* Gen (23,9 %) sowie die Gene *CBL* (13,0 %), *PTPRC* (13,0 %), *MAP2K1* (10,9 %), *COL3A1* (13,0 %) und *ADAMTS18* (13,0 %) dar, wobei die beiden letzteren in allen Subtypen besonders hohe Mutationsfrequenzen aufwiesen. Auch der Anteil an *BRAF*-mutierten Proben war mit 10,9 % relativ hoch. Bei diesen *BRAF* Mutationen handelte es sich jedoch nicht um die typischen Hotspot-Mutationen. Im *RAS* Subtyp war mit 11,1 % eine vergleichsweise große Zahl an *PPP6C* Mutationen auffällig. Außerdem wurden dort geringe Mutationszahlen der Gene *KIT* (0 %) und *CBL* (1,9 %) beobachtet, wobei dieser negative Zusammenhang zwischen Mutationen der genannten Gene und *RAS* Hotspot-Mutationen signifikant war (Exakter Test nach Fisher: $p = 0,007$ für *KIT* bzw. $p = 0,044$ für *CBL*). Des Weiteren war ein signifikanter Zusammenhang für die Abwesenheit von Mutationen der Gene *KIT*, *CBL*, und *TP53* mit dem *BRAF* Subtyp zu beobachten. Dort lag der Anteil an mutierten Proben bei 1,7 % für *KIT* ($p = 0,043$), 0 % für *CBL* ($p = 0,002$) und 3,4 % für *TP53* ($p = 0,025$).

Tabelle 7: Anteil der Proben in der Gesamtkohorte und in den molekularen Subtypen, die von einer nicht-synonymen, kodierenden Mutation in den nominierten Treibergenen betroffen waren.

Gen	gesamt	BRAF	RAS	NF1	Triple-WT
<i>BRAF</i>	35,2 %	100,0 %	3,7 %	8,6 %	10,9 %
<i>NRAS</i>	26,4 %	0,0 %	92,6 %	2,9 %	0,0 %
<i>COL3A1</i>	24,4 %	13,8 %	22,2 %	60,0 %	13,0 %
<i>ADAMTS18</i>	23,8 %	17,2 %	16,7 %	60,0 %	13,0 %
<i>NF1</i>	19,2 %	5,2 %	9,3 %	82,9 %	0,0 %
<i>MECOM</i>	18,1 %	17,2 %	14,8 %	42,9 %	4,3 %
<i>TET2</i>	15,5 %	6,9 %	11,1 %	45,7 %	8,7 %
<i>CDKN2A</i>	15,0 %	10,3 %	14,8 %	37,1 %	4,3 %
<i>EPHA3</i>	14,0 %	3,4 %	13,0 %	40,0 %	8,7 %
<i>PTPRC</i>	12,4 %	6,9 %	7,4 %	28,6 %	13,0 %
<i>TP53</i>	11,4 %	3,4 %	5,6 %	40,0 %	6,5 %
<i>DICER1</i>	9,8 %	10,3 %	7,4 %	20,0 %	4,3 %
<i>ARID2</i>	9,3 %	3,4 %	11,1 %	20,0 %	6,5 %
<i>CBL</i>	8,8 %	0,0 %	1,9 %	28,6 %	13,0 %
<i>HGF</i>	8,8 %	8,6 %	5,6 %	25,7 %	0,0 %
<i>CBLB</i>	8,3 %	6,9 %	5,6 %	22,9 %	2,2 %
<i>KIT</i>	8,3 %	1,7 %	0,0 %	11,4 %	23,9 %
<i>NUP98</i>	7,8 %	0,0 %	11,1 %	22,9 %	2,2 %
<i>MAP2K1</i>	7,3 %	5,2 %	3,7 %	11,4 %	10,9 %
<i>AR</i>	7,3 %	5,2 %	5,6 %	17,1 %	4,3 %
<i>PPP6C</i>	5,2 %	1,7 %	11,1 %	5,7 %	2,2 %
<i>TOP2A</i>	5,2 %	3,4 %	7,4 %	8,6 %	2,2 %
<i>PTEN</i>	4,7 %	5,2 %	1,9 %	5,7 %	6,5 %
<i>CDC27</i>	3,6 %	1,7 %	1,9 %	11,4 %	2,2 %
<i>CYP3A5</i>	3,6 %	5,2 %	3,7 %	5,7 %	0,0 %
<i>TCF12</i>	3,1 %	1,7 %	0,0 %	8,6 %	4,3 %
<i>RPL5</i>	2,1 %	1,7 %	1,9 %	5,7 %	0,0 %
<i>CARM1</i>	1,6 %	0,0 %	1,9 %	5,7 %	0,0 %
<i>CAST</i>	1,6 %	0,0 %	1,9 %	2,9 %	2,2 %

3.7.2 *TERT* Promoter Mutationen

Unter den im Kapitel 2.4.7 genannten Voraussetzungen wurden 111 Patienten in die Auswertung der *TERT* Promotor Mutationen aufgenommen. Davon wurde in 77,5 % (n = 86) der Tumoren eine Mutation in einem der Mutationshotspots des *TERT* Promoters detektiert. Von diesen 111 Proben wiesen 65 eine gute Sequenzieriefe von mindestens 20x in allen Hotspot-Positionen auf. 61,5 % dieser 65 Proben waren wiederum von einer Hotspot-Mutation betroffen.

Bei allen detektierten Mutationen handelte es sich um C>T-Transitionen. Außerdem war ausnahmslos höchstens je einer der Hotspots von einer Veränderung betroffen. Wie Tabelle 8 indirekt zu entnehmen, entfielen 50 % der Hotspot-Mutationen auf die Position C228, gefolgt von Position C250, die in 43,0 % der Fälle betroffen war. Sechs der 43 C228T Mutationen zeigten zusätzlich eine C>T-Transition im benachbarten Codon C229. Tandem-Mutationen der Codons C242 und C243 wurden lediglich in sechs Fällen beobachtet.

Tabelle 8: *TERT* Promoter Hotspot-Mutationen der Gesamtkohorte (n = 111), aufgegliedert nach ihrer Lokalisation auf Chromosom 5.

	Variante	Anzahl	Anteil
Wildtyp		25	22,5 %
1.295.228	C > T	43	38,7 %
1.295.242/3	CC > TT	6	5,4 %
1.295.250	C > T	37	33,3 %

Die Aufschlüsselung der *TERT* Promoter Mutationen nach den vier molekularen Subtypen ist Tabelle 9 zu entnehmen. Der NF1 Subtyp wies mit 95,5 % der in die Analyse eingeschlossenen Proben den höchsten Anteil an Tumoren mit *TERT* Promoter Mutation auf. Triple-WT Melanome zeigten demgegenüber mit 39,1 % die geringste Mutationsfrequenz. Wie in der Gesamtkohorte entfiel in den Subtypen *BRAF* und *NF1* der größte Anteil der Mutationen auf den Hotspot C228. In der *RAS* und Triple-WT Kohorte war jedoch der C250 Hotspot etwas häufiger von einer Mutation betroffen.

Es bestand außerdem ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorliegen von *TERT* Promoter Mutationen und einer Dominanz der UV-Signatur 7 im Tumorgewebe (Exakter Test nach Fisher: $p = 6 \times 10^{-10}$).

Tabelle 9: Häufigkeit der Hotspot-Mutationen des *TERT* Promoters in den molekularen Subtypen (n = 111).

	<i>BRAF</i>	<i>RAS</i>	<i>NF1</i>	Triple-WT
gesamt	38	28	22	23
mutiert	32 (84,2 %)	24 (85,7 %)	21 (95,5 %)	9 (39,1 %)
C228T	16 (42,1 %)	10 (35,7 %)	14 (63,6 %)	3 (13,0 %)
CC242/3TT	3 (7,9 %)	1 (3,6 %)	1 (4,5 %)	1 (4,3 %)
C250T	13 (34,2 %)	13 (46,4 %)	6 (27,3 %)	5 (21,7 %)

3.8 Somatische Kopienzahlveränderungen

Für 3 Patienten war aus Qualitätsgründen die Auswertung der CNVs nicht möglich. Davon gehörten zwei Proben dem *NF1* Subtyp und eine dem *RAS* Subtyp an. Diese Proben wurden daher bei allen Analysen dieses Kapitels nicht berücksichtigt.

Abbildung 12 stellt die Verteilung des von SCNAs betroffenen Genomanteils in den molekularen Subtypen dar. Für die Berechnung wurden alle detektierten SCNAs ohne Cutoffs berücksichtigt (Kapitel 2.4.8). Die Werte reichten in der Gesamtkohorte von 0 % bis 46,8 %. Triple-WT Tumoren wiesen mit 13,0 % den höchsten Median auf, *RAS* Tumoren mit 9,7 % den niedrigsten. Insgesamt existierten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den molekularen Subtypen (Kruskal-Wallis Test: $p = 0,18$).

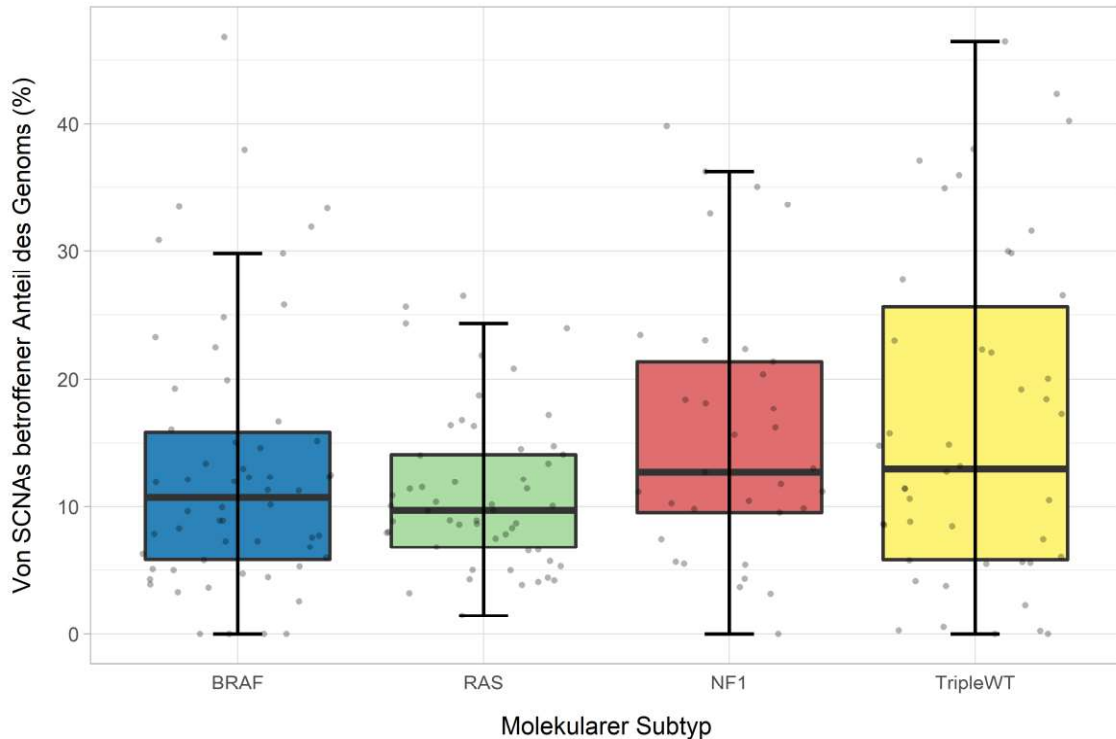


Abbildung 12: **Vergleich des von SCNAs betroffenen Anteils am gesamten Genom zwischen den molekularen Subtypen.**

Die CNVs der Stadium II Melanomkohorte wurden mit ClinCNV anhand der vorliegenden NGS-Daten ermittelt (n = 190). Der Boxplot stellt die Höhe des von SCNAs betroffenen Genomanteils in Abhängigkeit der molekularen Subtypen dar. Die Begrenzungen der Box markieren das erste bzw. dritte Quartil. Es existierten keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Subtypen (Kruskal-Wallis Test: $p = 0,18$).

Abbildung 13 wurde mittels GISTIC 2.0 erstellt und gibt einen Überblick über die genomischen Regionen, die in den Proben von SCNAs betroffen waren. Die Abbildung zeigt deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Chromosomen. Einige waren in der Kohorte besonders häufig von Deletionen betroffen, wie beispielsweise 6q, 9 und 10. Andere, wie zum Beispiel 1q, 6p, 7 und 8q, wiesen vor allem Amplifikationen auf.

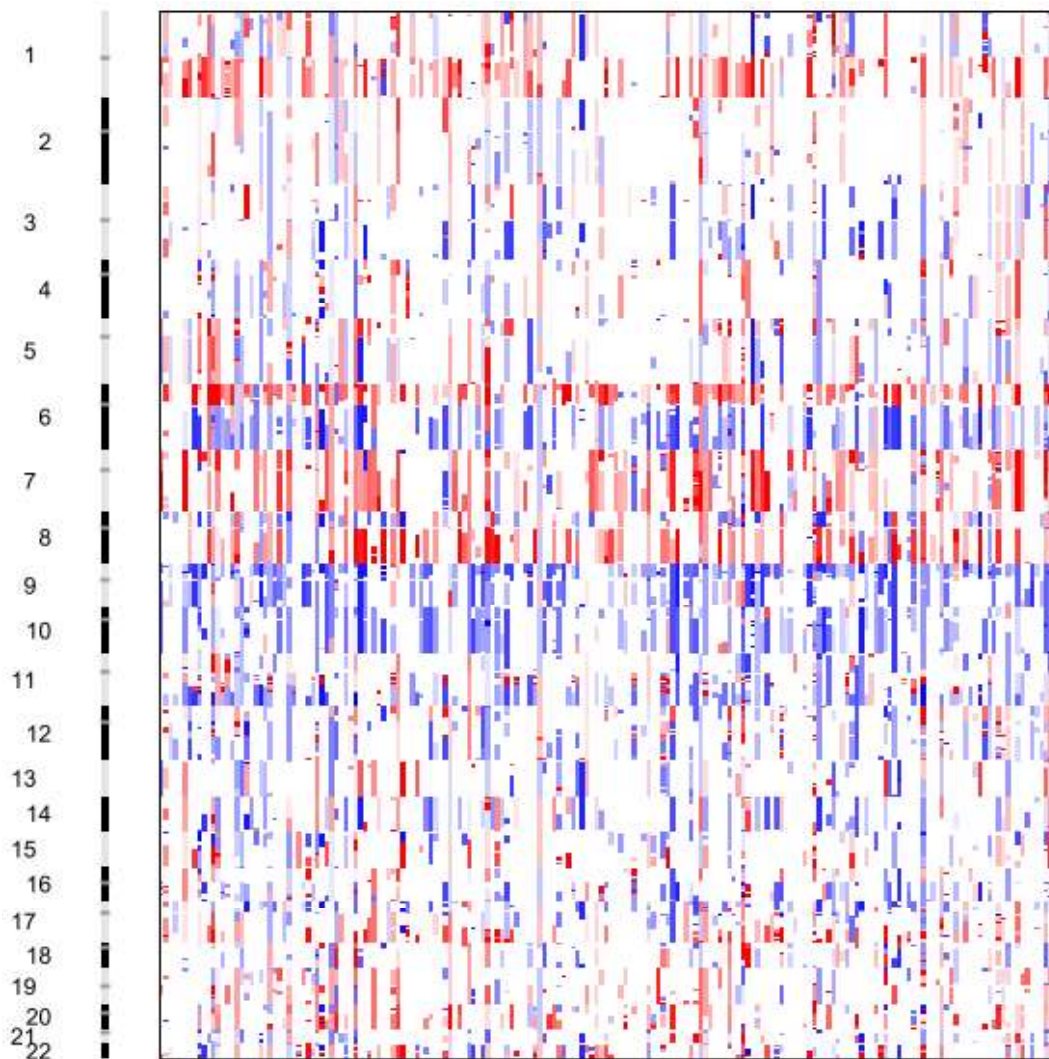


Abbildung 13: **Darstellung des Copy-number (CN) Profils der Stadium II Melanomkohorte.**

193 Melanompatienten im Stadium II wurden mittels NGS sequenziert. Für 190 Tumoren war die Analyse der CNVs durch ClinCNV erfolgreich. Die Heatmap wurde mittels GISTIC 2.0 anhand dieser Daten erstellt. Die Chromosomen sind vertikal angeordnet. Die analysierten Proben sind nebeneinander auf der x-Achse dargestellt. Deletionen sind blau, Amplifikationen rot. Die Chromosomen 1q, 6p, 7 und 8q waren in der Kohorte besonders häufig von Amplifikationen betroffen. Häufig deletiert waren die Chromosomen 6q, 9 und 10.

Die Gesamtkohorte sowie die molekularen Subtypen wurden mittels GISTIC 2.0 auf Signale positiver Selektion von SCNAs analysiert. Abbildung 14 zeigt die GISTIC Ergebnisse der Gesamtkohorte (n = 190). Die Ergebnisse der vier molekularen Subtypen sind in Supplement 8 dargestellt. Das Signifikanzniveau lag, wie im Algorithmus voreingestellt, bei 0,25 (grüne Linie). Da auf den meisten der detektierten Genabschnitte viele Gene lokalisiert waren, kann nicht sicher auf ein einzelnes Gen als Ursache der positiven Selektion geschlossen werden. Lediglich für signifikante Regionen, die laut GISTIC nur eine geringe Anzahl an Genen beinhalteten, ist ein Rückschluss auf das der Selektion zugrundeliegende Gen mit hoher Wahrscheinlichkeit möglich. Für die manuelle Beschriftung der genomischen Regionen in den Abbildungen wurden einige Gene ausgewählt, die auf dem von GISTIC ausgegebenen Wide-Peak der jeweiligen Region lokalisiert waren und aufgrund der aktuellen Studienlage von Interesse sein könnten.

In der Gesamtkohorte wies die Deletion der Region 9p21.3 den niedrigsten q-Wert auf. Auf dem entsprechenden Wide-Peak war neben *CDKN2A* nur ein weiteres Gen, *C9orf53*, lokalisiert. Weitere Deletionen in der Gesamtkohorte, für die GISTIC nur eine geringe Anzahl an Genen auf dem Wide-Peak ausgab, betrafen die Regionen 10q21.2 und 17q11.2. Die erste dieser Deletionen beinhaltete lediglich die Gene *ANK3* und *C10orf40*, die zweite ausschließlich *NF1*. Unter den Amplifikationen wies 11q13.3 den geringsten q-Wert auf. Der Wide-Peak dieser Region enthielt drei Gene: *CCND1*, *FGF19* und *ORAOV1*. Weitere signifikante Amplifikationen mit Wide-Peaks, die nur einzelne Gene enthielten, betrafen 4q12 mit *KIT*, 17q25.3 mit *RPTOR* und 3p13 mit *MITF*. Die signifikante Amplifikation des Locus 22q13.2 beinhaltete mit *EP300*, *RBX1* und *MIR1281* ebenfalls nur eine vergleichsweise geringe Anzahl an Genen.

Bei der separaten Analyse der molekularen Subtypen ergaben sich einige Gemeinsamkeiten zwischen den Ergebnissen (Supplement 8). In allen vier Subtypen wurde die Deletion der Region 9p21.3 detektiert, die das Gen *CDKN2A* enthielt. Die Deletion des Locus 6q25.3, wo unter anderem das *ARID1B* Gen lokalisiert war, ergab in der *BRAF*, *NF1* und Triple-WT Kohorte signifikante q-Werte. Auch der Locus 6q23.3, dessen Deletion im *RAS* Subtyp signifikant war, enthielt dieses Gen. Das Gen *CBL*, das bereits im Kapitel 3.7.1 als potenzieller

Tumortreiber nominiert wurde, befand sich ebenfalls in allen Subtypen auf einer signifikant deletierten Region (11q24.1: *BRAF* und *NF1*; 11q23.3: *RAS*; 11q23.1: Triple-WT). Außerdem wurde in der *RAS*, *NF1* und Triple-WT Kohorte die Amplifikation des Locus 12q15 detektiert. Von dieser Amplifikation war unter anderem das Gen *MDM2* betroffen.

Zum Teil wurden Alterationen von GISTIC im Gegensatz dazu lediglich in einem oder wenigen Subtypen identifiziert. Beispielsweise war die Deletion von 17q11.2 nur in den Subtypen *NF1* und Triple-WT signifikant. Im Wide-Peak der Region war unter anderem das Gen *NF1* lokalisiert, in der Triple-WT Kohorte sogar ausschließlich. In diesen beiden Subtypen fand sich außerdem die Amplifikation des Locus 12q14.1 mit dem Gen *CDK4* als signifikante Alteration. In *RAS* und Triple-WT Tumoren wurde die Amplifikation der Region 11q13.3 detektiert, die unter anderem das *CCND1* Gen enthielt. *TERT* war auf dem Locus 5p15.33 lokalisiert, der ebenfalls in *RAS* und Triple-WT Tumoren signifikant amplifiziert war. Das Gen *PTEN* war von einer Deletion des Locus 10q11.22 in der *BRAF* Kohorte und der Region 10q21.2 in Triple-WT Tumoren betroffen. Auf diesen genomischen Abschnitten waren jedoch in beiden Fällen eine große Anzahl weiterer Gene lokalisiert. Die Amplifikation der Region 4q12 war nur in der Triple-WT Kohorte signifikant und enthielt dort ausschließlich das *KIT* Gen. Spezifisch für die *BRAF* Kohorte war die Amplifikation von 1p12, die unter anderem das Gen *NOTCH2* betraf, sowie von 7q33 mit dem Gen *BRAF*. Im *NF1* Subtyp wurde eine 5p12 Amplifikation identifiziert, deren Wide-Peak lediglich das Gen *FGF10* beinhaltete. Dieser Locus war in keinem der anderen Subtypen signifikant amplifiziert. Die 3p13 Amplifikation, die auch in der Gesamtkohorte signifikant war und lediglich das Gen *MITF* im Wide-Peak aufwies, wurde ausschließlich im Triple-WT Subtyp detektiert.

In Tabelle 10 sind für einige Gene die Anteile der Tumoren mit Amplifikationen ($CN \geq 4$) und Deletionen an der Gesamtkohorte sowie an den verschiedenen molekularen Subtypen angegeben. Dabei wurde nicht zwischen homozygoten und heterozygoten Deletionen unterschieden. In der Tabelle wurden die in Abbildung 14 beschrifteten Gene sowie *PTEN* berücksichtigt.

Tabelle 10 zeigt, dass die Alterationsfrequenzen der meisten Gene in der Triple-WT Kohorte verglichen mit den anderen Subtypen besonders hoch waren. Dies galt insbesondere für Amplifikationen. Für alle aufgeführten Gene bis auf *BRAF* und *MITF* wies der Triple-WT Subtyp den höchsten Anteil an von einer Amplifikation betroffenen Tumoren auf. Besonders deutlich zeigte sich dieser Unterschied für Amplifikationen der Gene *KIT*, *MDM2*, *CCND1* und *RAC1*. Das Gen *BRAF* war hingegen häufiger im *BRAF* Subtyp amplifiziert und *MITF* häufiger im *NF1* Subtyp.

Von *CDKN2A* Deletionen waren *BRAF* und *RAS* Tumoren am häufigsten betroffen. *PTEN* Deletionen traten im *BRAF* Subtyp ungefähr doppelt so häufig auf, wie in den anderen Subtypen. *NF1* Deletionen kamen häufiger in *NF1* und Triple-WT Tumoren vor. Von *CBL* Deletionen waren die Subtypen *RAS* und *NF1* besonders häufig betroffen.

Tabelle 10: Der Anteil der von Amplifikationen und Deletionen ausgewählter Gene betroffenen Tumoren in der Gesamtkohorte und den molekularen Subtypen.

	Gesamt	<i>BRAF</i>	<i>RAS</i>	<i>NF1</i>	Triple-WT
Amplifikationen					
<i>BRAF</i>	15,9 %	22,4 %	9,4 %	15,2 %	17,4 %
<i>TERT</i>	11,3 %	8,6 %	7,5 %	15,2 %	17,4 %
<i>CCND1</i>	12,3 %	6,9 %	11,3 %	12,1 %	21,7 %
<i>KIT</i>	8,7 %	3,4 %	7,5 %	6,1 %	19,6 %
<i>MITF</i>	9,2 %	3,4 %	5,7 %	18,2 %	15,2 %
<i>CDK4</i>	10,3 %	3,4 %	3,8 %	15,2 %	23,9 %
<i>MDM2</i>	11,3 %	5,2 %	5,7 %	9,1 %	28,3 %
<i>RAC1</i>	15,4 %	10,3 %	7,5 %	18,2 %	30,4 %
<i>MYC</i>	18,5 %	10,3 %	18,9 %	21,2 %	28,3 %
<i>RBX1</i>	14,9 %	6,9 %	18,9 %	18,2 %	19,6 %
Deletionen					
<i>CDKN2A</i>	53,8 %	62,1 %	62,3 %	48,5 %	43,5 %
<i>PTEN</i>	26,2 %	41,4 %	22,6 %	21,2 %	17,4 %
<i>ARID1B</i>	32,8 %	32,8 %	35,8 %	30,3 %	34,8 %
<i>NF1</i>	13,3 %	12,1 %	5,7 %	21,2 %	19,6 %
<i>CBL</i>	33,8 %	25,9 %	45,3 %	45,5 %	26,1 %

Gesamte Kohorte (n = 190)

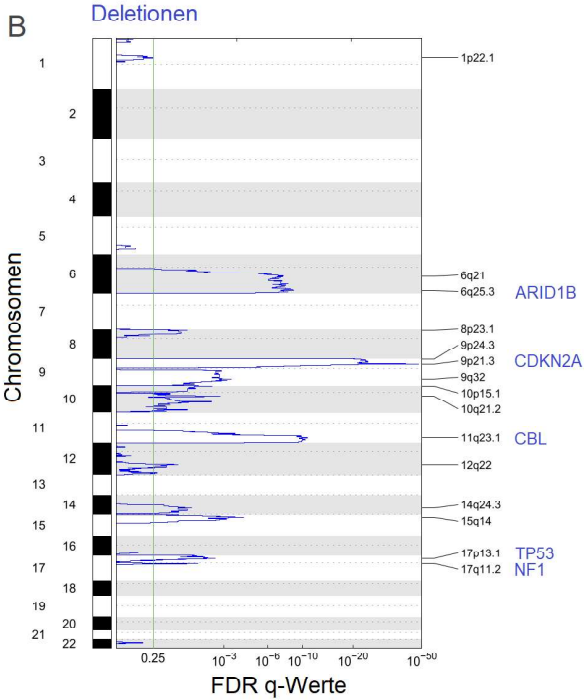
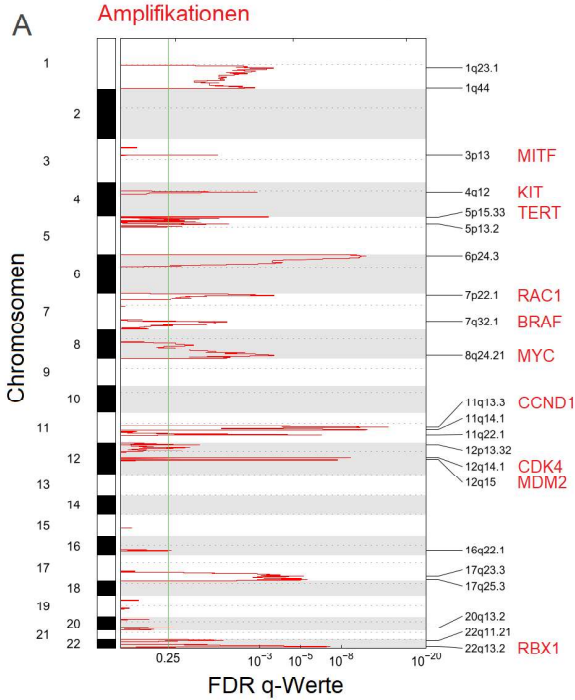


Abbildung 14: **GISTIC Ergebnisse der Gesamtkohorte.**

Die CNVs der NGS-Daten wurden mittels ClinCNV analysiert. Für 3 Patienten war dies aufgrund der geringen Qualität der Daten nicht möglich. Davon gehörten zwei dem Subtyp *NF1* und einer dem *RAS* Subtyp an. Anschließend wurden die SCNAs der gesamten Kohorte sowie der einzelnen molekularen Subtypen mittels GISTIC auf Signale positiver Selektion untersucht. Der Graph bildet die Ergebnisse der Gesamtkohorte ab ($n = 190$). Amplifikationen sind in Graph A, Deletionen in Graph B aufgetragen. Die Skala links gibt die Lokalisation der detektierten SCNAs auf dem Genom wieder. Die untere x-Achse zeigt die Höhe der ermittelten FDR q-Werte, die obere die entsprechenden G-Scores. Die grüne, vertikale Linie stellt das Signifikanzniveau für die FDR q-Werte dar. Die Beschriftungen auf der rechten Seite geben die Bezeichnungen der signifikanten Regionen an. "q" bezeichnet den langen Chromosomenarm, "p" den kurzen Arm. Außerdem wurden manuell ausgewählte Gene der Peak-Region ergänzt. Hierfür wurden Gene gewählt, die bereits in Studien als SCNAs des malignen Melanoms beschrieben wurden oder solche, die anderweitig von Interesse sein könnten. A. Amplifikationen. B. Deletionen.

Von den 22 Proben, die eine *TERT* Amplifikation aufwiesen, wurden 12 Proben aufgrund einer zu geringen Sequenziertiefe der Hotspot-Positionen von der Analyse der *TERT* Promoter Mutationen ausgeschlossen (Kapitel 2.4.7). Weitere drei dieser amplifizierten Proben waren nicht gleichzeitig von einer Mutation in den analysierten Hotspots betroffen. Sieben Melanome zeigten sowohl eine Amplifikation des *TERT* Gens als auch eine Hotspot-Mutation im *TERT* Promoter. In Triple-WT Tumoren entfielen die beobachteten *TERT* Amplifikationen ausschließlich auf Proben, die keine zusätzliche Mutation aufwiesen oder in der Analyse der *TERT* Promoter Mutationen nicht berücksichtigt werden konnten.

66 Proben der Kohorte waren von einer heterozygoten Deletion des *CBL* Gens betroffen, von denen fünf gleichzeitig eine Mutation des Gens trugen. Vier dieser fünf Mutationen betrafen die Aminosäurepositionen P417 oder F418. Homozygote Deletionen wurden nicht beobachtet.

3.9 Überlebensanalysen

Für die Überlebensanalysen lagen Daten über das Gesamtüberleben (OS) sowie das rezidivfreie Überleben (RFS) vor. Die mediane Follow-up Zeit betrug 33 Monate (Range: 1 – 213 Monate). Insgesamt wurde in 54 Fällen ein Rezidiv dokumentiert, das im Median nach 14 Monaten auftrat (Range: 3 – 72 Monate). Bei 32 dieser 54 Rezidive handelte es sich um Fernmetastasen (Stadium IV). Die übrigen wurden als Stadium III Erkrankung eingestuft. Keiner der Rezidivtumoren hatte die gleiche Lokalisation wie der exzidierte Primarius.

Über die Therapieschemata, die im Rezidivfall zur Anwendung kamen, lagen keine Informationen vor. Insgesamt starben 41 Patienten, deren medianes Gesamtüberleben 26 Monate betrug (Range: 5 – 126 Monate). Hierbei wurde nicht unterschieden, ob der Tod durch die Melanomerkkrankung hervorgerufen wurde oder eine andere Ursache hatte. Bei lediglich 26 dieser verstorbenen Patienten wurde zuvor ein Rezidiv der Tumorerkrankung festgestellt.

Mittels univariater Cox-Analysen wurde der Einfluss ausgewählter klinischer Parameter, der TMB, der molekularen Subtypen, der *TERT* Promoter Mutationen sowie der Aneuploidie auf das RFS und das OS analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 aufgeführt. In den univariaten Analysen wurden ausschließlich Proben berücksichtigt, für die die jeweiligen Informationen vorlagen. Die Anzahl der Patienten mit fehlenden Daten ist jeweils in der Spalte "fehlend" angegeben. Die Proportional Hazard Assumption wurde in allen Fällen erfüllt, mit Ausnahme der OS-Analysen für die Faktoren Ulzeration und Regression.

Lediglich das Alter, die Tumordicke und das Tumorstadium sowie der molekulare Subtyp zeigten in der univariaten Cox-Analyse einen signifikanten Einfluss auf das RFS. Das Alter wurde als kontinuierliche Variable analysiert und wies eine relativ kleine Hazard Ratio (HR) von 1,03 (95%-Konfidenzintervall (95% KI): 1,005 - 1,05) auf. Nur das Stadium IIC war gegenüber dem Stadium IIA mit einem signifikant schlechteren RFS assoziiert (95% KI: 1,46 - 5,20; Abbildung 15.1A). Ein ähnlicher Zusammenhang zeigte sich für die Tumordicke, wobei lediglich T4 gegenüber T2 mit einer signifikant schlechteren Prognose einherging (95% KI: 1,12 - 7,80). Die Analyse der molekularen Subtypen ergab für *NF1* Tumoren im

Vergleich zu Triple-WT Melanomen ein signifikant besseres RFS (Abbildung 15.3A). Mit 0,3 war die entsprechende HR außerdem weit von der 1 entfernt (95% KI: 0,10 - 0,89). Dieser Zusammenhang blieb auch in der multivariaten Analyse nach Korrektur für unter anderem Alter und Tumorstadium signifikant (Tabelle 12). Für *BRAF* und *RAS* Tumoren wurde bezüglich des RFS kein signifikanter Unterschied zu Triple-WT Tumoren festgestellt.

Als prognostische Faktoren des OS wurden, wie auch für das RFS, Alter, Stadium und Tumordicke identifiziert. Zusätzlich wies die Histologie des Tumors einen signifikanten Einfluss auf das OS auf (Abbildung 15.2). SSM waren dabei mit einem signifikant besseren OS verglichen mit NM assoziiert ($p = 0,008$; $HR = 0,32$; 95% KI: 0,14 – 0,74). Für LMM wurde bei der Auswertung des OS ebenfalls eine kleine HR beobachtet ($HR = 0,33$), wobei dieser Zusammenhang nicht signifikant war ($p = 0,079$; 95% KI: 0,09 – 1,14). Bezüglich der molekularen Subtypen ergaben sich bei der Analyse des OS, im Gegensatz zum RFS, keine signifikanten Unterschiede. Lediglich Tumoren des *BRAF* Subtyps wiesen mit 0,43 eine relativ kleine HR auf. Das Signifikanzniveau wurde dabei allerdings nicht unterschritten ($p = 0,060$; 95% KI: 0,18 – 1,04). Abbildung 15.3B zeigt eine Tendenz zu einem besseren OS von Patienten mit *BRAF* Tumoren gegenüber jenen mit anderen Melanomsotypen in den ersten Jahren nach Diagnosestellung.

Die TMB wurde sowohl als binärer Faktor, mit dem Median der Kohorte als Cutoff, als auch als kontinuierliche Variable analysiert. Für keine der beiden Herangehensweisen ergaben sich signifikante Unterschiede bezüglich RFS oder OS. Insbesondere für das OS verliefen die Überlebenskurven dicht beieinander (Abbildung 15.4B). In der Analyse der TMB als kontinuierlicher Marker zeigte sich außerdem eine HR, die sehr nah am Wert 1 lokalisiert war. Dies wird vor allem auch bei Betrachtung des 95%-Konfidenzintervalls deutlich (RFS: 0,99 - 1,00; OS: 0,99 – 1,01).

Auch hinsichtlich des Mutationsstatus des *TERT* Promoters ergab sich kein signifikanter Zusammenhang zum Outcome. In Abbildung 15.5A ist die Tendenz zu einem verkürzten RFS der Patienten ohne *TERT* Promoter Mutation zu erkennen, wobei das Signifikanzniveau nicht unterschritten wurde ($p = 0,25$). Die Auswertung wurde für eine Kohorte wiederholt, die nur kutane Melanome der

Histologien SSM, NM und LMM beinhaltete (n = 86, davon neun ohne Hotspot-Mutation des *TERT* Promoters). Auch bei der Analyse dieser Subgruppe war kein signifikanter Zusammenhang auszumachen (RFS: HR = 1,03; 95% KI: 0,24 – 4,44; p = 0,97; OS: HR = 1,13; 95% KI: 0,15 – 8,70; p = 0,91).

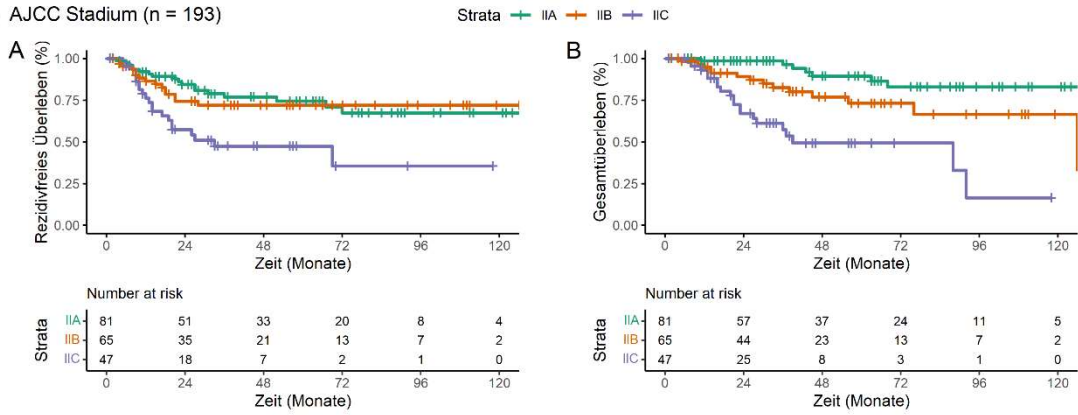
Die Auswirkung der Aneuploidie auf das Outcome wurde analysiert, indem die Kohorte in vier Quartile eingeteilt wurde. Die Werte des Aneuploidie-Scores bewegten sich dabei zwischen 0 und 16. Das erste Quartil lag bei einem Score von 1, der Median bei 3 und das dritte Quartil bei 5. Da der verwendete Aneuploidie-Score nur ganzzahlige Werte annehmen kann, war eine Einteilung in vier Gruppen gleicher Größe nicht möglich. In die Gruppe mit den höchsten Werten wurden Proben mit einem Score > 5 eingeschlossen (n = 42). Für das dritte Quartil wurden Proben mit Werten > 3 bis einschließlich 5 berücksichtigt (n = 34). Das zweite Quartil beinhaltete alle Melanome mit einem Aneuploidie-Score > 1 bis einschließlich 3 (n = 63). Die übrigen 51 Tumoren wurden dem ersten Quartil zugewiesen. Abbildung 15.6A zeigt, dass nach dem ersten Jahr der Nachbeobachtung besonders viele Rezidive im dritten Quartil auftraten. Insgesamt ergaben sich jedoch weder für das RFS noch für das OS signifikante p-Werte.

Tabelle 11: Univariate Cox-Analysen ausgewählter klinischer Faktoren sowie der TMB, des molekularen Subtyps, des *TERT* Promoter Status und der Aneuploidie.

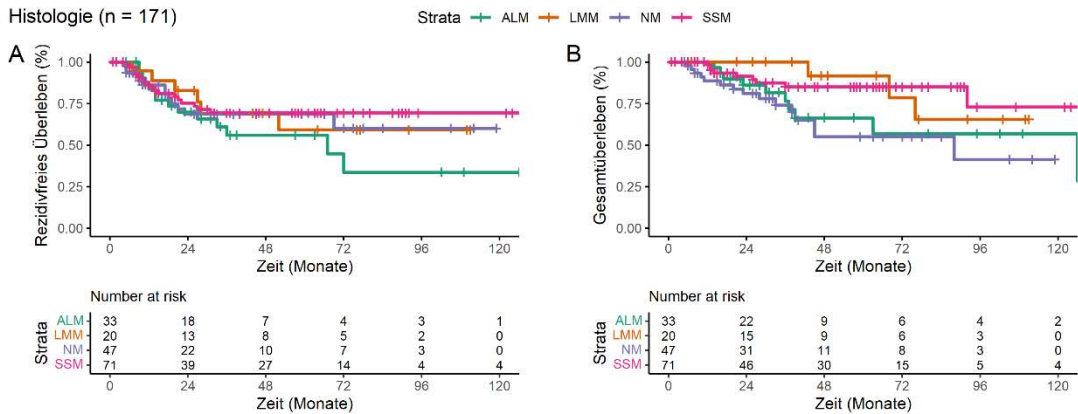
	fehlend	Rezidivfreies Überleben (RFS)			Gesamtüberleben (OS)		
		HR	95% KI	p-Wert	HR	95% KI	p-Wert
Alter		1,03	1,005 - 1,05	0,018	1,10	1,06 - 1,14	2 × 10⁻⁷
TMB kontinuierlich		0,99	0,99 - 1,00	0,14	1,00	0,99 - 1,01	0,98
TMB binär							
niedrig (≤ 14,3) [°]							
hoch (> 14,3)		0,85	0,49 - 1,45	0,54	0,93	0,50 - 1,73	0,83
Geschlecht							
weiblich [°]							
männlich		1,10	0,64 - 1,90	0,74	1,05	0,56 - 1,98	0,87
AJCC Stadium							
IIA [°]							
IIB		1,16	0,58 - 2,30	0,67	2,78	1,12 - 6,89	0,028
IIC		2,76	1,46 - 5,20	0,002	7,88	3,29 - 18,87	4 × 10⁻⁶
Tumordicke							
T2 [°]							
T3		1,50	0,57 - 3,93	0,41	6,39	0,84 - 48,46	0,073
T4		2,96	1,12 - 7,80	0,028	20,16	2,66 - 153,0	0,004
Ulzeration							
nein [°]							
ja		1,42	0,79 - 2,54	0,24	1,96	0,93 - 4,11	0,077
Regression	30						
nein [°]							
ja		1,87	0,95 - 3,69	0,072	1,45	0,60 - 3,56	0,41
Lokalisation							
Kopf/Hals [°]							
Rumpf		1,11	0,53 - 2,30	0,79	1,66	0,67 - 4,11	0,27
Obere Extremität		0,36	0,08 - 1,60	0,18	0,73	0,16 - 3,45	0,69
Untere Extremität		1,26	0,65 - 2,46	0,49	1,88	0,82 - 4,31	0,14
Histologie	22						
NM [°]							
SSM		0,83	0,40 - 1,69	0,60	0,32	0,14 - 0,74	0,008
LMM		0,90	0,34 - 2,37	0,83	0,33	0,09 - 1,14	0,079
ALM		1,39	0,65 - 2,96	0,39	0,76	0,34 - 1,71	0,50
Subtyp							
Triple-WT [°]							
<i>BRAF</i>		0,67	0,34 - 1,30	0,23	0,43	0,18 - 1,04	0,060
<i>RAS</i>		0,65	0,33 - 1,29	0,22	0,74	0,33 - 1,64	0,46
<i>NF1</i>		0,30	0,10 - 0,89	0,030	0,95	0,39 - 2,28	0,90
<i>TERT</i> Promoter	82						
Wildtyp [°]							
Hotspot-Mutation		0,63	0,29 - 1,39	0,25	0,90	0,30 - 2,75	0,86
Aneuploidie	3						
1. Quartil [°]							
2. Quartil		1,26	0,61 - 2,60	0,53	0,87	0,38 - 2,02	0,75
3. Quartil		1,50	0,65 - 3,47	0,35	1,33	0,53 - 3,39	0,55
4. Quartil		1,41	0,64 - 3,08	0,40	1,39	0,59 - 3,27	0,46

[°] Referenzkategorie, HR = Hazard Ratio, KI: Konfidenzintervall

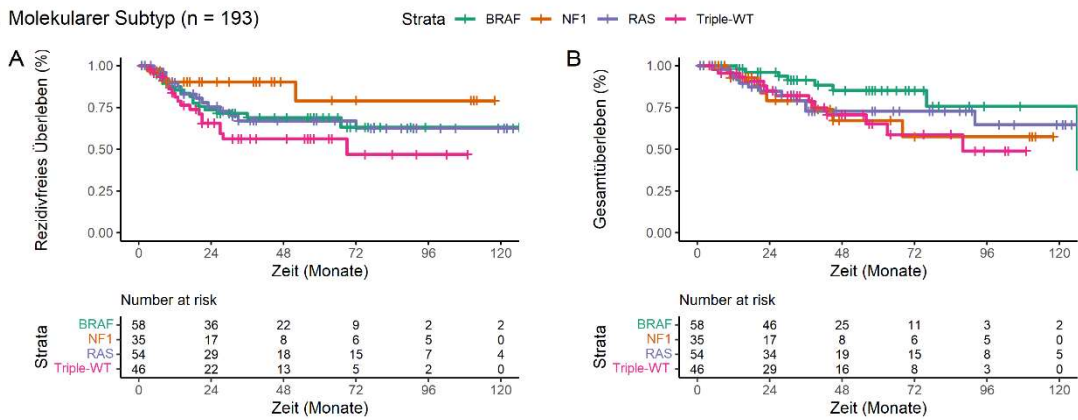
1. AJCC Stadium (n = 193)



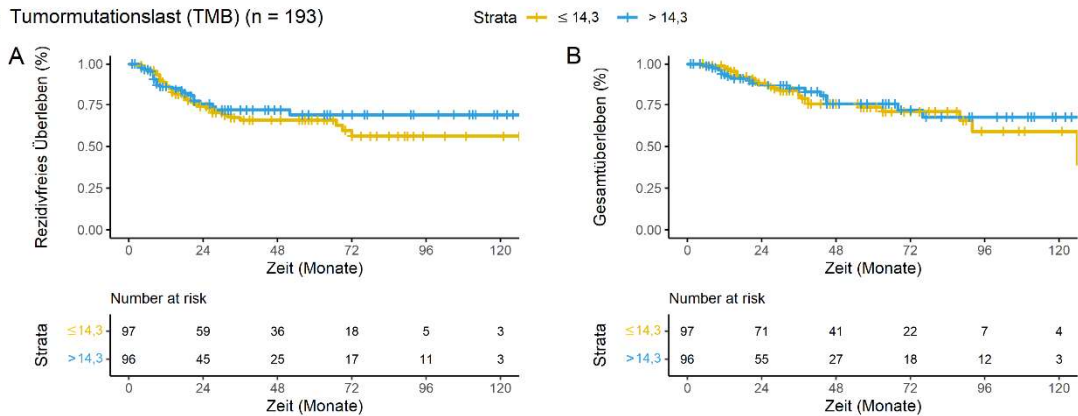
2. Histologie (n = 171)



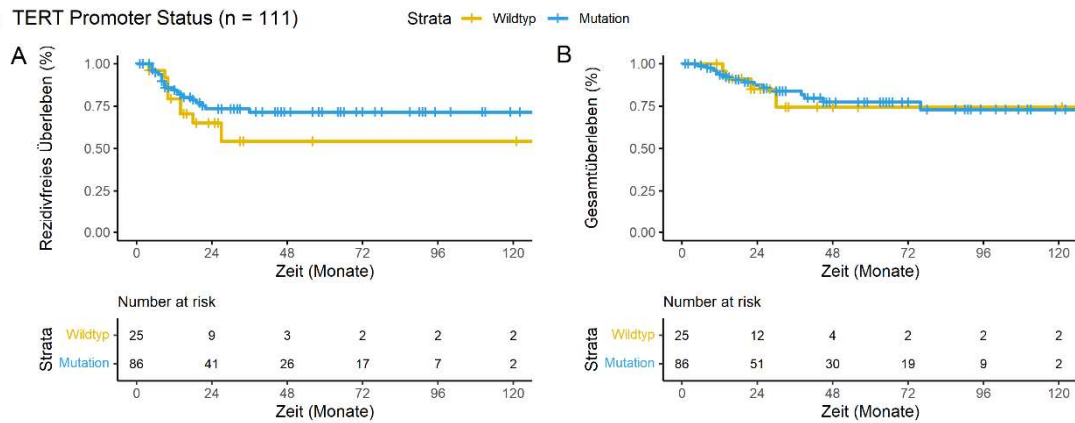
3. Molekularer Subtyp (n = 193)



4. Tumormutationslast (TMB) (n = 193)



5. *TERT* Promoter Status (n = 111)



6. Aneuploidie-Score (n = 190)

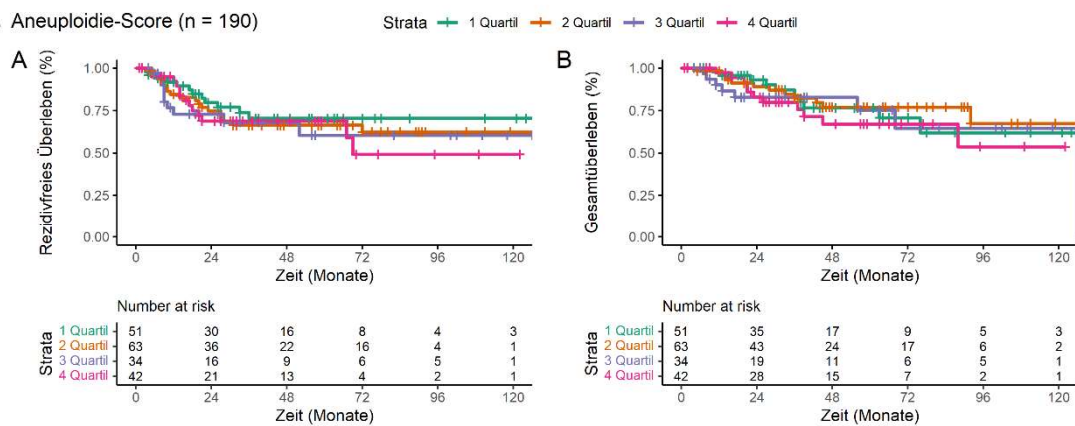


Abbildung 15: Kaplan-Meier Überlebenskurven für ausgewählte Faktoren.

Für 193 Melanompatienten im Stadium II wurden Überlebensdaten analysiert. Die jeweils als "A" benannte Abbildung stellt das rezidivfreie Überleben (RFS) dar, die mit "B" bezeichnete das Gesamtüberleben (OS). Über die Histologie, die Aneuploidie und den Mutationsstatus des *TERT* Promoters lagen nicht für alle Tumoren Daten vor. Die Anzahl der in der Auswertung berücksichtigten Patienten ist in der jeweiligen Abbildung angegeben. In der univariaten Analyse ergaben sich signifikante Unterschiede für das Stadium (RFS und OS), den molekularen Subtyp (RFS) sowie die Histologie (OS). Die Ergebnisse der entsprechenden univariaten Cox-Analysen sind Tabelle 11 zu entnehmen. Die Kurven wurden bei 120 Monaten abgeschnitten, da die Nachbeobachtung von Stadium II Melanompatienten in der Regel nur über 10 Jahre erfolgt.

Des Weiteren wurde der Einfluss des Mutationsstatus der nominierten Treiber-gene auf das RFS und das OS analysiert. Hierfür wurden Gene berücksichtigt, die in der Gesamtkohorte als Treiber nominiert wurden und dort in mindestens 5 % der Tumoren von einer kodierenden, nicht-synonymen Mutation betroffen waren (Supplement 4, Tabelle 7). Das traf für *BRAF*, *NRAS*, *NF1*, *ADAMTS18*, *TET2*, *CDKN2A*, *TP53*, *DICER1*, *ARID2*, *CBL*, *HGF*, *NUP98*, *MAP2K1*, *PPP6C* und *TOP2A* zu. Da die Einteilung in die molekularen Subtypen auf dem Vorliegen von Mutationen der Gene *BRAF*, *NRAS* und *NF1* basiert, wurde auf die erneute Analyse dieser Gene verzichtet. Für die übrigen Gene wurden jeweils die Proben, welche von einer kodierenden Mutation des Gens betroffen waren, mit den WT-Proben verglichen. Die Ergebnisse wurden anschließend, separat für RFS und OS, mit Hilfe des BH-Verfahrens für multiples Testen korrigiert. Nach der BH-Korrektur ergab sich für keines der genannten Gene ein signifikanter Einfluss auf das RFS oder das OS (Supplement 9).

Neben den Auswirkungen von Mutationen in potenziellen Treibergenen wurde auch der Einfluss der fünf von GISTIC als deletiert detektierten Regionen analysiert, die die geringsten q-Werte aufwiesen. Die Peaks dieser fünf Regionen lagen bei 9p21.3, 9p24.3, 11q23.1, 6q25.3 und 6q21 (Abbildung 14). Die von GISTIC ermittelten Begrenzungen der Regionen können Supplement 10 entnommen werden. Da sich die Begrenzungen der CNVs zwischen verschiedenen Proben grundlegend unterscheiden, wurden die GISTIC Ergebnisse für die Überlebensanalysen verwendet. Proben mit einem Amplitude Threshold von $< -0,1$ für die entsprechende Region wurden als deletiert angesehen und mit den übrigen WT-Proben verglichen. Die p-Werte wurden erneut mittels des BH-Verfahrens für multiples Testen korrigiert. Die Ergebnisse dieser Auswertung können Supplement 11 entnommen werden. Lediglich für die Deletion der Region 11q23.1 ergab sich eine signifikante Auswirkung auf das Outcome (Abbildung 16). Patienten, deren Tumor eine Deletion aufwies, zeigten hierbei ein schlechteres OS mit einer HR von 4,75 (95% KI: 2,32 – 9,73; korrigiertes p = 0,0001) gegenüber Patienten, deren Tumor nicht von einer Deletion betroffen war. Diese Assoziation blieb auch in der multivariaten Cox-Analyse signifikant (Tabelle 12).

Hinsichtlich des RFS bestand kein signifikanter Unterschied in Abhängigkeit des Vorliegens einer 11q23.1 Deletion im Tumor (95% KI: 0,77 – 2,24). Die 261 Gene, die auf dem Wide-Peak der GISTIC Region 11q23.1 lokalisiert sind, können Supplement 12 entnommen werden. Unter anderem traf dies auf das Gen *CBL* zu.

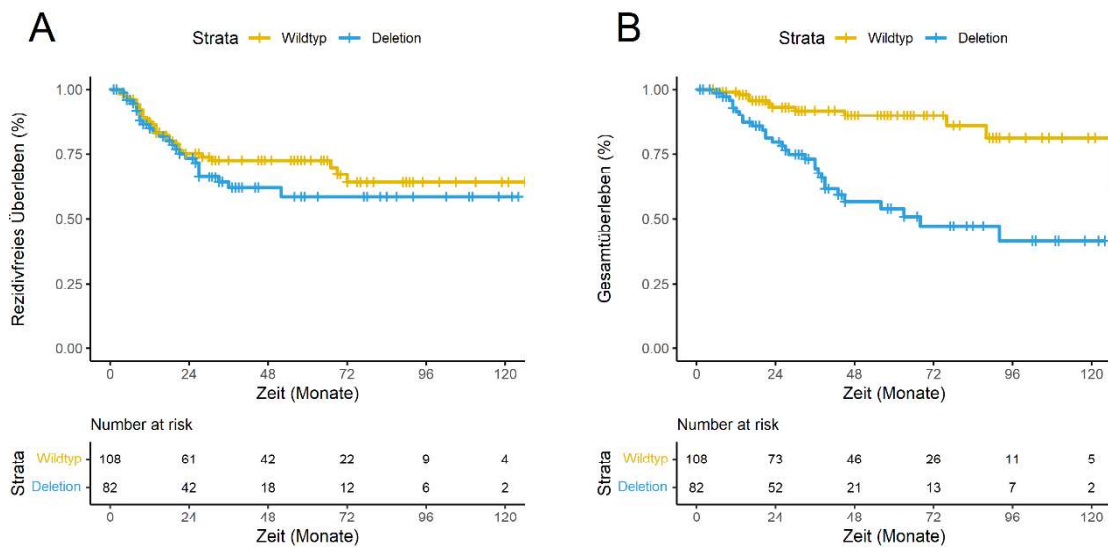


Abbildung 16: Kaplan-Meier Überlebenskurven in Abhängigkeit des Deletionsstatus der GISTIC Region 11q23.1

Von 190 Melanompatienten im Stadium II wurden mittels NGS CNV-Daten gewonnen. Mit dem Algorithmus GISTIC wurden signifikant amplifizierte und deletierte Regionen identifiziert. Überlebensanalysen für die fünf signifikanten Deletionen mit den kleinsten q-Werten wurden durchgeführt. Nach der Korrektur für multiples Testen waren lediglich Deletionen der Region 11q23.1 mit einem signifikant schlechteren OS assoziiert ($p = 0,0001$; HR = 4,75; 95% KI: 2,32 – 9,73). Die Abbildung stellt die Überlebenskurven für Patienten mit und ohne Deletion der 11q23.1 GISTIC Region jeweils für das RFS (A) und das OS (B) gegenüber. Die Kurven wurden bei 120 Monaten abgeschnitten, da die Nachbeobachtung von Stadium II Melanompatienten in der Regel nur über 10 Jahre erfolgt.

Die Ergebnisse der multivariaten Cox-Analysen des RFS und des OS sind in Tabelle 12 aufgeführt. Da in der Kohorte lediglich 55 Events für das RFS und 41 Events für das OS auftraten, wurden nur fünf Variablen in das Modell eingeschlossen. Auf die Analyse von Tumordicke und Ulzeration wurde verzichtet, da das Stadium über diese beiden Faktoren definiert ist. Es wurden Variablen gewählt, die für diese Studie von besonderem Interesse waren.

In der multivariaten Analyse des RFS waren das Alter und das Tumorstadium IIC mit einem verkürzten RFS assoziiert, wohingegen der Subtyp *NF1*, verglichen mit Triple-WT, mit einem verbesserten RFS einherging. Das Alter und die Tumorstadien IIB und IIC waren ebenfalls mit einem signifikant schlechteren OS assoziiert. Zudem wurde genau wie in der univariaten Analyse im Zusammenhang mit Deletionen der von GISTIC als signifikant identifizierten Region 11q23.1 ein schlechteres OS beobachtet ($p = 0,008$, HR = 2,85). Die TMB wies auch in der multivariaten Analyse keine Signifikanz auf.

Tabelle 12: Multivariate Cox-Analysen für RFS und OS (n = 190).

	Rezidivfreies Überleben (RFS)			Gesamtüberleben (OS)		
	HR	95% KI	p-Wert	HR	95% KI	p-Wert
Alter	1,03	1,01 - 1,05	0,010	1,09	1,05 - 1,13	1×10⁻⁶
TMB binär						
niedrig ($\leq 14,3$) [°]						
hoch ($> 14,3$)	1,20	0,65 - 2,21	0,56	1,19	0,52 - 2,71	0,68
Stadium						
IIA [°]						
IIB	1,20	0,60 - 2,40	0,61	2,52	1,003 - 6,33	0,049
IIC	2,72	1,41 - 5,27	0,003	6,88	2,72 - 17,43	5×10⁻⁵
Subtyp						
Triple-WT [°]						
<i>BRAF</i>	0,87	0,44 - 1,73	0,69	1,12	0,43 - 2,94	0,81
<i>RAS</i>	0,76	0,37 - 1,57	0,46	1,16	0,49 - 2,75	0,74
<i>NF1</i>	0,25	0,08 - 0,82	0,022	0,88	0,29 - 2,67	0,83
GISTIC Region 11q23.1						
Wildtyp [°]						
Deletion	1,04	0,58 - 1,86	0,90	2,85	1,31 - 6,19	0,008

[°] Referenzkategorie

4 Diskussion

4.1 Methodik und potenzielle Fehlerquellen

Da das NGS große Mengen an Daten generiert, wird für deren Auswertung von bioinformatischen bzw. statistischen Methoden Gebrauch gemacht. Diese Herangehensweisen stützen sich auf eine Reihe an Grundannahmen, die sich zum Teil zwischen verschiedenen Studien grundlegend unterscheiden. Auch hinsichtlich der Berechnung von TMB und Aneuploidie herrscht eine ausgeprägte Heterogenität (Melendez et al., 2018). Diese Abweichungen könnten zu widersprüchlichen Ergebnissen von Studien führen. Daher sollen an diese Stelle zunächst die wichtigsten verwendeten Methoden bezüglich Heterogenität und weiterer möglicher Fehlerquellen diskutiert werden.

4.1.1 Eigenschaften der verwendeten Gewebeproben

Die DNA für die Sequenzierung wurde aus FFPE-Tumorblöcken gewonnen. Da Stadium II Melanome teilweise eine sehr geringe Tumordicke von lediglich etwas mehr als 1 mm aufweisen (Kapitel 1.3.3.1), war es in einigen Fällen nicht möglich, genug DNA für das NGS zu gewinnen. Aufgrund dessen mussten einige Proben bereits vor der Sequenzierung ausgeschlossen werden. Eine wichtige Fehlerquelle ist, dass sowohl Tumor- als auch Normalgewebe aus demselben Gewebepblock gewonnen wurden. Durch eine ungenaue Dissektion der Abschnitte könnte es folglich in einigen Proben zu einer Kontamination der Normal-DNA mit Tumor-DNA gekommen sein. Dadurch wird die Detektion von Tumorvarianten verhindert oder erschwert. Außerdem ist es ebenfalls möglich, dass in der extrahierten Tumor-DNA ein großer Anteil an Normal-DNA vorhanden war. Da nur Varianten in die Analyse aufgenommen wurden, die eine Allelfrequenz von mindestens 5 % aufwiesen, könnte ein sehr geringer Tumoranteil die Detektion echter Varianten verhindern. Das Gleiche gilt jedoch auch für subklonale Varianten, die nur in einem kleinen Anteil der Tumorzellen zu finden sind. Für zwei Proben der Kohorte konnten weder Mutationen noch SCNAs identifiziert werden, wofür ein geringer Tumoranteil dieser Proben ursächlich sein könnte.

Auch die Fixierung mit Formalin und die anschließende Einbettung in Paraffin, eine Methodik, die sehr häufig zur Gewebekonservierung verwendet wird, stellt eine wichtige potenzielle Fehlerquelle dar. Hierdurch kann es zu Artefakten bei der Sequenzierung kommen, wie beispielsweise Transitionen von Cytosin zu Thymin und Fragmentierung der DNA (Do und Dobrovic, 2009; Greer et al., 1991; Melendez et al., 2018). Vor allem C>T Transitionen sind für viele der durchgeführten Analysen relevant. Diese können zur Detektion von Mutationen im Tumorgewebe führen, die vor der Fixierung des Gewebes nicht vorhanden waren. Daraus könnte unter anderem eine Überschätzung der TMB sowie der Mutationsfrequenz des *TERT* Promoters resultieren. Da auch UV-Strahlung klassischerweise C>T Transitionen zur Folge hat (Ikehata und Ono, 2011; Pfeifer et al., 2005), ist diese Fehlerquelle außerdem im Hinblick auf die Analyse der Mutational Signatures relevant.

Im Idealfall sollte nicht-fixiertes Gewebe dem FFPE Material vorgezogen werden (Allgäuer et al., 2018). Das ist jedoch, wie in der vorliegenden Studie, nicht immer möglich. Prentice et al. (2018) konnten hingegen zeigen, dass die Allelfrequenzen der durch FFPE verursachten Transitionen in der Regel bei unter 2 % liegen. Varianten mit einer Frequenz von bis zu 5 % wurden, wie in Kapitel 2.4.2 beschrieben, in den Variantenlisten nicht berücksichtigt. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die meisten durch FFPE entstandenen Transitionen herausgefiltert wurden. Für einige, sehr alte Proben kann allerdings eine Verfälschung nicht gänzlich ausgeschlossen werden (Prentice et al., 2018).

4.1.2 Berechnung der TMB

Ursprünglich wurde die TMB als die Anzahl nicht-synonymer SNVs pro Megabase des kodierenden Genoms im WES von Tumor-Normal-Probenpaaren definiert (Melendez et al., 2018). Die bedeutendste Abweichung zu dieser Herangehensweise in der vorliegenden Studie stellt die Sequenzierung der Proben mittels Targeted Panel Sequencing (TPS) dar. Auf die Verwendung von FFPE-Material wurde bereits im Abschnitt 4.1.1 eingegangen.

Aufgrund geringerer Kosten und einer kürzeren Sequenzierdauer stellt das TPS eine attraktive Alternative zum WES für die TMB-Analyse dar. Im Gegensatz zur

ursprünglichen Definition wird dabei nur ein kleiner Teil des Genoms sequenziert, wodurch die direkte Vergleichbarkeit der Werte grundsätzlich fraglich ist. In Studien wurde jedoch für Sequenzierpanels ausreichender Größe eine gute Korrelation mit WES TMB-Werten gezeigt (Chalmers et al., 2017; Rizvi et al., 2018). Chalmers et al. (2017) identifizierten eine Panelgröße von 1,1 Mb als Cutoff für eine suffiziente Aussagekraft. Da das verwendete Panel eine Größe von insgesamt 3,14 Mb aufwies, kann eine gute Abbildung der Gesamt-TMB angenommen werden. Außerdem ist die Auswahl der Gene eines Panels dahingehend verzerrt, dass typische Treibergene überrepräsentiert sind. Das kann theoretisch zu einer Überschätzung der Mutationslast führen. Wie in Kapitel 2.4.4 beschrieben, wurde deshalb bei der Berechnung der TMB für Mutationen in ausgewählten Krebsgenen korrigiert. Diese Herangehensweise wurde mit Hilfe verfügbarer TCGA Daten von Stadium II Melanompatienten validiert, wobei sich eine hohe Korrelation der Panel-Werte mit denen der ursprünglichen TMB-Definition zeigte (Abbildung 6). Daher kann insgesamt eine solide Aussagekraft des verwendeten Berechnungsverfahrens angenommen werden.

Ein großer Vorteil des TPS gegenüber dem WES ist neben Zeit- und Kostenaspekten die durchschnittlich höhere Sequenziertiefe der einzelnen Varianten. Diese ermöglicht eine bessere Sensitivität für die Detektion von Mutationen, auch in Proben mit geringem Tumorgehalt und großer Heterogenität des Tumors (Melendez et al., 2018). Eine weitere Stärke der Studie ist, dass Probenpaare aus Tumor- und Normalgewebe verwendet wurden, um somatische Mutationen zu identifizieren. Chalmers et al. (2017) verzichteten beispielsweise auf die Sequenzierung von Normalgewebe. Stattdessen wurden Keimbahnmutationen mittels verschiedener Algorithmen detektiert und herausgefiltert (Chalmers et al., 2017). Die zusätzliche Sequenzierung einer Normalprobe ist diesem statistischen Verfahren vorzuziehen, da auf diese Weise auch seltene Keimbahnvarianten von somatischen Mutationen unterschieden werden können (Melendez et al., 2018). Hierdurch fallen jedoch höhere Kosten für die Sequenzierung an.

Vor diesem Hintergrund kann insgesamt eine gute Aussagekraft der TMB sowie eine Vergleichbarkeit zu TMB-Werten in Studien, die von der ursprünglichen Definition Gebrauch machten, angenommen werden.

4.1.3 Identifizierung potenzieller Treibergene

Bioinformatische Algorithmen zur Identifikation potenzieller Treibergene unterscheiden sich hinsichtlich der gemessenen Ausprägung positiver Selektion zum Teil grundlegend voneinander. Daher können, in Abhängigkeit des verwendeten Algorithmus, sehr unterschiedliche Gene detektiert werden. In der Studie wurde deshalb eine Kombination aus den drei Algorithmen MutSigCV, OncodriveCLUST und OncodriveFM verwendet. Diese Kombination wurde bereits von Tamborero et al. (2013) empfohlen, da sich die Tools gut ergänzen.

MutSigCV identifiziert vor allem häufig mutierte Treibergene (Lawrence et al., 2013). Der Algorithmus MutSig wurde ebenfalls von Akbani et al. (2015) in der TCGA Melanom-Studie verwendet. OncodriveCLUST detektiert in erster Linie Onkogene, da besonders Gain-of-Function-Mutationen in Clustern vorkommen (Tamborero et al., 2013). OncodriveFM ist demgegenüber besser für die Detektion von Tumorsuppressorgenen geeignet (Tamborero et al., 2013). Aufgrund dieser grundlegenden Unterschiede und da mindestens zwei Algorithmen für die Nominierung signifikante q-Werte aufweisen mussten, ist es sehr wahrscheinlich, dass mögliche Treibergene übersehen wurden. Das trifft vor allem auf selten mutierte Gene zu, weil lediglich OncodriveFM unabhängig von der Mutationszahl arbeitet (Gonzalez-Perez und Lopez-Bigas, 2012). Des Weiteren muss beachtet werden, dass aufgrund der Verwendung eines Genpanels logischerweise auch nur Aussagen über die sequenzierten Gene gemacht werden können. Die Durchführung eines WES wäre prinzipiell für diese Analyse besser geeignet gewesen. Die molekularen Subtypen wurden zusätzlich separat analysiert, da sie sich zum Teil wesentlich voneinander unterscheiden (Akbani et al., 2015). Daher liegt nahe, dass auch verschiedene Treiber bei der Tumorentstehung eine Rolle spielen. Auf diese Weise ist es möglich Gene zu nominieren, die nur in einem Subtyp eine Rolle spielen. Die Detektion selten mutierter Treiber wird jedoch durch die kleinere Kohortengröße erschwert.

Eine häufig diskutierte Problematik stellt außerdem das durch die Algorithmen berechnete Hintergrundmodell der Mutationsfrequenz dar. Die Schwierigkeit besteht darin, dass sich nicht nur die Mutationsraten einzelner Tumoren und Tumorentitäten relevant voneinander unterscheiden. Es existieren auch große

Unterschiede zwischen verschiedenen Abschnitten des Genoms und innerhalb einzelner Gene. Wird diese Hintergrundmutationsrate unterschätzt, so steigt die Zahl an falsch-positiv detektierten Treibermutationen. Wird sie hingegen überschätzt, so werden Treiber schwerer erkannt und die Zahl der falsch-negativen nimmt zu (Lawrence et al., 2013). Die Berechnungsweisen der Hintergrundmodelle wurden bereits in Kapitel 2.4.6 beschrieben. Diese Herangehensweisen stellen allerdings eine starke Vereinfachung der Realität dar. Bei synonymen Mutationen, die von OncodriveCLUST für das Hintergrundmodell verwendet werden, wird beispielsweise über Auswirkungen auf die mRNA Prozessierung oder die Chromatin-Remodellierung spekuliert (Tamborero et al., 2013). Damit könnten sie ebenfalls einer positiven Selektion unterliegen. Lawrence et al. (2013) sind außerdem der Meinung, dass andere Formen der Heterogenität, wie beispielsweise Kataegis, weiterer Untersuchung bedürfen, um sie im Hintergrundmodell angemessen berücksichtigen zu können. Hess et al. (2019) kritisierten aktuelle Algorithmen, da sie die basenspezifische Variabilität im Hintergrundmodell nicht hinreichend abbilden und damit Mutations-Hotspots identifizieren, die eigentlich keiner positiven Selektion unterliegen. Diesbezüglich gibt es definitiv noch Verbesserungs- und Weiterentwicklungspotential.

Ein grundlegender Kritikpunkt betrifft die Definition von Treibergenen über das Vorliegen von Treibermutationen. Vogelstein et al. (2013) plädierten dafür, den Begriff des Treibergens auszudehnen, da auch epigenetische Mechanismen zur veränderten Expression eines Gens führen können. Daher kann es auch unabhängig von klassischen Mutationen zu einem Wachstumsvorteil der Zelle kommen. Die drei verwendeten Algorithmen basieren hingegen ausschließlich auf der Analyse somatischer Mutationen. Über epigenetische Mechanismen lagen in dieser Studie keine Informationen vor.

Insgesamt ist es folglich nicht möglich, alle Treibergene bzw. -mutationen mittels bioinformatischer Algorithmen zu identifizieren. Da zwei von drei Algorithmen signifikante q-Werte aufweisen mussten, ist eine Treiberrolle der detektierten Gene jedoch wahrscheinlich. Die Detektion eines Gens stellt allerdings keinen Beweis für hierfür dar. Es ist lediglich möglich potenzielle Treiber zu nominieren, deren Rolle anschließend in weiteren Studien evaluiert werden muss.

4.1.4 Aneuploidie als Surrogatmarker für CIN

Hinsichtlich der Messung chromosomaler Instabilität von Tumoren gibt es ebenfalls große Unterschiede zwischen verschiedenen Studien. Da die direkte Messung der CIN nur schwer möglich ist, werden in den meisten Fällen indirekte Methoden verwendet. Diese messen chromosomale Instabilität stellvertretend über Surrogatmarker. (Gordon et al., 2012; McGranahan et al., 2012)

Es existieren viele Studien, die sich mit den Auswirkungen von Aneuploidie auf die Krebsentwicklung und die zelluläre Fitness befassten. Zum Teil wurde die Aneuploidie hierbei als indirekter Surrogatmarker für chromosomale Instabilität verwendet (Miyazaki et al., 1999). Andere Studien analysierten demgegenüber die direkten Effekte der Aneuploidie (Davoli et al., 2017). Grundsätzlich ist es wichtig, zwischen Aneuploidie und CIN zu differenzieren, da Aneuploidie lediglich eine der möglichen Folgen chromosomaler Instabilität darstellt und auch andere Ursachen haben kann (Gordon et al., 2012; Lengauer et al., 1997; McGranahan et al., 2012). Des Weiteren ist zu beachten, dass Aneuploidie ein Resultat der nCIN ist, wobei die sCIN, die im Gegensatz dazu zu strukturellen Chromosomenabberationen führt, unberücksichtigt bleibt (McGranahan et al., 2012). In der Literatur wird Aneuploidie außerdem als mögliche Ursache für die Entwicklung genomischer Instabilität angesehen (Burrell et al., 2013; Holland und Cleveland, 2009). Daher kann bei der Betrachtung von Studienergebnissen oftmals nicht unterschieden werden, ob die Aneuploidie direkt oder die zugrundeliegende CIN ursächlich für die beobachteten Effekte war. In Kapitel 4.6.5 wird aufgrund dieser zum Teil untrennbaren Zusammenhänge sowohl auf Studien eingegangen, die die Effekte von CIN untersuchten, als auch auf solche, die sich mit Aneuploidie auseinandersetzten.

Die Messung der CIN über Aneuploidie als Surrogatmarker kann, im Vergleich zu anderen Verfahren wie beispielsweise der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) (Roylance et al., 2011), anhand von NGS-Daten erfolgen und stellt folglich eine attraktive Messmethode dar. Ein großer Nachteil dabei ist, dass lediglich ein Zeitpunkt während der Tumorprogression abgebildet werden kann (Lengauer et al., 1997), was dem Verständnis von CIN als sukzessiven Zugewinn von Veränderungen über die Zeit (Lengauer et al., 1998; Miyazaki et al., 1999) nicht gerecht

wird. Die Veränderung des Karyotyps über die Zeit anhand von Biopsaten zu messen ist jedoch bisher quasi nicht möglich (Geigl et al., 2008). Auch die Heterogenität des Tumors, die ebenfalls eine Folge der CIN darstellt (Geigl et al., 2008), wird bei der Analyse von Aneuploidie über NGS-Daten vernachlässigt. Wie in der Studie von Taylor et al. (2018) wurde für die Auswertung ein Aneuploidie-Score entwickelt, der sich über die Anzahl ganzer Chromosomenarme, die im Tumor von SCNAs betroffen sind, errechnet. Ben-David und Amon (2019) kritisierten, dass bei dieser Herangehensweise die unterschiedliche Größe der Chromosomenarme vernachlässigt wird. Als Folge dessen ist es möglich, dass ein Abschnitt mit einer hohen Zahl betroffener Gene auf einem großen Chromosomenarm nicht berücksichtigt wird, der auf einem kleinen Arm in die Berechnung eingeflossen wäre. Da die Anzahl betroffener Gene mit dem resultierenden Phänotyp korreliert, postulierten die Autoren, dass die Aneuploidie durch die Definition eines uniformen Grenzwertes für die Größe der berücksichtigten Regionen besser abgebildet würde. Die meisten Studien machen jedoch von der klassischen Definition der Aneuploidie Gebrauch. Daher sprachen sich die Autoren dafür aus, diese Herangehensweise beizubehalten, um Heterogenität zu vermindern. (Ben-David und Amon, 2019)

4.2 Besonderheiten der Stadium II Kohorte

Die analysierte Kohorte bestand ausschließlich aus Stadium II Tumoren. Daher werden an dieser Stelle zuerst einige Abweichungen zu Ergebnissen früherer Studien, die vor allem Melanome höherer Stadien beinhalteten, diskutiert. Es stellt sich die Frage, ob diese Unterschiede auf den selektiven Einschluss der Patienten zurückgehen oder ob andere Diskrepanzen der Studienkohorten dafür ursächlich sind. Da ein direkter Vergleich der verschiedenen Stadien des Melanoms nicht Gegenstand der Auswertung war, kann diese Frage nicht mit abschließender Sicherheit beantwortet werden.

4.2.1 Anteile der molekularen Subtypen und Histologien

ALM waren mit einem Anteil von 17,1 % der Kohorte verglichen mit 5-10 % in einer großen Melanomstudie aller Tumorstadien überrepräsentiert (Garbe und Leiter, 2009). Gleichzeitig waren SSM mit 36,8 % der Tumoren gegenüber 60 % der Melanome in der deutschen Bevölkerung deutlich unterrepräsentiert (Garbe und Leiter, 2009). Es ist denkbar, dass diese Unterschiede durch eine durchschnittlich höhere Tumordicke der ALM zum Diagnosezeitpunkt zu erklären sind (Kuchelmeister et al., 2000). Bradford et al. (2009) beobachteten, dass viele ALM im Stadium II diagnostiziert wurden. Tumoren anderer Histologien wurden hingegen häufiger bereits im sehr frühen Stadium I entdeckt (Bradford et al., 2009). Eine andere Erklärung könnte jedoch auch der selektive Einschluss von Tumoren sein, die am UKT exzidiert worden waren. Möglicherweise ist das ALM durch dessen subunguale oder palmoplantare Lokalisation (Clark et al., 1986) für eine schwierige Exzision prädestiniert, was die Therapie an einer Universitätsklinik notwendig machen könnte.

Auch der *BRAF* Subtyp war mit einem Anteil von 30,1 % im Vergleich zu früheren Studienergebnissen unterrepräsentiert. In der Literatur wiesen in der Regel zwischen 40 % und 60 % der Melanome *BRAF* Hotspot-Mutationen auf (Akbari et al., 2015; Greaves et al., 2013; Long et al., 2011). Tumoren des *BRAF* Subtyps machten in der analysierten Kohorte einen großen Anteil der SSM aus, jedoch nur einen kleinen der ALM (Abbildung 5). Dieser Zusammenhang wurde bereits

von Maldonado et al. (2003) beschrieben. Daher besteht vermutlich ein Zusammenhang zu den bereits diskutierten Abweichungen bezüglich der Histologien. *BRAF* Mutationen sind für eine frühe Entstehung während der Melanomagenese bekannt (Shain et al., 2015b). Daher ist es unwahrscheinlich, dass der Unterschied im selektiven Einschluss von Stadium II Patienten begründet liegt. Thomas et al. (2015) beobachteten jedoch ebenfalls eine *BRAF* Mutationsrate von 30 % in einer Kohorte mit einem großen Anteil dünner Primärtumoren. Eine andere Studie stellte außerdem die signifikante Assoziation von *BRAF* Mutationen mit einem höheren Tumorstadium fest (Kim et al., 2015). Dies impliziert, dass es aller Wahrscheinlichkeit nach in manchen Fällen auch während der Tumorprogression zu einer Akquisition von *BRAF* Mutationen kommt, was wiederum mit einer größeren Mutationsfrequenz in höheren Stadien einhergehen würde. Der Anteil an Tumoren mit *BRAF* V600E und V600K Mutationen, die mit über 90 % den Großteil der *BRAF* Hotspot Mutationen ausmachten (Abbildung 3), ist auch aus klinischer Sicht relevant. Eine adjuvante Therapie mit *BRAF*-Inhibitoren könnte möglicherweise in frühen Tumorstadien das Rückfallrisiko verringern. Der Einsatz einer adjuvanten Therapie mit Dabrafenib und Trametinib wurde für das Stadium III in einer doppelblinden, Placebo-kontrollierten Studie untersucht (Long et al., 2017). Diese adjuvante Kombinationstherapie hatte eine signifikant geringere Rezidivrate zur Folge (Long et al., 2017). Satzger et al. (2015) beschrieben außerdem eine hohe Konkordanz zwischen *BRAF* Mutationen im Primarius und im entsprechenden Metastasengewebe. Das deutet auf eine positive Selektion dieser Mutationen während der Tumorprogression hin. Es liegt daher nahe, dass auch Tumoren in lokalisierten Tumorstadien von der Therapie mit *BRAF*-Inhibitoren profitieren könnten. Diese Frage konnte jedoch mit den vorhandenen Daten nicht untersucht werden. Stattdessen werden diesbezüglich Placebo-kontrollierte Studien an Stadium II Patienten benötigt. Eine adjuvante Therapie könnte vor allem im Stadium IIC sinnvoll sein, da sich für diese Patienten die 5- und 10-Jahres-Überlebensraten im Bereich derer des Stadiums IIIB bewegen (Gershenwald et al., 2017). Obwohl der *BRAF* Subtyp einen geringeren Anteil der Tumoren ausmachte als in anderen Studien beschrieben, könnten dennoch

theoretisch 55 Patienten, bzw. 28,5 % der Kohorte, mit einer V600E oder V600K Mutation von der Therapie mit BRAF- und MEK-Inhibitoren profitieren.

4.2.2 Höhe der TMB

Das maligne Melanom ist eine Tumorentität, die sich verglichen mit den meisten anderen soliden Tumoren durch eine sehr hohe Mutationslast auszeichnet. (Alexandrov et al., 2013a; Chalmers et al., 2017). Als wichtigster Grund hierfür wird die oftmals hochgradige Schädigung der DNA durch UV-Strahlung angesehen (Greenman et al., 2007). In großen Melanom-Studien wurden mediane Mutationslasten von 14,4 var/Mb (Chalmers et al., 2017; Hodis et al., 2012) bzw. eine durchschnittliche TMB von 16,8 var/Mb (Akbari et al., 2015) berichtet. Die mediane TMB der hier analysierten Kohorte lag mit 14,3 var/Mb (IQR: 4,3 - 40,2 var/Mb) geringfügig unter diesen Werten. In den genannten Studien wurden allerdings Tumoren aller Stadien berücksichtigt.

Im direkten Vergleich zu den TCGA Stadium II Melanom-Daten ergab sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der TMB. In den TCGA Proben lag der Median mit 12,6 var/Mb (IQR: 5,0 – 22,4 var/Mb) etwas unter dem der Tübinger Kohorte. Es ist fraglich, ob die Differenzen zu den oben genannten Melanom-Studien durch den selektiven Einschluss von Stadium II Patienten zu erklären sind oder ob sich hier lediglich die Heterogenität der TMB-Analyse (Kapitel 4.1.2) sowie Unterschiede bei der Zusammensetzung der Kohorten widerspiegeln. Conic und Arbesman (2018) untersuchten ebenfalls anhand von TCGA Daten potenzielle Unterschiede zwischen den TMB-Werten in Melanomen verschiedener Stadien. Sie konnten jedoch keine signifikanten Abweichungen feststellen (Conic und Arbesman, 2018). Das unterstützt die Annahme, dass der geringere TMB-Median der analysierten Kohorte nicht auf dem selektiven Einschluss von Patienten im Tumorstadium II basiert.

4.3 Eigenschaften der Histologien und molekularen Subtypen

Die Einteilung von Melanomen in molekulare Subtypen ist, wie im Abschnitt 4.2.1 erwähnt, aufgrund der therapeutischen Anwendung von BRAF- und MEK-Inhibitoren auch aus klinischer Sicht relevant. Wie zuvor in der Literatur beschrieben, lagen *BRAF* und *RAS* Hotspot-Mutationen auch in dieser Stadium II Kohorte nicht gleichzeitig im Tumor vor, was für eine funktionelle Redundanz dieser Varianten spricht (Akbari et al., 2015; Davies et al., 2002; Goel et al., 2006). *BRAF* Hotspot-Mutationen wurden ebenfalls in der Kohorte nicht mit LoF-Mutation des *NF1* Gens beobachtet. Letztere traten jedoch zusammen mit *RAS* Hotspot-Mutationen auf. Ein ähnlicher Zusammenhang wurde auch von Akbari et al. (2015) beschrieben. Das unterstreicht die wichtige Rolle dieser Alterationen bei der Melanomentstehung.

Vor der Einführung der molekularen Klassifikation wurden Melanome hauptsächlich anhand der Histologie eingeteilt. An dieser Stelle soll auf die klinischen Attribute sowie die TMB und UV-Signatur der verschiedenen Histologien und Subtypen im Stadium II eingegangen werden. Auf Unterschiede zwischen den Subtypen hinsichtlich detektierter Tumortreiber und positiv selektierter SCNAs sowie den Auswirkungen auf das Outcome wird an späterer Stelle eingegangen.

4.3.1 Unterschiede bei TMB und UV-Exposition

Die TMB unterschied sich in der Kohorte signifikant zwischen Tumoren verschiedener Subtypen, Histologien und Lokalisationen (Abbildung 8). Ursächlich dafür ist am ehesten eine Assoziation dieser Attribute mit verschiedenen Graden der UV-Exposition. Curtin et al. (2005) stellten die Hypothese auf, dass sich je nach Grad der UV-Exposition genetisch verschiedene Melanome entwickeln. Diese genetische Diversität geht auch mit grundlegenden klinischen Unterschieden einher (Curtin et al., 2005). Insgesamt war in der gesamten Kohorte die UV-Signatur 7 vorherrschend (Alexandrov et al., 2013a). Vor allem in Tumoren mit hoher Mutationslast wurde diese Signatur besonders häufig beobachtet (Abbildung 9). Das unterstützt die Hypothese, dass eine exzessive UV-Exposition mit einer hohen TMB des Tumors einhergeht (Greenman et al., 2007).

NF1 Tumoren sowie LMM wiesen in der Kohorte die höchsten TMB-Werte auf. Tumoren beider Gruppen waren zu einem Großteil im Kopf-Hals-Bereich lokalisiert. Diese Lokalisation passt zu der Beschreibung des LMM als Neoplasie der chronisch sonnenexponierten Areale des Körpers (Clark et al., 1969; Whiteman et al., 2006). Eine starke Assoziation zwischen *NF1* Tumoren und der UV-Signatur wurde bereits von Akbani et al. (2015) und Cirenajwis et al. (2017) beschrieben. Tumoren der beiden Gruppen wiesen auch in der Stadium II Kohorte zum größten Teil eine UV-Dominanz auf (Tabelle 4, Tabelle 5). *NF1* Patienten waren mit einem Median von 78 Jahren außerdem signifikant älter als die Patienten der anderen Subtypen, was in einer höheren kumulativen Sonnenexposition begründet sein könnte. Das passt zu den Ergebnissen anderer Studien (Akbani et al., 2015; Krauthammer et al., 2015; Menzies et al., 2012). Beim LMM lag eine klare Dominanz des *NF1* (50 %) und des Triple-WT Subtyps (40 %) vor. Tumoren des *NF1* Subtyps wiesen wiederum häufig die Histologien NM und LMM auf. Diese Überschneidungen könnten für die genannten Gemeinsamkeiten zwischen LMM und dem *NF1* Subtyp verantwortlich sein.

Für Triple-WT Tumoren und ALM wurde die niedrigste TMB beobachtet. Zwischen den beiden Gruppen gab es große Überschneidungen. Triple-WT Tumoren machten mehr als die Hälfte der ALM aus. ALM waren außerdem besonders häufig an der unteren Extremität lokalisiert, die ebenfalls mit einer sehr geringen TMB assoziiert war. Die niedrige TMB von ALM und Triple-WT Melanomen spiegelt sich in den Signatur 7 Anteilen dieser Tumoren wider. Vor allem in ALM hatte die UV-Signatur mit 6,1 % nur einen sehr geringen Einfluss (Tabelle 5). ALM sind für eine UV-unabhängige Entstehung bekannt (Hayward et al., 2017), was aufgrund der der palmoplantaren oder subungualen Lokalisation naheliegt (Clark et al., 1986). Das ALM stellte aufgrund einer geringen Streuung der TMB-Werte einen guten Prädiktor für eine niedrige TMB dar. Des Weiteren wiesen Triple-WT Tumoren unter den molekularen Subtypen den kleinsten Anteil der UV-Signaturdominanten Proben auf. Dieser lag jedoch mit 41,3 % noch immer weit über dem der ALM (Tabelle 4, Tabelle 5). Auch die Streuung der TMB-Werte war im Vergleich zum ALM größer (Abbildung 8). Bereits Cirenajwis et al. (2017) und Akbani et al. (2015) beobachteten die niedrigste TMB im Triple-WT Subtyp. In den Triple-

WT Tumoren, die nicht von der UV-Signatur dominiert waren, hatte vor allem die Signatur 1 einen großen Einfluss. Insgesamt wurde diese in der gesamten Kohorte, nach Signatur 7, am zweithäufigsten beobachtet. Signatur 1 ist mit dem Alter assoziiert und wurde schon zuvor in malignen Melanomen beschrieben (Alexandrov et al., 2013a). Des Weiteren zeigten einzelne Proben einen hohen Anteil anderer Signaturen, wie beispielsweise 3, 6, 11, 16 und 30. Dies impliziert, dass in Tumoren, die UV-unabhängig entstehen, vielfältige Prozesse zur Tumorentstehung beitragen können. Es muss jedoch beachtet werden, dass der Algorithmus bei einer sehr kleinen Anzahl an Mutationen im Tumorgewebe Schwierigkeiten mit der Zuordnung der Signaturen hat. Daher müssen die Ergebnisse in den entsprechenden Proben zurückhaltend interpretiert werden. Auf Signaturen, die nur in einzelnen Proben dominant waren, soll deshalb an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden.

BRAF und *RAS* Tumoren sowie SSM und NM wiesen insgesamt moderate TMB-Werte auf. *BRAF* Melanome und SSM waren vergleichsweise häufig am Rumpf lokalisiert, was zu einer intermittierenden UV-Exposition passt. Mit einer intermittierenden UV-Exposition wurden diese Gruppen schon zuvor in Verbindung gebracht (Kim et al., 2015; Naldi et al., 2005; Whiteman et al., 2006). *BRAF* Patienten waren außerdem signifikant jünger als der Rest der Kohorte. Dieser Zusammenhang wurde ebenfalls zuvor beschrieben (Akbari et al., 2015; Menzies et al., 2012).

NM waren, wie bereits von Clark et al. (1986) beobachtet, auf verschiedene Lokalisationen verteilt. Trotz der moderaten TMB-Werte von *RAS* Melanomen wurden diese in der Literatur mit einer chronischen Sonnenexposition in Verbindung gebracht (Shain und Bastian, 2016). In der analysierten Stadium II Kohorte war der Anteil an Proben mit einer Dominanz der UV-Signatur jedoch nur unwesentlich größer als im *BRAF* Subtyp. Damit zeigte sich für die Subtypen *RAS* und *BRAF* hinsichtlich TMB und UV-Signatur ein sehr ähnliches Verhalten.

Zusammenfassend wurden in der Stadium II Kohorte Assoziationen zwischen UV-Exposition, TMB, molekularem Subtyp und Histologie des Tumors sowie dem Patientenalter beobachtet. Diese Beobachtungen unterstützen die Hypothese, dass es in Abhängigkeit des Grades der UV-Exposition zur Entwicklung

genetisch verschiedener Melanome kommt (Bastian, 2014; Curtin et al., 2005; Shain und Bastian, 2016). Die Histologien unterschieden sich hinsichtlich des Vorliegens der Signatur 7 zum Teil deutlicher als die molekularen Subtypen (Tabelle 5).

Die Kenntnis der Faktoren, die die TMB maßgeblich beeinflussen, ist auch aus klinischer Sicht relevant, da damit bereits vor der Sequenzierung eines Tumors die Abschätzung der TMB ermöglicht werden könnte. Interessant wäre dies vor allem, sollte die TMB als prädiktiver Biomarker für das Ansprechen von Immuntherapien in der Klinik etabliert werden. Möglicherweise könnten die hohen Kosten des NGS sogar eingespart werden. In der analysierten Kohorte zeigte sich jedoch für die meisten Faktoren eine deutliche Streuung der Werte. Dies könnte eine Prädiktion des TMB-Wertes für einzelne Patienten anhand dieser Parameter erschweren. Allein die Histologie ALM präsentierte sich als guter Hinweis auf das Vorliegen einer niedrigen TMB in der Probe. Möglicherweise wäre eine gute Prädiktion der Werte über das Einbeziehen vieler verschiedener Faktoren möglich. Um dies zu evaluieren werden jedoch weitere Studien mit großen Patientenzahlen benötigt. Daher sollte auch die Einteilung der Melanome in verschiedene Histologien nicht vollständig durch die molekularen Subtypen ersetzt, sondern besser um diese ergänzt werden.

4.3.2 Häufigkeit der *TERT* Promoter Mutationen

Auch die Mutationsfrequenzen der *TERT* Promoter Hotspots unterschieden sich zwischen den molekularen Subtypen. Der Anteil an mutierten Proben war dabei im *NF1* Subtyp am größten. Triple-WT Tumoren waren im Vergleich zu Melanomen anderer Subtypen wesentlich seltener von *TERT* Promoter Hotspot-Mutationen betroffen. Dieser Zusammenhang wurde bereits von Akbani et al. (2015) in der TCGA Kohorte beobachtet, wobei dort der Anteil an mutierten Proben im Triple-WT Subtyp mit unter 10 % noch wesentlich geringer war. Die Autoren vermuteten für Triple-WT Tumoren einen alternativen Weg der *TERT* Aktivierung (Akbani et al., 2015). In der Stadium II Kohorte wäre das häufige Vorliegen von *TERT* Amplifikationen in Triple-WT Tumoren (Tabelle 10) als aktivierende Alteration denkbar. Für einige der Melanome wurde jedoch weder eine Amplifikation

des *TERT* Gens noch eine Mutation des Promoters nachgewiesen. In diesen Tumoren könnten eventuell andere, zum Beispiel epigenetische, Aktivierungsmechanismen eine Rolle spielen. Außerdem wurden auch im häufig mutierten *NF1* Subtyp viele *TERT* Amplifikationen beobachtet. Die *TERT* Region war allerdings in der GISTIC Analyse des *NF1* Subtyps im Gegensatz zur Triple-WT Subkohorte nicht signifikant amplifiziert. Daher könnte es sich um einen Zufall handeln, dass diese Region in *NF1* Tumoren von einer Amplifikation mitbetroffen war.

In der Literatur werden Hotspot-Mutationen des *TERT* Promoters mit chronischer oder intermittierender UV-Exposition in Verbindung gebracht (Heidenreich et al., 2014). Mehrere Studien beobachteten, dass ALM Tumoren seltener von den besagten Mutationen betroffen waren (de Unamuno Bustos et al., 2016; Griewank et al., 2014; Heidenreich et al., 2014). Auch Zehir et al. (2017) wiesen *TERT* Promoter Mutationen vor allem in kutanen Melanomen nach. Diese Hypothese wird in der analysierten Kohorte durch einen signifikanten Zusammenhang der *TERT* Mutationen mit der UV-Signatur unterstützt. Das könnte als Erklärung für die unterschiedlichen Mutationsfrequenzen in den Subtypen *NF1* und Triple-WT dienen (siehe auch Kapitel 4.3.1). In anderen Studien wurde außerdem eine Assoziation von *TERT* Promoter Mutationen mit *BRAF* und *NRAS* Mutationen gefunden (Griewank et al., 2014; Heidenreich et al., 2014), passend zu den hohen Mutationsfrequenzen in *BRAF* und *RAS* Tumoren.

Horn et al. (2013) beobachteten eine Mutationsfrequenz von 85 % in metastatischem Gewebe und demgegenüber lediglich 33 % in Primärtumoren. Die Stadium II Melanome der Tübinger Kohorte wiesen im Vergleich dazu eine wesentlich höhere Mutationsfrequenz auf. Horn et al. (2013) räumten ein, dass die Sensitivität im Gewebe der Primärtumoren aufgrund einer Kontamination mit Normalgewebe möglicherweise herabgesetzt war, was diese Abweichung zum Teil erklären könnte. Außerdem wurde in der genannten Studie nicht angegeben, um welches Tumorstadium es sich bei den jeweiligen Primärtumoren handelte. Griewank et al. (2014) beschrieben ebenfalls eine signifikant höhere Mutationsfrequenz des *TERT* Promoters in Metastasengewebe im Vergleich zu Primärtumoren. Weiterhin gibt es Evidenz für eine Assoziation dieser Mutationen mit aggressiven Tumoreigenschaften (Heidenreich et al., 2014; Nagore et al., 2016;

Pópulo et al., 2014). Shain et al. (2015b) beobachteten hingegen bereits in intermediären Läsionen und in-situ Melanomen eine Mutationsfrequenz von 77 %, was auf ein sehr frühes Auftreten dieser Veränderungen schließen lässt. Bei ausschließlicher Betrachtung der Proben mit einer guten Sequenziertiefe der Hotspot-Positionen wiesen in der Stadium II Kohorte 61,5 % der Tumoren eine entsprechende Mutation auf. Dieser hohe Wert passt zu den Beobachtungen von Shain et al. (2015b) und unterstützt die Hypothese, dass *TERT* Mutationen meist früh während der Tumorgenese entstehen.

4.4 Treibergene des Melanoms im Stadium II

Die Entdeckung von Treibergenen hat wesentlich zum Verständnis verschiedener Krebserkrankungen beigetragen, indem zentrale Mechanismen und Signalwege der Krebsentstehung ermittelt werden konnten. Die Identifikation weiterer Treibergene ist noch immer eines der Hauptziele der Krebsforschung. Aus klinischer Sicht ist das vor allem im Hinblick auf die Entwicklung und den Einsatz von Signaltransduktions-Inhibitoren von zunehmender Bedeutung. Auf diese Weise können beispielsweise neue Therapietargets identifiziert werden. Außerdem ist es möglich, durch die NGS Analyse von Tumorproben eine Aussage darüber zu treffen, welche Patienten von bereits zugelassenen Substanzen profitieren könnten.

4.4.1 Überschneidung zu Melanomen höherer Stadien

Die meisten detektierten Gene, die in dieser Analyse sehr niedrige q-Werte in vielen Algorithmen aufwiesen, wurden bereits in früheren Studien als Treiber des malignen Melanoms beschrieben. Hierzu zählen die schon lange bekannten Treibergene *BRAF* (Davies et al., 2002), *NRAS* (Padua et al., 1984) und *NF1* (Andersen et al., 1993) sowie *PTEN* (Guldberg et al., 1997), *CDKN2A* (Hussussian et al., 1994; Kamb et al., 1994), *KIT* (Curtin et al., 2006) und *TP53* (Hodis et al., 2012; Ragnarsson-Olding et al., 2002). Außerdem wurden auch Gene in der Kohorte detektiert, die erst in den letzten zehn Jahren als Treiber des Melanoms nominiert wurden. Dazu gehörten beispielsweise *PPP6C* (Hodis et al., 2012), *MAP2K1* (Nikolaev et al., 2011) und *ARID2* (Krauthammer et al., 2012). Auch *MECOM* wurde zuvor als mögliches Onkogen (Bailey et al., 2018) und *ADAMTS18* als Tumorsuppressorgen des kutanen Melanoms identifiziert (Wei et al., 2010). Das für eine Protein-Tyrosinkinase kodierende Gen *EPHA3* wurde ebenfalls in einer vorherigen Studie als Tumortreiber des Melanoms beschrieben (Ding et al., 2014). Die erneute Detektion der genannten Gene in dieser neuen Melanomkohorte erhärtet den Verdacht, dass diese tatsächlich eine Treiberrolle innehaben. Abgesehen davon wurde *CBL* bereits im desmoplastischen Melanom als Treiber diskutiert (Shain et al., 2015a).

In den meisten Studien des malignen Melanoms machte Metastasengewebe einen großen Anteil der analysierten Proben aus. Das trifft auch für die Arbeiten von Hodis et al. (2012) sowie Akbani et al. (2015) zu, die ebenfalls Treibergene mittels statistischer Methoden identifizierten. Die Tatsache, dass sehr viele bekannte Treibergene auch in der analysierten Stadium II Kohorte detektiert wurden und ein großer Anteil der Tumoren eine entsprechende Mutation dieser Gene aufwies (Abbildung 11), legt eine relativ frühe Entstehung der Veränderungen während der Tumorgenese und -progression nahe. Daraus leitet sich die Frage nach der Rolle dieser Gene bei der Metastasierung ab. Diesbezüglich sind zwei Hypothesen naheliegend.

Auf der einen Seite ist es denkbar, dass Mutationen dieser Gene lediglich Treiber der Tumorinitiation darstellen und allein für die Metastasierung nicht ausreichend sind. Dann wäre es nötig, dass während der Tumorprogression weitere genetische Veränderungen hinzukommen. Dies könnte wiederum durch Alterationen begünstigt werden, die beispielsweise DNA-Reparaturmechanismen betreffen.

Auf der anderen Seite wäre es möglich, dass Tumoren im Stadium II bereits die Fähigkeit der Metastasenbildung besitzen und es nur noch nicht zu einer klinischen Manifestation von Fernmetastasen kam. Shain und Bastian (2016) stellten auf Grundlage diverser Studien die Hypothese auf, dass schon im sehr frühen Stadium Melanomzellen disseminieren. Möglicherweise werden diese freien Tumorzellen durch das Immunsystem bekämpft, was eine Metastasenbildung vorerst und in vielen Fällen auch langfristig verhindern könnte. Ob bestimmte Treibermutationen für die Metastasierung verantwortlich sind, ist allerdings bisher nicht abschließend geklärt (Shain und Bastian, 2016).

Eine Assoziation zwischen dem Vorliegen von Mutationen in einem Gen und einem verkürzten RFS könnte auf dessen zentrale Rolle bei der Metastasierung hinweisen. Da alle beobachteten Rezidive nicht an der Lokalisation des Primarius auftraten, kann davon ausgegangen werden, dass bereits zum Zeitpunkt der Tumorexzision Zellen disseminiert waren und die Fähigkeit zur Metastasierung somit bereits im Stadium II vorlag. Aufgrund dieser Überlegungen wurde der Einfluss von Mutationen der detektierten Treibergene auf RFS und auch OS analysiert. Die Ergebnisse dieser Analysen werden im Kapitel 4.6.6 diskutiert.

4.4.2 Unterschiede zwischen den molekularen Subtypen

Wie auch für viele andere Tumorattribute zeigten sich hinsichtlich der Mutationsfrequenzen nominierter Treibergene zum Teil grundlegende Unterschiede zwischen den molekularen Subtypen.

In *NF1* Tumoren lagen für die meisten Gene hohe Mutationszahlen vor, in Triple-WT Tumoren im Vergleich dazu besonders geringe. Das hängt aller Wahrscheinlichkeit nach mit den bereits diskutierten Unterschieden der TMB-Werte zusammen (Kapitel 4.3.1). Auch Cirenajwis et al. (2017) machten diese Beobachtung und führten sie ebenfalls auf eine erhöhte Mutationsrate von *NF1* Tumoren zurück. Es wäre hingegen auch denkbar, dass vor allem in Triple-WT Tumoren alternative Mechanismen zu Alterationen von Treibergenen führen. Akbani et al. (2015) beobachteten beispielsweise in diesen Tumoren besonders viele CN-Segmente und fokale Amplifikationen von Onkogenen. Auch in der analysierten Kohorte waren viele Proben des Triple-WT Subtyps von SCNAs in zuvor beschriebenen oder von GISTIC identifizierten Treibergenen betroffen (Kapitel 3.8).

Bei der Suche nach potenziellen Treibergenen in der Triple-WT Kohorte wurden die Gene *KIT*, *COL3A1*, *CBL* und *BRAF* nominiert. Bereits Siroy et al. (2015) beschrieben eine signifikante Häufung von *KIT* Mutationen in akralen und mukosalen Melanomen. Die in der hier vorliegenden Arbeit beobachtete negative Assoziation von *KIT* Mutationen mit den Subtypen *BRAF* und *RAS* deutet außerdem auf eine funktionelle Redundanz dieser Alterationen hin. Das ist auch aus funktioneller Sicht naheliegend, da *KIT* zu einer Aktivierung des MAPK-Signalwegs beiträgt (Reddy et al., 2017). Gegebenenfalls könnte es sich daher um einen fünften molekularen Subtyp des malignen Melanoms handeln. In der Kohorte wurden jedoch in einigen Proben gleichzeitig Mutationen des *NF1* Gens detektiert (Supplement 7). Auf die *KIT* Mutationen wird im Abschnitt 4.4.3 näher eingegangen. Das Gen *CBL* wird in Kapitel 4.4.4 näher beleuchtet. Die Detektion des Gens *BRAF* in der Triple-WT Kohorte könnte darauf hindeuten, dass auch Mutationen, die nicht die typischen *BRAF*-Hotspots betreffen, zu einer Aktivierung des MAPK-Signalwegs beitragen und damit einer positiven Selektion unterliegen.

Für Gene, die im gleichen Tumor häufig zusammen mutiert sind, ist eine kooperierende Funktion bei der Tumorgenese denkbar. Das gilt auch für Gene, die nur in einem bestimmten Subtyp detektiert wurden. *TP53* wurde neben der Gesamtkohorte beispielsweise lediglich in Tumoren des *NF1* Subtyps als Treiber nominiert. Bereits Cirenajwis et al. (2017) beobachteten *TP53* Mutationen besonders häufig in *NF1* Tumoren. Auch Akbani et al. (2015) beschrieben eine hohe Mutationsfrequenz des *TP53* Gens in *NF1* Melanomen. Das könnte bedeuten, dass Alterationen dieser Gene bei der Karzinogenese zusammenwirken. Dieser Zusammenhang könnte jedoch auch dadurch mediiert sein, dass sowohl *NF1* Mutationen als auch *TP53* Mutationen häufig in Tumoren präsent waren, die eine UV-Schädigung aufwiesen (Kapitel 4.3.1 und 4.4.5).

Auch *HGF* wurde von den vier Subtypen lediglich in *NF1* Tumoren als Treiber nominiert. Das Gen *HGF* kodiert für ein Protein, das mit der Rezeptor-Tyrosinkinase c-MET an der Zelloberfläche interagiert (Bottaro et al., 1991). Die intrazelluläre Signalweiterleitung erfolgt unter anderem über den MAPK- und den PI3K-Signalweg (Ponzetto et al., 1996; Trusolino et al., 2010). Es wurde gezeigt, dass über diese Signalwege auch ein anti-apoptotischer Effekt vermittelt wird (Xiao et al., 2001). Im Gegensatz zu benignen Melanozyten sekretieren Melanomzellen *HGF*, was zu einer autokrinen Stimulation des c-MET Rezeptors führt (Czyz, 2018; Otsuka et al., 1998). Da das Gen *HGF* in dieser Stadium II Kohorte von bioinformatischen Algorithmen als potenzieller Treiber identifiziert wurde, wäre es denkbar, dass Mutationen des Gens möglicherweise zu einer gesteigerten Sekretion oder Wirkung von *HGF* beitragen. Obwohl *HGF* nicht durch OncodriveCLUST detektiert wurde, gab es in der Kohorte eine relative Häufung von E199K Mutationen, die damit von besonderer Relevanz sein könnten.

Für *PPP6C* wurde ein Zusammenhang zwischen Hotspot-Mutationen des Gens und dem *RAS* Subtyp bereits von Akbani et al. (2015) beobachtet. Auch in der analysierten Stadium II Kohorte wurde *PPP6C* neben der Gesamtkohorte lediglich im *RAS* Subtyp als Treiber nominiert. *ARID2* und *EPHA3* waren ebenfalls nur in *RAS* Tumoren signifikant.

4.4.3 *KIT* Mutationen als mögliche Therapietargets im Stadium II

In der Kohorte wurden unter anderem fünf L576P Mutationen sowie eine K642E und eine V559A Mutation des *KIT* Gens beobachtet (Supplement 7), die die Juxtamembrandomäne des Rezeptors betrafen (Curtin et al., 2006). Auch in der Melanomkohorte von Curtin et al. (2006) wurden diese Mutationen detektiert, was für ein regelhaftes Vorkommen in Melanomen spricht. Garrido und Bastian (2010) fassten *KIT* Mutationen einiger Melanom-Studien zusammen, wobei ebenfalls besonders häufig die Varianten L576P und K642E beobachtet wurden. Gleiches gilt für eine Studie von Cirenajwis et al. (2017), wo außerdem zwei N822K Mutationen des *KIT* Gens gefunden wurden. Diese Variante wurde einmal in der vorliegenden Stadium II Kohorte detektiert (Supplement 7).

KIT Mutationen sind von klinischem Interesse, da sie zum Teil mit einem guten Ansprechen des Tumors auf KIT-Inhibitoren, wie beispielsweise Imatinib, assoziiert sind. Antonescu et al. (2007) beobachteten, *in vitro*, eine Imatinib- und Dasatinib-Sensitivität von analen Melanomen, welche eine L576P Mutation aufwiesen. Auch in klinischen Studien zeigte sich vor allem für Mutationen der Exone 11 und 13, die unter anderem die Aminosäuren L576, V559 und K642 beinhalten, ein prädiktiver Wert für das Ansprechen des Tyrosinkinase-Inhibitors Imatinib (Carvajal et al., 2011; Guo et al., 2011; Hodi et al., 2013).

Für *KIT* Amplifikationen wurden diesbezüglich verschiedene Beobachtungen gemacht. Carvajal et al. (2011) beschrieben einen Trend hin zu einem verbesserten Ansprechen von Tumoren mit gleichzeitiger *KIT* Amplifikation und Mutation auf Imatinib. In anderen Studien wurden für Tumoren, die ausschließliche von einer *KIT* Amplifikation oder Überexpression betroffen waren, schlechtere Ansprechraten auf Imatinib und Sunitinib im Vergleich zu Tumoren mit *KIT* Mutationen beobachtet (Hodi et al., 2013; Minor et al., 2012). Hodi et al. (2013) konnten hingegen keinen signifikanten Unterschied zwischen *KIT*-mutierten und -amplifizierten Tumoren bezüglich der Zeit bis zur Progression der Erkrankung feststellen. Da in einem Tumor eine erworbene Resistenz gegen Imatinib mit einer Zunahme der Kopienzahl des *KIT* Gens im Tumor einherging, spekulierten die Autoren, dass *KIT* Amplifikationen womöglich zur Resistenzentwicklung beitragen könnten (Hodi et al., 2013)

Die meisten der in der analysierten Kohorte beobachteten *KIT* Mutationen traten in Triple-WT Melanomen auf (Supplement 7). Von 46 Triple-WT Tumoren waren insgesamt elf von mindestens einer Missense-Mutation im *KIT* Gen betroffen. Außerdem wiesen mit 19,6 % ein großer Anteil der Triple-WT Melanome eine *KIT* Amplifikation auf (Tabelle 10). Fünf Tumoren waren dabei zugleich von einer Missense-Mutation und einer zum Teil hochgradigen Amplifikation betroffen (Supplement 7). Da diese Kohorte im Vergleich zu anderen Studien viele ALM enthielt, ist eine Überschätzung der allgemeinen Mutationsfrequenz des *KIT* Gens im Stadium II jedoch wahrscheinlich.

Da Triple-WT Melanome nicht mit BRAF- und MEK-Inhibitoren therapiert werden können und durch eine oftmals geringe TMB auch ein schlechteres Ansprechen auf Immuncheckpoint-Inhibitoren nahelegt, könnten diese Patienten im Rezidiv gegebenenfalls von einer Therapie mit Tyrosinkinase-Inhibitoren profitieren. Garrido und Bastian (2010) postulierten außerdem, dass ein früher Therapiebeginn mit KIT-Inhibitoren vorteilhaft für das Outcome sein könnte. Sie argumentierten, dass bei einer kleinen Anzahl an Tumorzellen die Wahrscheinlichkeit geringer ist, dass eine Variante vorliegt, die eine Therapieresistenz vermitteln kann. Des Weiteren könnte auf diese Weise der Entwicklung von Hirnmetastasen vorgebeugt werden, die aufgrund der Blut-Hirn-Schranke nur schwer einer systemischen Therapie zugänglich sind. (Garrido und Bastian, 2010)

Daher sollte in weiteren Studien evaluiert werden, ob Patienten mit einem *KIT*-mutierten Melanom und einem hohen Rezidivrisiko bereits im Stadium II von einer Therapie mit Tyrosinkinase-Inhibitoren profitieren können.

4.4.4 *CBL* als potenzieller Tumortreiber des malignen Melanoms

Da *CBL* in der Gesamtkohorte von allen drei Algorithmen detektiert wurde, soll auf eine mögliche Treiberrolle des Gens näher eingegangen werden.

Das Gen *CBL*, auch *c-CBL* oder *Casitas B-lineage lymphoma* genannt, kodiert für eine sogenannte RING-Finger E3 Ubiquitin Ligase (Sanjay et al., 2001). *CBL* und *CBLB* stellen Homologe dar, die damit eine ähnliche Funktion aufweisen (Keane et al., 1995). Die Annahme einer potenziellen Treiberrolle wird durch die

Detektion beider Gene in der Kohorte mittels der verwendeten Algorithmen unterstützt, wobei *CBLB* jedoch lediglich im *NF1* Subtyp signifikant war.

Die Nominierung dieser beiden Gene im *NF1* Subtyp könnte auf eine besonders wichtige Rolle in Tumoren dieses Subtyps hinweisen. *BRAF* bzw. *RAS* Hotspot-Mutationen und *CBL* Mutationen schienen sich in der Kohorte außerdem gegenseitig auszuschließen (Exakter Test nach Fisher: $p = 0,002$ bzw. $p = 0,044$). Das deutet auf eine funktionelle Redundanz dieser Veränderungen hin. Im Gegensatz zu *CBL* zeigten sich *CBLB* Mutationen jedoch auch in einigen *BRAF* und *NRAS* Proben. Vermutlich ist dies durch Unterschiede der Funktionen von *CBL* und *CBLB* zu erklären. Denkbar wäre, dass *CBLB* beispielsweise einen geringeren Einfluss auf den MAPK-Signalweg haben könnte.

E3 Ubiquitin Ligasen tragen unter anderem dazu bei, den Abbau von Proteinen zu initiieren. An die entsprechenden Proteine werden mit Hilfe der Ubiquitin Ligasen mehrere Ubiquitin-Moleküle über kovalente Bindungen angehängt. Das führt wiederum zu einem Abbau der markierten Proteine durch das Proteasom. (Ciechanover, 1998)

Wildtyp Formen von *CBL* und *CBLB* spielen auf diese Weise auch eine Rolle beim Abbau aktivierter Rezeptor-Tyrosinkinasen (Ettenberg et al., 1999; Levkowitz et al., 1999; Miyake et al., 1998; Ota und Samelson, 1997). Daraus resultiert eine verminderte Aktivierung der betroffenen Signalwege, wie beispielsweise des MAPK-Signalwegs (Ettenberg et al., 1999) und des PI3K-Signalwegs (Kales et al., 2010). Unabhängig von diesem Mechanismus wird auch eine indirekte Hemmung des MAPK-Signalwegs angenommen, indem *CBL* kompetitiv zu *SOS* an *Grb2* bindet (Abbildung 1) (Schmidt und Dikic, 2005).

Neben der Funktion als E3 Ubiquitin Ligase fungiert *CBL* auch als Adapter-Protein. Auf diese Weise interagiert es mit einer großen Zahl anderer Proteine (Swaminathan und Tsygankov, 2006) und führt unter anderem zu einer direkten Aktivierung des MAPK-Signalwegs (Finkelstein und Shimizu, 2000; Garcia-Guzman et al., 2000).

Aufgrund dieser vielfältigen und zum Teil gegensätzlichen Funktionen sind für *CBL* sowohl onkogene als auch tumorsuppressive Einflüsse beschrieben (Kales et al., 2010).

In der Literatur wird *CBL* häufig als Protoonkogen bezeichnet (Andoniou et al., 1994; Lupher et al., 1998). Onkogene Formen, wie beispielsweise *v-CBL* und *70Z-CBL*, zeichnen sich durch Deletionen oder Mutationen in der sogenannten Linker-Region und der RING-Finger-Domäne (Position 381-420) aus (Grand et al., 2009; Kales et al., 2010). Vor allem Mutationen der Linker-Region scheinen dabei für die Onkogenese relevant zu sein (Thien et al., 2001). Es wird vermutet, dass diese onkogenen Proteine die Funktion des Wildtyp *CBL* blockieren, wodurch eine Polyubiquitinierung und Herabregulation von Rezeptor-Tyrosinkinasen verhindert wird (Kales et al., 2010; Thien et al., 2001). Außerdem wurde in Studien auch in Abwesenheit von Wildtyp *CBL* eine EGFR-aktivierende Rolle beschrieben (Thien und Langdon, 1997).

Hingegen wurden für bestimmte *CBL* Hotspot-Mutationen, die einen Verlust der Ubiquitinierungsaktivität des Enzyms zur Folge hatten, eine verminderte Herabregulation proliferationsfördernder Signalwege gezeigt. Levkowitz et al. (1999) beobachteten beispielsweise, dass das *CBL* Protein durch eine Mutation der Aminosäure Y371 *in vitro* nicht mehr in der Lage war, den aktivierten EGF-Rezeptor zu ubiquitieren. Als Ursache dafür sahen die Autoren an, dass eine Phosphorylierung der Aminosäure durch den Austausch von Tyrosin nicht mehr möglich war. (Levkowitz et al., 1999)

Grand et al. (2009) beobachteten in einer Studie hämatologischer Neoplasien ebenfalls einen Verlust der Ubiquitin Ligase-Aktivität für die Mutationen S376F, H398Y, P417A und R420Q. Diese führten zu einem autonomen Wachstum der Zellen. Die Autoren vermuteten, dass für die maligne Transformation jedoch gegebenenfalls weitere kooperierende Veränderungen notwendig sein könnten. (Grand et al., 2009)

Kumaradevan et al. (2018) zeigten weiterhin, dass die Y371H Mutation zu einer verminderten Herabregulation des Protoonkogens β -*Catenin* in kolorektalen Karzinomen führte. Dies hatte wiederum ein erhöhtes Wachstum mutierter Tumorzellen zur Folge. Außerdem war eine hohe *CBL* Expression mit einem besseren Überleben von Patienten mit kolorektalen Karzinomen im Stadium IV assoziiert. (Kumaradevan et al., 2018)

Die genannten Beobachtungen deuten auf eine Rolle des Gens als Tumorsuppressor hin, dessen Funktionsverlust zu einer Hochregulation von Signalwegen führt.

Bezogen auf das maligne Melanom sind die Angaben in der Literatur ebenfalls heterogen. In kutanen Formen des malignen Melanoms wurde für *CBL* bisher noch keine generelle Treiberrolle angenommen.

Nihal und Wood (2016) beobachteten eine hohe Expression von *CBL* in Melanomzellen verglichen mit Zellen benigner melanozytärer Nävi. Der Unterschied war allerdings nicht signifikant. Ein Knock-Down der *CBL* Expression führte zwar nicht zum Zelltod, jedoch wurde eine geringere Proliferation und Invasion der Zellen beobachtet. (Nihal und Wood, 2016)

Diese Beobachtung lässt vermuten, dass es sich bei *CBL* auch im malignen Melanom um ein Onkogen handeln könnte. Die Studie beschäftigte sich allerdings nicht mit den Auswirkungen bestimmter Mutationen, sondern lediglich mit den Folgen einer herabgesetzten Expression von Wildtyp *CBL*.

Shain et al. (2015a) vermuteten hingegen eine Rolle von *CBL* als Tumorsuppressor im desmoplastischen Melanom. Das Gen wies in der Kohorte eine hohe Zahl an Missense- und Nonsense-Varianten sowie Deletionen auf. Des Weiteren vermuteten die Autoren eine funktionelle Redundanz zu aktivierenden Mutationen der Gene *BRAF* und *NRAS*. Dieser Zusammenhang könnte niedrige Mutationsraten von *CBL* in anderen Melanomstudien erklären, die meist einen sehr hohen Anteil an *BRAF* und *NRAS* mutierten Proben aufweisen. (Shain et al., 2015a)

In der analysierten Stadium II Kohorte wies *CBL* unter anderem in der OncodriveCLUST Analyse einen signifikanten q-Wert auf. In zwei Proben wurde eine Missense-Mutation der mehrfach beschriebenen Y371 Aminosäure detektiert (Kumaradevan et al., 2018; Levkowitz et al., 1999). Außerdem wurden auch Mutationen der von Grand et al. (2009) erwähnten Position P417 beobachtet sowie der angrenzenden Aminosäure F418. Vier dieser fünf Proben, waren gleichzeitig von einer heterozygoten Deletion des *CBL* Gens betroffen. Diese Beobachtungen unterstützen die Hypothese einer tumorsuppressiven Rolle des Gens.

In der GISTIC Analyse wurde außerdem die Deletion einer Region detektiert, auf der unter anderem *CBL* lokalisiert war. Die Deletion des Gens deutet ebenfalls auf eine Rolle als Tumorsuppressor hin. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass die Detektion der Region mittels GISTIC aus der positiven Selektion eines anderen dort lokalisierten Gens resultiert. Insgesamt wiesen 66 Proben der Kohorte eine heterozygote Deletion des *CBL* Gens auf, homozygote Deletionen wurden allerdings nicht beobachtet. Lediglich fünf Proben trugen neben der Deletion zusätzlich mindestens eine Mutation des Gens, wovon wiederum vier einen der detektierten Mutationshotspots betrafen. Laut der Knudson-Hypothese müssen für die vollständige Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens in der Regel beide Allele von inaktivierenden Alterationen betroffen sein (Knudson, 1971). Bei *CBL* könnte es sich jedoch um ein haploinsuffizientes Gen handeln. Das würde bedeuten, dass die Dosis des Genprodukts eines einzelnen Allels nicht ausreicht, um die normale Genfunktion in der Zelle aufrecht zu erhalten (Payne und Kemp, 2005).

Der Einfluss von *CBL* auf den MAPK-Signalweg, der im malignen Melanom von zentraler Bedeutung ist (Sanchez-Vega et al., 2018), unterstützt die Annahme einer Treiberrolle des Gens. In den Subtypen *NF1* und Triple-WT scheint *CBL* besonders relevant zu sein, da sich nur in der Analyse dieser beiden Subtypen signifikante q-Werte für das Gen ergaben und Mutationen hier besonders häufig beobachtet wurden. In Triple-WT Tumoren könnten *CBL* Mutationen eine von *BRAF* und *NRAS* unabhängige Aktivierung des MAPK-Signalwegs ermöglichen. *NF1* Mutationen könnten möglicherweise zu einer geringeren Aktivierung des MAPK-Signalwegs im Vergleich zu *BRAF* und *NRAS* Mutationen führen. Das würde weitere Alterationen des Signalwegs, wie zum Beispiel *CBL* Mutationen, in diesem Subtyp nötig machen. Da für einige der detektierten Mutationen bereits zuvor ein Funktionsverlust der Ubiquitinligaseaktivität von *CBL* berichtet wurde (Grand et al., 2009; Kumaradevan et al., 2018; Levkowitz et al., 1999) und das Gen in der Kohorte auf einer in GISTIC signifikanten Deletion lokalisiert war, liegt eine tumorsuppressive Rolle im Melanom nahe. Dies muss durch funktionelle Analysen verifiziert werden, indem der Einfluss der detektierten Mutationen sowie von Deletionen und Amplifikationen auf Melanomzellen untersucht wird.

4.4.5 Assoziation detektierter Treibergene mit der UV-Signatur

Es ist auffallend, dass für sehr viele der potenziellen Treibergene eine signifikante Assoziation zwischen einer Mutation im jeweiligen Gen und dem Vorliegen der Signatur 7 in der entsprechenden Probe bestand (Tabelle 6). Der wahrscheinlichste Grund dafür ist, dass UV-Strahlung als Mutagen mit einer hohen Tumormutationslast einhergeht (Chalmers et al., 2017). Entsprechend ist auch die Wahrscheinlichkeit größer, dass ein Gen zufällig von einer Mutation betroffen ist. Daher sind besonders die Gene mit einem sehr geringen q-Wert sowie Gene, für die kein Zusammenhang zu Signatur 7 nachgewiesen werden konnte von Interesse.

Bei Letzteren sind *BRAF*, *NRAS* und *KIT* besonders hervorzuheben. Die klassischen *BRAF* Mutationen werden häufig bereits in benignen melanozytären Nävi beobachtet (Shain et al., 2015b). *NRAS* Mutationen wurden von Shain et al. (2015b) ab intermediären Läsionen beschrieben, also ebenfalls vor dem invasiven Stadium. Bei den meisten Mutationen in diesen klassischen Treibergenen handelt es sich nicht um UV-typische C>T Transitionen (Hodis et al., 2012). Denkbar wäre daher, dass diesen Mutationen nur ein geringer UV-Einfluss zugrunde liegt, eine UV-Schädigung jedoch möglicherweise im weiteren Verlauf der Tumorentwicklung hinzukommt. Auch Rüniger (2016) schloss aus Studienergebnissen, dass die Akquisition von UV-Mutationen während der Tumorprogression fortgesetzt wird. Insgesamt passt dies zu der Beobachtung, dass in der Kohorte keine signifikante Assoziation zwischen *BRAF* und *NRAS* Mutationen mit der UV-Signatur bestand. *KIT* Mutationen treten sowohl häufig in den UV-unabhängigen ALM und mukosalen Melanomen als auch in Melanomen, die auf Hautarealen mit chronischer Sonnenschädigung entstehen, sogenannten CSD-Melanomen, auf (Curtin et al., 2006). Dies passt wiederum zur mangelnden Assoziation zwischen einer Mutation des *KIT* Gens mit der UV-Signatur.

Für Gene, deren Mutationen hochsignifikant mit der Signatur 7 assoziiert waren, wäre beispielsweise eine Rolle im Reparaturmechanismus von UV-Schäden denkbar. Eine Mutation des entsprechenden Gens könnte dazu führen, dass DNA-Schäden nicht mehr repariert werden oder die Zelle der Apoptose entgehen

kann. Die nominierten Treibergene *NF1*, *MECOM*, *TET2*, *CDKN2A*, *PTPRC*, *TP53*, *ARID2*, *HGF* sowie *ADAMTS18*, *COL3A1* und *EPHA3* wiesen in der vorliegenden Studie besonders niedrige p-Werte auf. In der Literatur wurden einige dieser Gene bereits im Zusammenhang mit einer UV-Signatur beim malignen Melanom genannt.

Lee et al. (2015) beobachteten, dass Gene, die als epigenetische Regulatoren gelten, vermehrt von UV-Signatur Mutationen betroffen waren. Hierzu zählten beispielsweise *MECOM*, *TET2* und *ARID2*. *MECOM* wurde hierbei besonders hervorgehoben, da das Gen einen besonders großen Anteil an UVB-Mutationen aufwies. Außerdem wurde auch in den Genen *TP53* (84,6 %), *CDKN2A* (81,8 %) und *EPHA3* ein hoher Anteil an UV-Mutationen beobachtet. (Lee et al., 2015)

Hocker und Tsao (2007) stellten ebenfalls einen großen Anteil an Mutationen mit UVB-Signatur in den Genen *TP53* und *CDKN2A* fest. Daher nahmen die Autoren für diese Gene eine direkte Rolle von UV-Strahlung bei der Mutagenese an (Hocker und Tsao, 2007). Akbani et al. (2015) machten für *TP53* Mutationen eine ähnliche Beobachtung. 93,9 % der Mutationen traten in Proben mit einer UV-Signatur auf (Akbani et al., 2015).

Das Tumorsuppressorgen *TP53* hat in der Wildtyp Form eine Reihe von Funktionen. Dazu gehören beispielsweise die Induktion von Apoptose, Zellseneszenz und Zellzyklusarrest als Reaktion auf Schädigungen der DNA sowie die DNA-Reparatur (Aubrey et al., 2016). Diese Funktionen könnten durch Mutationen beeinträchtigt werden. Die Folge wäre, dass Zellen überleben können, die eine starke UV-Schädigung aufweisen. Das würde wiederum die Assoziation von Mutationen des Gens mit dem Vorliegen der UV-Signatur erklären.

Zusammenfassend wurden in der analysierten Kohorte einige bereits zuvor beschriebene Assoziationen von Mutationen bestimmter Gene mit einer UV-Mutagenese beobachtet. Für diese Gene könnte eine Rolle bei der Reparatur von UV-Mutationen denkbar sein. Anhand der vorliegenden Daten kann die Frage nach der Ursache der beobachteten Assoziationen jedoch nicht sicher beantwortet werden.

4.5 SCNAs des Melanoms im Stadium II

Alternativ zu Mutationen, können auch Amplifikationen zur Aktivierung von Onkogenen und Deletionen zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen beitragen. Daher unterliegen diese genetischen Alterationen ebenfalls einer positiven Selektion (Beroukhim et al., 2007). Da SCNAs jedoch im Gegensatz zu Mutationen meist mehrere Gene betreffen, ist es schwierig eine Alteration sicher auf ein einzelnes zugrundeliegendes Ziel-Gen zurückzuführen (Beroukhim et al., 2007). Für die Identifikation dieser Ziel-Gene werden weitere Studien benötigt, die auch funktionelle Testungen beinhalten sollten (Beroukhim et al., 2010). Lediglich, falls auf dem Wide-Peak der von GISTIC detektierten Region nur ein Gen lokalisiert ist, kann davon ausgegangen werden, dass dieses Gen wahrscheinlich der positiven Selektion zugrunde lag. Für Alterationen größerer Regionen ist außerdem denkbar, dass eine Kombination aus mehreren, dort lokalisierten Genen bei der Tumorgenese eine Rolle spielt. Für Aberrationen ganzer Chromosomen oder Chromosomenarme, die im Rahmen einer Aneuploidie beobachtet werden (Kapitel 1.1.3), wird beispielsweise angenommen, dass sich die betroffenen Gene kooperierend auf den Phänotyp auswirken (Bonney et al., 2015; Xue et al., 2012).

4.5.1 Aberrationen ganzer Chromosomenarme

Taylor et al. (2018) setzten sich mit Mustern der Aneuploidie in Krebszellen im Allgemeinen sowie in verschiedenen soliden Tumorentitäten auseinander. Dabei fanden sie, dass der Chromosomenarm 8q den insgesamt am häufigsten amplifizierten Chromosomenarm darstellte. Der Arm 1q war ebenfalls vor allem von Amplifikationen betroffen. Die Autoren beobachteten wesentliche Unterschiede zwischen Tumoren verschiedener Entitäten. Die Aneuploidie-Muster waren dabei zu einem großen Teil abhängig vom Ursprungsgewebe. Melanome bildeten ein Cluster mit anderen Tumoren neuraler Abstammung. Für dieses Cluster war eine häufige Amplifikation des Chromosoms 7 charakteristisch sowie insgesamt weniger Aberrationen im Vergleich zu anderen Tumorentitäten. Für kutane Melanome war außerdem eine Deletion des Chromosoms 10 besonders prominent. (Taylor et al., 2018)

Auch in der analysierten Stadium II Melanom-Kohorte zeigten sich Amplifikationen der Chromosomenarme 8q, 1q und 7 wie auch Deletionen des Chromosoms 10 in vielen Proben (Abbildung 13). Die Deletionen der Chromosomen 6q, 9 und 10 sowie Amplifikationen von 1q, 6p 7 und 8q, die in der analysierten Stadium II Kohorte besonders auffielen, wurden bereits von Bastian et al. (1998) beschrieben. In der genannten Studie wurde hingegen das gesamte Chromosom 8, nicht nur dessen langer Arm, als häufig amplifiziert beobachtet (Bastian et al., 1998). In der Stadium II Kohorte war der Chromosomenarm 8p im Gegensatz dazu eher von Deletionen betroffen. Auch Guan et al. (2015) beobachteten anhand von TCGA Daten unter anderem signifikante Amplifikationen von 1q, 6p und 7 sowie Deletionen von 6q, 9 und 10 im Melanom. Die Kohorte beinhaltete zum größten Teil metastatische Tumoren (Guan et al., 2015).

Während der Tumorprogression zeigen maligne Melanome eine Zunahme karyotypischer Veränderungen. In Studien nahmen CNVs während der klinischen Progression von Vorläuferläsionen zu Melanomen sowie von lokalen zu metastasierten Tumoren zu (Balaban et al., 1986; Kaufmann et al., 2014; Shain et al., 2015b). Bastian et al. (2003) beschrieben außerdem mit 13 % eine geringe Frequenz chromosomaler Aberrationen in benignen Nävi im Gegensatz zu 96,2 % in malignen Melanomen. In der vorliegenden Studie zeigte sich, wie oben erläutert, bereits im Stadium II eine große Anzahl typischer Alterationen. Es ist allerdings wahrscheinlich, dass während der Progression von lokalisierten Stadium II Tumoren zu einer metastatischen Tumorerkrankung noch weitere Alterationen hinzukommen oder eine größere Zahl der Tumoren die beschriebenen Veränderungen akquiriert. Das konnte anhand der vorliegenden Daten nicht analysiert werden.

4.5.2 Fokale SCNAs und potenzielle Treibergene

In der Stadium II Gesamtkohorte wurden von GISTIC viele fokale Alterationen identifiziert, die bereits zuvor beschrieben waren und im Melanom bekannte Treibergene betrafen. Dazu gehörten die Gene *KIT*, *MITF*, *TERT*, *BRAF*, *CCND1*, *CDK4*, *MDM2* und *MYC*, die auf amplifizierten Regionen lokalisiert waren, sowie die Deletion einer Region, die *CDKN2A* enthielt (Akbari et al., 2015; Bastian et al., 1998; Curtin et al., 2005; Curtin et al., 2006; Garraway et al., 2005; Guan et al., 2015; Hodis et al., 2012; Lin et al., 2008). Shain et al. (2015b) fanden einen Zusammenhang zwischen Deletionen der Gene *CDKN2A* und *PTEN* sowie Amplifikationen von *BRAF*, *MDM2* und *TERT* und der Progression von einer benignen melanozytären Läsion zu einem invasiven Melanom. Die Ergebnisse der Stadium II Kohorte deuten darauf hin, dass diese Gene bereits im frühen Stadium des Melanoms häufig von SCNAs betroffen sind. Jedoch kann erneut nicht ausgeschlossen werden, dass die Häufigkeit dieser Alterationen während der Progression zu einer metastatischen Erkrankung noch zunimmt. Deletionen der *PTEN* Region wurden, entgegen früheren Studienergebnissen, die das Gen im Melanom als häufig amplifiziert identifizierten (Curtin et al., 2005; Lin et al., 2008; Shain et al., 2015b), in der Gesamtkohorte nicht von GISTIC detektiert. Auf dieses Gen wird an späterer Stelle dieses Kapitels erneut eingegangen.

Neben den zuvor bekannten Genen befand sich *CBL* in der Gesamtkohorte sowie in allen vier Subtypen auf einer signifikant deletierten Region. Die Rolle von *CBL* wurde bereits in Kapitel 4.4.4 diskutiert. GISTIC identifizierte außerdem fokale SCNAs, die nicht zuvor beschrieben waren und nur ein einzelnes oder wenige Gene einschlossen. Diese betrafen unter anderem Amplifikationen der Gene *RPTOR* und *RBX1* sowie Deletionen von *ANK3*. Auch das Gen *NF1* war allein auf einem von GISTIC als deletiert identifizierten Wide-Peak lokalisiert.

Das Gen *RPTOR* kodiert für Regulatory associated protein of mTOR complex 1, das mit mTOR interagiert und daher eine Rolle im mTOR-Signalweg innehat (Hara et al., 2002). Dieser Signalweg ist dem PI3K-Signalweg nachgeschaltet und beeinflusst Zellmetabolismus und Zellwachstum (Hocker et al., 2008; Wullschleger et al., 2006). Pópulo et al. (2011) vermuteten zuvor einen Einfluss des mTOR-Signalwegs bei der Progression des kutanen Melanoms.

RBX1 kodiert für das Protein RING-box protein 1, das Teil des SCF-Komplexes, einem E3 Ubiquitin Ligase Komplex, ist. Dieser Komplex ist an der Kontrolle der Zellzyklusprogression beteiligt, indem er zum Abbau hierfür wichtiger Komponenten beiträgt (Kamura et al., 1999; Nakayama und Nakayama, 2006; Sun et al., 2001). Die grundlegende Funktion von Ubiquitin Ligasen wurde bereits in Kapitel 4.4.4 beleuchtet. Es wurde zuvor vermutet, dass die Deregulation des SCF-Komplexes zur Krebsentstehung beitragen könnte (Bielskiene et al., 2015; Nakayama und Nakayama, 2006).

Das Gen *ANK3* (*Ankyrin 3*) kodiert für das AnkyrinG Protein (Kordeli et al., 1995). Ankyrine verbinden integrale Membranproteine mit Komponenten des Zytoskeletts, wodurch sie unter anderem dazu in der Lage sind, Zellmotilität und Proliferation zu regulieren (Bennett, 1992; De Matteis und Morrow, 1998). Des Weiteren wurde in der Literatur eine Assoziation zwischen der Herabregulation von *ANK3* und einem schlechteren Outcome von Krebserkrankungen beschrieben, vor allem für Prostatakarzinome (Glinsky et al., 2005; Wang et al., 2016). Bereits Lattanzi et al. (2018) berichteten nicht-synonyme SNVs von *ANK3* in NM Tumoren.

Zusammenfassend könnte dies darauf hindeuten, dass SCNAs der beschriebenen Gene bei der Melanomagenese eine Rolle spielen. Die Effekte dieser Alterationen in Melanomzellen müssen jedoch in weiteren Studien evaluiert werden.

Genau wie für Mutationen verschiedener Treibergene, wurden auch bezüglich der SCNAs zwischen den molekularen Subtypen deutliche Unterschiede festgestellt. Mögliche Erklärungen für Gemeinsamkeiten und Unterschiede hinsichtlich Alterationsfrequenzen einzelner Gene wurden in Kapitel 4.4.2 für die mutierten Treibergene diskutiert. Insgesamt wiesen Triple-WT Tumoren den höchsten Median des von CNVs betroffenen Genomanteils auf. Diesbezüglich wurde jedoch kein signifikanter Unterschied festgestellt. Neben der von Akbani et al. (2015) gezeigten hohen Rate an CN-Segmenten und fokalen Amplifikationen in Triple-WT Tumoren, wurde auch für ALM ein vergleichsweise hoher Grad an chromosomalen Aberrationen (Curtin et al., 2005) sowie eine große Zahl an Amplifikationen beschrieben (Bastian et al., 2000). Da es sich bei 41,3 % der Triple-WT

Tumoren in der Kohorte um ALM handelte, passen diese Beobachtungen gut zusammen.

In Kapitel 4.4.2 wurde bereits erwähnt, dass SCNAs in Triple-WT Melanomen aufgrund der niedrigen Mutationsfrequenzen vieler Treibergene eine Alternative für die Aktivierung relevanter Signalwege darstellen könnten. Dafür spricht, dass viele Gene in einem relativ großen Anteil der Tumoren des Triple-WT Subtyps von SCNAs betroffen waren (Tabelle 10). Des Weiteren wurde beispielsweise die Deletion der *NF1* Region neben dem *NF1* Subtyp auch in der Triple-WT Kohorte von GISTIC detektiert. Da *NF1* dabei allein auf dem Wide-Peak angegeben war, wäre die Deletion des Gens in Triple-WT Melanomen als Alternative zu *LoF*-Mutationen denkbar.

Prinzipiell wurden sehr viele Amplifikationen bekannter Protoonkogene, die nur in einem Teil der Subtypen in signifikanten Regionen lokalisiert waren, im Triple-WT Subtyp beobachtet. Dazu gehörten beispielsweise *MDM2*, *CDK4*, *CCND1*, *TERT*, *KIT* und *MITF*. *KIT* und *MITF* waren dabei ausschließlich in Triple-WT Melanomen signifikant und alleine auf dem Wide-Peak lokalisiert, was für eine wichtige Rolle der beiden Gene in diesem Subtyp sprechen könnte.

Entgegen diesen Beobachtungen postulierten Garraway et al. (2005) einen Zusammenhang zwischen *BRAF* Mutationen und *MITF* Amplifikationen. Auch Akbani et al. (2015) fanden mit Hilfe von GISTIC, dass *MITF* Amplifikationen ausschließlich im *BRAF* Subtyp einen signifikanten q-Wert aufwiesen. Im Gegensatz dazu waren *BRAF* Melanome in der Stadium II Kohorte lediglich in 3,4 % der Fälle von *MITF* Amplifikationen betroffen. Denkbar wäre, dass *MITF* Amplifikationen in *BRAF* Tumoren erst zu einem späteren Zeitpunkt der Tumorprogression entstehen. Dafür spricht, dass Garraway et al. (2005) *MITF* Amplifikationen besonders häufig im metastasierten Stadium der Erkrankung nachwiesen.

CDK4 und *CCND1* Amplifikationen wurden von Curtin et al. (2005) vor allem in Wildtyp Tumoren für *BRAF* und *NRAS* beobachtet, was zu der hier beschriebenen Detektion der Alterationen im Triple-WT Subtyp passt. In der analysierten Kohorte war jedoch die *CCND1* Region auch im *RAS* Subtyp signifikant amplifiziert. *KIT* Amplifikationen wurden von Pfarr et al. (2016) ebenfalls in *BRAF*- und

RAS-wildtyp Tumoren beschrieben. Auf die Bedeutung des *KIT* Gens im Triple-WT Subtyp wurde in den Kapiteln 4.4.2 und 4.4.3 eingegangen.

Die Amplifikation der *BRAF* Region wurde von GISTIC ausschließlich im *BRAF* Subtyp detektiert. Corcoran et al. (2010) identifizierten *BRAF* Amplifikationen als Resistenzmechanismus gegen BRAF- und MEK-Inhibitoren *in vitro*. Die Autoren zeigten hingegen außerdem, dass eine Kombinationstherapie der Substanzen in der Lage war, diese Resistenz zu überwinden (Corcoran et al., 2010). Die Identifikation dieser Amplifikationen im *BRAF* Subtyp bereits im frühen und für BRAF- und MEK-Inhibitoren Therapie-naiven Stadium II in 22,4 % der Tumoren spricht dafür, dass es sich um einen primären Resistenzmechanismus handeln könnte. Das unterstreicht die Wichtigkeit des Einsatzes einer Kombinationstherapie aus BRAF- und MEK-Inhibitoren. Inwieweit dieser Zusammenhang im klinischen Alltag als prädiktiver Faktor für das Therapieansprechen auf BRAF- und MEK-Inhibitoren genutzt werden könnte, muss in weiteren Studien evaluiert werden.

Im *BRAF* Subtyp war außerdem, im Gegensatz zu den anderen Subtypen, die Region 1p12 signifikant amplifiziert. Unter anderem war auf dem Wide-Peak das Gen *NOTCH2* lokalisiert, das somit der positiven Selektion dieser Amplifikation zugrunde liegen könnte. In der TCGA Melanom-Kohorte wurde diese Region ebenfalls speziell im *BRAF* Subtyp von GISTIC identifiziert (Akbari et al., 2015; Guan et al., 2015).

PTEN, ein Gen das bereits zuvor in Melanomen als mutiertes und deletiertes Tumorsuppressorgen beschrieben wurde (Curtin et al., 2005; Gulberg et al., 1997), lag lediglich in den Subtypen *BRAF* und Triple-WT auf von GISTIC als deletiert identifizierten Regionen. Neben *PTEN* war jeweils noch eine große Zahl weiterer Gene auf den jeweiligen Wide-Peaks lokalisiert. In der Gesamtkohorte der Stadium II Tumoren wurde das Gen hingegen nicht von GISTIC detektiert. Das könnte dafürsprechen, dass *PTEN* erst im weiteren Verlauf der Tumorerkrankung einer verstärkten positiven Selektion unterliegt. Allerdings war besonders in *BRAF* Melanomen mit 41,4 % ein hoher Anteil der Tumoren von einer *PTEN* Deletion betroffen. Curtin et al. (2005) beobachteten ebenfalls, dass *BRAF* Tumoren im Gegensatz zu *NRAS* Melanomen besonders häufig von *PTEN* Deletionen betroffen waren. In der analysierten Stadium II Kohorte wies der *RAS*

Subtyp zwar mit 22,6 % einen relativ großen Anteil an Tumoren mit *PTEN* Deletion auf, jedoch wurde in *RAS* Melanomen die *PTEN* Region nicht von GISTIC detektiert. Als Erklärungsansatz führten Curtin et al. (2005) eine Studie von Tsao et al. (2000) an, die für *NRAS* Aktivierung und *PTEN* Verlust eine funktionelle Redundanz in Melanomzellen nahelegte. Am ehesten ist diese Redundanz auf eine Aktivierung des PI3K-Signalweges durch Alterationen beider Gene zurückzuführen (Rodriguez-Viciano et al., 1994; Stambolic et al., 1998). Curtin et al. (2005) vermuteten, dass in *BRAF* Tumoren hingegen die zusätzliche Alteration von *PTEN* für die Aktivierung des PI3K-Signalweges benötigt wird.

Damit wurden in der analysierten Stadium II Kohorte viele bereits zuvor beschriebene SCNAs und Zusammenhänge dieser zu den molekularen Subtypen festgestellt. Die Identifikation der Gene, die die Grundlage der positiven Selektion dieser SCNAs darstellen, könnte Gegenstand zukünftiger Studien sein. Außerdem wird in Zukunft voraussichtlich das relativ neue Long-Read Sequencing das in dieser Studie verwendete Short-Read Sequencing für die CNV-Analyse ablösen (Mason-Suares et al., 2016).

4.6 Einflussfaktoren des Outcomes von Stadium II Melanomen

In frühen Tumorstadien ist es von großem Interesse, Patienten mit einem erhöhten Risiko für das Fortschreiten der Erkrankung zu identifizieren. Da Patienten mit Stadium II Melanomen zum Teil eine schlechtere Prognose haben als solche mit Stadium IIIA Tumoren (Balch et al., 2009), ist es von Interesse, die Risikostratifizierung weiter zu optimieren. Dafür müssten neben dem Tumorstadium zusätzliche prognoserelevante Parameter aufgefunden gemacht werden.

Eine genauere Stratifizierung des Rezidiv- und Sterberisikos im Stadium II wäre auch von großer klinischer Relevanz. Immuncheckpoint-Inhibitoren sowie BRAF- und MEK-Inhibitoren wurden bisher erst ab dem Stadium III zur Melanomtherapie eingesetzt (Leitlinienprogramm Onkologie, 2020). Eine aktuelle Studie zeigte jedoch auch für die Stadien IIB und IIC einen Überlebensvorteil durch den adjuvanten Einsatz von Pembrolizumab (Luke et al., 2022). Da diese Substanzen zum Teil gravierende Nebenwirkungen hervorrufen (Anforth et al., 2013; Chapman et al., 2011; Michot et al., 2016), ist eine Anwendung vor allem bei einem hohen Rezidivrisiko der Erkrankung sinnvoll. Des Weiteren wäre es gegebenenfalls sinnvoll, die Intervalle zwischen den Nachsorgeuntersuchungen für Hochrisikopatienten zu verkürzen.

Für diese Studie wurden sowohl Daten über das rezidivfreie Überleben (RFS) als auch über das Gesamtüberleben (OS) dokumentiert. Da es sich mit 193 eingeschlossenen Patienten um eine große Kohorte handelte, kann im Allgemeinen eine gute Aussagekraft der Ergebnisse angenommen werden. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Patienten vor Auftreten eines Rezidivs mehr oder weniger einheitlich therapiert wurden. Im Stadium II steht die Exzision des Tumors im Vordergrund, die in einzelnen Fällen durch eine adjuvante Interferon-Therapie ergänzt wird (Leitlinienprogramm Onkologie, 2020). Für das RFS können daher die verschiedenen Faktoren weitestgehend unabhängig von den Effekten unterschiedlicher Therapeutika wie Immuncheckpoint-Inhibitoren oder BRAF- und MEK-Inhibitoren beurteilt werden.

Neben dem RFS soll jedoch auch auf das OS eingegangen werden, da das Gesamtüberleben für den Patienten den relevanteren Endpunkt darstellt. Hinsichtlich des OS existieren allerdings zwei große Nachteile. Erstens wird dabei nicht

berücksichtigt, ob die Patienten an den Folgen eines Melanoms verstarben oder ob der Tod andere Ursachen hatte. Das ist vor allem im Hinblick auf Patienten höheren Alters relevant. Zweitens lagen keine Informationen über das Therapie-regime im Falle eines Rezidivs vor. Da der Einschluss von Patienten über einen großen Zeitraum erfolgte, die gut wirksamen Immuncheckpoint-Inhibitoren sowie BRAF- und MEK-Inhibitoren hingegen erst seit einigen Jahren in klinischer Anwendung sind (Davey et al., 2016), muss angenommen werden, dass die Rezidive zum Teil sehr unterschiedlich therapiert wurden. Ein weiterer Nachteil der Studie ist, dass die Nachbeobachtungszeit für einzelne Patienten sehr kurz war. Insgesamt zeigte sich für das Stadium II, dass die Stadieneinteilung nach Infiltrationstiefe und Ulzerationsstatus, wie bereits hinlänglich bekannt, einen guten prognostischen Faktor für RFS und OS darstellte (Gershenwald et al., 2017). Der Ulzerationsstatus allein hatte jedoch keinen signifikanten Einfluss auf das Outcome und auch der Regressionsstatus war nicht signifikant mit dem RFS oder dem OS assoziiert. Diese Beobachtung hatten bereits Leiter et al. (2004) für dünne primäre Melanome mit einer Dicke bis einschließlich 1 mm gemacht.

Des Weiteren war in der analysierten Kohorte ein höheres Alter signifikant mit einem schlechteren OS und RFS assoziiert. Balch et al. (2013) beobachteten ebenfalls ein schlechteres melanomspezifische Überleben (MSS) mit zunehmender Lebensdekade in Tumoren der Stadien I, II und III. Die Autoren vermuteten eine Kombination verschiedener Faktoren als ursächlich für diesen Zusammenhang, unter anderem Veränderungen der Immunabwehr und des Lymphflusses sowie der Tumorattribute bzw. histologischen Charakteristika im Alter (Balch et al., 2013). Auch Leiter et al. (2004) fanden für dünne Melanome bis maximal 1 mm Dicke ein signifikant schlechteres MSS der Patienten mit einem Alter von mindestens 60 Jahren im Vergleich zu jenen unter 60 Jahren. Dieser Einfluss war unabhängig von Geschlecht, Tumordicke, Histologie und Lokalisation (Leiter et al., 2004). Gegebenenfalls wäre es daher sinnvoll, das Patientenalter beim Festlegen der Nachsorgeintervalle zu berücksichtigen.

Auf den Einfluss der Histologie sowie der verschiedenen molekularen Faktoren wird im Folgenden gesondert eingegangen.

4.6.1 Histologie

Zwischen den Histologien ergaben sich lediglich bei der Analyse des OS signifikante Unterschiede. Patienten mit SSM zeigten dabei ein signifikant besseres Outcome verglichen mit NM Patienten. Auch LMM wiesen im Vergleich zu NM eine HR deutlich unter 1 auf, wobei das Signifikanzniveau jedoch nicht unterschritten wurde. Ein signifikanter Unterschied zwischen NM und ALM ergab sich in der analysierten Kohorte hingegen nicht. Diese Beobachtungen passen prinzipiell zu früheren Studienergebnissen, obwohl dort in der Regel der Einfluss auf das MSS analysiert wurde. Es wurde wiederholt ein schlechteres MSS von NM Patienten verglichen mit SSM Patienten berichtet (Lattanzi et al., 2018; Mishra et al., 2019). Auch ALM Tumoren wurden mit einem schlechteren 5- und 10-Jahres-MSS im Vergleich zu kutanen Formen des Melanoms in Verbindung gebracht (Bradford et al., 2009). Diese Beobachtung wäre wiederum damit vereinbar, dass ALM und NM Tumoren in der analysierten Kohorte ein ähnliches Outcome aufwiesen.

Als Gründe für ein schlechteres Outcome bei Vorliegen von ALM und NM wurde wiederholt ein schnelleres Tumorwachstum (Liu et al., 2006) und die daraus resultierende spätere Diagnosestellung in einem höheren Tumorstadium diskutiert (Bradford et al., 2009; Teramoto et al., 2018). Lattanzi et al. (2018) untersuchten diesen Zusammenhang für das NM in einer großen Kohorte mit Melanomen der Stadien I bis III. Nach Korrektur für Tumorstadium, -dicke und einige weitere Faktoren zeigten NM Tumoren im Vergleich zu SSM jedoch noch immer ein signifikant schlechteres MSS (Lattanzi et al., 2018). In einer anderen Studie wurde auch für das ALM, nach Korrektur für Stadium und Tumordicke, eine schlechtere Prognose festgestellt (Bradford et al., 2009). Das spricht für einen direkten prognoserelevanten Einfluss der Histologie.

In der analysierten Stadium II Kohorte wurden besonders LMM und SSM vermehrt im frühen Stadium IIA diagnostiziert (Tabelle 2). Obwohl kein signifikanter Unterschied bei der Stadienverteilung der Histologien festgestellt wurde, könnte das den Unterschied des OS zwischen NM und SSM zum Teil erklären. Die Histologie wurde aufgrund der relativ kleinen Gesamtzahl an Events in der Kohorte allerdings nicht in die multivariate Analyse eingeschlossen. Daher kann keine

Aussage darüber gemacht werden, ob der Zusammenhang tatsächlich über das Tumorstadium vermittelt wurde.

Die Unterschiede bei der Analyse des OS könnten außerdem durch ein besseres Ansprechen der SSM und LMM Rezidivtumoren auf Systemtherapien mediert sein. SSM waren beispielsweise in der Kohorte besonders häufig von *BRAF* Hot-spot-Mutationen betroffen (Abbildung 5), was eine Therapie mit einem BRAF-Inhibitor ermöglicht (Flaherty et al., 2010; Leitlinienprogramm Onkologie, 2020). LMM wiesen im Vergleich zu den anderen Histologien eine höhere TMB auf (Abbildung 8). Das könnte wiederum mit einem verbesserten Ansprechen auf Immuncheckpoint-Inhibitoren einhergehen (Snyder et al., 2014).

4.6.2 Molekulare Subtypen

Mit der Frage, ob *BRAF*, *RAS* und *NF1* Mutationen das Outcome der Patienten beeinflussen, befassten sich bereits einige Studien. Bisher zeigten die meisten Arbeiten keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem molekularen Subtyp und dem Outcome (Akbari et al., 2015; Edlundh-Rose et al., 2006; Krauthammer et al., 2015; Long et al., 2011; Maldonado et al., 2003).

Thomas et al. (2015) beschrieben hingegen für eine relativ große Kohorte von Primärtumoren (n = 912) ein signifikant schlechteres MSS für *NRAS*- und *BRAF*-mutierte Tumoren, die sich mindestens im Stadium IIB befanden. Die Signifikanz zeigte sich erst nach Korrektur für einige Faktoren, wie beispielsweise das Tumorstadium. Für Tumoren in niedrigeren Stadien ergab sich hingegen keine Signifikanz. Daraus schlossen die Autoren, dass *BRAF* und *NRAS* Mutationen nur im höheren Tumorstadium mit einem schlechteren Outcome assoziiert sind. (Thomas et al., 2015)

Cirenajwis et al. (2017) fanden ein signifikant schlechteres MSS sowie OS für *NF1*-mutierte Tumoren. In der multivariaten Analyse blieb der Unterschied jedoch lediglich für das MSS signifikant (n = 626). Des Weiteren wurde kein signifikanter Zusammenhang gefunden, falls nur Primärtumoren bei der Analyse berücksichtigt wurden. (Cirenajwis et al., 2017)

Aufgrund dieser zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse kann anhand der aktuellen Studienlage keine allgemeine Aussage über die Auswirkung der Subtypen

auf das Outcome gemacht werden. Außerdem gibt es in den genannten Studien Hinweise darauf, dass lediglich in höheren Tumorstadien ein Zusammenhang zwischen den analysierten Mutationen und dem Outcome besteht.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde ein signifikant besseres RFS von *NF1* Tumoren im Vergleich zu Triple-WT Tumoren festgestellt (HR = 0,30). Weitere Assoziationen zeigten sich nicht. Dieses Ergebnis scheint auf den ersten Blick unstimmig mit dem von Cirenajwis et al. (2017) beschriebenen schlechteren MSS der *NF1* Tumoren. Allerdings lagen in der genannten Studie keine Informationen über das RFS vor und für Primärtumoren ergab sich ebenfalls keine signifikante Assoziation mit dem Outcome (Cirenajwis et al., 2017).

Eine mögliche Begründung für das längere RFS von Patienten mit Melanomen des *NF1* Subtyps ist die höhere TMB dieser Tumoren. Diese könnte beispielsweise auch unabhängig von einer Immuntherapie eine bessere Bekämpfung des Tumors durch das körpereigene Immunsystem ermöglichen (Klebanov et al., 2019). Dem widerspricht, dass die TMB keine signifikante Auswirkung auf das RFS zeigte. Außerdem ergab sich in der multivariaten Analyse, nach Korrektur für TMB, Alter und Stadium, noch immer ein signifikanter p-Wert, was gegen einen kausalen Zusammenhang dieser Faktoren spricht. Es ist also naheliegend, dass der Zusammenhang zwischen der Zugehörigkeit des Tumors zum *NF1* Subtyp und dem verbesserten RFS nicht durch andere Faktoren mediiert ist.

Hinsichtlich des OS ergaben sich keine signifikanten Assoziationen. Im Vergleich zu Triple-WT Tumoren wiesen *BRAF* Tumoren eine niedrige HR auf, wobei das Signifikanzniveau nicht unterschritten wurde (HR = 0,43; p = 0,060). Das passt wiederum nicht zu der Beobachtung von Thomas et al. (2015), die ein schlechteres MSS für *BRAF*-mutierte Tumoren berichteten. Da in der Stadium II Kohorte keine Informationen über das Therapieregime im Rezidivfall vorlagen, könnte dieser Trend jedoch auf ein besseres Ansprechen der *BRAF* Tumoren auf BRAF- und MEK-Inhibitoren zurückgehen (Flaherty et al., 2010; Hatzivassiliou et al., 2010).

4.6.3 Tumormutationslast

Wie in Kapitel 1.1.2 beschrieben, ist die TMB vor allem als möglicher prädiktiver Biomarker für das Ansprechen der Immuncheckpoint-Inhibitoren von klinischem Interesse (Arora et al., 2019). Daraus leitet sich die Frage ab, ob die TMB auch als prognostischer Biomarker, unabhängig von der Behandlung mit Immuntherapeutika, das Outcome beeinflusst. Die durchgeführte Studie war die erste, die einen prognostischen Wert der TMB in Stadium II Melanomen untersuchte.

Für die TMB wurde kein signifikanter Einfluss auf RFS oder OS festgestellt, weder bei der Analyse als kontinuierlicher noch als binärer Faktor. Die Hazard Ratios der kontinuierlichen Analyse lagen außerdem sehr nahe am Wert 1, was die Annahme unterstützt, dass die Höhe der TMB im Stadium II tatsächlich keinen Einfluss auf das Outcome hat. Die Ergebnisse der OS Analyse müssen mit Zurückhaltung interpretiert werden, da eine hohe TMB als prädiktiver Marker für das Ansprechen von Immuntherapien angesehen wird (Rizvi et al., 2015) und Informationen über den Einsatz dieser Therapeutika im Rezidiv-Fall nicht vorlagen. Die Studienlage zur Rolle der TMB als prognostischer Faktor ist ambivalent und soll daher im Folgenden beleuchtet werden.

Owada-Ozaki et al. (2018) beobachteten, dass sich eine hohe TMB für NSCLC Patienten im Stadium I sowohl negativ auf das OS als auch auf das krankheitsfreie Überleben (DFS) auswirkte. Für die Auswertung wurde der Median der Kohorte als Cutoff zwischen hoher und niedriger TMB verwendet. Die Autoren interpretierten eine hohe TMB als Zeichen erhöhter Malignität. (Owada-Ozaki et al., 2018)

Eine weitere Studie zeigte, in einer Kohorte mit Adenokarzinomen der Lunge aller Stadien, ebenfalls ein schlechteres OS bei Vorliegen einer hohen Mutationslast. Dieser Zusammenhang blieb auch in der multivariaten Cox-Analyse bestehen. Die Cutoffs wurden hierbei jedoch scheinbar willkürlich festgelegt und es wurde nicht berichtet, welche Patienten gegebenenfalls mittels Immuntherapie behandelt worden waren. Außerdem wurde lediglich ein kleines Genpanel mit 51 Genen sequenziert. (Xiao et al., 2016)

Samstein et al. (2019) untersuchten den Zusammenhang zwischen hoher TMB und dem OS in fortgeschrittenen Tumoren verschiedener Entitäten. Als Cutoff

wurde die 80. Perzentile der jeweiligen Tumorentität gewählt. Lediglich für das kolorektale Karzinom ergab sich ein signifikanter Zusammenhang, wobei die Überlebenskurven nach ca. 175 Monaten kreuzten. Nach diesem Zeitpunkt wies die Gruppe mit einer hohen TMB das bessere OS auf, davor die mit einer niedrigen. Für das Melanom wurde kein signifikanter Zusammenhang festgestellt, wobei die Kohortengröße mit $n = 31$ gering war. Auch für NSCLC Tumoren ($n = 623$) zeigte sich kein signifikanter Einfluss auf das OS. (Samstein et al., 2019)

Klebanov et al. (2019) postulierten einen Überlebensvorteil von Patienten mit Tumoren, die eine hohe Mutationslast aufwiesen und gleichzeitig einer Tumorentität mit einem bekanntermaßen großen Anteil an Passenger-Mutationen angehörten. Dieser Zusammenhang wurde auch für das maligne Melanom nachgewiesen. Für die Analyse wurden TCGA Daten verwendet. Informationen über das Therapieregime waren laut den Autoren für einige Patienten nicht verfügbar, weshalb der Einfluss verschiedener Therapieschemata auf das Überleben nicht in die Auswertung einbezogen werden konnte. Als Surrogatmarker für die TMB wurde in der Studie von der sogenannten "Tumor exonic missense mutational burden" (TEMMB) Gebrauch gemacht, die allerdings gut mit der exonischen Mutationslast korrelierte. (Klebanov et al., 2019)

Gupta et al. (2015) stellten anhand von TCGA Melanom-Daten aller Stadien ($n = 266$) ein signifikant besseres Gesamtüberleben für Patienten mit einer hohen logarithmisch-transformierten Anzahl an Missense-Mutationen fest. In der multivariaten Analyse wurde dabei jedoch nicht beachtet, ob die Patienten eine Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren erhalten hatten. Der Cutoff für die Einteilung in Gruppen mit hoher und niedriger Mutationslast wurde mittels einer Optimierungsmethode definiert. (Gupta et al., 2015)

Davoli et al. (2017) beobachteten, ebenfalls anhand der TCGA Daten, ein signifikant besseres Überleben von Melanompatienten hoher Tumorstadien mit einer großen Anzahl an Mutationen. Als Cutoff wurde der Median der Kohorte verwendet. Patienten, die eine Immun- oder Interferontherapie erhielten, wurden von der Analyse ausgeschlossen. (Davoli et al., 2017)

Insgesamt sind die Studienergebnisse damit sehr vielfältig und zum Teil widersprüchlich. Die genannten Studien zeigten jedoch für das maligne Melanom, im

Gegensatz zu anderen Tumorentitäten wie dem Bronchialkarzinom, wiederholt einen Überlebensvorteil durch hohe TMB-Werte (Davoli et al., 2017; Gupta et al., 2015; Klebanov et al., 2019). Teile der Abweichungen zwischen den Studien könnten durch ein unterschiedliches Verhalten der verschiedenen Tumorentitäten erklärt werden (Klebanov et al., 2019).

Oftmals wurden TCGA Daten für die Analyse des malignen Melanoms verwendet. Die TCGA Melanom-Kohorte besteht zu einem großen Teil aus metastasierenden Stadium IV Tumoren (Akbari et al., 2015). Das könnte eine mögliche Begründung für die Abweichungen zu den Ergebnissen der hier analysierten Stadium II Kohorte darstellen. Es wäre denkbar, dass die TMB erst in einem fortgeschrittenen Tumorstadium die Prognose beeinflusst. Beim Vergleich der Studienergebnisse muss außerdem beachtet werden, dass die Herangehensweise sich zum Teil wesentlich zwischen den verschiedenen Studien unterscheidet. Die Heterogenität bei der Berechnung der TMB wurde bereits in Kapitel 4.1.2 diskutiert. Des Weiteren gab es auch maßgebliche Unterschiede hinsichtlich der Definition des Cutoffs zur Differenzierung zwischen hoher und niedriger TMB. Außerdem wurde zum Teil nicht berichtet, ob die Patienten im Verlauf der Erkrankung mit Immuncheckpoint-Inhibitoren behandelt worden waren (Gupta et al., 2015; Klebanov et al., 2019; Xiao et al., 2016). Daher ist in diesen Fällen die Differenzierung zwischen einem prognostischen und einem prädiktiven Einfluss der TMB nur schwer möglich.

Obwohl die analysierte Kohorte mit 193 Patienten relativ groß war, sollte die Beobachtung, dass die TMB in Stadium II Melanomen das Outcome der Erkrankung nicht signifikant beeinflusste, in weiteren Studien mit Primärtumoren verifiziert werden. Es wäre sinnvoll, in Zukunft einheitliche Methoden für die Berechnung der TMB und die Festlegung von Cutoffs zu definieren (Goto, 2018). Auf diese Weise könnte die Vergleichbarkeit von Studien gewährleistet werden.

4.6.4 *TERT* Promoter Mutationen

TERT Promoter Mutationen wurden in Studien mit aggressiven Tumoreigenschaften wie erhöhter Tumordicke und Ulzeration in Verbindung gebracht (Heidenreich et al., 2014; Nagore et al., 2016; Pópulo et al., 2014). Daher wurde wiederholt auch eine prognostische Auswirkung dieser Alterationen untersucht. Griewank et al. (2014) wiesen für nicht-akrale Melanome einen signifikanten Zusammenhang der Hotspot-Mutationen mit einem schlechteren OS der Patienten nach. Für Melanome der Tumorstadien I und II (n = 300) wurde auch von Nagore et al. (2016) ein signifikant kürzeres krankheitsfreies Überleben und MSS bei Vorliegen einer *TERT* Promoter Mutation berichtet. Dieser Zusammenhang bestätigte sich in der multivariaten Analyse jedoch lediglich für das MSS, wobei der p-Wert mit $p = 0,05$ nahe dem Signifikanzniveau lag (Nagore et al., 2016). Allerdings wurde in der multivariaten Analyse zusätzlich zwischen dem ausschließlichen Vorliegen einer *TERT* Promoter Mutation und der Kombination dieser mit einer *BRAF* oder *NRAS* Mutation im Tumor unterschieden. Letztere Gruppe zeigte auch in der multivariaten Analyse im Vergleich zu *TERT*-wildtyp Tumoren für beide Überlebensparameter signifikante p-Werte (Nagore et al., 2016). Zehir et al. (2017) fanden im Gegensatz zu früheren Studien keine signifikante Auswirkung der Mutationen im *TERT* Promoter auf das OS von Melanompatienten.

In der analysierten Kohorte wurde für das Stadium II kein signifikanter Effekt von Mutationen der *TERT* Promoter Hotspots auf das RFS oder OS festgestellt. Die Auswertung wurde zusätzlich für eine Subkohorte mit ausschließlich kutanen Melanomen wiederholt, da auch Griewank et al. (2014) nur nicht-akrale Melanome für die Analyse berücksichtigten. Hierfür ergab sich in der analysierte Stadium II Kohorte jedoch ebenfalls kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Outcome und dem Vorliegen einer *TERT* Promoter Hotspot-Mutation.

Zumindest ein Teil der in den genannten Studien beobachteten Zusammenhänge zwischen Hotspot-Mutationen des *TERT* Promoters und dem Outcome könnte auf eine Assoziation dieser Mutationen mit klinisch aggressiven Tumoreigenschaften zurückzuführen sein. Dafür spricht, dass sich in der Studie von Nagore et al. (2016), nach Korrektur für unter anderem Alter und Stadium, in der multivariaten Analyse für das krankheitsfreie Überleben kein signifikanter

Zusammenhang ergab und das MSS das Signifikanzniveau nur knapp unterschritt. Da sich außerdem nicht nur die Tumorstadien, sondern auch die einzelnen Substadien hinsichtlich der Prognose wesentlich unterscheiden (Gershenwald et al., 2017), sollten diese in der multivariaten Cox-Analyse ebenfalls berücksichtigt werden. Nagore et al. (2016) korrigierten beispielsweise nur für die Tumorstadien I und II, nicht aber für die jeweiligen Substadien. Da jedoch in der hier vorliegenden Arbeit für das gesamte Stadium II, unabhängig von den Substadien, kein signifikanter Effekt beobachtet wurde, kann dieser Kritikpunkt die Abweichungen zu früheren Studien nicht vollständig begründen.

Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass in der analysierten Kohorte in lediglich 114 Fällen Informationen über den Mutationsstatus des *TERT* Promoters vorliegen (Kapitel 2.4.7). Diese Zahl könnte zu gering sein, um sehr kleine Effekte auf das Überleben nachzuweisen. Auch Zehir et al. (2017) beobachteten jedoch für das Melanom keinen signifikanten Zusammenhang.

4.6.5 Aneuploidie

Aneuploidie kann in einem Großteil solider Malignome als somatische Alteration der Tumorzellen beobachtet werden (Taylor et al., 2018; Weaver und Cleveland, 2006). In Kapitel 1.1.3 wurden bereits einige Eigenschaften von Aneuploidie und CIN *in vitro* sowie das Aneuploidie-Paradoxon beleuchtet. Daraus resultiert die Frage, ob der Grad der Aneuploidie bzw. der chromosomalen Instabilität im Tumor den klinischen Verlauf der Erkrankung beeinflusst. Wie in Kapitel 4.1.4 diskutiert, wurde in der vorliegenden Arbeit die Aneuploidie als Surrogatmarker für chromosomale Instabilität verwendet.

In der analysierten Stadium II Kohorte wurde kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Grad der Aneuploidie im Tumorgewebe und dem RFS oder OS festgestellt. Für die Analyse wurde die Kohorte anhand eines Aneuploidie-Scores in vier Quartile unterteilt, die miteinander verglichen wurden. Dieser Herangehensweise lag die aus Studien abgeleitete Annahme zugrunde, dass Patienten mit einer hohen Aneuploidie im Tumor ein schlechteres Outcome aufweisen, jene mit einer extremen Aneuploidie jedoch insgesamt wiederum ein verbessertes (Birkbak et al., 2011; Roylance et al., 2011). Es existieren bereits einige Studien

an Tumoren anderer Entitäten, die einen Einfluss von CIN und Aneuploidie auf das Outcome der Patienten feststellten. Die Datenlage für das maligne Melanom ist allerdings bisher sehr begrenzt. Daher sollen zunächst die Ergebnisse großer Studien dargestellt werden, die sich mit den Effekten in anderen Tumorentitäten auseinandersetzten. Bei der Interpretation der Studienergebnisse muss bedacht werden, dass zum Teil eine große Heterogenität bei der Messung von CIN und Aneuploidie besteht (Kapitel 4.1.4).

Carter et al. (2006) beschrieben für chromosomal instabile Tumoren sechs verschiedener Tumorentitäten eine Assoziation zwischen CIN und einem schlechteren klinischen Outcome. Dieser Zusammenhang galt unter anderem für Kohorten von Mammakarzinomen, Adenokarzinomen der Lunge, Mesotheliomen sowie Gliomen. Die Studie machte von CIN-25- und CIN-70-Signaturen Gebrauch. Die Berechnung dieser Signaturen erfolgte anhand von Expressionsdaten 25 bzw. 70 ausgewählter Gene, die mit der sogenannten totalen funktionellen Aneuploidie korrelierten. Bei der Analyse verschiedener Mammakarzinomstadien zeigte sich lediglich für die niedrigen Stadien I und II ein signifikanter Zusammenhang zwischen der CIN-25-Signatur und einem schlechteren Outcome. (Carter et al., 2006)

Eine Meta-Analyse von mehr als 60 Studien untersuchte die Assoziation von CIN oder Aneuploidie bzw. Polyploidie mit dem klinischen Outcome des kolorektalen Karzinoms. Wie die CIN in den einzelnen Studien definiert war, wurde nicht im Detail ausgeführt. In 20 der betrachteten Studien wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen CIN und einem schlechteren Gesamtüberleben nachgewiesen. Dieser Zusammenhang wurde auch in der separaten Analyse der Tumorstadien II und III detektiert. Die Autoren schlussfolgerten, dass CIN in kolorektalen Karzinomen mit einem schlechteren Outcome einhergeht. (Walther et al., 2008)

Birkbak et al. (2011) beobachteten in einer Meta-Analyse verschiedener solider Tumoren einen Zusammenhang zwischen extremer CIN, definiert als das höchste Quartil der Kohorte, und einer verbesserten Prognose im Vergleich zum dritten Quartil. Der Grad der vorliegenden CIN wurde erneut mittels der CIN-70 Signatur gemessen. Der genannte Zusammenhang zeigte sich in

Mammakarzinomen, Ovarialkarzinomen, Plattenepithelkarzinomen der Lunge sowie Magenkarzinomen. Diese Assoziation war außerdem unabhängig von der Durchführung einer adjuvanten Therapie. Die Studie beschäftigte sich jedoch ebenfalls nicht mit den Auswirkungen im malignen Melanom (Birkbak et al., 2011) Auch Roylance et al. (2011) stellten in einer Kohorte von 51 Östrogenrezeptor-negativen Mammakarzinomen ein signifikant besseres Überleben der Patienten mit Tumoren, die von einer „extremen“ CIN betroffen waren, fest. Dieser Zusammenhang blieb auch in der multivariaten Analyse bestehen. Für Östrogenrezeptor-positive Mammakarzinome war hingegen das Vorliegen einer „extremen“ CIN im Tumor mit dem schlechtesten Überleben assoziiert. Die CIN wurde unter anderem mittels zentromerer FISH der Chromosomen 2 und 15 sowie anhand der CIN-70-Signatur ermittelt. Auch für Magenkarzinome, Ovarialkarzinome und NSCLC wurde anhand der CIN-70-Signatur ein verbessertes Überleben im höchsten Quartil des jeweiligen Kollektivs festgestellt. Die Effekte von CIN im malignen Melanom wurden auch in dieser Studie nicht untersucht. (Roylance et al., 2011)

Als möglicher Erklärungsansatz für das wiederholt beschriebene schlechtere Outcome chromosomal instabiler Tumoren könnte eine Assoziation zwischen der durch CIN hervorgerufenen intratumoralen Heterogenität mit einer erhöhten Anpassungsfähigkeit des Tumors dienen (Heng et al., 2013; Turajlic et al., 2019). Durch eine größere genetische Variabilität der Zellpopulation haben CIN-Tumoren aus evolutionärer Sicht bessere Chancen einen therapieresistenten Klon hervorzubringen (Gerlinger und Swanton, 2010). Bei extremer Ausprägung von CIN oder Aneuploidie scheint jedoch eine negative Auswirkung auf die zelluläre Fitness zu überwiegen (Turajlic et al., 2019). Diese Annahme könnte einen Ansatzpunkt für neue Therapeutika darstellen (Janssen et al., 2009; Kops et al., 2004; Tang et al., 2011). Janssen et al. (2009) hielten beispielsweise eine selektive Abtötung von Tumorzellen durch die Induktion einer fehlerhaften Chromosomentrennung während der Mitose für möglich. Außerdem zeigten einige Medikamente *in vitro* eine erhöhte Zytotoxizität in Zellen mit komplexen Karyotypen (Roschke et al., 2005).

Wie bereits erwähnt ist die bisherige Datenlage zum Einfluss von Aneuploidie und CIN auf das klinische Outcome für das maligne Melanom dürrtig. Kaufmann et al. (2014) stellten für Melanome keine signifikante Auswirkung von CIN auf die Metastasierungstendenz von Primärtumoren fest. In der Studie wurde erneut von einer CIN-Signatur Gebrauch gemacht (Kaufmann et al., 2014).

Im Gegensatz zu anderen Tumorentitäten beobachteten auch Davoli et al. (2017) für das Melanom keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem SCNA-Niveau und dem Outcome, unabhängig von der Anwendung systemischer Therapeutika. Es zeigte sich in der analysierten Kohorte jedoch eine Tendenz hin zu einem besseren Outcome in Verbindung mit einem hohen SCNA-Niveau. Außerdem wurde eine signifikante Assoziation zwischen einem hohen SCNA-Level im Tumor und einer verbesserten Prognose in Verbindung mit der Applikation von CTLA-4-Inhibitoren gefunden. Da eine negative Korrelation zwischen Aneuploidie und dem zytotoxischen Immuninfiltrat im Tumorgewebe auffiel, vermuteten die Autoren, dass ein niedrigeres SCNA-Level im Tumor mit einer verbesserten Immunreaktion einhergeht. Für Aberrationen ganzer Chromosomen und Chromosomenarme wurde in dieser Hinsicht ein besonders großer Einfluss beobachtet. Als Erklärungsansatz wurde angeführt, dass Aneuploidie durch die Induktion eines Proteinungleichgewichts eine erhöhte Präsentation von Wildtyp-Proteinen auf MHC zur Folge haben könnte. (Davoli et al., 2017)

Vor allem der von Davoli et al. (2017) beschriebene positive Einfluss von SCNAs auf die Prognose nach einer Immuntherapie könnte auch von klinischem Interesse sein und sollte daher in weiteren Studien untersucht werden. Diesbezüglich konnte anhand der vorliegenden Daten für die Stadium II Kohorte keine Aussage gemacht werden. Das Ergebnis der analysierten Kohorte unterstützt allerdings die Annahme, dass für das maligne Melanom unabhängig vom Therapieregime kein Zusammenhang zwischen Aneuploidie und Outcome besteht. Es sollten jedoch weitere Studien mit größeren Patientenzahlen durchgeführt werden. Obwohl bereits einige Studien auch Patienten in früheren Stadien analysierten (Carter et al., 2006; Walther et al., 2008), sollte der prognostische Wert von CIN und Aneuploidie in Abhängigkeit des Stadiums evaluiert werden. Da karyotypische Veränderungen während der Tumorprogression zunehmen (Balaban et al.,

1986; Carter et al., 2006; Kaufmann et al., 2014; Shain et al., 2015b), ist denkbar, dass es sich um einen Stadien-spezifischen prognostischen Marker handeln könnte (Laubert et al., 2015).

4.6.6 Mutationen und SCNAs potenzieller Treibergene

Alterationen in Treibergenen werden als wichtige Ursachen für die Tumorentstehung und Progression angesehen. Daher liegt nahe, dass Mutationen, Amplifikationen und Deletionen von Treibergenen auch mit aggressiveren Tumoreigenschaften und folglich einem schlechteren klinischen Outcome einhergehen könnten. Die Studienlage in Bezug auf dieses Thema ist erneut ambivalent. Für einige Treibergene wurde bereits in verschiedenen Arbeiten eine negative Auswirkung auf das Outcome nachgewiesen. Wie in Kapitel 4.6.4 beleuchtet, beobachteten beispielsweise mehrere Studien eine negative Auswirkung von *TERT* Promoter Mutationen auf das Überleben betroffener Patienten (Griewank et al., 2014; Nagore et al., 2016). Auch für *BRAF*, *NRAS* und *NF1* Mutationen wurde in einigen Arbeiten, wie in Kapitel 4.6.2 diskutiert, ein negativer Einfluss auf das Outcome von Melanompatienten festgestellt (Thomas et al., 2015). In einer Kohorte mit kolorektalen Karzinomen der Stadien II und III zeigte sich hingegen kein Einfluss verschiedener Treibermutationen auf die Prognose (Mouradov et al., 2013).

Es ist sehr wahrscheinlich, dass sich nicht alle Treibergene diesbezüglich gleich verhalten. Für Gene, deren Alteration mit einem verkürzten RFS einhergeht, wäre eine Rolle bei der Metastasierung denkbar. Veränderungen, die zu einem verkürzten OS führen, könnten zusätzlich zu der Metastasierungstendenz mit einer generell erhöhten Aggressivität des Tumors assoziiert sein.

Im Gegensatz zu dem bereits diskutierten Einfluss der molekularen Subtypen auf das RFS (Kapitel 4.6.2), konnte für die übrigen analysierten potenziellen Treibergene in der Kohorte kein Einfluss auf das Outcome der Patienten beobachtet werden. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass meist nicht die Mutation eines einzelnen Gens, sondern eine Kombination aus genomischen Alterationen für ein aggressiveres Tumorverhalten verantwortlich ist. Außerdem wäre denkbar, dass

einige Treibergene lediglich zur Tumorinitiation, nicht jedoch zur Metastasierung beitragen. Des Weiteren wurden in der Analyse alle kodierenden Mutationen berücksichtigt, nicht nur jene, die nachgewiesenermaßen zu einem Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen oder einem Gain-of-Function von Onkogenen führen. Diese Herangehensweise wurde gewählt, um für alle Gene einheitlich zu verfahren. Für die nominierten Tumortreiber, die zuvor im Melanom noch nicht beschrieben waren, hätte andernfalls über die genauen Auswirkungen der einzelnen Mutationen spekuliert werden müssen. Interessant wäre es daher, auch den Einfluss der Expressionslevel dieser Gene auf das Überleben zu prüfen, da vom Vorliegen einer kodierenden Mutation in den Tumorzellen nicht automatisch auf die tatsächliche Expression des Gens geschlossen werden kann. Für die analysierten Proben waren jedoch keine Expressionsdaten verfügbar.

Bei der Analyse des Einflusses der von GISTIC als hochsignifikant detektierten Deletionen auf das Überleben war die Deletion der Region 11q23.1 mit einem schlechteren OS assoziiert. Ein Zusammenhang zwischen einem Loss of Heterozygosity (LOH) der Region 11q23 und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen wurde bereits von Herbst et al. (2000) für das maligne Melanom beschrieben. Ein LOH der Region wurde in 38 % der Primärtumoren, 67 % der regionalen Lymphknotenmetastasen und 100 % der Fernmetastasen beobachtet (Herbst et al., 2000). Dies unterstützt die Hypothese, dass eine Deletion der von GISTIC detektierten Region mit einem aggressiveren Tumorverhalten assoziiert sein könnte. Bei einer hohen Signifikanz von $p = 0,0001$ nach der BH-Korrektur ist ein durch Zufall entstandenes Ergebnis unwahrscheinlich. Trotzdem sollten die Ergebnisse in weiteren Studien verifiziert werden.

Aufgrund der Größe der GISTIC Region 11q23.1 war eine hohe Anzahl an Genen auf dem entsprechenden Wide-Peak lokalisiert (Abbildung 14, Supplement 10). Wie bereits in Kapitel 4.5 erklärt, ist es daher nicht möglich, die positive Selektion der Alteration sicher auf ein einzelnes Gen zurückzuführen. Interessanterweise war jedoch auch das Gen *CBL*, das von allen drei Algorithmen als potenzielles Treibergen nominiert wurde (Kapitel 4.4.4), auf dem Wide-Peak der Region 11q23.1 lokalisiert. Diese Beobachtung könnte eine Rolle von *CBL* als Tumorsuppressorgen des malignen Melanoms unterstützen.

Es existieren bereits Studien anderer Tumorentitäten, die Unterschiede in der *CBL* Expression als prognostischen Faktor identifizierten. Kumaradevan et al. (2018) beobachteten in einer Patientenkohorte mit kolorektalen Karzinomen im Stadium IV eine Assoziation zwischen hoher *CBL* Expression und einem verbesserten OS (n = 72). Zwischen den Gruppen mit hoher und niedriger *CBL* Expression existierten jedoch Unterschiede hinsichtlich der therapeutischen Herangehensweise (Kumaradevan et al., 2018). Im Gegensatz dazu fanden Jing et al. (2016) für Gliome ein signifikant schlechteres progressionsfreies Überleben (PFS) sowie OS im Zusammenhang mit einer hohen *CBL* Expression. Tumoren mit einer hohen Expression wiesen dabei insgesamt ein höheres Tumorstadium auf, allerdings wurde der Zusammenhang zu einem schlechteren Outcome auch unabhängig vom Tumorstadium in der multivariaten Analyse nachgewiesen (Jing et al., 2016). Luo et al. (2018) identifizierten ebenfalls eine hohe Expression von *CBL* und dessen Homolog *CBLB* als negative Einflussfaktoren auf das OS und PFS in Chordomen der Schädelbasis (n = 70).

Damit wurden sowohl positive als auch negative Auswirkungen der *CBL* Expression auf das Outcome verschiedener Tumorarten beobachtet. Diese Widersprüche könnten mit den vielfältigen Funktionen zusammenhängen, die *CBL* in der Zelle ausübt (Kapitel 4.4.4). Es wäre denkbar, dass sich der Einfluss von *CBL* auf das Überleben zwischen verschiedenen Tumorentitäten unterscheidet. Da *CBL* in der Melanomkohorte auf einer deletierten Region lokalisiert war, wäre eine negative Beeinflussung des OS durch die Deletion des Gens möglich. Allerdings könnte für diesen Effekt auch ein anderes auf dem Wide-Peak lokalisiertes Gen verantwortlich sein oder, aufgrund der Größe der Region, auch eine Kombination mehrerer Gene. Außerdem konnten keine Auswirkungen von *CBL* Mutationen auf das Outcome beobachtet werden (Kapitel 3.9). Das könnte jedoch erneut damit zusammenhängen, dass bei der Analyse nicht nach den funktionellen Auswirkungen der einzelnen Mutationen gefiltert wurde. Ein signifikanter Einfluss von Mutationen, die zu einem Funktionsverlust von *CBL* führen, könnte hierdurch überlagert worden sein. Die Funktion von *CBL* in Melanomzellen sowie ein potenzieller Einfluss auf das Outcome der Patienten sollte in weiteren Studien untersucht werden.

4.7 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit wurde eine große Kohorte aus Patienten mit Stadium II Melanomen mittels NGS auf molekulargenetische Eigenschaften analysiert.

Ein wichtiger Aspekt war dabei der indirekte Vergleich von und die Abgrenzung zu Studienergebnissen, die vornehmlich an Melanomen höherer Tumorstadien gewonnen wurden. Zusammenfassend zeigte sich, dass die klinischen und genetischen Charakteristika der Stadium II Tumoren häufig mit denen höherer Stadien übereinstimmten. Es wurden mit *BRAF*, *NRAS*, *NF1*, *PTEN*, *CDKN2A*, *KIT*, *TP53*, *PPP6C*, *MAP2K1* und *ARID2* beispielsweise viele der typischen Treiber-gene von den verwendeten Algorithmen identifiziert. Auch *TERT* Promoter-Mutationen wurden in einem großen Anteil der Tumoren beobachtet. Die GISTIC Analyse identifizierte ebenfalls einige Regionen, die bereits bekannte Treiber-gene enthielten. Hierzu gehörten Amplifikationen von *KIT*, *MITF*, *TERT*, *BRAF*, *CCND1*, *CDK4*, *MDM2* und *MYC* sowie Deletionen von *CDKN2A*. Wie in vorherigen Studien metastasierter Melanome (Bastian et al., 1998; Guan et al., 2015), zeigten sich außerdem Amplifikationen der Chromosomenarme 1q, 6p, 7 und 8q sowie Deletionen von 6q, 9 und 10 in vielen Proben. Die weitere Zunahme dieser karyotypischen Veränderungen während der Tumorprogression konnte jedoch anhand der vorliegenden Daten nicht ausgeschlossen werden.

Es ergaben sich jedoch auch geringfügige Unterschiede zu Ergebnissen vorheriger Studien. Dazu gehörte beispielsweise ein auffallend geringer Anteil an *BRAF*-mutierten Melanomen, was jedoch auch in einem höheren Anteil von ALM an der Studienpopulation begründet sein könnte.

Die Detektion von Unterschieden war in der vorliegenden Arbeit nur sehr begrenzt möglich, da anhand der vorliegenden Daten lediglich ein indirekter Vergleich erfolgen konnte. Um den Unterschieden zwischen Stadium II Melanomen und Melanomen höherer Tumorstadien weiter nachzugehen, sollten daher Folgestudien angeschlossen werden. Ein direkter Vergleich wäre durch die gleichzeitige Analyse von Tumorgewebe von Melanomen im Stadium II und Metastasengewebe im Fall eines Fernrezidivs des Tumors möglich.

Ein weiteres Ziel der Studie war die Identifikation von Unterschieden zwischen den molekularen Subtypen *BRAF*, *RAS*, *NF1* und Triple-WT (Akbari et al., 2015) im frühen Tumorstadium, da diese unter anderem mit prädiktiven Faktoren für das Ansprechen zielgerichteter Therapien assoziiert sind. Die vier Subtypen wiesen, wie bereits zuvor in Studien beobachtet (Akbari et al., 2015; Cirenajwis et al., 2017), deutliche Unterschiede hinsichtlich klinischer und histopathologischer Eigenschaften, der TMB sowie der vorherrschenden Tumortreiber und SCNAs auf. *NF1* Tumoren zeichneten sich beispielsweise durch eine hohe TMB, das höchste Patientenalter, eine Dominanz der UV-Signatur sowie das überwiegende Auftreten im Kopf-Hals-Bereich aus. Triple-WT Tumoren waren im Gegensatz dazu meist an der unteren Extremität lokalisiert, gehörten oft der ALM Histologie an und wiesen die geringste TMB unter den Subtypen auf. Außerdem waren sie häufig von *KIT* Mutationen betroffen und trugen besonders viele SCNAs, die als alternativer Mechanismus zu Mutationen bei der Tumorgenese dienen könnten. Da in Triple-WT Tumoren der Einsatz von BRAF- und MEK-Inhibitoren nicht möglich ist und die TMB in den meisten Tumoren vergleichsweise gering ist, was mit einem verminderten Ansprechen auf Immuncheckpointinhibitoren einhergehen könnte, käme eventuell eine Therapie mit Tyrosinkinase-Inhibitoren in Frage. Da *KIT* Mutationen bereits im Stadium II häufig vorhanden waren, unter anderem solche, die in vorherigen Studien mit einem Ansprechen auf besagte Substanzen assoziiert waren (Carvajal et al., 2011; Guo et al., 2011; Hodi et al., 2013), könnten Patienten mit einem hohen Rezidivrisiko bereits im frühen Tumorstadium von einer systemischen Therapie mit diesen Substanzen profitieren. Diesbezüglich müssten weitere Studien abgeschlossen werden.

Ein weiterer zentraler Aspekt der Arbeit war die Identifikation möglicher Treiber-gene im nicht-metastasierten Tumorstadium. Als neuer potenzieller Tumortreiber ist das Gen *CBL*, das von allen drei Algorithmen in der Gesamtkohorte identifiziert wurde, besonders hervorzuheben. Bisher wurde *CBL* lediglich im desmoplastischen Melanom als mögliches Treiber-gen diskutiert (Shain et al., 2015a). Die Annahme einer Treiberrolle des Gens wird durch die Detektion der Mutations-cluster im Bereich um die Positionen P417 und Y371 unterstützt. Diese beiden

Positionen wurden bereits in Studien anderer Neoplasien als mutiert beschrieben, was sich wiederum auf die Funktion des Genprodukts auswirkte (Grand et al., 2009; Kumaradevan et al., 2018). Das Vorliegen einer Mutation von *CBL* war außerdem signifikant mit der Abwesenheit einer *BRAF* oder *NRAS* Hotspot-Mutation im Tumor assoziiert, was auf eine funktionelle Redundanz dieser Alterationen hindeutet. Diese Hypothese wird durch Studienergebnisse unterstützt, die eine Beeinflussung des MAPK-Signalwegs durch *CBL* postulieren (Ettenberg et al., 1999; Finkelstein und Shimizu, 2000; Schmidt und Dikic, 2005). Damit könnte *CBL* einen alternativen Aktivierungsmechanismus dieses Signalweges in den Subtypen *NF1* und Triple-WT, unabhängig von den klassischen *BRAF* und *NRAS* Mutationen, darstellen. Es sollten sich weitere Studien anschließen, die sich beispielsweise mit Expressionsdaten des Gens in von Mutationen betroffenen Tumoren auseinandersetzen. Auf diese Weise könnte die Annahme einer Treiberrolle ggf. weiter erhärtet werden. Außerdem sollte *in vitro* untersucht werden, wie sich die verschiedenen Mutationen sowie die SCNAs des Gens auf Melanomzellen auswirken. Sollte sich tatsächlich ein Einfluss auf den im Melanom zentralen MAPK-Signalweg zeigen, wäre es von Interesse, die prädiktive Auswirkung von *CBL* Mutationen hinsichtlich des Ansprechens auf *BRAF*- und *MEK*-Inhibitoren, die therapeutisch in den MAPK-Signalweg eingreifen, zu untersuchen.

Auch die weiteren von den Algorithmen identifizierten potenziellen Treibergene, wie beispielsweise *HGF* und *ADAMTS18*, die zuvor nie oder nur in wenigen Studien beschrieben wurden, sollten Inhalt weiterer Forschung sein. Bezüglich der Detektion von SCNAs ist der Rückschluss auf ein zugrundeliegendes Gen meist schwierig, da viele der identifizierten Regionen eine große Zahl an Genen enthielten. Hervorzuheben sind jedoch Amplifikationen von *RPTOR* und *RBX1* sowie Deletionen von *ANK3*, die allein oder nur mit wenigen weiteren Genen auf detektierten Regionen lokalisiert waren. Diese sollten ebenfalls in weiteren Studien genauer betrachtet werden. Neu identifizierte Treibergene könnten als Therapietargets für zielgerichtete Tumorthérapien dienen.

Eine weitere Zielsetzung der Studie betraf die Identifikation prognostischer Faktoren im lokalisierten Tumorstadium II. Das RFS und das OS wurden in der hier vorliegenden Arbeit vor allem durch die bereits bekannten Faktoren Tumordicke, Tumorstadium sowie das Patientenalter und die Histologie (OS) beeinflusst. Diese Beobachtungen unterstützen die aktuelle Stadieneinteilung, die sich aus der Tumordicke und dem Vorliegen einer Ulzeration im Tumor ergibt (Gershenwald et al., 2017). Als Konsequenz dieser Ergebnisse könnte eine Berücksichtigung des Alters bei der Festlegung der Nachsorgeintervalle erfolgen, da ältere Patienten ein höheres Rezidivrisiko aufwiesen. Diesbezüglich müssten jedoch weitere Studien mit höheren Patientenzahlen abgeschlossen werden.

Für die genetischen Eigenschaften wie die TMB, das Vorliegen einer *TERT* Promoter Hotspot-Mutation, den Grad der Aneuploidie im Tumorgewebe sowie das Vorliegen von Mutationen in den nominierten Treibergenen konnte im Stadium II keine signifikante Auswirkung auf die Prognose festgestellt werden. Lediglich die Zuordnung des Tumors zum *NF1* Subtyp war mit einem verbesserten RFS im Vergleich zu Patienten mit Triple-WT Melanomen assoziiert.

Als neuer prognostischer Faktor des OS wurde die Deletion der mittels GISTIC detektierten Region 11q23.1 im Tumorgewebe identifiziert. Dieser Einfluss blieb auch nach Korrektur für Alter, TMB, Tumorstadium und molekularen Subtyp signifikant (HR = 2,85). Auf dem Wide-Peak der genannten Region war unter anderem das als Treiber nominierte Gen *CBL* lokalisiert, was eine tumorsuppressive Rolle des Gens unterstützen könnte. Da die von GISTIC identifizierte Region 11q23.1 sehr groß war und somit sehr viele Gene beinhaltete, sollten weitere Studien folgen, um die der positiven Selektion zugrunde liegenden Ziel-Gene zu identifizieren. Außerdem sollte klinisch evaluiert werden, ob eine Einbeziehung dieses Prognosefaktors die Risikostratifizierung weiter verbessern und eventuell eine zusätzliche systemische Therapie im frühen Stadium rechtfertigen könnte.

Eine wichtige Limitation der dieser Arbeit zugrunde liegenden Studie ist, dass keine Informationen über das Melanom-spezifische Überleben sowie das Therapieregime im Fall eines Rezidivs vorlagen. So konnte der Einfluss verschiedener systemischer Therapien auf das Outcome nicht berücksichtigt werden.

Außerdem war aufgrund der Sequenzierung eines Gen-Panels keine Aussage über Mutationen der nicht-sequenzierten Gene möglich.

Eine weitere potenzielle Fehlerquelle stellt die Verwendung von FFPE-Material dar. Diese Art der Gewebefixierung könnte Artefakte bei der Sequenzierung verursachen (Do und Dobrovic, 2009; Greer et al., 1991; Melendez et al., 2018). Außerdem wurden Tumor- und Normalgewebe aus dem gleichen Gewebeblock gewonnen, wodurch eine Kontamination des Normalgewebes mit Tumorgewebe möglich wäre.

Allgemeine Limitationen der Herangehensweise sind die Heterogenität bei der Messung von TMB, Aneuploidie und CIN zwischen verschiedenen Studien und das in Kapitel 4.1.3 diskutierte Verbesserungspotential hinsichtlich der verwendeten Algorithmen für die Detektion von Tumortreibern. Für die Zukunft wäre es von Bedeutung, Herangehensweisen und Definitionen zu vereinheitlichen, um eine bessere Vergleichbarkeit verschiedener Studien zu gewährleisten. Damit könnte sichergestellt werden, dass unterschiedliche Studienergebnisse nicht auf methodische Faktoren zurückgehen.

Trotz der aufgezeigten Verbesserungspotenziale handelt es sich mit 193 Melanompatienten um eine große Studienkohorte, die in dieser Form und dieser Kohortengröße auch die Identifikation kleiner Unterschiede des Outcomes sowie selten mutierter Treibergene ermöglicht. Die meisten bisherigen Studien beinhalteten vor allem Melanome der metastasierten Stadien III und IV. Dies gilt auch für die TCGA Melanomkohorte (Akbari et al., 2015). Durch die Sequenzierung von Tumor- und Normalgewebe konnte außerdem sichergestellt werden, dass es sich bei den detektierten Mutationen um somatische Veränderungen handelt. Mittels der Kombination von drei Algorithmen zur Detektion potenzieller Treibergene steigt außerdem die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei den identifizierten Genen tatsächlich um relevante Tumortreiber handelt. Ein weiterer Vorteil der Studie besteht darin, dass das RFS im Stadium II weitestgehend unabhängig vom Einfluss systemischer Therapien ist, da diese zum Zeitpunkt der Datenerhebung erst ab Stadium III zum Einsatz kamen.

5 Zusammenfassung

Das Ziel der Studie war eine umfassende Charakterisierung der genetischen Eigenschaften von Melanomen im Stadium II sowie die Analyse prognostischer Einflussfaktoren auf das rezidivfreie Überleben (RFS) und das Gesamtüberleben (OS) im frühen Erkrankungsstadium. Hierfür wurde das Tumor- und Normalgewebe einer Kohorte aus 193 Patienten mit Stadium II Melanomen mittels Next Generation Sequencing eines Genpanels aus 693 Genen auf somatische Mutationen und Somatic copy-number alterations (SCNAs) analysiert.

Mit Hilfe der bioinformatischen Algorithmen MutSigCV, OncodriveCLUST und OncodriveFM sowie GISTIC für SCNAs wurden potenzielle Treibergene in der Gesamtkohorte sowie den vier molekularen Subtypen *BRAF*, *RAS*, *NF1* und Triple-WT identifiziert. Auf diese Weise wurden viele Gene detektiert, die bereits zuvor als Treibergene des Melanoms bekannt waren sowie einige, die bisher nicht in diesem Zusammenhang beschreiben waren. Dabei ist das Gen *CBL* als mögliches Tumorsuppressorgen besonders hervorzuheben. Mutationen dieses Gens könnten als alternativer Aktivierungsmechanismus des MAPK-Signalwegs zu den typischen *BRAF* und *NRAS* Hotspot-Mutationen fungieren. *CBL* wurde zuvor eine mögliche Treiberrolle in desmoplastischen Melanomen zugeschrieben (Shain et al., 2015a).

In der Stadium II Kohorte wurden die klinischen und pathologischen Faktoren Tumorstadium, Tumordicke und Alter bei Diagnosestellung als prognostisch relevant identifiziert. Außerdem wirkte sich die Histologie signifikant auf das OS aus und *NF1* Tumoren waren mit einem verbesserten RFS assoziiert. Für die Tumormutationslast (TMB), die Aneuploidie sowie den Mutationsstatus der nominierten Treibergene ergaben sich keine signifikanten Auswirkungen auf das RFS oder das OS. Als neuer prognostischer Parameter wurde die Deletion der von GISTIC identifizierten Region 11q23.1 gefunden, die mit einem signifikant schlechteren OS einherging (HR = 4,75). Dieser Zusammenhang blieb auch nach Korrektur für die Parameter Alter bei Diagnose, TMB, Tumorstadium und molekularen Subtyp signifikant.

Hinsichtlich der molekulargenetischen Eigenschaften ergaben sich insgesamt große Übereinstimmungen mit Tumoren höherer Stadien. Für neu identifizierte Tumortreiber, wie beispielsweise *CBL*, wäre eine Nutzung als Therapietargets für neue, zielgerichtete Therapeutika denkbar. Die prognostische Relevanz der 11q23.1 Deletion könnte eine verbesserte Risikostratifizierung ermöglichen und möglicherweise den Einsatz individualisierter Therapieschemata bereits im früheren Stadium rechtfertigen. Dies muss in weiteren Studien untersucht werden.

Literaturverzeichnis

- Adzhubei, IA, Schmidt, S, Peshkin, L, Ramensky, VE, Gerasimova, A, Bork, P, . . . Sunyaev, SR (2010) A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 7: 248-9.
- Akbani, R, Akdemir, KC, Aksoy, BA, Albert, M, Ally, A, Amin, SB, . . . Zou, L (2015) Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell* 161: 1681-96.
- Alexandrov, LB, Nik-Zainal, S, Wedge, DC, Aparicio, SA, Behjati, S, Biankin, AV, . . . Stratton, MR (2013a) Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* 500: 415-21.
- Alexandrov, LB, Nik-Zainal, S, Wedge, DC, Campbell, PJ & Stratton, MR (2013b) Deciphering signatures of mutational processes operative in human cancer. *Cell Rep* 3: 246-59.
- Allgäuer, M, Budczies, J, Christopoulos, P, Endris, V, Lier, A, Rempel, E, . . . Stenzinger, A (2018) Implementing tumor mutational burden (TMB) analysis in routine diagnostics-a primer for molecular pathologists and clinicians. *Transl Lung Cancer Res* 7: 703-15.
- Andersen, LB, Fountain, JW, Gutmann, DH, Tarle, SA, Glover, TW, Dracopoli, NC, . . . Collins, FS (1993) Mutations in the neurofibromatosis 1 gene in sporadic malignant melanoma cell lines. *Nat Genet* 3: 118-21.
- Andoniou, CE, Thien, CB & Langdon, WY (1994) Tumour induction by activated abl involves tyrosine phosphorylation of the product of the cbl oncogene. *EMBO J* 13: 4515-23.
- Anforth, R, Fernandez-Penas, P & Long, GV (2013) Cutaneous toxicities of RAF inhibitors. *Lancet Oncol* 14: e11-8.
- Antonescu, CR, Busam, KJ, Francone, TD, Wong, GC, Guo, T, Agaram, NP, . . . Weiser, MR (2007) L576P KIT mutation in anal melanomas correlates with KIT protein expression and is sensitive to specific kinase inhibition. *Int J Cancer* 121: 257-64.
- Arora, S, Velichinskii, R, Lesh, RW, Ali, U, Kubiak, M, Bansal, P, . . . Bumber, Y (2019) Existing and Emerging Biomarkers for Immune Checkpoint Immunotherapy in Solid Tumors. *Adv Ther*: 1-41.
- Ascierto, PA, McArthur, GA, Dréno, B, Atkinson, V, Liskay, G, Di Giacomo, AM, . . . Larkin, J (2016) Cobimetinib combined with vemurafenib in advanced BRAF(V600)-mutant melanoma (coBRIM): updated efficacy results from a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 17: 1248-60.
- Atkins, MB, Lee, SJ, Chmielowski, B, Tarhini, AA, Cohen, GI, Truong, TG, . . . Kirkwood, JM (2022) Combination Dabrafenib and Trametinib Versus Combination Nivolumab and Ipilimumab for Patients With Advanced BRAF-Mutant Melanoma: The DREAMseq Trial-ECOG-ACRIN EA6134. *J Clin Oncol*: Jco2201763.
- Aubrey, BJ, Strasser, A & Kelly, GL (2016) Tumor-Suppressor Functions of the TP53 Pathway. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6: a026062.

- Bache, SM & Wickham, H. (2014) *magrittr: A Forward-Pipe Operator for R*. R package version 1.5. <https://CRAN.R-project.org/package=magrittr>.
- Bailey, MH, Tokheim, C, Porta-Pardo, E, Sengupta, S, Bertrand, D, Weerasinghe, A, . . . Ding, L (2018) Comprehensive Characterization of Cancer Driver Genes and Mutations. *Cell* 173: 371-85.e18.
- Balaban, GB, Herlyn, M, Clark, WH & Nowell, PC (1986) Karyotypic evolution in human malignant melanoma. *Cancer Genet Cytogenet* 19: 113-22.
- Balch, CM, Gershenwald, JE, Soong, SJ, Thompson, JF, Atkins, MB, Byrd, DR, . . . Sondak, VK (2009) Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol* 27: 6199-206.
- Balch, CM, Soong, SJ, Gershenwald, JE, Thompson, JF, Coit, DG, Atkins, MB, . . . Sondak, VK (2013) Age as a prognostic factor in patients with localized melanoma and regional metastases. *Ann Surg Oncol* 20: 3961-8.
- Bastian, BC, Leboit, PE, Hamm, H, Brocker, EB & Pinkel, D (1998) Chromosomal gains and losses in primary cutaneous melanomas detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 58: 2170-5.
- Bastian, BC, Kashani-Sabet, M, Hamm, H, Godfrey, T, Moore, DH, Brocker, EB, . . . Pinkel, D (2000) Gene amplifications characterize acral melanoma and permit the detection of occult tumor cells in the surrounding skin. *Cancer Res* 60: 1968-73.
- Bastian, BC, Olshen, AB, Leboit, PE & Pinkel, D (2003) Classifying Melanocytic Tumors Based on DNA Copy Number Changes. *The American Journal of Pathology* 163: 1765-70.
- Bastian, BC (2014) The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. *Annu Rev Pathol* 9: 239-71.
- Bayani, J, Selvarajah, S, Maire, G, Vukovic, B, Al-Romaih, K, Zielenska, M & Squire, JA (2007) Genomic mechanisms and measurement of structural and numerical instability in cancer cells. *Semin Cancer Biol* 17: 5-18.
- Ben-David, U & Amon, A (2019) Context is everything: aneuploidy in cancer. *Nature Reviews Genetics*: 1-19.
- Bender, A, Urba, WJ & Curti, BD (2016). Melanom. Seiten: 599-606. In: Suttorp, N, Möckel, M, Siegmund, B & Dietel, M (eds.) *Harrisons Innere Medizin*. 19. Auflage. ABW Wissenschaftsverlag.
- Bennett, V (1992) Ankyrins. Adaptors between diverse plasma membrane proteins and the cytoplasm. *J Biol Chem* 267: 8703-6.
- Beroukhi, R, Getz, G, Nghiemphu, L, Barretina, J, Hsueh, T, Linhart, D, . . . Sellers, WR (2007) Assessing the significance of chromosomal aberrations in cancer: Methodology and application to glioma. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 20007-12.
- Beroukhi, R, Mermel, CH, Porter, D, Wei, G, Raychaudhuri, S, Donovan, J, . . . Meyerson, M (2010) The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* 463: 899-905.

- Bielskiene, K, Bagdoniene, L, Mozuraitiene, J, Kazbariene, B & Janulionis, E (2015) E3 ubiquitin ligases as drug targets and prognostic biomarkers in melanoma. *Medicina (Kaunas)* 51: 1-9.
- Birkbak, NJ, Eklund, AC, Li, Q, McClelland, SE, Endesfelder, D, Tan, P, . . . Swanton, C (2011) Paradoxical relationship between chromosomal instability and survival outcome in cancer. *Cancer Res* 71: 3447-52.
- Bishop, DT, Demenais, F, Goldstein, AM, Bergman, W, Bishop, JN, Paillerets, BB, . . . Tucker, MA (2002) Geographical Variation in the Penetrance of CDKN2A Mutations for Melanoma. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 94: 894-903.
- Bliss, JM, Ford, D, Swerdlow, AJ, Armstrong, BK, Cristofolini, M, Elwood, JM, . . . Easton, DF (1995) Risk of cutaneous melanoma associated with pigmentation characteristics and freckling: systematic overview of 10 case-control studies. The International Melanoma Analysis Group (IMAGE). *Int J Cancer* 62: 367-76.
- Bonney, ME, Moriya, H & Amon, A (2015) Aneuploid proliferation defects in yeast are not driven by copy number changes of a few dosage-sensitive genes. *Genes Dev* 29: 898-903.
- Bottaro, DP, Rubin, JS, Faletto, DL, Chan, AM, Kmieciak, TE, Vande Woude, GF & Aaronson, SA (1991) Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science* 251: 802-4.
- Boveri, T (1914) Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren.
- Bradford, PT, Goldstein, AM, McMaster, ML & Tucker, MA (2009) Acral lentiginous melanoma: incidence and survival patterns in the United States, 1986-2005. *Arch Dermatol* 145: 427-34.
- Brahmer, JR, Tykodi, SS, Chow, LQ, Hwu, WJ, Topalian, SL, Hwu, P, . . . Wigginton, JM (2012) Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* 366: 2455-65.
- Brash, DE, Rudolph, JA, Simon, JA, Lin, A, Mckenna, GJ, Baden, HP, . . . Ponten, J (1991) A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 10124-8.
- Buermans, HP & Den Dunnen, JT (2014) Next generation sequencing technology: Advances and applications. *Biochim Biophys Acta* 1842: 1932-41.
- Burrell, RA, McClelland, SE, Endesfelder, D, Groth, P, Weller, MC, Shaikh, N, . . . Swanton, C (2013) Replication stress links structural and numerical cancer chromosomal instability. *Nature* 494: 492-6.
- Carter, SL, Eklund, AC, Kohane, IS, Harris, LN & Szallasi, Z (2006) A signature of chromosomal instability inferred from gene expression profiles predicts clinical outcome in multiple human cancers. *Nat Genet* 38: 1043-8.
- Carvajal, RD, Antonescu, CR, Wolchok, JD, Chapman, PB, Roman, RA, Teitcher, J, . . . Schwartz, GK (2011) KIT as a therapeutic target in metastatic melanoma. *JAMA* 305: 2327-34.

- Cerami, E, Gao, J, Dogrusoz, U, Gross, BE, Sumer, SO, Aksoy, BA, . . . Schultz, N (2012) The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov* 2: 401-4.
- Chalmers, ZR, Connelly, CF, Fabrizio, D, Gay, L, Ali, SM, Ennis, R, . . . Frampton, GM (2017) Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden. *Genome Med* 9: 34.
- Chapman, PB, Hauschild, A, Robert, C, Haanen, JB, Ascierto, P, Larkin, J, . . . McArthur, GA (2011) Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* 364: 2507-16.
- Chen, DS & Mellman, I (2017) Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature* 541: 321-30.
- Ciechanover, A (1998) The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J* 17: 7151-60.
- Cirenajwis, H, Lauss, M, Ekedahl, H, Torngren, T, Kvist, A, Saal, LH, . . . Jonsson, G (2017) NF1-mutated melanoma tumors harbor distinct clinical and biological characteristics. *Mol Oncol* 11: 438-51.
- Clark, WH, From, L, Bernardino, EA & Mihm, MC (1969) The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res* 29: 705-27.
- Clark, WH, Elder, DE & Van Horn, M (1986) The biologic forms of malignant melanoma. *Hum Pathol* 17: 443-50.
- Coleman, WP, Loria, PR, Reed, RJ & Krentz, ET (1980) Acral lentiginous melanoma. *Arch Dermatol* 116: 773-6.
- Conic, RZ & Arbesman, J (2018) Melanoma Tumor Characteristics: An Analysis of Mutational Burden and Copy Number Alterations by Patient Age and Stage. *J Invest Dermatol* 138: 1218-21.
- Corcoran, RB, Dias-Santagata, D, Bergethon, K, Iafrate, AJ, Settleman, J & Engelman, JA (2010) BRAF gene amplification can promote acquired resistance to MEK inhibitors in cancer cells harboring the BRAF V600E mutation. *Sci Signal* 3: ra84.
- Costin, GE & Hearing, VJ (2007) Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB J* 21: 976-94.
- Curtin, JA, Fridlyand, J, Kageshita, T, Patel, HN, Busam, KJ, Kutzner, H, . . . Bastian, BC (2005) Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med* 353: 2135-47.
- Curtin, JA, Busam, K, Pinkel, D & Bastian, BC (2006) Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J Clin Oncol* 24: 4340-6.
- Czyz, M (2018) HGF/c-MET Signaling in Melanocytes and Melanoma. *Int J Mol Sci* 19: 3844.
- Davey, RJ, Van Der Westhuizen, A & Bowden, NA (2016) Metastatic melanoma treatment: Combining old and new therapies. *Crit Rev Oncol Hematol* 98: 242-53.

- Davies, H, Bignell, GR, Cox, C, Stephens, P, Edkins, S, Clegg, S, . . . Futreal, PA (2002) Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417: 949-54.
- Davoli, T, Xu, AW, Mengwasser, KE, Sack, LM, Yoon, JC, Park, PJ & Elledge, SJ (2013) Cumulative Haploinsufficiency and Triplosensitivity Drive Aneuploidy Patterns and Shape the Cancer Genome. *Cell* 155: 948-62.
- Davoli, T, Uno, H, Wooten, EC & Elledge, SJ (2017) Tumor aneuploidy correlates with markers of immune evasion and with reduced response to immunotherapy. *Science* 355: eaaf8399.
- De Matteis, MA & Morrow, JS (1998) The role of ankyrin and spectrin in membrane transport and domain formation. *Curr Opin Cell Biol* 10: 542-9.
- De Unamuno Bustos, B, Murria Estal, R, Pérez Simó, G, Oliver Martínez, V, Llavador Ros, M, Palanca Suela, S & Botella Estrada, R (2016) Lack of TERT promoter mutations in melanomas with extensive regression. *J Am Acad Dermatol* 74: 570-72.
- Demidov, G & Ossowski, S (2019) ClinCNV: novel method for allele-specific somatic copy-number alterations detection. *bioRxiv*: 837971.
- Diaz, LA, Williams, RT, Wu, J, Kinde, I, Hecht, JR, Berlin, J, . . . Vogelstein, B (2012) The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature* 486: 537-40.
- Ding, L, Kim, M, Kanchi, KL, Dees, ND, Lu, C, Griffith, M, . . . Weber, JS (2014) Clonal architectures and driver mutations in metastatic melanomas. *PLoS One* 9: e111153.
- Do, H & Dobrovic, A (2009) Limited copy number-high resolution melting (LCN-HRM) enables the detection and identification by sequencing of low level mutations in cancer biopsies. *Mol Cancer* 8: 82.
- Dowle, M & Srinivasan, A. (2019) *data.table: Extension of `data.frame`*. R package version 1.12.4. <https://CRAN.R-project.org/package=data.table>.
- Dummer, R, Ascierto, PA, Gogas, HJ, Arance, A, Mandalà, M, Liskay, G, . . . Flaherty, KT (2018) Encorafenib plus binimetinib versus vemurafenib or encorafenib in patients with BRAF-mutant melanoma (COLUMBUS): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 19: 603-15.
- Edlundh-Rose, E, Egyhazi, S, Omholt, K, Mansson-Brahme, E, Platz, A, Hansson, J & Lundeberg, J (2006) NRAS and BRAF mutations in melanoma tumours in relation to clinical characteristics: a study based on mutation screening by pyrosequencing. *Melanoma Res* 16: 471-8.
- Eggermont, AMM, Blank, CU, Mandalà, M, Long, GV, Atkinson, VG, Dalle, S, . . . Robert, C (2021) Adjuvant pembrolizumab versus placebo in resected stage III melanoma (EORTC 1325-MG/KEYNOTE-054): distant metastasis-free survival results from a double-blind, randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 22: 643-54.
- Emery, CM, Vijayendran, KG, Zipser, MC, Sawyer, AM, Niu, L, Kim, JJ, . . . Garraway, LA (2009) MEK1 mutations confer resistance to MEK and B-RAF inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 20411-16.

- Ettenberg, SA, Keane, MM, Nau, MM, Frankel, M, Wang, LM, Pierce, JH & Lipkowitz, S (1999) cbl-b inhibits epidermal growth factor receptor signaling. *Oncogene* 18: 1855-66.
- Faries, MB, Thompson, JF, Cochran, AJ, Andtbacka, RH, Mozzillo, N, Zager, JS, . . . Elashoff, RM (2017) Completion Dissection or Observation for Sentinel-Node Metastasis in Melanoma. *N Engl J Med* 376: 2211-22.
- Faust, GG & Hall, IM (2014) SAMBLASTER: fast duplicate marking and structural variant read extraction. *Bioinformatics* 30: 2503-5.
- Finkelstein, LD & Shimizu, Y (2000) Role of phosphoinositide 3-kinase and the Cbl adaptor protein in coupling the alpha4beta1 integrin to mitogen-activated protein kinase signalling. *Biochem J* 345 Pt 2: 385-92.
- Flaherty, KT, Puzanov, I, Kim, KB, Ribas, A, Mcarthur, GA, Sosman, JA, . . . Chapman, PB (2010) Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med* 363: 809-19.
- Flaherty, KT, Hodi, FS & Fisher, DE (2012a) From genes to drugs: targeted strategies for melanoma. *Nature Reviews Cancer* 12: 349-61.
- Flaherty, KT, Infante, JR, Daud, A, Gonzalez, R, Kefford, RF, Sosman, J, . . . Weber, J (2012b) Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. *N Engl J Med* 367: 1694-703.
- Gao, J, Aksoy, BA, Dogrusoz, U, Dresdner, G, Gross, B, Sumer, SO, . . . Schultz, N (2013) Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal* 6: p11.
- Garbe, C & Blum, A (2001) Epidemiology of Cutaneous Melanoma in Germany and Worldwide. *Skin Pharmacol Physiol* 14: 280-90.
- Garbe, C & Leiter, U (2009) Melanoma epidemiology and trends. *Clin Dermatol* 27: 3-9.
- Garcia-Guzman, M, Larsen, E & Vuori, K (2000) The proto-oncogene c-Cbl is a positive regulator of Met-induced MAP kinase activation: a role for the adaptor protein Crk. *Oncogene* 19: 4058-65.
- Garibyan, L & Fisher, DE (2010) How Sunlight Causes Melanoma. *Curr Oncol Rep* 12: 319-26.
- Garraway, LA, Widlund, HR, Rubin, MA, Getz, G, Berger, AJ, Ramaswamy, S, . . . Sellers, WR (2005) Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature* 436: 117-22.
- Garrido, MC & Bastian, BC (2010) KIT as a Therapeutic Target in Melanoma. *J Invest Dermatol* 130: 20-7.
- Gdc Data Portal. *The Cancer Genome Atlas Data* [Online]. National Cancer Institute. Verfügbar unter: <https://portal.gdc.cancer.gov/repository> [Zugriff 19.06.2019].
- Geigl, JB, Obenauf, AC, Schwarzbraun, T & Speicher, MR (2008) Defining 'chromosomal instability'. *Trends Genet* 24: 64-9.
- Gerlinger, M & Swanton, C (2010) How Darwinian models inform therapeutic failure initiated by clonal heterogeneity in cancer medicine. *Br J Cancer* 103: 1139-43.

- Gershenwald, JE, Scolyer, RA, Hess, KR, Sondak, VK, Long, GV, Ross, MI, . . . Thompson, JF (2017) Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin* 67: 472-92.
- Glinsky, GV, Berezovska, O & Glinskii, AB (2005) Microarray analysis identifies a death-from-cancer signature predicting therapy failure in patients with multiple types of cancer. *J Clin Invest* 115: 1503-21.
- Goel, VK, Lazar, AJF, Warneke, CL, Redston, MS & Haluska, FG (2006) Examination of Mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in Primary Cutaneous Melanoma. *J Invest Dermatol* 126: 154-60.
- Goldstein, AM, Chan, M, Harland, M, Hayward, NK, Demenais, F, Bishop, DT, . . . Melanoma Genetics Consortium (2007) Features associated with germline CDKN2A mutations: a GenoMEL study of melanoma-prone families from three continents. *J Med Genet* 44: 99-106.
- Gonzalez-Perez, A & Lopez-Bigas, N (2012) Functional impact bias reveals cancer drivers. *Nucleic Acids Res* 40: e169.
- Goodsell, DS (2001) The molecular perspective: ultraviolet light and pyrimidine dimers. *Oncologist* 6: 298-9.
- Goodwin, S, Mcpherson, JD & McCombie, WR (2016) Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics* 17: 333-51.
- Gordon, DJ, Resio, B & Pellman, D (2012) Causes and consequences of aneuploidy in cancer. *Nature Reviews Genetics* 13: 189-203.
- Gordon, R (2013) Skin cancer: an overview of epidemiology and risk factors. *Semin Oncol Nurs* 29: 160-9.
- Goto, Y (2018) Tumor Mutation Burden: Is It Ready for the Clinic? *J Clin Oncol* 36: 2978-9.
- Grand, FH, Hidalgo-Curtis, CE, Ernst, T, Zoi, K, Zoi, C, Mcguire, C, . . . Cross, NC (2009) Frequent CBL mutations associated with 11q acquired uniparental disomy in myeloproliferative neoplasms. *Blood* 113: 6182-92.
- Greaves, WO, Verma, S, Patel, KP, Davies, MA, Barkoh, BA, Galbincea, JM, . . . Luthra, R (2013) Frequency and spectrum of BRAF mutations in a retrospective, single-institution study of 1112 cases of melanoma. *J Mol Diagn* 15: 220-6.
- Greenman, C, Stephens, P, Smith, R, Dalgliesh, GL, Hunter, C, Bignell, G, . . . Stratton, MR (2007) Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* 446: 153-8.
- Greer, CE, Lund, JK & Manos, MM (1991) PCR amplification from paraffin-embedded tissues: recommendations on fixatives for long-term storage and prospective studies. *PCR Methods Appl* 1: 46-50.
- Griewank, KG, Murali, R, Puig-Butille, JA, Schilling, B, Livingstone, E, Potrony, M, . . . Schadendorf, D (2014) TERT promoter mutation status as an independent prognostic factor in cutaneous melanoma. *J Natl Cancer Inst* 106.

- Gu, Z. (2014) *circlize implements and enhances circular visualization in R*. Bioinformatics.
- Gu, Z, Eils, R & Schlesner, M. (2016) *Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data*. Bioinformatics.
- Gu, Z. (2020) *GetoptLong: Parsing Command-Line Arguments and Variable Interpolation*. R package version 0.1.8. <https://CRAN.R-project.org/package=GetoptLong>.
- Guan, J, Gupta, R & Filipp, FV (2015) Cancer systems biology of TCGA SKCM: efficient detection of genomic drivers in melanoma. *Sci Rep* 5: 7857.
- Guldberg, P, Thor Straten, P, Birck, A, Ahrenkiel, V, Kirkin, AF & Zeuthen, J (1997) Disruption of the MMAC1/PTEN gene by deletion or mutation is a frequent event in malignant melanoma. *Cancer Res* 57: 3660-3.
- Guo, J, Si, L, Kong, Y, Flaherty, KT, Xu, X, Zhu, Y, . . . Qin, S (2011) Phase II, open-label, single-arm trial of imatinib mesylate in patients with metastatic melanoma harboring c-Kit mutation or amplification. *J Clin Oncol* 29: 2904-9.
- Gupta, S, Artomov, M, Goggins, W, Daly, M & Tsao, H (2015) Gender Disparity and Mutation Burden in Metastatic Melanoma. *J Natl Cancer Inst* 107.
- Hanahan, D & Weinberg, RA (2000) The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100: 57-70.
- Hanahan, D & Weinberg, RA (2011) Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144: 646-74.
- Hara, K, Maruki, Y, Long, X, Yoshino, K, Oshiro, N, Hidayat, S, . . . Yonezawa, K (2002) Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* 110: 177-89.
- Hatzivassiliou, G, Song, K, Yen, I, Brandhuber, BJ, Anderson, DJ, Alvarado, R, . . . Malek, S (2010) RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature* 464: 431-5.
- Hauswirth, U (2016). Malignes Melanom. Seiten: 330-33. In: Moll, I (ed.) *Duale Reihe Dermatologie*. 8. vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Thieme.
- Hayward, NK, Wilmott, JS, Waddell, N, Johansson, PA, Field, MA, Nones, K, . . . Mann, GJ (2017) Whole-genome landscapes of major melanoma subtypes. *Nature* 545: 175-80.
- Hegyí, I & Zelger, B (2012). Melanome. Seiten: 846-9. In: Böcker, W, Denk, H, Heitz, PU, Höfler, G, Kreipe, H & Moch, H (eds.) *Pathologie*. 5. vollständig überarbeitete Auflage. München: Urban & Fischer Verlag, Elsevier GmbH.
- Heidenreich, B, Nagore, E, Rachakonda, PS, Garcia-Casado, Z, Requena, C, Traves, V, . . . Kumar, R (2014) Telomerase reverse transcriptase promoter mutations in primary cutaneous melanoma. *Nature Communications* 5: 1-7.
- Heng, HH, Bremer, SW, Stevens, JB, Horne, SD, Liu, G, Abdallah, BY, . . . Ye, CJ (2013) Chromosomal instability (CIN): what it is and why it is crucial to cancer evolution. *Cancer Metastasis Rev* 32: 325-40.
- Henry, L & Wickham, H. (2019a) *purrr: Functional Programming Tools*. R package version 0.3.2. <https://CRAN.R-project.org/package=purrr>.

- Henry, L & Wickham, H. (2019b) *rlang: Functions for Base Types and Core R and 'Tidyverse' Features*. R package version 0.4.0. <https://CRAN.R-project.org/package=rlang>.
- Herbst, RA, Mommert, S, Casper, U, Podewski, EK, Kiehl, P, Kapp, A & Weiss, J (2000) 11q23 allelic loss is associated with regional lymph node metastasis in melanoma. *Clin Cancer Res* 6: 3222-7.
- Hess, JM, Bernardis, A, Kim, J, Miller, M, Taylor-Weiner, A, Haradhvala, NJ, . . . Getz, G (2019) Passenger Hotspot Mutations in Cancer. *Cancer Cell* 36: 288-301.e14.
- Hocker, T & Tsao, H (2007) Ultraviolet radiation and melanoma: a systematic review and analysis of reported sequence variants. *Hum Mutat* 28: 578-88.
- Hocker, TL, Singh, MK & Tsao, H (2008) Melanoma genetics and therapeutic approaches in the 21st century: moving from the benchside to the bedside. *J Invest Dermatol* 128: 2575-95.
- Hodges, E, Xuan, Z, Balija, V, Kramer, M, Molla, MN, Smith, SW, . . . Mccombie, WR (2007) Genome-wide in situ exon capture for selective resequencing. *Nat Genet* 39: 1522-7.
- Hodi, FS, Corless, CL, Giobbie-Hurder, A, Fletcher, JA, Zhu, M, Marino-Enriquez, A, . . . Fisher, DE (2013) Imatinib for melanomas harboring mutationally activated or amplified KIT arising on mucosal, acral, and chronically sun-damaged skin. *J Clin Oncol* 31: 3182-90.
- Hodis, E, Watson, IR, Kryukov, GV, Arold, ST, Imielinski, M, Theurillat, JP, . . . Chin, L (2012) A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell* 150: 251-63.
- Holderfield, M, Deuker, MM, McCormick, F & McMahon, M (2014) Targeting RAF kinases for cancer therapy: BRAF-mutated melanoma and beyond. *Nature Reviews Cancer* 14: 455-67.
- Holinski-Feder, E (2017). Mutationen beim Menschen und ihre Folgen. Seiten: 49-87. In: Murken, JD, Grimm, T, Holinski-Feder, E & Zerres, K (eds.) *Taschenlehrbuch Humangenetik*. 9. teilaktualisierte Auflage. Stuttgart: Thieme.
- Holland, AJ & Cleveland, DW (2009) Boveri revisited: chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 478-87.
- Horn, S, Figl, A, Rachakonda, PS, Fischer, C, Sucker, A, Gast, A, . . . Kumar, R (2013) TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science* 339: 959-61.
- Houghton, AN & Viola, MV (1981) Solar radiation and malignant melanoma of the skin. *J Am Acad Dermatol* 5: 477-83.
- Huang, FW, Hodis, E, Xu, MJ, Kryukov, GV, Chin, L & Garraway, LA (2013) Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma. *Science* 339: 957-9.
- Hussussian, CJ, Struewing, JP, Goldstein, AM, Higgins, PA, Ally, DS, Sheahan, MD, . . . Dracopoli, NC (1994) Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nat Genet* 8: 15-21.

- Ikehata, H & Ono, T (2011) The mechanisms of UV mutagenesis. *J Radiat Res* 52: 115-25.
- IMGAG (Institute of Medical Genetics and Applied Genomics). megSAP [Online]. *GitHub*: <https://github.com/imgag/megSAP>.
- IMGAG (Institute of Medical Genetics and Applied Genomics). ngs-bits [Online]. *GitHub*: <https://github.com/imgag/ngs-bits>.
- IMGAG (Institute of Medical Genetics and Applied Genomics). BamClipOverlap [Online]. *GitHub*: <https://github.com/imgag/ngs-bits/blob/master/doc/tools/BamClipOverlap.md>.
- Isozaki, K, Terris, B, Belghiti, J, Schiffmann, S, Hirota, S & Vanderwinden, JM (2000) Germline-activating mutation in the kinase domain of KIT gene in familial gastrointestinal stromal tumors. *Am J Pathol* 157: 1581-5.
- Janssen, A, Kops, GJ & Medema, RH (2009) Elevating the frequency of chromosome mis-segregation as a strategy to kill tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 19108-13.
- Jemal, A, Devesa, SS, Hartge, P & Tucker, MA (2001) Recent Trends in Cutaneous Melanoma Incidence Among Whites in the United States. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 93: 678-83.
- Jing, Z, Li, L, Wang, X, Wang, M, Cai, Y, Jin, ZI & Zhang, YE (2016) High c-Cbl expression in gliomas is associated with tumor progression and poor prognosis. *Oncol Lett* 11: 2787-91.
- Kaidbey, KH, Agin, PP, Sayre, RM & Kligman, AM (1979) Photoprotection by melanin--a comparison of black and Caucasian skin. *J Am Acad Dermatol* 1: 249-60.
- Kales, SC, Ryan, PE, Nau, MM & Lipkowitz, S (2010) Cbl and human myeloid neoplasms: the Cbl oncogene comes of age. *Cancer Res* 70: 4789-94.
- Kamb, A, Shattuck-Eidens, D, Eeles, R, Liu, Q, Gruis, NA, Ding, W, . . . Cannon-Albrigt, LA (1994) Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus. *Nat Genet* 8: 23-6.
- Kamura, T, Koepp, DM, Conrad, MN, Skowyra, D, Moreland, RJ, Iliopoulos, O, . . . Conaway, JW (1999) Rbx1, a component of the VHL tumor suppressor complex and SCF ubiquitin ligase. *Science* 284: 657-61.
- Kandoth, C, McLellan, MD, Vandin, F, Ye, K, Niu, B, Lu, C, . . . Ding, L (2013) Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* 502: 333-39.
- Kassambara, A, Kosinski, M & Biecek, P. (2019) *survminer: Drawing Survival Curves using 'ggplot2'*. R package version 0.4.6. <https://CRAN.R-project.org/package=survminer>.
- Kaufmann, WK, Carson, CC, Omolo, B, Filgo, AJ, Sambade, MJ, Simpson, DA, . . . Thomas, NE (2014) Mechanisms of chromosomal instability in melanoma. *Environ Mol Mutagen* 55: 457-71.

- Keane, MM, Rivero-Lezcano, OM, Mitchell, JA, Robbins, KC & Lipkowitz, S (1995) Cloning and characterization of cbl-b: a SH3 binding protein with homology to the c-cbl proto-oncogene. *Oncogene* 10: 2367-77.
- Keilholz, U, Ascierto, PA, Dummer, R, Robert, C, Lorigan, P, Van Akkooi, A, . . . Michielin, O (2020) ESMO consensus conference recommendations on the management of metastatic melanoma: under the auspices of the ESMO Guidelines Committee. *Ann Oncol* 31: 1435-48.
- Kim, S, Scheffler, K, Halpern, AL, Bekritsky, MA, Noh, E, Kallberg, M, . . . Saunders, CT (2018) Strelka2: fast and accurate calling of germline and somatic variants. *Nat Methods* 15: 591-94.
- Kim, SY, Kim, SN, Hahn, HJ, Lee, YW, Choe, YB & Ahn, KJ (2015) Metaanalysis of BRAF mutations and clinicopathologic characteristics in primary melanoma. *J Am Acad Dermatol* 72: 1036-46.e2.
- Klebanov, N, Artomov, M, Goggins, WB, Daly, E, Daly, MJ & Tsao, H (2019) Burden of unique and low prevalence somatic mutations correlates with cancer survival. *Sci Rep* 9: 1-7.
- Knudson, AG (1971) Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 68: 820-3.
- Knudson, AG (2001) Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nature Reviews Cancer* 1: 157-70.
- Kops, GJPL, Foltz, DR & Cleveland, DW (2004) Lethality to human cancer cells through massive chromosome loss by inhibition of the mitotic checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 8699-704.
- Kops, GJPL, Weaver, BaA & Cleveland, DW (2005) On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nature Reviews Cancer* 5: 773-85.
- Kordeli, E, Lambert, S & Bennett, V (1995) AnkyrinG. A new ankyrin gene with neural-specific isoforms localized at the axonal initial segment and node of Ranvier. *J Biol Chem* 270: 2352-9.
- Krauthammer, M, Kong, Y, Ha, BH, Evans, P, Bacchiocchi, A, Mccusker, JP, . . . Halaban, R (2012) Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nat Genet* 44: 1006-14.
- Krauthammer, M, Kong, Y, Bacchiocchi, A, Evans, P, Pornputtpong, N, Wu, C, . . . Halaban, R (2015) Exome sequencing identifies recurrent mutations in NF1 and RASopathy genes in sun-exposed melanomas. *Nat Genet* 47: 996-1002.
- Kuchelmeister, C, Schaumburg-Lever, G & Garbe, C (2000) Acral cutaneous melanoma in caucasians: clinical features, histopathology and prognosis in 112 patients. *Br J Dermatol* 143: 275-80.
- Kuhn, M. Contributions from: Wing, J, Weston, S, Williams, A, Keefer, C, Engelhardt, A, Cooper, T, . . . Hunt, T (2019) *caret: Classification and Regression Training*. R package version 6.0-84. <https://CRAN.R-project.org/package=caret>.
- Kumar, P, Henikoff, S & Ng, PC (2009) Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc* 4: 1073-81.

- Kumaradevan, S, Lee, SY, Richards, S, Lyle, C, Zhao, Q, Tapan, U, . . . Chitalia, VC (2018) c-Cbl Expression Correlates with Human Colorectal Cancer Survival and Its Wnt/beta-Catenin Suppressor Function Is Regulated by Tyr371 Phosphorylation. *Am J Pathol* 188: 1921-33.
- Landrum, MJ, Lee, JM, Riley, GR, Jang, W, Rubinstein, WS, Church, DM & Maglott, DR (2013) ClinVar: public archive of relationships among sequence variation and human phenotype. *Nucleic Acids Res* 42: D980-D5.
- Landrum, MJ, Lee, JM, Benson, M, Brown, GR, Chao, C, Chitipiralla, S, . . . Maglott, DR (2018) ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res* 46: D1062-67.
- Larkin, J, Ascierto, PA, Dreno, B, Atkinson, V, Liskay, G, Maio, M, . . . Ribas, A (2014) Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med* 371: 1867-76.
- Larkin, J, Chiarion-Sileni, V, Gonzalez, R, Grob, JJ, Cowey, CL, Lao, CD, . . . Wolchok, JD (2015) Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med* 373: 23-34.
- Lattanzi, M, Lee, Y, Simpson, D, Moran, U, Darvishian, F, Kim, RH, . . . Osman, I (2018) Primary Melanoma Histologic Subtype: Impact on Survival and Response to Therapy. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 111: 180-8.
- Laubert, T, Freitag-Wolf, S, Linnebacher, M, König, A, Vollmar, B & Habermann, JK (2015) Stage-specific frequency and prognostic significance of aneuploidy in patients with sporadic colorectal cancer--a meta-analysis and current overview. *Int J Colorectal Dis* 30: 1015-28.
- Lawrence, MS, Stojanov, P, Polak, P, Kryukov, GV, Cibulskis, K, Sivachenko, A, . . . Getz, G (2013) Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature* 499: 214-8.
- Lazar, AJ (2018). Melanoma. Seiten: 905-7. In: Kumar, V, Abbas, AK & Aster, JC (eds.) *Robbins Basic Pathology*. 10th Edition. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier.
- Lee, JJ, Sholl, LM, Lindeman, NI, Granter, SR, Laga, AC, Shivdasani, P, . . . Lian, CG (2015) Targeted next-generation sequencing reveals high frequency of mutations in epigenetic regulators across treatment-naive patient melanomas. *Clin Epigenetics* 7: 59.
- Leiter, U, Buettner, PG, Eigentler, TK & Garbe, C (2004) Prognostic factors of thin cutaneous melanoma: an analysis of the central malignant melanoma registry of the german dermatological society. *J Clin Oncol* 22: 3660-7.
- Leiter, U, Stadler, R, Mauch, C, Hohenberger, W, Brockmeyer, NH, Berking, C, . . . Garbe, C (2019) Final Analysis of DeCOG-SLT Trial: No Survival Benefit for Complete Lymph Node Dissection in Patients With Melanoma With Positive Sentinel Node. *J Clin Oncol* 37: 3000-8.
- Leitlinienprogramm Onkologie. (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF). 2020. *S3 Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms, Langversion 3.3* [Online]. AWMF Registernummer: 032/024OL.

- Verfügbar unter: <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/melanom/> [Zugriff 30.10.2022].
- Lengauer, C, Kinzler, KW & Vogelstein, B (1997) Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 386: 623-7.
- Lengauer, C, Kinzler, KW & Vogelstein, B (1998) Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396: 643-9.
- Lev, S, Yarden, Y & Givol, D (1992) Dimerization and activation of the kit receptor by monovalent and bivalent binding of the stem cell factor. *J Biol Chem* 267: 15970-7.
- Levkowitz, G, Waterman, H, Ettenberg, SA, Katz, M, Tsygankov, AY, Alroy, I, . . . Yarden, Y (1999) Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1. *Mol Cell* 4: 1029-40.
- Li, H & Durbin, R (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25: 1754-60.
- Lin, WM, Baker, AC, Beroukhir, R, Winckler, W, Feng, W, Marmion, JM, . . . Garraway, LA (2008) Modeling genomic diversity and tumor dependency in malignant melanoma. *Cancer Res* 68: 664-73.
- Liu, W, Dowling, JP, Murray, WK, McArthur, GA, Thompson, JF, Wolfe, R & Kelly, JW (2006) Rate of growth in melanomas: characteristics and associations of rapidly growing melanomas. *Arch Dermatol* 142: 1551-8.
- Long, GV, Menzies, AM, Nagrial, AM, Haydu, LE, Hamilton, AL, Mann, GJ, . . . Kefford, RF (2011) Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 29: 1239-46.
- Long, GV, Stroyakovskiy, D, Gogas, H, Levchenko, E, De Braud, F, Larkin, J, . . . Flaherty, K (2015) Dabrafenib and trametinib versus dabrafenib and placebo for Val600 BRAF-mutant melanoma: a multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet* 386: 444-51.
- Long, GV, Hauschild, A, Santinami, M, Atkinson, V, Mandala, M, Chiarion-Sileni, V, . . . Kirkwood, JM (2017) Adjuvant Dabrafenib plus Trametinib in Stage III BRAF-Mutated Melanoma. *N Engl J Med* 377: 1813-23.
- Long, GV, Eroglu, Z, Infante, J, Patel, S, Daud, A, Johnson, DB, . . . Flaherty, KT (2018) Long-Term Outcomes in Patients With BRAF V600-Mutant Metastatic Melanoma Who Received Dabrafenib Combined With Trametinib. *J Clin Oncol* 36: 667-73.
- Luke, JJ, Rutkowski, P, Queirolo, P, Del Vecchio, M, Mackiewicz, J, Chiarion-Sileni, V, . . . Eggermont, AMM (2022) Pembrolizumab versus placebo as adjuvant therapy in completely resected stage IIB or IIC melanoma (KEYNOTE-716): a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet* 399: 1718-29.
- Lumley, T. based on Fortran code by Alan Miller. (2017) *leaps: Regression Subset Selection*. R package version 3.0. <https://CRAN.R-project.org/package=leaps>.

- Luo, P, Wang, X, Zhou, J, Li, L & Jing, Z (2018) C-Cbl and Cbl-b expression in skull base chordomas is associated with tumor progression and poor prognosis. *Hum Pathol* 74: 129-34.
- Lupher, ML, Andoniou, CE, Bonita, D, Miyake, S & Band, H (1998) The c-Cbl oncoprotein. *Int J Biochem Cell Biol* 30: 439-44.
- Lux, ML, Rubin, BP, Biase, TL, Chen, CJ, Maclure, T, Demetri, G, . . . Fletcher, JA (2000) KIT extracellular and kinase domain mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Am J Pathol* 156: 791-5.
- Maldonado, JL, Fridlyand, J, Patel, H, Jain, AN, Busam, K, Kageshita, T, . . . Bastian, BC (2003) Determinants of BRAF mutations in primary melanomas. *J Natl Cancer Inst* 95: 1878-90.
- Mason-Suares, H, Landry, L & Lebo, MS (2016) Detecting Copy Number Variation via Next Generation Technology. *Current Genetic Medicine Reports* 4: 74-85.
- Maxam, AM & Gilbert, W (1977) A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74: 560-4.
- Mcgranahan, N, Burrell, RA, Endesfelder, D, Novelli, MR & Swanton, C (2012) Cancer chromosomal instability: therapeutic and diagnostic challenges. *EMBO reports* 13: 528-38.
- Mclaren, W, Gil, L, Hunt, SE, Riat, HS, Ritchie, GRS, Thormann, A, . . . Cunningham, F (2016) The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biol* 17: 122.
- Melendez, B, Van Campenhout, C, Rorive, S, Remmelink, M, Salmon, I & D'haene, N (2018) Methods of measurement for tumor mutational burden in tumor tissue. *Transl Lung Cancer Res* 7: 661-7.
- Menzies, AM, Haydu, LE, Visintin, L, Carlino, MS, Howle, JR, Thompson, JF, . . . Long, GV (2012) Distinguishing clinicopathologic features of patients with V600E and V600K BRAF-mutant metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 18: 3242-9.
- Mermel, CH, Schumacher, SE, Hill, B, Meyerson, ML, Beroukhi, R & Getz, G (2011) GISTIC2.0 facilitates sensitive and confident localization of the targets of focal somatic copy-number alteration in human cancers. *Genome Biol* 12: R41.
- Michielin, O, Van Akkooi, A, Lorigan, P, Ascierto, PA, Dummer, R, Robert, C, . . . Keilholz, U (2020) ESMO consensus conference recommendations on the management of locoregional melanoma: under the auspices of the ESMO Guidelines Committee. *Ann Oncol* 31: 1449-61.
- Michot, JM, Bigenwald, C, Champiat, S, Collins, M, Carbonnel, F, Postel-Vinay, S, . . . Lambotte, O (2016) Immune-related adverse events with immune checkpoint blockade: a comprehensive review. *Eur J Cancer* 54: 139-48.
- Minor, DR, Kashani-Sabet, M, Garrido, M, O'day, SJ, Hamid, O & Bastian, BC (2012) Sunitinib therapy for melanoma patients with KIT mutations. *Clin Cancer Res* 18: 1457-63.
- Mishra, K, Barnhill, RL, Paddock, LE, Fine, JA & Berwick, M (2019) Histopathologic variables differentially affect melanoma survival by age at diagnosis. *Pigment Cell & Melanoma Research* 32: 593-600.

- Miyake, S, Lopher, ML, Druker, B & Band, H (1998) The tyrosine kinase regulator Cbl enhances the ubiquitination and degradation of the platelet-derived growth factor receptor alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 7927-32.
- Miyazaki, M, Furuya, T, Shiraki, A, Sato, T, Oga, A & Sasaki, K (1999) The relationship of DNA ploidy to chromosomal instability in primary human colorectal cancers. *Cancer Res* 59: 5283-5.
- Montagut, C, Sharma, SV, Shioda, T, Mcdermott, U, Ulman, M, Ulkus, LE, . . . Settleman, J (2008) Elevated CRAF as a Potential Mechanism of Acquired Resistance to BRAF Inhibition in Melanoma. *Cancer Res* 68: 4853-61.
- Morgan, M. (2019) *BiocManager: Access the Bioconductor Project Package Repository*. R package version 1.30.10. <https://CRAN.R-project.org/package=BiocManager>.
- Mort, RL, Jackson, IJ & Patton, EE (2015) The melanocyte lineage in development and disease. *Development* 142: 620-32.
- Mose, LE, Wilkerson, MD, Hayes, DN, Perou, CM & Parker, JS (2014) ABRA: improved coding indel detection via assembly-based realignment. *Bioinformatics* 30: 2813-5.
- Mouradov, D, Domingo, E, Gibbs, P, Jorissen, RN, Li, S, Soo, PY, . . . Sieber, OM (2013) Survival in stage II/III colorectal cancer is independently predicted by chromosomal and microsatellite instability, but not by specific driver mutations. *Am J Gastroenterol* 108: 1785-93.
- Müller, K & Wickham, H. (2019) *tibble: Simple Data Frames*. R package version 2.1.3. <https://CRAN.R-project.org/package=tibble>.
- Nagore, E, Heidenreich, B, Rachakonda, S, Garcia-Casado, Z, Requena, C, Soriano, V, . . . Kumar, R (2016) TERT promoter mutations in melanoma survival. *Int J Cancer* 139: 75-84.
- Nakayama, KI & Nakayama, K (2006) Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer* 6: 369-81.
- Naldi, L, Altieri, A, Imberti, GL, Gallus, S, Bosetti, C & La Vecchia, C (2005) Sun exposure, phenotypic characteristics, and cutaneous malignant melanoma. An analysis according to different clinico-pathological variants and anatomic locations (Italy). *Cancer Causes Control* 16: 893-9.
- Nazarian, R, Shi, H, Wang, Q, Kong, X, Koya, RC, Lee, H, . . . Lo, RS (2010) Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature* 468: 973-7.
- Neuwirth, E. (2014) *RColorBrewer: ColorBrewer Palettes*. R package version 1.1-2. <https://CRAN.R-project.org/package=RColorBrewer>.
- Ng, PC & Henikoff, S (2003) SIFT: predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res* 31: 3812-4.
- Nihal, M & Wood, GS (2016) c-CBL regulates melanoma proliferation, migration, invasion and the FAK-SRC-GRB2 nexus. *Oncotarget* 7: 53869-80.

- Nik-Zainal, S, Alexandrov, LB, Wedge, DC, Van Loo, P, Greenman, CD, Raine, K, . . . Stratton, MR (2012) Mutational processes molding the genomes of 21 breast cancers. *Cell* 149: 979-93.
- Nikolaev, SI, Rimoldi, D, Iseli, C, Valsesia, A, Robyr, D, Gehrig, C, . . . Antonarakis, SE (2011) Exome sequencing identifies recurrent somatic MAP2K1 and MAP2K2 mutations in melanoma. *Nat Genet* 44: 133-41.
- Oliver, GR, Hart, SN & Klee, EW (2015) Bioinformatics for clinical next generation sequencing. *Clin Chem* 61: 124-35.
- Ossio, R, Roldan-Marin, R, Martinez-Said, H, Adams, DJ & Robles-Espinoza, CD (2017) Melanoma: a global perspective. *Nat Rev Cancer* 17: 393-4.
- Ota, Y & Samelson, LE (1997) The product of the proto-oncogene c-cbl: a negative regulator of the Syk tyrosine kinase. *Science* 276: 418-20.
- Otsuka, T, Takayama, H, Sharp, R, Celli, G, Larochelle, WJ, Bottaro, DP, . . . Merlino, G (1998) c-Met autocrine activation induces development of malignant melanoma and acquisition of the metastatic phenotype. *Cancer Res* 58: 5157-67.
- Owada-Ozaki, Y, Muto, S, Takagi, H, Inoue, T, Watanabe, Y, Fukuhara, M, . . . Suzuki, H (2018) Prognostic Impact of Tumor Mutation Burden in Patients With Completely Resected Non-Small Cell Lung Cancer: Brief Report. *J Thorac Oncol* 13: 1217-21.
- Padua, RA, Barrass, N & Currie, GA (1984) A novel transforming gene in a human malignant melanoma cell line. *Nature* 311: 671-3.
- Palmer, JS, Duffy, DL, Box, NF, Aitken, JF, O'gorman, LE, Green, AC, . . . Sturm, RA (2000) Melanocortin-1 receptor polymorphisms and risk of melanoma: is the association explained solely by pigmentation phenotype? *Am J Hum Genet* 66: 176-86.
- Pardoll, DM (2012) The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer* 12: 252-64.
- Payne, SR & Kemp, CJ (2005) Tumor suppressor genetics. *Carcinogenesis* 26: 2031-45.
- Pfarr, N, Penzel, R, Klauschen, F, Heim, D, Brandt, R, Kazdal, D, . . . Stenzinger, A (2016) Copy number changes of clinically actionable genes in melanoma, non-small cell lung cancer and colorectal cancer-A survey across 822 routine diagnostic cases. *Genes Chromosomes Cancer* 55: 821-33.
- Pfeifer, GP, You, YH & Besaratinia, A (2005) Mutations induced by ultraviolet light. *Mutat Res* 571: 19-31.
- Ponzetto, C, Zhen, Z, Audero, E, Maina, F, Bardelli, A, Basile, ML, . . . Comoglio, P (1996) Specific Uncoupling of GRB2 from the Met Receptor. *J Biol Chem* 271: 14119-23.
- Pópulo, H, Soares, P, Faustino, A, Rocha, AS, Silva, P, Azevedo, F & Lopes, JM (2011) mTOR pathway activation in cutaneous melanoma is associated with poorer prognosis characteristics. *Pigment Cell Melanoma Res* 24: 254-7.

- Pópulo, H, Boaventura, P, Vinagre, J, Batista, R, Mendes, A, Caldas, R, . . . Soares, P (2014) TERT Promoter Mutations in Skin Cancer: The Effects of Sun Exposure and X-Irradiation. *J Invest Dermatol* 134: 2251-7.
- Porta-Pardo, E, Kamburov, A, Tamborero, D, Pons, T, Grases, D, Valencia, A, . . . Godzik, A (2017) Comparison of algorithms for the detection of cancer drivers at subgene resolution. *Nature Methods* 14: 782-9.
- Prentice, LM, Miller, RR, Knaggs, J, Mazloomian, A, Aguirre Hernandez, R, Franchini, P, . . . Sheffield, BS (2018) Formalin fixation increases deamination mutation signature but should not lead to false positive mutations in clinical practice. *PLoS One* 13: e0196434.
- R Core Team. (2019) *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich. <https://www.R-project.org/>.
- Ragnarsson-Olding, BK, Karsberg, S, Platz, A & Ringborg, UK (2002) Mutations in the TP53 gene in human malignant melanomas derived from sun-exposed skin and unexposed mucosal membranes. *Melanoma Res* 12: 453-63.
- Reddy, BY, Miller, DM & Tsao, H (2017) Somatic driver mutations in melanoma. *Cancer* 123: 2104-17.
- Reva, B, Antipin, Y & Sander, C (2007) Determinants of protein function revealed by combinatorial entropy optimization. *Genome Biol* 8: R232.
- Reva, B, Antipin, Y & Sander, C (2011) Predicting the functional impact of protein mutations: application to cancer genomics. *Nucleic Acids Res* 39: e118.
- Rizvi, H, Sanchez-Vega, F, La, K, Chatila, W, Jonsson, P, Halpenny, D, . . . Hellmann, MD (2018) Molecular Determinants of Response to Anti-Programmed Cell Death (PD)-1 and Anti-Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1) Blockade in Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer Profiled With Targeted Next-Generation Sequencing. *J Clin Oncol* 36: 633-41.
- Rizvi, NA, Hellmann, MD, Snyder, A, Kvistborg, P, Makarov, V, Havel, JJ, . . . Chan, TA (2015) Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* 348: 124-8.
- Robert, C, Schachter, J, Long, GV, Arance, A, Grob, JJ, Mortier, L, . . . Ribas, A (2015) Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med* 372: 2521-32.
- Robinson, JT, Thorvaldsdóttir, H, Winckler, W, Guttman, M, Lander, ES, Getz, G & Mesirov, JP (2011) Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol* 29: 24-6.
- Robinson, JT, Thorvaldsdóttir, H, Wenger, AM, Zehir, A & Mesirov, JP (2017) Variant Review with the Integrative Genomics Viewer. *Cancer Res* 77: e31-e4.
- Rodriguez-Viciano, P, Warne, PH, Dhand, R, Vanhaesebroeck, B, Gout, I, Fry, MJ, . . . Downward, J (1994) Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* 370: 527-32.
- Rooney, MS, Shukla, SA, Wu, CJ, Getz, G & Hacohen, N (2015) Molecular and genetic properties of tumors associated with local immune cytolytic activity. *Cell* 160: 48-61.

- Roschke, AV, Lababidi, S, Tonon, G, Gehlhaus, KS, Bussey, K, Weinstein, JN & Kirsch, IR (2005) Karyotypic "state" as a potential determinant for anticancer drug discovery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 2964-9.
- Rosenthal, R. (2016) *deconstructSigs: Identifies Signatures Present in a Tumor Sample*. R package version 1.8.0. <https://CRAN.R-project.org/package=deconstructSigs>.
- Roylance, R, Endesfelder, D, Gorman, P, Burrell, RA, Sander, J, Tomlinson, I, . . . Swanton, C (2011) Relationship of extreme chromosomal instability with long-term survival in a retrospective analysis of primary breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 20: 2183-94.
- Rstudio Team. (2019) *RStudio: Integrated Development for R*. RStudio, Inc., Boston, MA. <http://www.rstudio.com/>.
- Rünger, TM (2016) Mechanisms of Melanoma Promotion by Ultraviolet Radiation. *J Invest Dermatol* 136: 1751-2.
- Samstein, RM, Lee, CH, Shoushtari, AN, Hellmann, MD, Shen, R, Janjigian, YY, . . . Morris, LGT (2019) Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types. *Nat Genet* 51: 202-6.
- Sanchez-Vega, F, Mina, M, Armenia, J, Chatila, WK, Luna, A, La, KC, . . . Schultz, N (2018) Oncogenic Signaling Pathways in The Cancer Genome Atlas. *Cell* 173: 321-37.e10.
- Sanger, F, Nicklen, S & Coulson, AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74: 5463-7.
- Sanjay, A, Horne, WC & Baron, R (2001) The Cbl family: ubiquitin ligases regulating signaling by tyrosine kinases. *Sci STKE* 2001: pe40.
- Santaguida, S & Amon, A (2015) Short- and long-term effects of chromosome mis-segregation and aneuploidy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16: 473-85.
- Satzger, I, Marks, L, Kerick, M, Klages, S, Berking, C, Herbst, R, . . . Gutzmer, R (2015) Allele frequencies of BRAFV600 mutations in primary melanomas and matched metastases and their relevance for BRAF inhibitor therapy in metastatic melanoma. *Oncotarget* 6: 37895-905.
- Schauberger, P & Walker, A. (2020) *openxlsx: Read, Write and Edit xlsx Files*. R package version 4.1.5. <https://CRAN.R-project.org/package=openxlsx>.
- Schmidt, MHH & Dikic, I (2005) The Cbl interactome and its functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 907-18.
- Schroeder, CM, Hilke, FJ, Loffler, MW, Bitzer, M, Lenz, F & Sturm, M (2017) A comprehensive quality control workflow for paired tumor-normal NGS experiments. *Bioinformatics* 33: 1721-2.
- Schumacher, TN & Schreiber, RD (2015) Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science* 348: 69-74.
- Shain, AH, Garrido, M, Botton, T, Talevich, E, Yeh, I, Sanborn, JZ, . . . Bastian, BC (2015a) Exome sequencing of desmoplastic melanoma identifies recurrent NFKBIE promoter mutations and diverse activating mutations in the MAPK pathway. *Nat Genet* 47: 1194-9.

- Shain, AH, Yeh, I, Kovalyshyn, I, Sriharan, A, Talevich, E, Gagnon, A, . . . Bastian, BC (2015b) The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions. *N Engl J Med* 373: 1926-36.
- Shain, AH & Bastian, BC (2016) From melanocytes to melanomas. *Nat Rev Cancer* 16: 345-58.
- Sheltzer, JM & Amon, A (2011) The aneuploidy paradox: costs and benefits of an incorrect karyotype. *Trends Genet* 27: 446-53.
- Shendure, J & Ji, H (2008) Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol* 26: 1135-45.
- Shendure, J, Balasubramanian, S, Church, GM, Gilbert, W, Rogers, J, Schloss, JA & Waterston, RH (2017) DNA sequencing at 40: past, present and future. *Nature* 550: 345-53.
- Siroy, AE, Boland, GM, Milton, DR, Roszik, J, Frankian, S, Malke, J, . . . Davies, MA (2015) Beyond BRAF(V600): clinical mutation panel testing by next-generation sequencing in advanced melanoma. *J Invest Dermatol* 135: 508-15.
- Sladden, MJ, Balch, C, Barzilai, DA, Berg, D, Freiman, A, Handiside, T, . . . Thompson, JF (2009) Surgical excision margins for primary cutaneous melanoma. *Cochrane Database Syst Rev*: 55-6.
- Slowikowski, K. (2019) *ggrepel: Automatically Position Non-Overlapping Text Labels with 'ggplot2'*. R package version 0.8.1. <https://CRAN.R-project.org/package=ggrepel>.
- Snyder, A, Makarov, V, Merghoub, T, Yuan, J, Zaretsky, JM, Desrichard, A, . . . Chan, TA (2014) Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma. *N Engl J Med* 371: 2189-99.
- Stambolic, V, Suzuki, A, De La Pompa, JL, Brothers, GM, Mirtsos, C, Sasaki, T, . . . Mak, TW (1998) Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* 95: 29-39.
- Storchova, Z & Pellman, D (2004) From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5: 45-54.
- Stratton, MR, Campbell, PJ & Futreal, PA (2009) The cancer genome. *Nature* 458: 719-24.
- Sturm, M, Schroeder, C & Bauer, P (2016) SeqPurge: highly-sensitive adapter trimming for paired-end NGS data. *BMC Bioinformatics* 17: 208.
- Sullivan, RJ, Lorusso, PM & Flaherty, KT (2013) The intersection of immune-directed and molecularly targeted therapy in advanced melanoma: where we have been, are, and will be. *Clin Cancer Res* 19: 5283-91.
- Sun, Y, Tan, M, Duan, H & Swaroop, M (2001) SAG/ROC/Rbx/Hrt, a zinc RING finger gene family: molecular cloning, biochemical properties, and biological functions. *Antioxid Redox Signal* 3: 635-50.
- Swaminathan, G & Tsygankov, AY (2006) The Cbl family proteins: ring leaders in regulation of cell signaling. *J Cell Physiol* 209: 21-43.

- Tamborero, D, Gonzalez-Perez, A & Lopez-Bigas, N (2013) OncodriveCLUST: exploiting the positional clustering of somatic mutations to identify cancer genes. *Bioinformatics* 29: 2238-44.
- Tang, YC, Williams, BR, Siegel, JJ & Amon, A (2011) Identification of aneuploidy-selective antiproliferation compounds. *Cell* 144: 499-512.
- Tate, JG, Bamford, S, Jubb, HC, Sondka, Z, Beare, DM, Bindal, N, . . . Forbes, SA (2018) COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Res* 47: D941-7.
- Tawbi, HA, Schadendorf, D, Lipson, EJ, Ascierto, PA, Matamala, L, Castillo Gutiérrez, E, . . . Long, GV (2022) Relatlimab and Nivolumab versus Nivolumab in Untreated Advanced Melanoma. *N Engl J Med* 386: 24-34.
- Taylor, AM, Shih, J, Ha, G, Gao, GF, Zhang, X, Berger, AC, . . . Meyerson, M (2018) Genomic and Functional Approaches to Understanding Cancer Aneuploidy. *Cancer Cell* 33: 676-89.e3.
- Teramoto, Y, Keim, U, Gesierich, A, Schuler, G, Fiedler, E, Tuting, T, . . . Garbe, C (2018) Acral lentiginous melanoma: a skin cancer with unfavourable prognostic features. A study of the German central malignant melanoma registry (CMMR) in 2050 patients. *Br J Dermatol* 178: 443-51.
- The Bioconductor Dev Team. (2014) *BSgenome.Hsapiens.UCSC.hg19: Full genome sequences for Homo sapiens (UCSC version hg19)*. R package version 1.4.0.
- The Cancer Genome Atlas Research Network, Chang, K, Creighton, CJ, Davis, C, Donehower, L, Drummond, J, . . . Stuart, JM (2013) The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. *Nat Genet* 45: 1113-20.
- Therneau, TM & Grambsch, PM (2000) *Modeling Survival Data: Extending the Cox Model*. New York, Springer.
- Therneau, TM. (2019) *A Package for Survival Analysis in R*. R package version 2.44-1.1. <https://CRAN.R-project.org/package=survival>.
- Thien, CB & Langdon, WY (1997) Tyrosine kinase activity of the EGF receptor is enhanced by the expression of oncogenic 70Z-Cbl. *Oncogene* 15: 2909-19.
- Thien, CB, Walker, F & Langdon, WY (2001) RING finger mutations that abolish c-Cbl-directed polyubiquitination and downregulation of the EGF receptor are insufficient for cell transformation. *Mol Cell* 7: 355-65.
- Thomas, NE, Edmiston, SN, Alexander, A, Groben, PA, Parrish, E, Krickler, A, . . . Conway, K (2015) Association Between NRAS and BRAF Mutational Status and Melanoma-Specific Survival Among Patients With Higher-Risk Primary Melanoma. *JAMA Oncol* 1: 359-68.
- Topalian, SL, Taube, JM, Anders, RA & Pardoll, DM (2016) Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 16: 275-87.
- Trusolino, L, Bertotti, A & Comoglio, PM (2010) MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 834-48.

- Tsai, J, Lee, JT, Wang, W, Zhang, J, Cho, H, Mamo, S, . . . Bollag, G (2008) Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 3041-6.
- Tsao, H, Zhang, X, Fowlkes, K & Haluska, FG (2000) Relative reciprocity of NRAS and PTEN/MMAC1 alterations in cutaneous melanoma cell lines. *Cancer Res* 60: 1800-4.
- Turajlic, S, Sottoriva, A, Graham, T & Swanton, C (2019) Resolving genetic heterogeneity in cancer. *Nature Reviews Genetics* 20: 404-16.
- Valsecchi, ME, Silbermins, D, De Rosa, N, Wong, SL & Lyman, GH (2011) Lymphatic mapping and sentinel lymph node biopsy in patients with melanoma: a meta-analysis. *J Clin Oncol* 29: 1479-87.
- Valverde, P, Healy, E, Jackson, I, Rees, JL & Thody, AJ (1995) Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nat Genet* 11: 328-30.
- Van Allen, EM, Miao, D, Schilling, B, Shukla, SA, Blank, C, Zimmer, L, . . . Garraway, LA (2015) Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma. *Science* 350: 207-11.
- Venza, M, Visalli, M, Beninati, C, De Gaetano, GV, Teti, D & Venza, I (2015) Cellular Mechanisms of Oxidative Stress and Action in Melanoma. *Oxid Med Cell Longev* 2015: 481782.
- Vigil, D, Cherfils, J, Rossman, KL & Der, CJ (2010) Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? *Nat Rev Cancer* 10: 842-57.
- Vogelstein, B, Papadopoulos, N, Velculescu, VE, Zhou, S, Diaz, LA & Kinzler, KW (2013) Cancer genome landscapes. *Science* 339: 1546-58.
- Walther, A, Houlston, R & Tomlinson, I (2008) Association between chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer: a meta-analysis. *Gut* 57: 941-50.
- Wan, PTC, Garnett, MJ, Roe, SM, Lee, S, Niculescu-Duvaz, D, Good, VM, . . . Marais, R (2004) Mechanism of Activation of the RAF-ERK Signaling Pathway by Oncogenic Mutations of B-RAF. *Cell* 116: 855-67.
- Wang, T, Abou-Ouf, H, Hegazy, SA, Alshalalfa, M, Stoletov, K, Lewis, J, . . . Bismar, TA (2016) Ankyrin G expression is associated with androgen receptor stability, invasiveness, and lethal outcome in prostate cancer patients. *J Mol Med* 94: 1411-22.
- Weaver, BaA & Cleveland, DW (2006) Does aneuploidy cause cancer? *Curr Opin Cell Biol* 18: 658-67.
- Wei, X, Prickett, TD, Vitoria, CG, Molinolo, A, Lin, JC, Cardenas-Navia, I, . . . Samuels, Y (2010) Mutational and functional analysis reveals ADAMTS18 metalloproteinase as a novel driver in melanoma. *Mol Cancer Res* 8: 1513-25.
- Whiteman, DC, Stickley, M, Watt, P, Hughes, MC, Davis, MB & Green, AC (2006) Anatomic site, sun exposure, and risk of cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 24: 3172-7.

- Wickham, H. (2007) *Reshaping Data with the reshape Package*. Journal of Statistical Software, 21(12), 1-20. <http://www.jstatsoft.org/v21/i12/>.
- Wickham, H, Chang, W, Henry, L, Pedersen, TL, Takahashi, K, Wilke, C, . . . Dunnington, D (2016) *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. New York, Springer.
- Wickham, H. (2017) *tidyverse: Easily Install and Load the 'Tidyverse'*. R package version 1.2.1. <https://CRAN.R-project.org/package=tidyverse>.
- Wickham, H. (2018) *scales: Scale Functions for Visualization*. R package version 1.0.0. <https://CRAN.R-project.org/package=scales>.
- Wickham, H, Hester, J & Francois, R. (2018) *readr: Read Rectangular Text Data*. R package version 1.3.1. <https://CRAN.R-project.org/package=readr>.
- Wickham, H, François, R, Henry, L & Müller, K. (2019) *dplyr: A Grammar of Data Manipulation*. R package version 0.8.3. <https://CRAN.R-project.org/package=dplyr>.
- Wickham, H & Henry, L. (2019) *tidyr: Tidy Messy Data*. R package version 1.0.0. <https://CRAN.R-project.org/package=tidyr>.
- Williams, BR, Prabhu, VR, Hunter, KE, Glazier, CM, Whittaker, CA, Housman, DE & Amon, A (2008) Aneuploidy affects proliferation and spontaneous immortalization in mammalian cells. *Science* 322: 703-9.
- Wolchok, JD, Chiarion-Sileni, V, Gonzalez, R, Grob, JJ, Rutkowski, P, Lao, CD, . . . Hodi, FS (2022) Long-Term Outcomes With Nivolumab Plus Ipilimumab or Nivolumab Alone Versus Ipilimumab in Patients With Advanced Melanoma. *J Clin Oncol* 40: 127-37.
- Wullschleger, S, Loewith, R & Hall, MN (2006) TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124: 471-84.
- Xiao, D, Pan, H, Li, F, Wu, K, Zhang, X & He, J (2016) Analysis of ultra-deep targeted sequencing reveals mutation burden is associated with gender and clinical outcome in lung adenocarcinoma. *Oncotarget* 7: 22857-64.
- Xiao, GH, Jeffers, M, Bellacosa, A, Mitsuuchi, Y, Vande Woude, GF & Testa, JR (2001) Anti-apoptotic signaling by hepatocyte growth factor/Met via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 247-52.
- Xue, W, Kitzing, T, Roessler, S, Zuber, J, Krasnitz, A, Schultz, N, . . . Lowe, SW (2012) A cluster of cooperating tumor-suppressor gene candidates in chromosomal deletions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 8212-17.
- Yarden, Y, Kuang, WJ, Yang-Feng, T, Coussens, L, Munemitsu, S, Dull, TJ, . . . Ullrich, A (1987) Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J* 6: 3341-51.
- Zehir, A, Benayed, R, Shah, RH, Syed, A, Middha, S, Kim, HR, . . . Berger, MF (2017) Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. *Nat Med* 23: 703-13.

- Zeileis, A, Fisher, JC, Hornik, K, Ihaka, R, Mcwhite, CD, Murrell, P, . . . Wilke, CO. (2019) *colorspace: A Toolbox for Manipulating and Assessing Colors and Palettes*. arXiv 1903.06490, arXiv.org E-Print Archive. <http://arxiv.org/abs/1903.06490>.
- Zentrum Für Krebsregisterdaten (2021) *Krebs in Deutschland für 2017/2018, 13. Ausgabe*. Robert Koch Institut.
- Zimmer, L, Livingstone, E, Hassel, JC, Fluck, M, Eigentler, T, Loquai, C, . . . Schadendorf, D (2020) Adjuvant nivolumab plus ipilimumab or nivolumab monotherapy versus placebo in patients with resected stage IV melanoma with no evidence of disease (IMMUNED): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet* 395: 1558-68.
- Zuo, L, Weger, J, Yang, Q, Goldstein, AM, Tucker, MA, Walker, GJ, . . . Dracopoli, NC (1996) Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nat Genet* 12: 97-9.

Anhang

Supplement 1: Angereicherte Gene des verwendeten Sequenzierpanels.

<i>ABCB1</i>	<i>CD274</i>	<i>EIF4A2</i>	<i>GNAI1</i>	<i>LRRK2</i>	<i>NSD1</i>	<i>RAD51D</i>	<i>STK19</i>
<i>ABCC2</i>	<i>CD276</i>	<i>ELF3</i>	<i>GNAQ</i>	<i>LYN</i>	<i>NSD2</i>	<i>RAD52</i>	<i>STK31</i>
<i>ABCC4</i>	<i>CD70</i>	<i>EML4</i>	<i>GNAS</i>	<i>LZTR1</i>	<i>NSD3</i>	<i>RAD54L</i>	<i>STK40</i>
<i>ABCG2</i>	<i>CD79A</i>	<i>EP300</i>	<i>GOLGA5</i>	<i>MAD2L2</i>	<i>NTN4</i>	<i>RAF1</i>	<i>SUFU</i>
<i>ABL1</i>	<i>CD79B</i>	<i>EPCAM</i>	<i>GOT1</i>	<i>MALAT1</i>	<i>NTRK1</i>	<i>RANBP2</i>	<i>SULT1A1</i>
<i>ABL2</i>	<i>CDC27</i>	<i>EPHA2</i>	<i>GPS2</i>	<i>MAML2</i>	<i>NTRK2</i>	<i>RARA</i>	<i>SUZ12</i>
<i>ABRAXAS1</i>	<i>CDC73</i>	<i>EPHA3</i>	<i>GPX1</i>	<i>MAP2K1</i>	<i>NTRK3</i>	<i>RASA1</i>	<i>SYK</i>
<i>ACO1</i>	<i>CDH1</i>	<i>EPHA5</i>	<i>GREM1</i>	<i>MAP2K2</i>	<i>NUMA1</i>	<i>RB1</i>	<i>SYNE1</i>
<i>ACTB</i>	<i>CDH20</i>	<i>EPHA6</i>	<i>GRIN2A</i>	<i>MAP2K4</i>	<i>NUP93</i>	<i>RBM10</i>	<i>TAF1</i>
<i>ACVR1B</i>	<i>CDK12</i>	<i>EPHA7</i>	<i>GRM3</i>	<i>MAP2K7</i>	<i>NUP98</i>	<i>RBMX</i>	<i>TAP1</i>
<i>ACVR2A</i>	<i>CDK2</i>	<i>EPHB1</i>	<i>GSK3B</i>	<i>MAP3K1</i>	<i>NUTM1</i>	<i>RECQL4</i>	<i>TBL1XR1</i>
<i>ADAM10</i>	<i>CDK4</i>	<i>EPHB2</i>	<i>GSTP1</i>	<i>MAP3K13</i>	<i>OR5A1</i>	<i>REL</i>	<i>TBX3</i>
<i>ADAMTS18</i>	<i>CDK6</i>	<i>EPHB6</i>	<i>GUCY1A2</i>	<i>MAP3K3</i>	<i>OTC</i>	<i>RET</i>	<i>TCF12</i>
<i>ADCY1</i>	<i>CDK8</i>	<i>EPPK1</i>	<i>GUSB</i>	<i>MAP3K4</i>	<i>PABPC1</i>	<i>RHBDF2</i>	<i>TCF3</i>
<i>ADGRA2</i>	<i>CDKN1A</i>	<i>ERBB2</i>	<i>H3F3A</i>	<i>MAP4K1</i>	<i>PAK1</i>	<i>RHEB</i>	<i>TCF7L2</i>
<i>AJUBA</i>	<i>CDKN1B</i>	<i>ERBB3</i>	<i>H3F3C</i>	<i>MAP4K3</i>	<i>PAK3</i>	<i>RHOA</i>	<i>TERT</i>
<i>AKAP9</i>	<i>CDKN2A</i>	<i>ERBB4</i>	<i>HCFC1</i>	<i>MAPK1</i>	<i>PAK5</i>	<i>RICTOR</i>	<i>TET1</i>
<i>AKT1</i>	<i>CDKN2B</i>	<i>ERCC1</i>	<i>HERC1</i>	<i>MAPK8IP1</i>	<i>PALB2</i>	<i>RIT1</i>	<i>TET2</i>
<i>AKT2</i>	<i>CDKN2C</i>	<i>ERCC2</i>	<i>HGF</i>	<i>MAX</i>	<i>PARP1</i>	<i>RNF43</i>	<i>TFDP1</i>
<i>AKT3</i>	<i>CEBPA</i>	<i>ERCC3</i>	<i>HIF1A</i>	<i>MBD1</i>	<i>PARP2</i>	<i>ROS1</i>	<i>TGFBR1</i>
<i>ALK</i>	<i>CHD1</i>	<i>ERCC4</i>	<i>HIST1H1C</i>	<i>MC1R</i>	<i>PARP3</i>	<i>RPA1</i>	<i>TGFBR2</i>
<i>ALOX12B</i>	<i>CHD3</i>	<i>ERCC5</i>	<i>HIST1H2BD</i>	<i>MCL1</i>	<i>PARP4</i>	<i>RPGR</i>	<i>TGIF1</i>
<i>AMER1</i>	<i>CHD4</i>	<i>ERG</i>	<i>HIST1H3B</i>	<i>MDC1</i>	<i>PAX5</i>	<i>RPL22</i>	<i>TIPARP</i>
<i>ANK3</i>	<i>CHD8</i>	<i>ESR1</i>	<i>HLA-A</i>	<i>MDM2</i>	<i>PAX8</i>	<i>RPL5</i>	<i>TJP2</i>
<i>APAF1</i>	<i>CHEK1</i>	<i>ESR2</i>	<i>HLA-B</i>	<i>MDM4</i>	<i>PBRM1</i>	<i>RPS15</i>	<i>TLR4</i>
<i>APC</i>	<i>CHEK2</i>	<i>ETV1</i>	<i>HNF1A</i>	<i>MECOM</i>	<i>PCBP1</i>	<i>RPS6KA4</i>	<i>TMEM127</i>
<i>APCDD1</i>	<i>CHUK</i>	<i>ETV4</i>	<i>HOXD8</i>	<i>MED1</i>	<i>PCSK9</i>	<i>RPS6KB2</i>	<i>TMEM43</i>
<i>AR</i>	<i>CIC</i>	<i>ETV5</i>	<i>HRAS</i>	<i>MED12</i>	<i>PDCD1</i>	<i>RPTOR</i>	<i>TMPRSS2</i>
<i>ARAF</i>	<i>CLTC</i>	<i>ETV6</i>	<i>HSD3B1</i>	<i>MED17</i>	<i>PDGFRA</i>	<i>RUNX1</i>	<i>TNF</i>
<i>ARFRP1</i>	<i>CNOT1</i>	<i>EWSR1</i>	<i>HSP90AB1</i>	<i>MED23</i>	<i>PDGFRB</i>	<i>RUNX1T1</i>	<i>TNFAIP3</i>
<i>ARHGAP35</i>	<i>CNTNAP1</i>	<i>EXT1</i>	<i>HSPA8</i>	<i>MEF2A</i>	<i>PKD1</i>	<i>RUNX3</i>	<i>TNFRSF14</i>
<i>ARHGEF6</i>	<i>COL1A1</i>	<i>EXT2</i>	<i>ICOSLG</i>	<i>MEF2B</i>	<i>PDPK1</i>	<i>RXRA</i>	<i>TNNI3</i>
<i>ARID1A</i>	<i>COL3A1</i>	<i>EZH1</i>	<i>IDH1</i>	<i>MEN1</i>	<i>PHF6</i>	<i>RYBP</i>	<i>TNNT2</i>
<i>ARID1B</i>	<i>COMT</i>	<i>EZH2</i>	<i>IDH2</i>	<i>MET</i>	<i>PHOX2B</i>	<i>RYR1</i>	<i>TNPO1</i>
<i>ARID2</i>	<i>COP1</i>	<i>FAM46C</i>	<i>IFNGR1</i>	<i>MGA</i>	<i>PIK3C2B</i>	<i>SACS</i>	<i>TOM1</i>
<i>ARID5B</i>	<i>CRBN</i>	<i>FANCA</i>	<i>IGF1</i>	<i>MITF</i>	<i>PIK3C2G</i>	<i>SAV1</i>	<i>TOP1</i>
<i>ASXL1</i>	<i>CREB1</i>	<i>FANCC</i>	<i>IGF1R</i>	<i>MLH1</i>	<i>PIK3C3</i>	<i>SBDS</i>	<i>TOP2A</i>

Anhang

ASXL2	CREBBP	FANCD2	IGF2	MLH3	PIK3CA	SCN11A	TP53
ATM	CRKL	FANCE	IGF2R	MLLT10	PIK3CB	SCN5A	TP53BP1
ATP1A1	CRLF2	FANCF	IKBKE	MLLT3	PIK3CD	SDHA	TP63
ATR	CRTC1	FANCG	IKZF1	MMP2	PIK3CG	SDHAF2	TPMT
ATRX	CRTC3	FANCI	IL10	MN1	PIK3R1	SDHB	TPX2
AURKA	CSDE1	FANCL	IL7R	MNDA	PIK3R2	SDHC	TRAF3
AURKB	CSF1R	FANCM	ING1	MPL	PIM1	SDHD	TRAF7
AXIN1	CTCF	FAS	INHBA	MPO	PIP5K1A	SETBP1	TRIM28
AXIN2	CTLA4	FAT1	INPP4B	MRE11	PKP2	SETD2	TRIO
AXL	CTNNA1	FAT3	INPPL1	MSH2	PLCG1	SETDB1	TRRAP
B2M	CTNNB1	FBN1	INSR	MSH6	PLCG2	SF3B1	TSC1
BACH1	CTNND1	FBXO11	IRF4	MTHFR	PLK2	SGK1	TSC2
BAP1	CTTN	FBXW7	IRS1	MTOR	PMAIP1	SH2B3	TSHR
BARD1	CUL1	FES	IRS2	MUTYH	PML	SH2D1A	TTK
BBC3	CUL4A	FGF10	IRS4	MYB	PMS1	SHQ1	TXNIP
BCL2	CUL4B	FGF12	JAG1	MYBPC3	PMS2	SIN3A	TYMS
BCL2L1	CUX1	FGF14	JAG2	MYC	PNRC1	SLC19A1	U2AF1
BCL2L11	CYLD	FGF19	JAK1	MYCL	POLD1	SLC22A2	UBE2T
BCL2L2	CYP17A1	FGF23	JAK2	MYCN	POLE	SLC26A3	UBR5
BCL6	CYP1B1	FGF3	JAK3	MYD88	POLQ	SLCO1B3	UGT1A1
BCLAF1	CYP2C19	FGF4	JUN	MYH7	POLR3B	SLX4	UPF3B
BCOR	CYP2C8	FGF6	KALRN	MYH9	POU2F2	SMAD2	USP9X
BCORL1	CYP2C9	FGF7	KAT6A	MYL2	PPM1D	SMAD3	VHL
BCR	CYP2D6	FGFBP1	KCNH2	MYL3	PPP2R1A	SMAD4	VTCN1
BLM	CYP3A4	FGFR1	KCNQ1	MYLK	PPP6C	SMARCA1	WASF3
BMPR1A	CYP3A5	FGFR2	KDM5A	MYOD1	PRDM1	SMARCA4	WISP3
BRAF	DAXX	FGFR3	KDM5C	NAV3	PREX2	SMARCB1	WNK1
BRCA1	DCUN1D1	FGFR4	KDM6A	NBN	PRKAG2	SMARCD1	WRN
BRCA2	DDB2	FH	KDR	NCOA3	PRKAR1A	SMC1A	WT1
BRD4	DDR1	FLCN	KEAP1	NCOR1	PRKDC	SMC3	XIAP
BRIP1	DDR2	FLI1	KEL	NCOR2	PRKN	SMO	XPA
BTG1	DDX3X	FLT1	KIT	NEDD4L	PRPF8	SNCAIP	XPC
BTK	DDX5	FLT3	KLF4	NF1	PRSS8	SOCS1	XPO1
BUB1B	DIAPH1	FLT4	KLF5	NF2	PRX	SOD2	XRCC2
CAD	DICER1	FN1	KLHL6	NFE2L2	PSIP1	SOS1	XRCC3
CALR	DIDO1	FOXA1	KMT2A	NFKB1	PTCH1	SOX10	YAP1
CARD11	DIS3	FOXA2	KMT2B	NFKB2	PTEN	SOX17	YES1
CARM1	DMD	FOXE1	KMT2C	NFKBIA	PTGS2	SOX2	ZFH3
CASP8	DNMT1	FOXL2	KMT2D	NIN	PTPN11	SOX9	ZFP36L1
CAST	DNMT3A	FOXP1	KRAS	NIPBL	PTPRC	SPEN	ZFP36L2
CBFB	DNMT3B	FOXQ1	LAMA2	NKX2-1	PTPRD	SPOP	ZMYM2

<i>CBL</i>	<i>DOT1L</i>	<i>FUBP1</i>	<i>LATS1</i>	<i>NKX3-1</i>	<i>PTPRS</i>	<i>SPOPL</i>	<i>ZMYM3</i>
<i>CBLB</i>	<i>DPYD</i>	<i>GABRA6</i>	<i>LATS2</i>	<i>NOTCH1</i>	<i>PTPRT</i>	<i>SPTA1</i>	<i>ZNF217</i>
<i>CBLC</i>	<i>E2F3</i>	<i>GATA1</i>	<i>LCP1</i>	<i>NOTCH2</i>	<i>QKI</i>	<i>SPTAN1</i>	<i>ZNF703</i>
<i>CCAR1</i>	<i>EED</i>	<i>GATA2</i>	<i>LDLR</i>	<i>NOTCH3</i>	<i>RAC1</i>	<i>SRC</i>	<i>ZNF750</i>
<i>CCND1</i>	<i>EEF1A1</i>	<i>GATA3</i>	<i>LIFR</i>	<i>NOTCH4</i>	<i>RAD21</i>	<i>SRSF2</i>	<i>ZNF814</i>
<i>CCND2</i>	<i>EGFL7</i>	<i>GID4</i>	<i>LMNA</i>	<i>NPM1</i>	<i>RAD50</i>	<i>STAG2</i>	<i>ZRSR2</i>
<i>CCND3</i>	<i>EGFR</i>	<i>GLA</i>	<i>LMO1</i>	<i>NQO1</i>	<i>RAD51</i>	<i>STAT3</i>	
<i>CCNE1</i>	<i>EGR3</i>	<i>GNA11</i>	<i>LPP</i>	<i>NR4A2</i>	<i>RAD51B</i>	<i>STAT4</i>	
<i>CD1D</i>	<i>EIF1AX</i>	<i>GNA13</i>	<i>LRP1B</i>	<i>NRAS</i>	<i>RAD51C</i>	<i>STK11</i>	

Supplement 2: Angereicherte Promoter-Regionen des verwendeten Sequenzierpanels.

Chromosom	Startposition	Endposition	Gen
chr2	47629807	47630406	<i>MSH2</i>
chr2	47636849	47637448	<i>MSH2</i>
chr2	48009785	48010384	<i>MSH6</i>
chr3	37034479	37035078	<i>MLH1</i>
chr3	37034804	37035403	<i>MLH1</i>
chr3	37053025	37053624	<i>MLH1</i>
chr5	1294968	1295567	<i>TERT</i>
chr7	6048580	6049179	<i>PMS2</i>
chr12	133263828	133264427	<i>POLE</i>
chr19	50887105	50887704	<i>POLD1</i>
chr19	50901590	50902189	<i>POLD1</i>

Anhang

Supplement 3: Liste der Tumorsuppressorgene für deren Mutationen bei der Berechnung der TMB korrigiert wurde, um eine Überschätzung der Werte zu vermeiden.

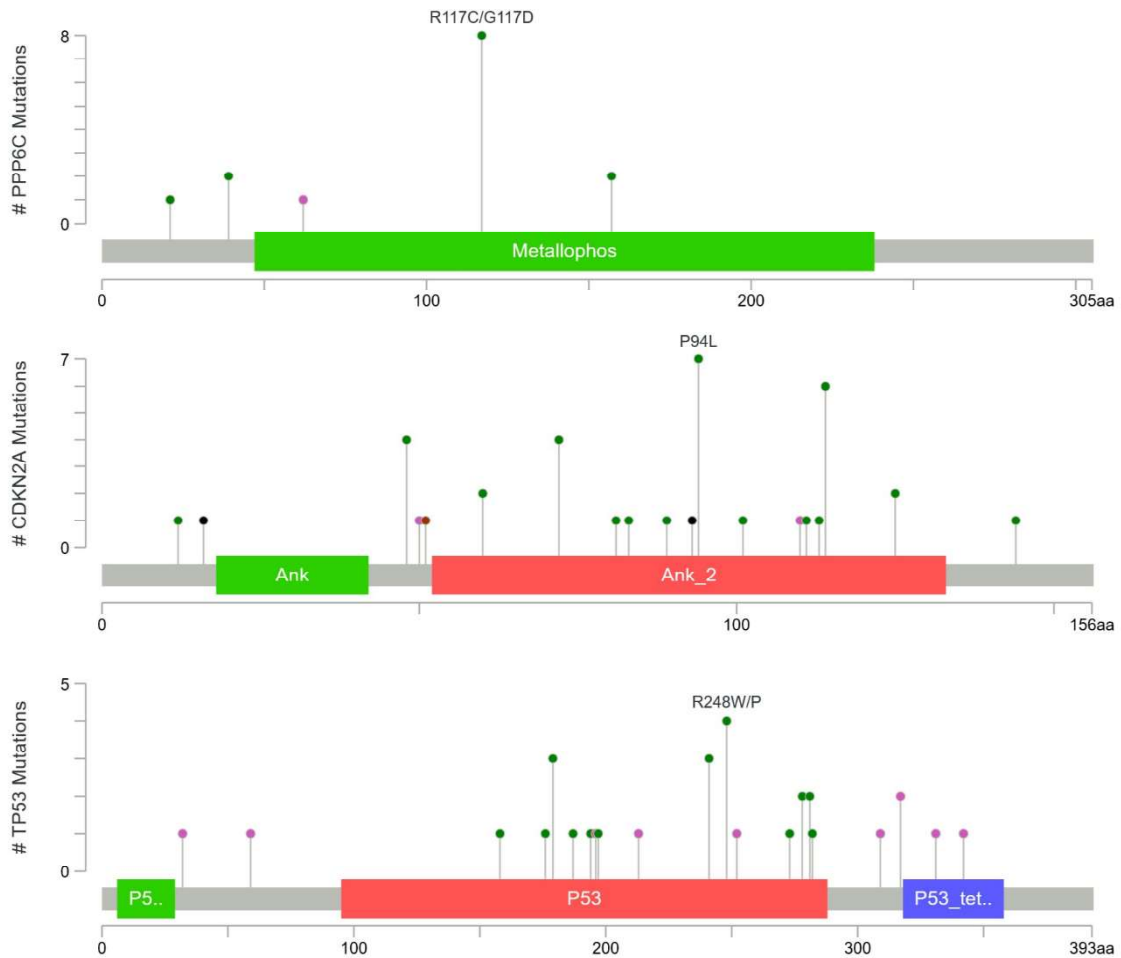
<i>ABI1</i>	<i>BRIP1</i>	<i>CNBP</i>	<i>FANCD2</i>	<i>LRP1B</i>	<i>PML</i>	<i>RPL10</i>	<i>STAG2</i>
<i>ACVR1B</i>	<i>BTG1</i>	<i>CNOT3</i>	<i>FANCE</i>	<i>LZTR1</i>	<i>PMS2</i>	<i>RPL22</i>	<i>STK11</i>
<i>ACVR2A</i>	<i>BUB1B</i>	<i>CNTNAP2</i>	<i>FANCF</i>	<i>MAX</i>	<i>POLD1</i>	<i>RPL5</i>	<i>SUFU</i>
<i>AMER1</i>	<i>CAMTA1</i>	<i>CPEB3</i>	<i>FANCG</i>	<i>MEN1</i>	<i>POLE</i>	<i>RSPO2</i>	<i>TENT5C</i>
<i>APC</i>	<i>CARS</i>	<i>CREB3L1</i>	<i>FAS</i>	<i>MGMT</i>	<i>POLG</i>	<i>SBDS</i>	<i>TET2</i>
<i>ARHGAP26</i>	<i>CASP3</i>	<i>CSMD3</i>	<i>FAT1</i>	<i>MLF1</i>	<i>POT1</i>	<i>SDHA</i>	<i>TGFBR2</i>
<i>ARHGEF10</i>	<i>CASP8</i>	<i>CTCF</i>	<i>FAT4</i>	<i>MLH1</i>	<i>PPARG</i>	<i>SDHAF2</i>	<i>TMEM127</i>
<i>ARHGEF10L</i>	<i>CASP9</i>	<i>CUL3</i>	<i>FBLN2</i>	<i>MSH2</i>	<i>PPP6C</i>	<i>SDHB</i>	<i>TNFAIP3</i>
<i>ARHGEF12</i>	<i>CBFA2T3</i>	<i>CYLD</i>	<i>FBXO11</i>	<i>MSH6</i>	<i>PRDM1</i>	<i>SDHC</i>	<i>TNFRSF14</i>
<i>ARID1A</i>	<i>CBFB</i>	<i>DDX10</i>	<i>FBXW7</i>	<i>MUTYH</i>	<i>PRDM2</i>	<i>SDHD</i>	<i>TPM3</i>
<i>ARID1B</i>	<i>CBLB</i>	<i>DDX3X</i>	<i>FEN1</i>	<i>MYH9</i>	<i>PRF1</i>	<i>SETD1B</i>	<i>TRAF7</i>
<i>ARID2</i>	<i>CCDC6</i>	<i>DICER1</i>	<i>FH</i>	<i>N4BP2</i>	<i>PTCH1</i>	<i>SETD2</i>	<i>TRIM33</i>
<i>ASXL1</i>	<i>CCNB1IP1</i>	<i>DNM2</i>	<i>FHIT</i>	<i>NAB2</i>	<i>PTEN</i>	<i>SFPQ</i>	<i>TSC1</i>
<i>ASXL2</i>	<i>CCNC</i>	<i>DROSHA</i>	<i>FLCN</i>	<i>NBN</i>	<i>PTPN13</i>	<i>SFRP4</i>	<i>TSC2</i>
<i>ATM</i>	<i>CD274</i>	<i>EBF1</i>	<i>FUS</i>	<i>NCOA4</i>	<i>PTPN6</i>	<i>SH2B3</i>	<i>UBR5</i>
<i>ATP2B3</i>	<i>CDC73</i>	<i>EED</i>	<i>GPC5</i>	<i>NCOR1</i>	<i>PTPRB</i>	<i>SIRPA</i>	<i>USP44</i>
<i>ATR</i>	<i>CDH1</i>	<i>EIF3E</i>	<i>GRIN2A</i>	<i>NCOR2</i>	<i>PTPRC</i>	<i>SLC34A2</i>	<i>VHL</i>
<i>ATRX</i>	<i>CDH10</i>	<i>ELF3</i>	<i>HNF1A</i>	<i>NDRG1</i>	<i>PTPRD</i>	<i>SMAD2</i>	<i>WIF1</i>
<i>AXIN1</i>	<i>CDH11</i>	<i>ELL</i>	<i>ID3</i>	<i>NF1</i>	<i>PTPRK</i>	<i>SMAD3</i>	<i>WNK2</i>
<i>AXIN2</i>	<i>CDK12</i>	<i>EP300</i>	<i>IGF2BP2</i>	<i>NF2</i>	<i>PTPRT</i>	<i>SMAD4</i>	<i>WRN</i>
<i>B2M</i>	<i>CDKN1B</i>	<i>EPS15</i>	<i>IKZF1</i>	<i>NFKBIE</i>	<i>RAD17</i>	<i>SMARCA4</i>	<i>XPA</i>
<i>BAP1</i>	<i>CDKN2A</i>	<i>ERCC2</i>	<i>KAT6B</i>	<i>NRG1</i>	<i>RAD51B</i>	<i>SMARCB1</i>	<i>XPC</i>
<i>BARD1</i>	<i>CDKN2C</i>	<i>ERCC3</i>	<i>KDM5C</i>	<i>NTHL1</i>	<i>RANBP2</i>	<i>SMARCD1</i>	<i>YWHAE</i>
<i>BAX</i>	<i>CDX2</i>	<i>ERCC4</i>	<i>KEAP1</i>	<i>PALB2</i>	<i>RB1</i>	<i>SMARCE1</i>	<i>ZBTB16</i>
<i>BAZ1A</i>	<i>CEBPA</i>	<i>ETNK1</i>	<i>KLF6</i>	<i>PATZ1</i>	<i>RBM10</i>	<i>SMC1A</i>	<i>ZFHX3</i>
<i>BCL10</i>	<i>CHD2</i>	<i>ETV6</i>	<i>KMT2C</i>	<i>PBRM1</i>	<i>RFWD3</i>	<i>SOCS1</i>	<i>ZMYM3</i>
<i>BCOR</i>	<i>CHEK2</i>	<i>EXT1</i>	<i>KNL1</i>	<i>PER1</i>	<i>RHOH</i>	<i>SOX21</i>	<i>ZNF331</i>
<i>BLM</i>	<i>CIITA</i>	<i>EXT2</i>	<i>LARP4B</i>	<i>PHF6</i>	<i>RMI2</i>	<i>SOX9</i>	<i>ZNRF3</i>
<i>BRCA1</i>	<i>CLTC</i>	<i>FANCA</i>	<i>LEPROTL1</i>	<i>PHOX2B</i>	<i>RNF43</i>	<i>SPEN</i>	<i>ZRSR2</i>
<i>BRCA2</i>	<i>CLTCL1</i>	<i>FANCC</i>	<i>LRIG3</i>	<i>PIK3R1</i>	<i>ROBO2</i>	<i>STAG1</i>	

Supplement 4: Nominierte Treibergene in der Gesamtkohorte und den molekularen Subtypen sowie deren signifikante q-Werte in der Analyse mittels MutSigCV, OncodriveCLUST und OncodriveFM.

	gesamt			BRAF			RAS			NF1			Triple-WT		
	CLUST	MutSig	FM	CLUST	MutSig	FM	CLUST	MutSig	FM	CLUST	MutSig	FM	CLUST	MutSig	FM
<i>BRAF</i>	1×10 ⁻⁷	6×10 ⁻¹²	5×10 ⁻¹⁴	8×10 ⁻⁷	4×10 ⁻¹¹	4×10 ⁻¹³				0,003			0,051	0,021	
<i>CDKN2A</i>	5×10 ⁻⁵	4×10 ⁻¹²	1×10 ⁻¹⁴		0,029	7×10 ⁻⁸				7×10 ⁻⁹	0,0002	1×10 ⁻¹²			
<i>NRAS</i>	6×10 ⁻¹⁰	6×10 ⁻¹²	2×10 ⁻¹²				0,004	0,0002	5×10 ⁻⁶						
<i>PPP6C</i>	3×10 ⁻⁷	0,005	2×10 ⁻⁸			0,009	5×10 ⁻⁷	5×10 ⁻¹¹	2×10 ⁻¹²						
<i>CBL</i>	0,0007	0	0,0001					0,051	5×10 ⁻¹⁴						
<i>TP53</i>	0,003	0,015	0							0,010	0,0008		0,079	0,004	
<i>MAP2K1</i>	0,014	4×10 ⁻⁷	3×10 ⁻⁵	0,003						0,006		3×10 ⁻⁶			
<i>ARID2</i>		0	9×10 ⁻¹¹					0,008	3×10 ⁻⁶				0,008		
<i>HGF</i>		9×10 ⁻¹²	7×10 ⁻⁵							0,017					
<i>NF1</i>		4×10 ⁻¹²	0						0,024	0,0001	0,001				
<i>ADAMTS18</i>	0,034		0,033							0	0	5×10 ⁻⁸			
<i>CARM1</i>	7×10 ⁻⁷		0,046												
<i>CAST</i>		0,063	0,0005												
<i>CDC27</i>	0,036	0,005													
<i>CYP3A5</i>		0,015	0,022												
<i>DICER1</i>		0,0001	0,014						0,010						
<i>NUP98</i>		1×10 ⁻¹⁰	0,0005							0,023					
<i>PTEN</i>		0,0003	0,0002												
<i>RPL5</i>		0,063	0,019												
<i>TCF12</i>		0,006	0,020							0,025					
<i>TET2</i>		1×10 ⁻¹²	0,007							0,003					
<i>TOP2A</i>		0,093	0,036												
<i>MECOM</i>					0,004	0,011									
<i>PTPRC</i>				4×10 ⁻⁵	0,040					0,013					
<i>COL3A1</i>			6×10 ⁻¹²					0,0002	0,016			4×10 ⁻⁷	0,088	0,029	
<i>EPHA3</i>								0,030	0,003						
<i>AR</i>											0,003	0,005			
<i>CBLB</i>		3×10 ⁻⁹								0,042	0,003				
<i>KIT</i>													0,008	0,003	

MutSig = MutSigCV, CLUST = OncodriveCLUST, FM = OncodriveFM, hellgrau: signifikanter q-Wert in zwei Algorithmen, dunkelgrau: signifikanter q-Wert in drei Algorithmen

Anhang



Supplement 5: Mutationscluster der Gene *PPP6C*, *CDKN2A* und *TP53*, die einen q-Wert < 0,01 in der OncodriveCLUST-Analyse der Gesamtkohorte aufwiesen.

Tumor- und Normal-Probenpaare von Melanompatienten im Stadium II wurden mittels NGS sequenziert (n = 193). Lollipop-Plots für Gene, die in mindestens zwei von drei Treiberalgorithmen detektiert wurde und die einen q-Wert von < 0,01 in der OncodriveCLUST-Analyse der Gesamtkohorte aufwiesen, wurden erstellt. Hierfür wurde die Anwendung MutationMapper von cBioportal (Cerami et al., 2012; Gao et al., 2013) verwendet. Die x-Achse zeigt die Aminosäureposition auf dem Gen. Die Höhe der Lollipops gibt die Anzahl der Mutationen in der jeweiligen Position des Gens wieder. Missense-Mutationen sind grün, trunkierende Mutationen (Nonsense, Nonstop, Frameshift-Deletion, Frameshift-Insertion, Splice-Site) schwarz, In-Frame-Deletionen und -Insertionen braun und alle anderen Mutationstypen pink dargestellt. Das Gen *PPP6C* zeigte ein besonders prominentes Mutationscluster, das die Aminosäureposition 117 betraf. *CDKN2A* wies mehrere Cluster auf, von denen die Position P94 in der Kohorte am häufigsten von Mutationen betroffen war. Auch für *TP53* wurden mehrere Cluster beobachtet, wobei die Position R248 die meisten Mutationen aufwies.

Supplement 6: Detektierte *CBL* Mutationen des kodierenden Bereichs.

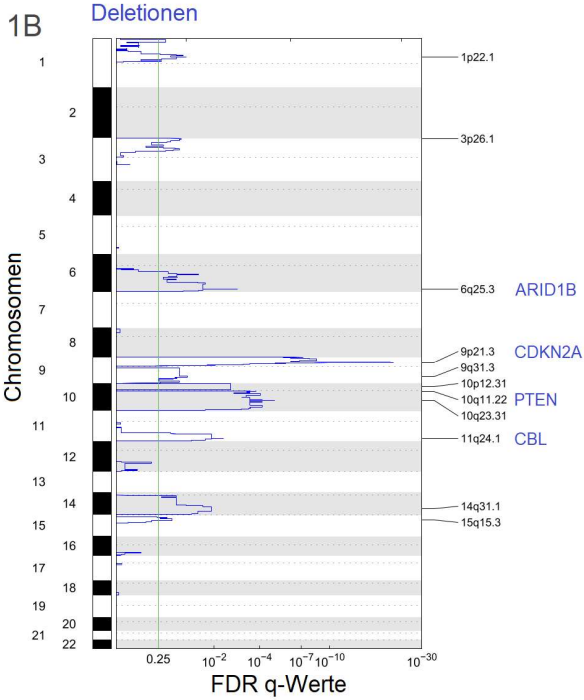
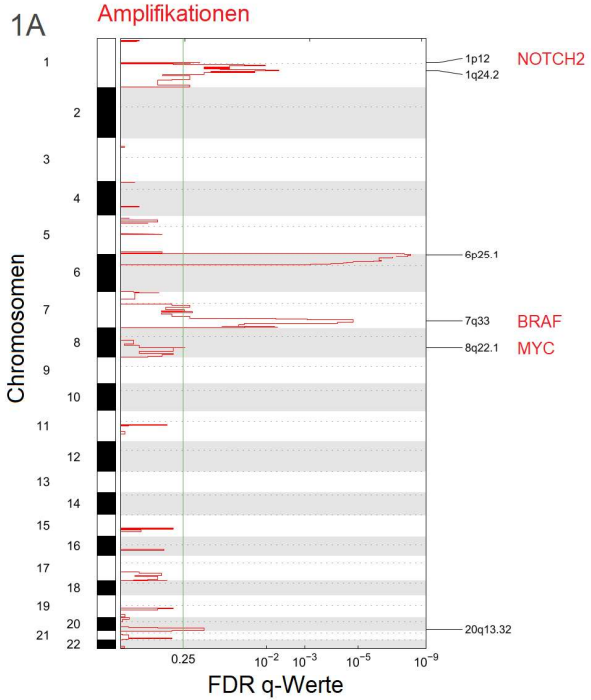
Patienten ID	<i>CBL</i> Mutation	<i>CBL</i> Mutation	<i>CBL</i> Deletion	Subtyp	TMB
273	S22L		Nein	<i>NF1</i>	74,70
301	R180W		Nein	Triple- WT	41,56
14	R180W		Heterozygot	<i>NF1</i>	63,69
320	S217F		Nein	<i>NF1</i>	249,86
37	Q358*		Nein	Triple-WT	75,95
48	V363K		Nein	Triple-WT	102,69
159	Q367H		Nein	Triple-WT	75,50
120	Y371H		Nein	Triple-WT	3,84
274	Y371N		Nein	<i>NF1</i>	56,36
161	P417L		Heterozygot	<i>NF1</i>	31,53
164	P417S	F418I	Heterozygot	<i>NF1</i>	99,45
136	P417S	P417F	Heterozygot	<i>NF1</i>	80,81
227	F418C		Nein	Triple-WT	96,50
317	F418I		Heterozygot	<i>NF1</i>	20,54
339	P582S		Nein	<i>NF1</i>	71,69
313	E696K		Nein	<i>RAS</i>	40,20
178	Q882*		Nein	<i>NF1</i>	136,46

Supplement 7: Detektierte *KIT* Mutationen des kodierenden Bereichs. Synonyme Mutationen wurden nicht angegeben.

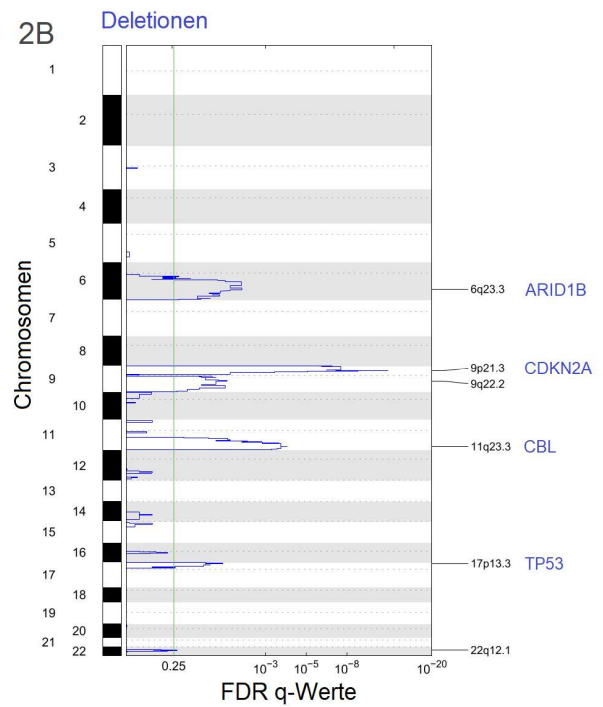
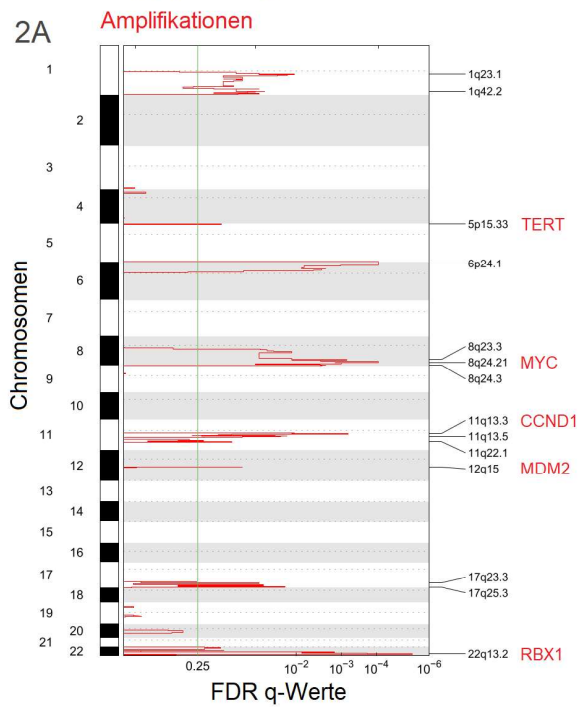
Patienten ID	<i>KIT</i> Mutation	<i>KIT</i> Mutation	<i>KIT</i> Amplifikation	Subtyp	TMB
344	P141L		Nein	<i>NF1</i>	97,90
81	S147F		Nein	<i>NF1</i>	60,18
41	C443S	S628G	CN = 17	Triple-WT	5,72
286	P524L		Nein	Triple-WT	85,38
289	A533D	D579del	CN = 21	Triple-WT	2,41
162	P551L	D816Y	Nein	<i>NF1</i>	169,66
133	V559A	A781V	Nein	Triple-WT	4,81
321	L576P		Nein	<i>NF1</i>	50,64
248	L576P		CN = 15	Triple-WT	0,95
314	L576P		Nein	Triple-WT	3,36
159	L576P		Nein	Triple-WT	75,50
37	L576P	H630D	Nein	Triple-WT	75,95
348	R634W		Nein	Triple-WT	84,15
227	K642E		CN = 4	Triple-WT	96,50
333	K684K		Nein	<i>BRAF</i>	68,26
120	N822K		CN = 4	Triple-WT	3,84

CN = Anzahl der Kopien des *KIT* Gens in der jeweiligen Probe, falls eine Amplifikation vorlag.
 Falls CN < 4, wurde das Gen als nicht amplifiziert gewertet.

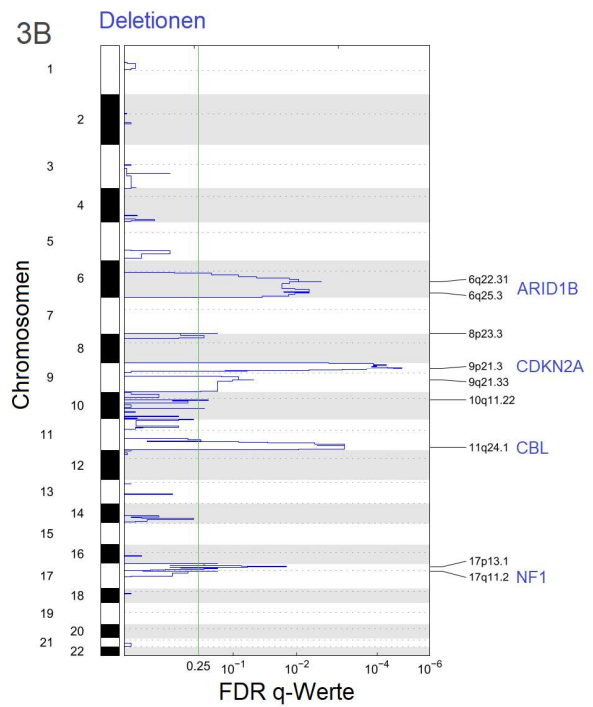
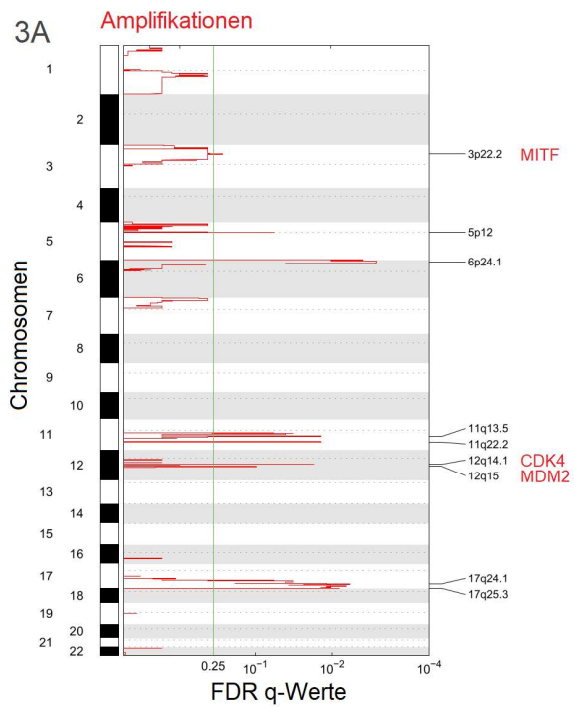
BRAF Subtyp (n = 58)



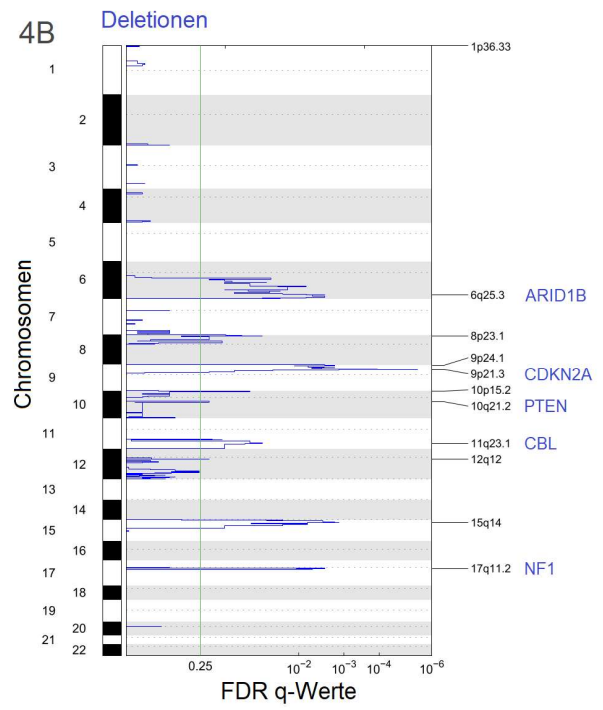
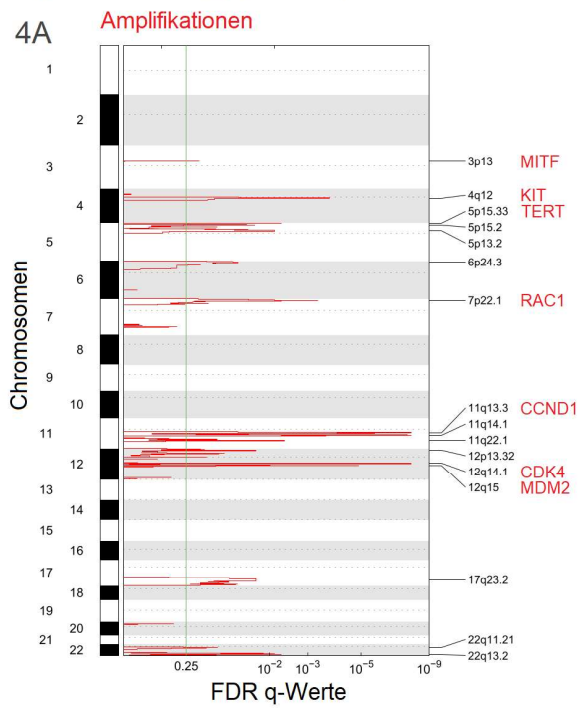
RAS Subtyp (n = 53)



NF1 Subtyp (n = 33)



Triple-WT Subtyp (n = 46)



Supplement 8: **GISTIC Ergebnisse der molekularen Subtypen.**

Die CNVs einer Stadium II Melanomkohorte (n = 193) wurden mittels ClinCNV anhand vorliegender NGS-Daten analysiert. Für drei Tumoren war dies aufgrund der geringen Qualität der Daten nicht möglich. Davon gehörten zwei dem Subtyp *NF1* und einer dem *RAS* Subtyp an. Anschließend wurden die SCNAs der gesamten Kohorte sowie der molekularen Subtypen mittels GISTIC auf Signale positiver Selektion untersucht. Die Graphen auf den vier vorhergegangenen Seiten zeigen die Ergebnisse der molekularen Subtypen. Die roten Graphen (A) illustrieren Amplifikationen, blaue Graphen (B) zeigen Deletionen. Die Skala auf der linken Seite gibt die Lokalisation der Regionen auf dem Genom an. Die untere x-Achse zeigt die Höhe der ermittelten FDR q-Werte. Die grüne, vertikale Linie stellt das Signifikanzniveau für die q-Werte dar. Die Beschriftungen auf der rechten Seite zeigen die genaue Bezeichnung der signifikanten Region. "q" steht dabei für den langen Chromosomenarm, "p" für den kurzen Arm. Außerdem wurden ausgewählte Gene der Peak-Region manuell ergänzt. Dafür wurden Gene gewählt, die bereits zuvor in Studien des malignen Melanoms als amplifiziert oder deletiert beschrieben wurden, oder solche, die anderweitig von Interesse sein könnten. 1. *BRAF* Subtyp (n = 58). 2. *RAS* Subtyp (n = 53). 3. *NF1* Subtyp (n = 33). 4. Triple-WT Subtyp (n = 46). A. Amplifikationen. B. Deletionen.

Supplement 9: Univariate Cox-Analysen in Abhängigkeit des Mutationsstatus der in der Gesamtkohorte nominierten Treibergene, die in mindestens 5 % der Tumoren von einer kodierenden, nicht-synonymen Mutation betroffen waren.

	n	Rezidivfreies Überleben (RFS)				Gesamtüberleben (OS)			
		HR	95% KI	p-Wert	korr.	HR	95% KI	p-Wert	korr.
ADAMTS18									
Wildtyp°	147								
Mutation	46	0,74	0,37 - 1,47	0,39	0,78	0,81	0,37 - 1,75	0,59	0,93
TET2									
Wildtyp°	163								
Mutation	30	0,98	0,46 - 2,08	0,96	0,96	0,84	0,33 - 2,13	0,71	0,93
CDKN2A									
Wildtyp°	164								
Mutation	29	1,44	0,74 - 2,80	0,28	0,78	1,26	0,58 - 2,73	0,57	0,93
TP53									
Wildtyp°	171								
Mutation	22	0,52	0,16 - 1,65	0,27	0,78	1,75	0,73 - 4,18	0,21	0,70
DICER1									
Wildtyp°	174								
Mutation	19	0,62	0,22 - 1,72	0,36	0,78	0,42	0,10 - 1,75	0,23	0,70
ARID2									
Wildtyp°	175								
Mutation	18	0,97	0,35 - 2,70	0,96	0,96	2,39	1,00 - 5,71	0,050	0,54
CBL									
Wildtyp°	176								
Mutation	17	0,86	0,31 - 2,39	0,78	0,96	0,80	0,25 - 2,59	0,71	0,93
HGF									
Wildtyp°	176								
Mutation	17	0,51	0,12 - 2,10	0,35	0,78	1,18	0,36 - 3,84	0,78	0,93
NUP98									
Wildtyp°	178								
Mutation	15	0,41	0,10 - 1,67	0,21	0,78	1,05	0,37 - 2,95	0,93	1,00
MAP2K1									
Wildtyp°	179								
Mutation	14	0,87	0,27 - 2,78	0,81	0,96	2,25	0,88 - 5,76	0,090	0,54
PPP6C									
Wildtyp°	183								
Mutation	10	1,07	0,26 - 4,40	0,93	0,96	1,63	0,39 - 6,76	0,50	0,93
TOP2A									
Wildtyp°	183								
Mutation	10	0,75	0,18 - 3,08	0,69	0,96	0,00	0,00 - Inf	1,00	1,00

° Referenzkategorie, HR = Hazard Ratio, KI: Konfidenzintervall, korr.: korrigierter p-Wert.

Supplement 10: Begrenzungen der fünf deletierten Regionen mit den kleinsten q-Werten in GISTIC.

Region	Wide Peak Limits	Peak Limits	Region Limits
9p21.3	chr9: 21868501- 21968794	chr9: 21967183- 21968697	chr9: 1-42527627
9p24.3	chr9: 1-14853103	chr9: 1118533- 1615339	chr9: 1-42527627
11q23.1	chr11: 106579213- 132219865	chr11: 110697331- 113074770	chr11: 80985294- 135006516
6q25.3	chr6: 154307667- 166552472	chr6: 160645862- 160680813	chr6: 72357937- 171115067
6q21	chr6: 94529953- 145673803	chr6: 112073547- 115474974	chr6: 72357937- 171115067

chr: Chromosom

Supplement 11: Univariate Cox-Analysen für die fünf deletierten Regionen, die in der GISTIC Analyse die kleinsten q-Werte aufwiesen.

	n	Rezidivfreies Überleben (RFS)				Gesamtüberleben (OS)			
		HR	95% KI	p-Wert	korr.	HR	95% KI	p-Wert	korr.
9p21.3									
Wildtyp°	70								
Deletion	120	1,82	0,99 - 3,35	0,054	0,27	1,56	0,79 - 3,08	0,20	0,42
9p24.3									
Wildtyp°	107								
Deletion	83	1,45	0,84 - 2,52	0,19	0,47	1,43	0,76 - 2,71	0,27	0,42
11q23.1									
Wildtyp°	108								
Deletion	82	1,31	0,77 - 2,24	0,32	0,51	4,75	2,32 - 9,73	2 × 10⁻⁵	0,0001
6q25.3									
Wildtyp°	109								
Deletion	81	1,20	0,70 - 2,05	0,51	0,51	1,35	0,73 - 2,51	0,33	0,42
6q21									
Wildtyp°	110								
Deletion	80	1,20	0,70 - 2,06	0,50	0,51	1,19	0,64 - 2,22	0,58	0,58

° Referenzkategorie, HR = Hazard Ratio, KI: Konfidenzintervall, korr.: korrigierter p-Wert.
Deletion: GISTIC amplitude threshold $t < -0.1$

Anhang

Supplement 12: Liste der Gene, die auf dem Wide-Peak der von GISTIC als deletiert detektierten Region 11q23.1 lokalisiert waren.

hsa-mir-3167	NCAM1	TREH	IFT46	FAM55A	OR6M1
hsa-mir-100	NFRKB	CEP164	PRDM10	FAM55B	OR10G4
hsa-mir-4301	NNMT	EXPH5	DSCAML1	AMICA1	OR10G7
hsa-mir-34c	NPAT	PHLDB1	GRAMD1B	CWF19L2	OR8B3
ACAT1	NRGN	SIK2	ARHGAP20	KDELC2	OR8A1
ACRV1	PAFAH1B2	ARHGEF12	USP28	LAYN	C11orf87
APLP2	POU2AF1	SIK3	PKNOX2	TTC36	C11orf92
APOA1	PPP2R1B	VSIG2	TP53AIP1	PATE1	C11orf88
APOA4	PTS	BACE1	ABCG4	C11orf65	MIR100HG
APOC3	PVRL1	TRIM29	ROBO3	ADAMTS15	PATE2
ARCN1	RDX	CADM1	C11orf1	MPZL3	PATE4
ATM	RPS25	POU2F3	RNF26	C11orf45	FLJ39051
FXYD2	SC5DL	HINFP	FAM118B	HYLS1	SNX19
CXCR5	SCN2B	REXO2	NLRX1	TMEM218	MIRLET7A2
CBL	SCN4B	OR8G2	C11orf61	SLC37A2	MIR100
CD3D	SDHD	OR8B8	ALG9	OR8B12	MIR125B1
CD3E	ST3GAL4	OR8G1	CLMP	OR8G5	MIR34B
CD3G	SLN	TIMM8B	PDZD3	OR10G8	MIR34C
CHEK1	SORL1	OR8B2	C11orf63	OR10G9	BLID
CRYAB	SRPR	DCPS	CCDC15	OR10S1	LINC00167
DDX6	ST14	ZBTB44	TMPRSS5	OR6T1	HEPN1
DDX10	TAGLN	DDX25	PUS3	OR4D5	LOC643923
DLAT	TECTA	NTM	MFRP	TBCEL	CLDN25
DPAGT1	THY1	CDON	BCO2	TMEM136	LOC649133
DRD2	UPK2	SIDT2	TMPRSS13	HEPACAM	RPL23AP64
ETS1	ZBTB16	TRAPPC4	KIRREL3	OAF	LOC100132078
FDX1	ZNF202	SPA17	BUD13	ANKK1	PATE3
FLI1	CUL5	FXYD6	TMEM25	RNF214	LOC100288346
SLC37A4	BARX2	SIAE	RPUSD4	LOC283143	BACE1-AS
GRIK4	ZNF259	C11orf71	TBRG1	BCL9L	MIR4301
GUCY1A2	USP2	ROBO4	UBASH3B	FOXR1	MIR3167
H2AFX	PCSK7	SLC35F2	DIXDC1	CCDC153	LOC100499227
HMBS	HTR3B	RAB39A	ZC3H12C	OR8D1	MIR3656
HSPA8	ZW10	BTG4	ESAM	OR8D2	LOC100507392
HSPB2	UBE4A	FAM55D	ALKBH8	OR8B4	LOC100526771
HTR3A	EI24	TTC12	FDXACB1	KIRREL3-AS3	HSPB2-C11orf52
IL10RA	FEZ1	C11orf57	C11orf52	CCDC84	FXYD6-FXYD2
IL18	ARHGAP32	ELMOD1	TIRAP	TMEM225	MIR4493
STT3A	C2CD2L	FOXRED1	C1QTNF5	OR8D4	MIR4491
KCNJ1	RBM7	SCN3B	PANX3	C11orf53	MIR4492
KCNJ5	MPZL2	VPS11	APOA5	LOC341056	LOC100652768
VWA5A	HYOU1	TEX12	TMEM45B	C11orf34	
MCAM	ATP5L	CRTAM	C11orf93	BSX	
MLL	ADAMTS8	TMPRSS4	PIH1D2	OR6X1	

Erklärungen zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde am Institut für medizinische Genetik und angewandte Genomik der Universität Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. Olaf Rieß durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Christopher Schroeder, Dr. Teresa Amaral, Dr. Tobias Sinnberg und Prof. Dr. Claus Garbe. Die Anträge an die Ethik-Kommission der medizinischen Fakultät der Universität Tübingen zur Beratung und Bewilligung der Studiendurchführung wurden von Dr. Teresa Amaral und Prof. Dr. Claus Garbe verfasst.

Die Gewebeproben wurden von Mitarbeitenden der Sektion für dermatologische Onkologie der Universitäts-Hautklinik Tübingen unter Leitung von Dr. Teresa Amaral und Dr. Tobias Sinnberg identifiziert und zur Verfügung gestellt. Das gleiche gilt für die klinischen Daten der eingeschlossenen Patienten, die aus dem CMMR herausgesucht und übermittelt wurden. Die pathologische Begutachtung, Mikrodissektion und DNA-Isolation erfolgte am Department für Pathologie und Neuropathologie des UKT unter Leitung von Dr. Irina Bonzheim. Das Next Generation Sequencing fand am Institut für medizinische Genetik und angewandte Genomik statt und wurde von Olga Kelemen und Beate Kootz durchgeführt. Die Rohdaten der Sequenzierung wurden von Axel Gschwind verarbeitet und Variantenlisten wurden erstellt sowie TMB-Werte berechnet. Die Analyse und Bereitstellung der CNVs erfolgte durch Dr. German Demidov.

Die Ein- und Ausschlusskriterien hinsichtlich der Qualitätsparameter der Sequenzierung wurden von mir in Rücksprache mit Dr. Christopher Schroeder definiert. Die Auswertung der Daten wurde selbstständig von mir geplant und durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich. Für einige spezifische Fragestellungen wurde Rücksprache mit Inka Rösel sowie Prof. Dr. Peter Martus vom Institut für klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie gehalten. Die Algorithmen OncodriveCLUST, MutSigCV und OncodriveFM sowie das R Package deconstructSigs wurden von Jakob Admard und die GISTIC Analyse von Dr. German Demidov ausgeführt. Die Ermittlung der Gesamtzahl der Mutationen und der TMB aus den online verfügbaren TCGA Daten wurde ebenfalls von Jakob Admard durchgeführt. Die Ergebnisse der bioinformatischen Algorithmen

Erklärungen zum Eigenanteil

wurden von mir selbstständig zusammengefasst, aufbereitet und interpretiert. Alle Abbildungen bis auf Abbildung 11 wurden von mir eigenständig erstellt. Dieser Oncoplot wurde gemäß meinen Vorstellungen von Jakob Admard aufgesetzt und von mir weiter angepasst.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, 18.02.2022

Elena Sophia Lindner

Veröffentlichungen

Publikation in Vorbereitung

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir die Arbeit an diesem Projekt ermöglicht, an der Durchführung mitgewirkt und mich hierbei unterstützt haben oder mir während dieser Zeit zur Seite gestanden sind.

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Betreuer Prof. Dr. Olaf Rieß bedanken, der mir diese Arbeit ermöglicht und sich stets für mich eingesetzt hat.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Dr. Christopher Schroeder, der mich exzellent betreut hat und jederzeit ein offenes Ohr für mich hatte.

Weiterhin bedanke ich mich herzlich bei allen an der Studie beteiligten Menschen, insbesondere den Kollegen aus der Dermatologie und der Bioinformatik, für die konstruktive Zusammenarbeit und die große Unterstützung durch fachliche Diskussionen und den interdisziplinären Austausch. Der Firma Novartis danke ich für die Finanzierung des Projekts.

Ein von Herzen kommendes Dankeschön geht auch an meine Familie, meine Freunde und meinen Freund, die mich immer unterstützt haben und mir stets mit gutem Rat zur Seite standen.