

Aktuelle molekulare Diagnostik beim malignen Melanom

Current Molecular Diagnostics in Melanoma



Autor

M. Kunz

Institut

Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie,
Universität Leipzig

Bibliografie

DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0042-116033>

Akt Dermatol 2017; 43: 46–59

© Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York

ISSN 0340-2541

VNR 2760512017152373520

Durch den Einsatz neuer Sequenzierungstechniken ist es zu einer rasanten Entwicklung bzgl. der Identifikation von genetischen Varianten beim malignen Melanom gekommen. Die dabei gewonnenen neuen Erkenntnisse erlauben ein besseres Verständnis der Pathogenese des malignen Melanoms und der genetischen Mechanismen der sekundären Behandlungsresistenz

Einleitung

Ein wesentlicher Durchbruch in der dermatologischen Onkologie war die Entdeckung von *BRAF*-V600E-Mutationen beim malignen Melanom [1]. Entsprechende *BRAF*-Mutationen gibt es auch bei anderen Tumoren wie z. B. beim Kolonkarzinom, hier allerdings in deutlich geringerer Häufigkeit. Nachfolgend kam es zu einer raschen Entwicklung von *BRAF*-Inhibitoren, die zunächst mit Sorafenib einen nicht sehr erfolgreichen Kandidaten hervorbrachte [2]. Mit der Entwicklung der neueren und spezifischeren *BRAF*-Inhibitoren Vemurafenib, Dabrafenib und Encorafenib hat die Behandlung des malignen Melanoms deutliche Fortschritte gemacht [3, 4]. Es kam dadurch zu einer Verbesserung des rezidivfreien Überlebens und letztlich des Gesamtüberlebens um 8–10 Monate.

Die *BRAF*-V600E-Mutation ist mit Abstand die am häufigsten vorkommende *BRAF*-Mutation beim Melanom (► **Tab. 1**). Von den therapeutisch bedeutsamen *BRAF*-V600-Mutationen steht die *BRAF*-V600K-Mutation bezüglich ihrer Häufigkeit an zweiter Stelle. Zumindest für die *BRAF*-V600K- und die *BRAF*-V600R-Mutation wurde in der klinischen Anwendung eine gegenüber der *BRAF*-V600E-Mutation vergleichbare Wirkung für die spezifischen *BRAF*-Inhibitoren gesehen [5, 6]. Für die *BRAF*-V600D-Mutation wurden *in vitro* für Melanomzellen vergleichbare Ergebnisse zu *BRAF*-V600R ge-

funden [7]. Mit Abstand die schwächste Wirkung der spezifischen *BRAF*-Inhibitoren *in vitro* wurde gegenüber dem *BRAF*-Wildtyp gesehen (3- bis 4-mal schlechtere Wirkung als gegenüber *BRAF*-V600E), was auch der klinischen Erfahrung der Unwirksamkeit von *BRAF*-Inhibitoren gegenüber *BRAF*-Wildtyp-Melanommetastasen entspricht.

Noch bessere Daten liegen für die Kombinationstherapie mit MEK1/2 (mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase 1/2)-Inhibitoren vor, z. B. mit Trametinib und Cobimetinib. Hier konnte das mediane Gesamtüberleben sogar um mehr als 15 auf 25 Monate verbessert werden [8–10]. Nicht überzeugend waren hingegen die Ergebnisse der alleinigen Behandlung *BRAF*-mutierter Melanompatienten mit einem MEK1/2-Inhibitor [11]. Bei Patienten mit einer *NRAS*-Mutation (meistens *NRAS* Q61), die sich mit einer *BRAF*-Mutation gegenseitig ausschließt, kommt es dabei nur zu einer Verbesserung des Gesamtüberlebens in 10% der Fälle [11]. Allerdings gibt es für die Monotherapie noch keine Zulassung. Ebenfalls noch nicht abschließend zu beurteilen sind die Daten der Inhibition von mutiertem *KIT*, dem Rezeptor für den *Stem Cell Factor* (SDF), z. B. mit Dasatinib, Masitinib oder Sunitinib. Die Erkenntnisse aus den sogenannten *Targeted Therapies*, also den auf ein Molekül zielgerichteten Behandlungen, haben die genetische Diagnostik beim malignen Mela-

nom beflügelt, in der Hoffnung, neue Zielstrukturen zu entdecken. Mittlerweile liegen die Ergebnisse großer Sequenzierungsstudien von vielen Hundert Patienten, bei denen die Gesamtheit der kodierenden Sequenzen (durch sog. *Whole-Exome Sequencing*) sequenziert wurden, vor [12–14]. Es stellt sich nun die Frage, welche und wie viele genetische Veränderungen beim malignen Melanom für die zukünftige Therapie Bedeutung haben können und später dann im Rahmen der Therapieentscheidung getestet werden sollten.

Unabhängig von dieser Entwicklung haben die sogenannten Checkpoint-Inhibitoren gegen CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4) und PD-1 (Programmed Cell Death 1) in jüngerer Zeit große Hoffnungen hinsichtlich der Verbesserung des Überlebens der Patienten geweckt. Diese wiederum werden in Zukunft mit den zielgerichteten Therapien kombiniert werden, wenn auch über die genauen Schemata gegenwärtig noch diskutiert wird [4, 15, 16]. Entsprechende klinische Studien laufen bereits oder werden gerade initiiert.

Zusammenfassend gibt es beim malignen Melanom eine stürmische Entwicklung sowohl hinsichtlich neuer Therapieansätze als auch hinsichtlich der molekularen Diagnostik mit neuen genetischen Untersuchungsmethoden.

Mutationen in Onkogenen und Onkogenkandidaten beim malignen Melanom

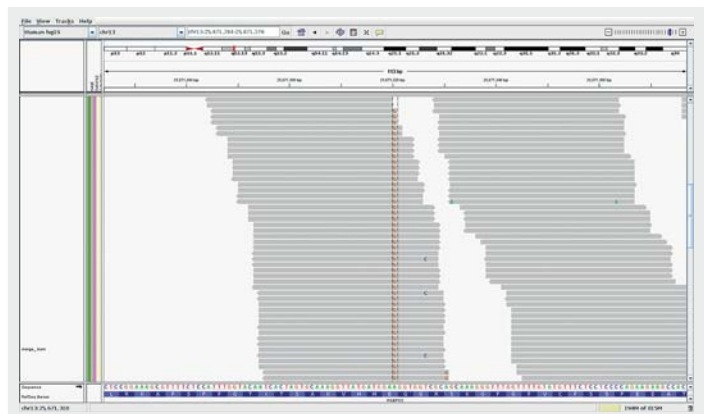
Mithilfe des sogenannten *Next-Generation Sequencing* (NGS) können heutzutage ganze Genome in wenigen Tagen untersucht werden [17, 18] (► **Abb. 1**). Neben dem deutlich gesunkenen Zeitaufwand haben sich auch die Kosten in den letzten Jahren deutlich verringert, sodass man heute eine *Whole-Exome-Sequenzierung* kommerziell in wenigen Tagen für unter 500 Dollar durchführen lassen kann. Die hohe Geschwindigkeit bei der NGS liegt unter anderem daran, dass man dabei ein sogenanntes „*massively parallel sequencing*“ durchführt, d. h. man untersucht Millionen kleiner DNA-Fragmente des jeweiligen Tumorgenoms in parallelen Ansätzen auf miniaturisierten DNA-Chips [17]. Die Untersuchung maligner Tumore hat dabei eine Fülle neuer Mutationen zu Tage gebracht, die möglicherweise pathogenetisch und therapeutisch von Bedeutung sein können. Die meisten sind aber noch nicht weiter funktionell untersucht.

Rückblickend hatte beim malignen Melanom alles mit der Sequenzierung eines Gesamtgenoms einer Melanomzelllinie begonnen (also inklusive der nicht kodierenden Sequenzen, den sogenannten Introns) [19]. In

► **Tab. 1** Häufigkeit der verschiedenen *BRAF*-V600-Mutationen beim malignen Melanom.

<i>BRAF</i> -V600-Mutationen	Prozentualer Anteil beim malignen Melanom ¹
V600E	89%
V600K	9%
V600R	1%
V600D	0,2%
V600M	0,14%
V600G	0,02%
V600L	0,02%

¹ <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/search?q=BRAF+melanoma>



► **Abb. 1** Bild eines *Read Alignments* von Sequenzen, die mittels *Next-Generation Sequencing* (NGS) bei einem Melanom generiert wurden. Anzeigt werden Basen, die nicht mit dem bekannten Genom an dieser Stelle übereinstimmen. Die Sequenzierungstiefe wird durch die Zahl der an einer bestimmten Position übereinander liegenden *Reads* bestimmt. Unter *Reads* versteht man kurze DNA-Stücke, die während des Sequenziervorganges generiert werden und hier als graue Balken abgebildet sind.

dieser Untersuchung wurde das Mutationsmuster dieser Melanomzelllinie mit der einer vom gleichen Patienten stammenden Lymphomzelllinie verglichen. Dabei waren die Mehrzahl der Mutationen C>T- oder G>A- und CC>TT- oder GG>AA-Transitionen, die auf die Bedeutung des UV-Lichtes bei der Mutationsentstehung hindeuten. Dieses Phänomen wurde auch später bei weiteren Untersuchungen zum Melanom gefunden, wenn auch die klassischen Mutationen im *BRAF*- und *NRAS*-Gen nicht einer solchen klassischen UV-Signatur entsprechen. Hinsichtlich neuer Kandidatengene war diese Studie nicht sehr aufschlussreich.

In der Folge erschien eine ganze Reihe von Untersuchungen, die sich in der Regel auf kleinere Zahlen von Melanomzelllinien bezogen [20–22]. Entweder wurden dabei ganze Exome sequenziert oder man fokussierte sich auf spezielle funktionelle Gengruppen, z. B.

► **Tab. 2** Häufig mutierte Gene und aktivierte Signalwege beim malignen Melanom mit zurzeit möglichen und zukünftigen (potenziellen) Behandlungsansätzen.

Mutiertes Gen	Signalweg	Häufigkeit der genetischen Veränderung	Substanzen für eine zielgerichtete Therapie (Beispiele)
<i>BRAF</i>	MAPK	50 %	Vemurafenib, Dabrafenib, Encorafenib, Vemurafenib plus Cobimetinib, Dabrafenib plus Trametinib
<i>MEK1/2</i>	MAPK	5 %	Trametinib, Cobimetinib, Binimetinib
<i>NRAS</i>	MAPK, PI3K	20 %	Trametinib, Cobimetinib, Binimetinib, Everolimus, Sorafenib plus Tivantinib
<i>KIT</i>	MAPK, PI3K	1 %	Imatinib, Sunitinib, Nilotinib, Dasatinib
<i>ERBB4</i>	MAPK, PI3K-Akt-mTOR	3 – 19 %	Lapatinib, Gefitinib
<i>AKT3</i>	PI3K-Akt-mTOR	25 %	Dactolisib, Everolimus
<i>PTEN</i>	PI3K-Akt-mTOR	30 – 40 %	Dactolisib, Everolimus

auf Matrix-Metalloproteinasen, Rezeptortyrosinkinasen oder G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Zumindest G-Protein-gekoppelte Rezeptoren scheinen auf Anhieb nicht zwingend mit dem Melanom in Verbindung zu stehen. Interessanterweise wurde allerdings in einer jüngeren Arbeit nachgewiesen, dass diese Rezeptoren eine Rolle bei der sekundären Therapieresistenz auf BRAF- und MEK-Inhibitoren spielen können [23].

Zurück zu den anfänglichen Studien. Hierbei wurde z. B. der ionotrope Glutamatrezeptor *GRIN2A* in mehr als 25 % aller untersuchten Tumoren mutiert gefunden. Dabei wurde die anfängliche Zahl von wenigen Tumoren auf mehr als 100 in einer Validierungsstudie ausgedehnt [21]. Allerdings war darunter keine rekurrente, d. h. an der gleichen Stelle vorkommende Mutation. Daher bleibt die funktionelle Bedeutung zunächst unklar. Ein metabotroper Glutamatrezeptor, nämlich *GRM3*, wurde in einer weiteren Studie ebenfalls sehr häufig (16 %) als mutiert identifiziert [22]. Hier wurde in der Validierungskohorte eine rekurrente Mutation in 4 von 57 Proben gefunden. Es zeigte sich, dass mutiertes *GRM3* *in vitro* und in Mausversuchen die Migration und das metastatische Verhalten von Melanomzellen beeinflussen kann und darüber hinaus zu einer Aktivierung von *MEK1/2* führt. Entsprechend hatte ein *MEK1/2*-Inhibitor Einfluss auf Melanomzellen mit *GRM3*-Mutation.

Therapeutische Hoffnungen setzte man zunächst in die Entdeckung von Mutationen im *ERBB4*-Gen [20] (► **Tab. 2**). *ERBB4* war in dieser Untersuchung in fast 20 % aller Fälle mutiert. Funktionell gehört *ERBB4* zur Familie der *Epidermal-Growth-Factor* (EGF)-Rezeptoren, die bei vielen soliden Tumoren mutiert oder durch andere Mechanismen aktiviert sind. Eine größere Zahl der gefundenen Mutationen war tatsächlich aktivierend für *ERBB4*. In der Folge wurde eine entsprechende klinische Phase-2-Studie mit dem pan-EGFR-Inhibitor Lapatinib initiiert, die mittlerweile beendet wurde

(www.clinicaltrials.gov; NCT01264081). Ergebnisse hierzu wurden aber noch nicht publiziert. Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass eine nachfolgende Untersuchung zeigen konnte, dass *ERBB4* tatsächlich nur in einem kleineren Prozentsatz von Melanomen mutiert ist, als ursprünglich angenommen, nämlich in nur etwa 3 % [24]. Daher werden größere klinische Studien der Phase 3 und 4 mit den dabei notwendigen Zahlen an Patienten nur schwer zustande kommen. Der offensichtliche Irrtum über die Häufigkeit der *ERBB4*-Mutationen war dadurch entstanden, dass über Jahre kultivierte Melanomzelllinien, und länger in Kultur gehaltene Melanomzellen, offenbar einen Zelltyp herausselektionieren, der ein anderes Mutationsmuster aufweist als Tumoren *in vivo*.

In einer neueren Arbeit, bei der 25 Melanommetastasen untersucht wurden, zeigte das *PREX2*-Gen Mutationen in 14 % der untersuchten Fälle [25]. Es handelte sich aber nicht um Mutationen an der gleichen Stelle. *PREX2* ist ein Rac Exchange Factor, und mutiertes *PREX2* ist in der Lage, das Wachstum von Melanomzellen zu verstärken.

Funktionelle und spätere therapeutische Bedeutung vermutet man vor allem in wiederkehrenden Mutationen an der gleichen Stelle des Genes (rekurrente Mutationen) (► **Tab. 2**). Im Zuge der neueren Untersuchungen wurde ein weiterer solcher Kandidat gefunden, nämlich *RAC1* [12 – 14, 26]. *RAC1* ist in etwa 5 % der Melanome als *RAC1* P29S mutiert, wodurch es strukturell zu einer Stabilisierung des GTP-bindenden und damit aktivierten Status von *RAC1* kommt. Beschränkt man sich auf die Melanome in chronisch sonnenexponierter Haut, fanden sich Mutationen sogar in knapp 10 % der Fälle. In den drei Arbeiten wurden deutlich über 100 Melanomproben untersucht, wovon der Großteil Primärtumoren und Metastasen waren. Mutiertes *RAC1* hat einen Einfluss auf die Migration und Proliferation

von Melanomzellen, ohne dass dessen Wirkung aber bisher detaillierter untersucht worden ist. Zwar gibt es chemische Inhibitoren von RAC1, aber bisher keine in klinischen Studien eingesetzte Substanz.

Mittlerweile gibt es großangelegte Sequenzierungsinitiativen, die für alle gängigen Tumortypen tausende von Sequenzierungen durchführen [14], www.wellcome.ac.uk. Für das maligne Melanom liegen, basierend unter anderem auf Studien des *Cancer Genome Atlas Network*, sehr aktuelle Daten von einigen Hundert Melanomproben vor [12–14]. Konkret wurden im erwähnten Projekt des *Cancer Genome Atlas Network* 331 Melanomproben (Primärmelanome, Melanommetastasen und Melanomzelllinien) hauptsächlich mittels *Whole-Exome*- und RNA-Sequenzierung untersucht [14].

Erwartungsgemäß wurden aufgrund des experimentellen Ansatzes in den großen oben erwähnten Studien nur genetische Varianten in Exonen gefunden. Das *Cancer Genome Atlas Network* hat allerdings auch eine geringere Zahl von Gesamtgenomen untersucht [14]. Hierbei konnten Daten bezüglich des *TERT* (terminale Transferase reverse Transkriptase)-Genes, die zwei Jahre zuvor veröffentlicht worden waren, im Wesentlichen bestätigt werden [27]. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass in Melanomen sehr häufig die Promotorregion des *TERT*-Genes mutiert ist, und zwar in 33% der Primärmelanome und 85% der Metastasen [27]. *TERT* ist Bestandteil des Telomerase-Komplexes, der zusätzlich noch eine RNA (*TERC*) als Template (Matrize) für die Telomerbildung an den Chromosomenenden enthält. In normalen Körperzellen ist *TERT* inaktiviert, in über 80% aller Tumoren aktiviert [28]. *TERT* sorgt für die Aufrechterhaltung der Telomerenenden und verhindert dadurch die durch Zellalterung und dadurch bedingte Apoptose.

Für eine der mutierten Stellen konnte gezeigt werden, dass es durch die Mutation zu einer verstärkten Aktivität des *TERT*-Promotors kommt. Interessant ist dabei die Ausgangsidee der Studie, die mithilfe einer sog. SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*)-Analyse nach pathogenetisch interessanten SNPs in einer Familie gesucht hatte, in der es gehäuft zum Auftreten von Melanomen kam. SNPs sind genetische Varianten, die in der allgemeinen Bevölkerung vorkommen, aber im Falle einer Häufung bei bestimmten Erkrankungen auch pathogenetische Bedeutung haben können. Bei vielen Erkrankungen ist aber ein solch direkter Zusammenhang nicht belegt. Im Falle des Melanoms handelt es sich um eine funktionelle Mutation im *TERT*-Promotor, die in einem Bindemotiv für den Transkriptionsfaktor *Ets* liegt. In einer jüngeren Studie zu initialen genetischen Veränderungen bei der Melanomentstehung konnte gezeigt werden, dass *TERT* offenbar bereits in der ganz frühen Phase am Übergang vom benignen

Nävus zum Melanom, in den sog. *intermediate lesions*, häufig (77%) mutiert ist [29].

Zusammenfassend liegen für das maligne Melanom damit umfassende Daten zum Mutationsspektrum vor, die aller Voraussicht nach nur noch geringfügig durch sehr selten (unter 1%) vorkommende Mutationen in Zukunft ergänzt werden.

Merke
Funktionelle und spätere therapeutische Bedeutung vermutet man vor allem in wiederkehrenden Mutationen an der gleichen Stelle des Genes (rekurrente Mutationen), da diese zufälligerweise nur extrem selten vorkommen (z. B. in *RAC1*, *GRM3* und *ERBB4*). In einer kürzlich erschienenen Studie konnte gezeigt werden, dass in Melanomen sehr häufig die Promotorregion des *TERT*-Genes mutiert ist.

Genfusionen und *read-through*-Transkripte

Wenig Beachtung haben bislang sogenannte Fusionsgene bei soliden Tumoren wie dem malignen Melanom gefunden. Bei der chronisch-myeloischen Leukämie ist die *BCR-ABL*-Fusion eine sehr bekannte funktionelle genetische Variante mit erheblichen therapeutischen Konsequenzen. Genetische Translokationen mit der Bildung von Fusionsgenen sind bei malignen hämatologischen Erkrankungen und diversen Sarkomen grundsätzlich sehr häufig [30]. Neuerdings mehrten sich allerdings die Hinweise, dass Translokationen und Genfusionen auch bei anderen soliden Tumoren eine Rolle spielen könnten [31,32]. Mittlerweile sind fast 8000 Genfusionen bei malignen Tumoren inkl. Leukämien identifiziert worden [32]. Wenig ist allerdings über ihre pathogenetische Bedeutung bekannt. Im Wesentlichen beruhen diese Entdeckungen auf den neueren Sequenzierungstechniken, die es erlauben, solche Veränderungen genomweit und mit hoher Präzision aufzuspüren. Hinsichtlich des Melanoms ist noch relativ wenig bekannt. In einer Arbeit, die das gesamte Transkriptom in 8 Kurzzeitkulturen und 2 Melanomzelllinien mittels RNA-Seq sequenzierte, wurden eine ganze Reihe von so genannten *read-through*-Transkripten als Resultat von Genfusionen gefunden [33]. Unter anderem wurden zwei Fusionen unter Beteiligung des Tumorsuppressorgens *RB1* und von *RECK* identifiziert. *RECK* kann Tumorinvasion und Metastasierung verhindern. Es kam aber keine der Fusionen in mehr als einer Probe vor und wurde auch in keiner von 90 weiteren untersuchten Zelllinien gefunden. Es handelt sich also offenbar um sogenannte private Mutationen, d. h. solche, die nur in Einzelfällen vorkommen.

Interessanterweise wurden bei spitzoiden Melanomen und bei möglichen Vorläuferläsionen wie spitzoiden Nävi und atypischen Spitztumoren häufiger solche Fusionen gefunden [34]. Hier gab es auch Fusionen, die im jeweilig gleichen Gen vorkamen. Untersucht wurden in der Arbeit 182 sogenannte *cancer-related genes*, 37 Introns von bei verschiedenen Krebsarten vorkommenden rearrangierten Genen und 612 Transkripte von Kinase-Genen. Wie erwähnt, wurden in der Arbeit Spitznävi, atypische Spitztumore und spitzoide Melanome untersucht. Von letzteren ist bekannt, dass sie nicht die üblichen *NRAS*- und *BRAF*-Mutationen tragen. Dabei konnten wiederholte Fusionen der Kinasen *ROS1*, *ALK*, *NTRK1*, *BRAF* und *RET* gefunden werden, und zwar zusammengenommen in 54,7% der Fälle von Spitznävi, 56,3% der atypischen Spitztumore und 39,4% der spitzoiden Melanome. Die genannten Kinasen hatten dabei jeweils einen anderen Fusionspartner und auch die Fusionsstelle variierte. Die funktionelle Bedeutung dieser Ergebnisse konnte aber im Folgenden an einigen Beispielen dadurch gezeigt werden, dass man Mäusen benigne Melan-A-Zellen injizierte, die die entsprechenden Fusionsgene trugen. Dadurch entwickelten diese subkutane Tumoren, während Kontrollzellen keine Tumorbildung aufwiesen [34].

Interessanterweise konnten auch in der großen Studie des *Cancer Genome Atlas Networks* zum Melanom über 240 neue Fusionsgene gefunden werden. Hier war aber nur ein sehr kleiner Prozentsatz rezidivierend, d. h. mit dem gleichen Fusionspartner, der mit verschiedenen anderen Genen fusionierte [35]. Unter den rezidivierenden Fusionspartnern waren *BRAF*, *RAF1*, *AKT3* und *MITF*, allerdings in sehr unterschiedlichen Kombinationen, entweder der Fusion voran- oder nachgestellt, sodass eine funktionelle Interpretation schwierig ist. Die mögliche funktionelle Bedeutung wurde dabei nicht untersucht. In einer früheren Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass *BRAF* in seltenen Fällen beim Melanom Genfusionen eingehen kann [35]. Es konnten in zwei von 52 untersuchten Fällen *BRAF*-Fusionen gefunden werden, deren Aktivität in funktionellen Assays auf MEK1/2-Inhibition, nicht aber auf *BRAF*-Inhibition, ansprach. Abgesehen von den spitzoiden Melanomen scheinen nach gegenwärtigem Stand Fusionsgene als Treiber beim malignen Melanom eher selten.

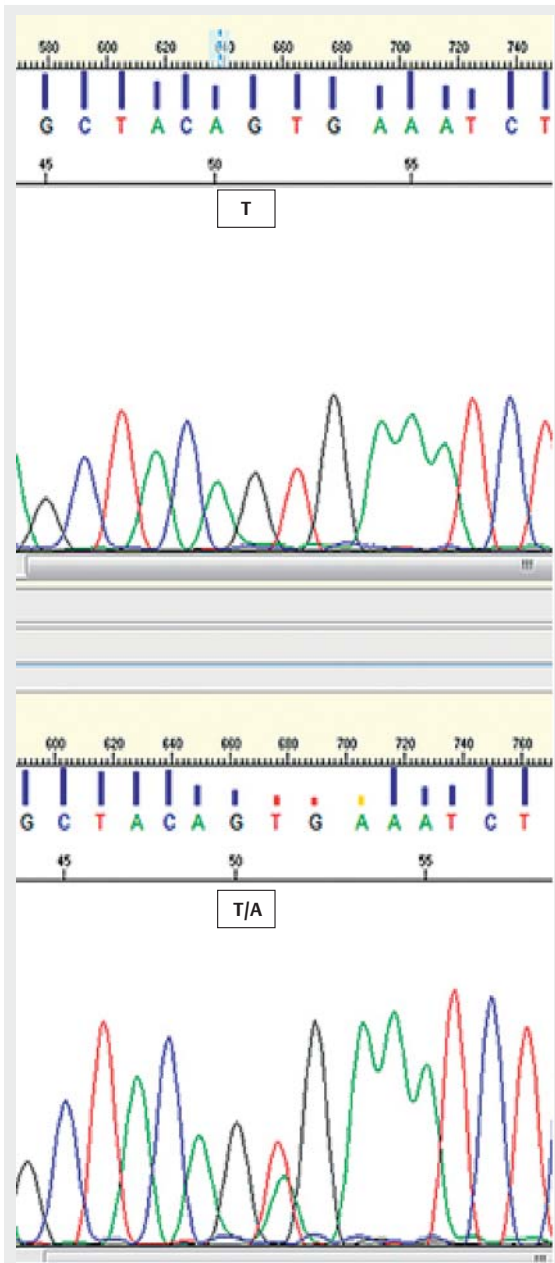
Merke

Interessanterweise wurden bei spitzoiden Melanomen und bei möglichen Vorläuferläsionen wie spitzoiden Nävi und atypischen Spitztumoren häufiger Genfusionen gefunden. Beteiligte Gene waren dabei *ROS1*, *ALK*, *NTRK1*, *BRAF* und *RET*.

Mutationsanalysen in der Routine

In der Routineanalyse werden gegenwärtig nur eine sehr begrenzte Anzahl von Genen untersucht, und zwar *BRAF*, *NRAS* und *KIT*. Dabei werden unterschiedliche Verfahren angewandt. Am bekanntesten ist der Cobas® 4800-Test zum Nachweis der *BRAF*-V600-Mutation [36]. Er basiert auf einer PCR, die für eine Mutation an dieser Stelle sensitiv ist. Diesem Test wird eine hohe Sensitivität und vor allem eine hohe Spezifität (über 95%) zugeschrieben. Er zeigt auch eine hohe Übereinstimmung mit einem weiteren kürzlich beschriebenen Test (Idylla TMBRAF) [37]. Die in den einzelnen Kliniken verwendeten Tests sind sehr unterschiedlich und reichen von klassischer Sanger-Sequenzierung und Pyrosequenzierung bis zur gezielten Exon-Sequenzierung, die alle mit einer hohen Spezifität ausgestattet sind (► **Abb. 2**).

In einer kürzlich erschienenen Arbeit wurden die gebräuchlichsten Nachweisverfahren zum Nachweis der *BRAF*-V600-Mutation kritisch gegenübergestellt [38]. Ausgangspunkt war eine kurz zuvor erschienene Arbeit, die behauptet hatte, dass es bei der Untersuchung von Primärmelanomen und Metastasen nur deshalb zu häufigen diskordanten Ergebnissen bezüglich des Mutationsstatus für *BRAF* kommt, weil die Nachweismethode mittels Cobas® 4800-Test z. B. gegenüber dem immunhistochemischen Nachweis mit dem VE1-Antikörper weniger sensitiv sei [39]. Hier wurden 140 Paare von Primärmelanomen und Metastasen untersucht und bei 23 Cobas-diskordanten Paaren eine komplette Konkordanz mit dem *BRAF*-spezifischen Antikörper VE1 gefunden. Eine genaue Betrachtung der 23 Cobas-diskordanten Fälle ergab aber, dass die Mehrzahl durchaus mittels Sanger-Sequenzierung als konkordant eingestuft werden konnten. Einige Fälle blieben jedoch als diskordante Fälle übrig, die alle weniger als 15% Tumorzellen enthielten [38]. Diese Ergebnisse unterstreichen noch einmal, dass Tumorzellen mit wenig Tumormaterial bezüglich der jeweiligen Mutation ein falsch-negatives Ergebnis ergeben können. Der Schluss, dass die Sanger-Sequenzierung letztlich sensitiver als die Cobas-Untersuchung sei, kann aber aus dieser einzelnen Untersuchung nicht gezogen werden. Eine ganze Reihe von Untersuchungen fand eine hohe Sensitivität und Spezifität für die Cobas-Untersuchung. Bei Anwendung der immunhistochemischen Methode sollte im Falle eines negativen Ergebnisses eine Sequenzierung für die weniger häufigen V600-Mutationen angeschlossen werden. Ob sich der immunhistochemische V600E-Nachweis in Zukunft als Screeningverfahren bewährt, müssen weitere Untersuchungen zeigen. Aktuell wurde über ähnliche Ergebnisse auch für mutiertes *NRAS* (*NRAS* Q61R) berichtet [40]. Die vielversprechenden Ergebnisse in dieser ersten Studie zu *NRAS* wurden kurz darauf von einer unabhängigen Gruppe bestätigt [41]. Die Autoren der zweiten Studie verweisen darauf,



► **Abb. 2 Mutationsanalyse mittels Sanger-Sequenzierung.** Melanomzelllinien wurden bzgl. der *BRAF*-V600E-Mutation (*BRAF T1799A*) mittels Sanger-Sequenzierung untersucht. Abgebildet sind Sequenzen in dieser Region, die einen Wildtyp (oben) und einen Wildtyp zusammen mit einer V600E-Mutation (unten) zeigen. Letzteres spricht für eine Heterozygotie oder für eine Heterogenität innerhalb der Zelllinie.

dass in ihrer Klinik beide Untersuchungen, Sequenzierung und Immunhistochemie, durchgeführt werden, um falsch-negative Resultate zu vermeiden.

Merke

In der Routineanalyse wird gegenwärtig nur eine sehr begrenzte Anzahl von Genen untersucht, und zwar *BRAF*, *NRAS* und *KIT*. Bisherige Untersuchungen unterstreichen die Tatsache, dass Tumormaterial bezüglich der jeweiligen Mutation ein falsch-negatives Ergebnis ergeben können. Ob sich der immunhistochemische Nachweis der *BRAF*-V600E-Mutation mit einem spezifischen Antikörper in Zukunft als Screeningverfahren bewährt, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Erweiterte Mutationsanalysen (Cancer Panels)

Gegenwärtig wird *NGS* in größeren Initiativen dazu genutzt, den genetischen Hintergrund vieler solider Tumore und hämatologischer Erkrankungen aufzuschlüsseln. Beispielsweise hat das *International Cancer Genome Consortium* (ICGC) eine größere Initiative für die Sequenzierung von 25 000 Krebsgenomen gestartet (<https://icgc.org/>; <http://www.wellcome.ac.uk>). Diese Daten werden die Basis bilden für zukünftige fokussiertere Analysen unter Nutzung individueller Tumorpanels und Behandlungsansätze. Basierend auf der oben genannten Veröffentlichung, hat das *Cancer Genome Atlas Network* einen sehr umfassenden Datensatz geliefert, wodurch die Mutationslandschaft beim malignen Melanom jetzt als sehr weit fortgeschritten betrachtet werden kann [14]. Zukünftige Analysen werden evtl. noch Mutationen ergänzen, die mit einer geringen Häufigkeit (z. B. von unter 1 %) vorkommen und möglicherweise von klinischer Bedeutung sind.

Gegenwärtig ist eine Reihe von sog. Sequenzierungspanels mit einer begrenzten Zahl an Genen für die Exon-Sequenzierung verfügbar von verschiedenen Firmen wie z. B. von Life Technologies (*AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2*; 50 oft mutierte Onkogene und Tumorsuppressorgene) und Qiagen® (*Breast cancer, colorectal cancer und lung cancer panel*). Die Firma Illumina hat das sogenannte *TruSight® Tumorpanel* mit 15 wiederholt mutierten Genen bei verschiedenen Krebsarten etabliert. Es ist möglich, dass dieses Panel in Zukunft noch erweitert wird.

Diese Panels benötigen für einzelne Tumorentitäten weitere Ergänzungen und können in Zukunft für individuelle Tumoranalysen eingesetzt werden. Bislang ist noch kein eigentliches Melanompanel etabliert, das in großem Maßstab eingesetzt wird. Einige Kliniken haben aber bereits eigene Panels entworfen, mit denen individuelle Fragestellungen beantwortet werden können. Die Universitäts-Hautklinik Essen sequenziert hier ein Panel von Genen mit 30 der am häufigsten beim Melanom mutierten Gene (Exonsequenzierung). Eingee-

schlossen sind dabei auch die Analysen des *TERT*-Promotors, der bei einer größeren Zahl von Melanomen mutiert ist [27]. Die Rolle des *TERT*-Promotors wurde auch in einer jüngeren Arbeit zur Entstehung des malignen Melanoms erneut unterstrichen [29]. Dieses wie auch die anderen Panels müssen sich jetzt in klinischen und experimentellen Studien bewähren.

Merke

Tumorpanels einzelner Tumorentitäten für die gezielte Sequenzierung sind aktuell in der Erprobung und benötigen wahrscheinlich noch weitere Ergänzungen. Sie könnten in Zukunft für individuelle Tumoranalysen eingesetzt werden. Bislang existiert noch kein käufliches Melanompanel.

Genetische und genomische Analysen bei Behandlungsresistenz

Mithilfe der NGS und anderer genomischer Analysen konnten Mechanismen der sekundären Behandlungsresistenz (nach Therapie) oder der primären Behandlungsresistenz (vor Therapie) aufgeklärt werden. Mittlerweile liegt hierzu eine Fülle von Untersuchungen vor, die hier nur exemplarisch dargestellt werden können. In einer der ersten Arbeiten wurden 45 Patienten untersucht [42]. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sekundäre Resistenzen gegenüber dem BRAF-Inhibitor Vemurafenib offenbar durch Mutationen in den beim Melanom bereits bekannten MAPK- und PI3K-Signalwegen verursacht werden. Konkret kam es zum Auftreten von *NRAS*-Mutationen, *BRAF*-Amplifikationen, *MEK1/2*-Mutationen und Mutationen der PI3-Kinase [42]. In den anschließend durchgeführten In-vitro-Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass eine Kombinationstherapie, die beide Signalwege adressiert, den BRAF- und den PI3K-Akt-Signalweg, einen deutlich besseren Effekt auf Melanomzellen erzielt als die jeweilige Einzeltherapie. Dies spricht dafür, dass Kombinationstherapien helfen können, die Zahlen der Rezidive zu verringern. Über ähnliche genetische Veränderungen ist auch in anderen Arbeiten berichtet worden. Diese beruhen aber z.T. auf reinen In-vitro-Untersuchungen [23,43,44].

In einer weiteren Arbeit wurde versucht, Resistenzmechanismen über einen umfassenden genetischen (*gain-of-function*) Screen zu identifizieren [45]. Hierbei wurden *BRAF*-mutierte Melanomzelllinien mit einem BRAF-, MEK1/2- und ERK1/2-Inhibitor einzeln oder in Kombination behandelt. Gleichzeitig dazu wurden insgesamt 15000 verschiedene Gene in parallelen Ansätzen überexprimiert, um eine Behandlungsresistenz zu erzeugen. Bei den Ergebnissen fiel auf, dass es überwiegend Gene der sogenannten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren waren, die Resistenz vermittelten. Diese

üben ihre intrazelluläre Signaltransduktion über die Adenylatzyklase, cAMP und Proteinkinase A (PKA) aus, was letztlich unter anderem zu einer transkriptionellen Aktivierung von MITF führt. Eine Inhibition der Transkription von MITF mit Histondeazetylase-Inhibitoren konnte konsequenterweise diese Resistenz wieder rückgängig machen. Ob dieses Experiment so in die humane Situation am Patienten übertragbar ist, kann gegenwärtig noch nicht beurteilt werden.

Etwa zur gleichen Zeit erschien eine Arbeit, die zeigen konnte, dass sich Melanome mit einer primären Behandlungsresistenz gegenüber BRAF- und MEK1/2-Inhibitoren durch Genexpressionsmuster auszeichnen, die als MITF low/NF- κ B high-Phänotyp bezeichnet wurden [46]. In diesen Untersuchungen hatte man Genexpressionsmuster von intrinsisch sensitiven mit intrinsisch resistenten Zelllinien verglichen und einen auffallenden Unterschied in der Genexpression von MITF- und NF- κ B-abhängigen Genen festgestellt. Ähnliche Beobachtungen wurden auch mit Melanomkurzzeitkulturen gemacht. Bei einer weitergehenden Untersuchung von Melanomproben von mit BRAF- und MEK1/2-Inhibitor behandelten Patienten waren MITF low/NF- κ B high-Genmuster mit einem deutlich geringeren progressionsfreien Überleben assoziiert. Ähnliche Ergebnisse konnten auch von einer anderen Gruppe erzielt werden, wobei es in dieser Studie auch eine ganze Reihe von Resistenzen mit erhöhter MITF-Expression gab [47]. Offenbar gibt es Resistenzentwicklungen, die mit niedriger, aber auch mit hoher MITF-Expression einhergehen.

Eine interessante Beobachtung zur Inhibitorresistenz wurde kürzlich zur kombinierten BRAF/MEK-Inhibitor-Resistenz gemacht [44]. Dabei wurde neben der Inhibitorresistenz eine sogenannte *Drug Addiction* nachgewiesen. Das bedeutet, die Melanomzellen wuchsen in Gegenwart der BRAF/MEK-Inhibitoren weiter, hörten aber nach Entzug mit dem Wachstum auf. Genetisch handelte es sich bei den resistenten Zellen um Zellen mit bis zu achtzigfach erhöhten Kopienzahlen des *BRAF*-Gens, die offenbar unter Therapie herausselektioniert worden waren. In nachfolgenden Versuchen konnte gezeigt werden, dass diese *Drug Addiction* durch eine Dreifachkombination mit einem zusätzlichen ERK1/2-Inhibitor überwunden werden konnte. Grundsätzlich sprechen diese Ergebnisse dafür, dass es Sinn machen könnte, bei Behandlungsresistenz die Behandlung zu unterbrechen, in der Hoffnung auf einen Rückgang von Metastasen. Die Autoren sagen aber auch, dass sie dafür in den bisher abgelegten Daten zu Behandlungsverläufen im *Cancer Genome Atlas* keine Hinweise gefunden haben. Allerdings werden gegenwärtig entsprechende Studien zu einer intermittierenden Therapie beim malignen Melanom durchgeführt.

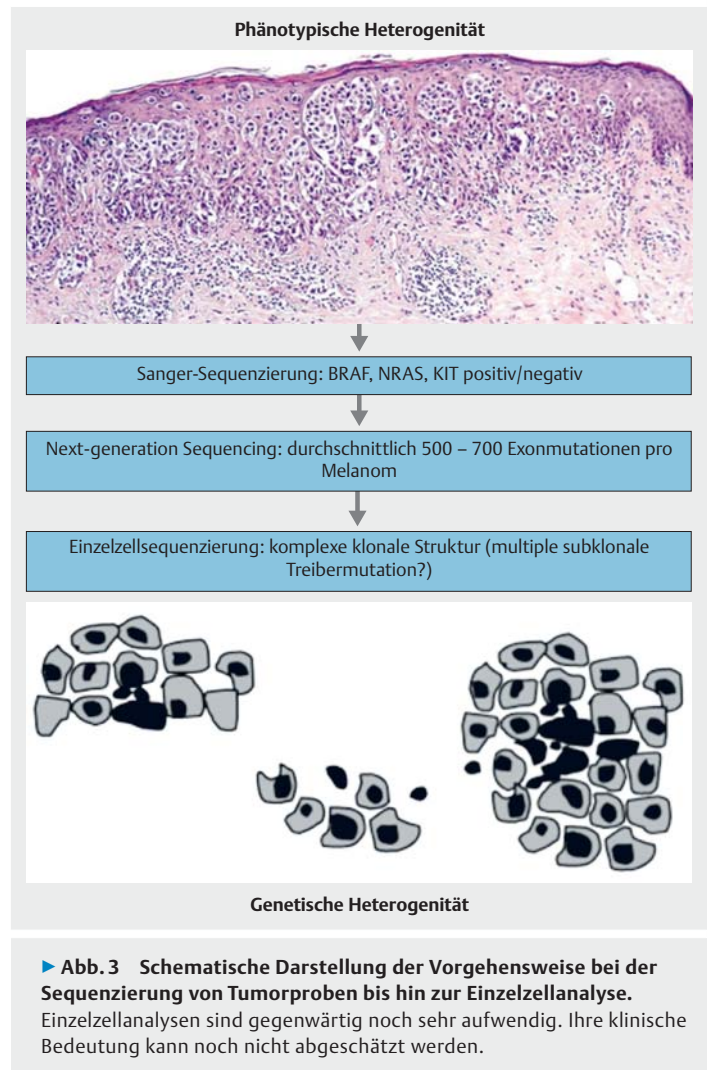
In einer weiteren Arbeit zur BRAF-Inhibitorresistenz konnte in der großen Mehrzahl der Fälle (ca. 70%) ebenfalls ein Mechanismus entdeckt werden, der die MAPK-Signalwege betrifft [43]. In ca. 20% der Fälle kam es zu einer Aktivierung des PTEN-PI3K-AKT-Signalweges. Die Autoren haben für die Mutationsmuster Progressionsstambäume erstellt, die darauf hindeuten, dass es zu einer verzweigten Evolution während der Progression kommt, die im Ursprungstumor bereits angelegt ist. All dies deutet daraufhin, dass die ursprüngliche genetische Heterogenität das Ansprechen und das Auftreten von Rezidiven beeinflussen kann.

Merke

Es konnte gezeigt werden, dass sekundäre Resistenzen gegenüber dem BRAF-Inhibitor Vemurafenib unter anderem offenbar durch Mutationen in den beim Melanom bereits bekannten MAPK- und PI3K/Akt-Signalwegen verursacht werden. Eine interessante Beobachtung wurde kürzlich zur kombinierten BRAF/MEK-Inhibitor-Resistenz gemacht. Dabei wurde neben der Inhibitorresistenz eine so genannte *Drug Addiction* nachgewiesen, sodass ein kurzfristiger Entzug des Pharmakons eventuell zu einer Gegen Selektion und einem späteren Wiederansprechen führen kann, was aber in Studien noch zu belegen ist.

Tumorheterogenität und Einzelzellanalysen

In einer Reihe von Untersuchungen aus den vergangenen Jahren konnte gezeigt werden, dass Tumoren genetisch heterogen sind [48] (► **Abb. 3**). Diese Heterogenität konnte besonders eindrucksvoll in einer Arbeit zum Nierenzellkarzinom nachgewiesen werden [49]. Hier wurden verschiedene Areale eines primären Nierenzellkarzinoms untersucht, und es konnte gezeigt werden, dass sich die Mutationsmuster in den verschiedenen Arealen deutlich unterschieden. Dabei gab es eine ganze Reihe von Überlappungen, aber auch viele Mutationen, die nur in dem jeweiligen Areal vorkamen. In einem sogenannten phylogenetischen Baum der Mutationen konnte gezeigt werden, dass sich Metastasen hinsichtlich ihres Mutationsmusters deutlich vom Primärtumor unterscheiden. Diese genetische Heterogenität ist nach heutiger Vorstellung eine wesentliche Ursache der sekundären Therapieresistenz bei verschiedenen Tumoren. Im Grunde ist dieser Sachverhalt zwar naheliegend, aber kaum wirklich einmal gezeigt worden. Hierzu liegt eine hinweisende Arbeit zum Kolonkarzinom vor, in der gezeigt werden konnte, dass es nach Behandlung mit einem EGF-Rezeptor-Inhibitor zum Auftreten von Rezidiven mit einer aktivierenden KRAS-Mutation kam [50]. Aktivierende KRAS-Mutationen finden sich wiederum grundsätzlich häufig in



Kolonkarzinomen. Aus dieser Tatsache, der relativ kurzen Zeit bis zum Auftreten der KRAS-mutierten Zellen und der geringeren Wahrscheinlichkeit einer zufälligen Mutation an der jeweiligen Stelle im KRAS-Gen schlossen die Autoren, dass es sich um Mutationen in einem vorher bereits vorhandenen Subklon handeln musste.

Dass das Überwachsen eines resistenten Subklons grundsätzlich so vonstattengehen kann, konnte für das Melanom gezeigt werden [51]. Dabei wurde ein kleiner Prozentsatz von 0,05% resistenter Tumorzellen unter 99,95% BRAF-Inhibitor-sensitiven Zellen gemischt und Mäusen injiziert. Schon nach wenigen Tagen kam es zu einem Überwachsen der resistenten Tumorzellen, wenn man mit Vemurafenib behandelte. Unbehandelte Tumoren brauchten für ein ähnliches Wachstum der resistenten Zellen deutlich länger. In den resistenten Zellen kam es dabei zu einer Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges. Eine Inhibition dieses Signalweges führte konsequenterweise zu einer Reduktion des Wachstums von resistenten Tumorzellen. Das Phänomen des Überwachsens eines Subklons in heterogenen

Tumorpopulationen hat in der jüngeren Vergangenheit zur Entwicklung entsprechender mathematischer Modelle zur Therapieresistenz geführt [52]. Diese Untersuchungen konnten unter Einbeziehung bekannter Wachstumsdaten von Tumorzellen zeigen, dass es nur wenige Monate braucht, bis ein relativ kleiner, therapieresistenter Subklon (von ca. 1% der Zellen) den Tumor überwächst, wenn man gegen den anfänglich dominanten Klon eine zielgerichtete Therapie durchführt [52]. Dieses Ergebnis entspricht sehr gut der klinischen Erfahrung bei vielen Tumoren, z. B. auch beim malignen Melanom, wo es nach einer anfänglichen Besserung nach 6–8 Monaten zu einem dann oft rasch progredienten Rezidiv kommt. Aus diesem Grund werden in jüngeren Arbeiten und im klinischen Alltag zunehmend Kombinationstherapien favorisiert, die von vornherein mehrere mögliche Subklone adressieren [16]. Jüngere, ebenfalls eher mathematisch orientierte Analysen haben für das Melanom eine ganze Reihe sogenannter *Subclonal Drivers* entdeckt, die zumindest theoretisch unter zielgerichteter Therapie das Wachstum des jeweiligen Subklones fördern können, wozu unter anderem *NF2*, *ERBB4*, *FGFR2/3*, *ATM* und *PDGFRA/B* gehören [53].

Grundsätzlich scheinen sich in Zukunft Kombinationstherapien durchzusetzen. Größere Screeninguntersuchungen für eine Kombinationsbehandlung von BRAF-Inhibitoren unter Zuhilfenahme einer größeren Substanzbank mit Tausenden von chemischen Substanzen wurden bereits durchgeführt [54]. Bei BRAF-mutierten Melanomzellen erzielte Lapatinib den besten synergistischen Effekt mit Vemurafenib. Bei NRAS-mutierten Melanomzellen erzielte Simvastatin den besten synergistischen Effekt mit Flavopiridol. Die Autoren geben aber zu bedenken, dass es keine epidemiologischen Hinweise auf eine tumorprotektive Wirkung von Simvastatin gibt [54]. Dies mag viele Gründe haben, die z. B. in der Dosierung liegen, aber auch in der Tatsache, dass das sogenannte Tumor-Mikroenvironment den Tumor gegenüber solchen Therapien resistenter macht im Vergleich zur Zellkultur.

Die Tumordiversität maligner Tumoren lässt sich gegenwärtig in ihrer Komplexität nur unvollständig abbilden. Neuere Untersuchungen konnten die NGS-Technologie auf die Untersuchung einzelner Zellen erweitern. Hier hat sich aus technologischen Gründen zunächst die Sequenzierung des Transkriptoms durchgesetzt [55], was unter anderem dran liegt, dass es pro Zelle in der Regel nur zwei Kopien für den jeweiligen DNA-Bereich gibt, aber durchaus hunderte von RNA-Kopien. In einer Arbeit zum Glioblastom konnte gezeigt werden, dass sich verschiedene Subklone offenbar durch verschiedene Genexpressionsmuster unterscheiden [56]. Diese Untersuchungen haben es auch erlaubt, einen kleinen Prozentsatz an Zellen zu identifizieren,

die von den Genmustern her Stammzellen entsprechen, die wiederum vielversprechende Zielstrukturen für zukünftige Therapieansätze sein können. Durch eine zielgerichtete Therapie beim Bronchialkarzinom durch den Kinaseinhibitor Vandetanib wurden die Genmuster der Einzelzellanalysen beeinflusst und verloren an Heterogenität [57]. Dies spricht dafür, dass gezielte Behandlungen die Heterogenität von Zellen beeinflussen können. Darüber hinaus waren primär resistente Zellen mit einer geringeren Diversität der Genmuster ausgestattet.

Für das maligne Melanom liegt eine kleinere Studie vor, die zwei unterschiedliche Zelllinien bzgl. ihrer Aggressivität auf Einzelzellebene untersucht hat [58]. Grundsätzlich würde man die Tumorheterogenität aber gerne auf DNA-Ebene nachweisen, um die komplexe klonale Struktur aufzuklären. Solche Untersuchungen befinden sich momentan in den Anfängen und werden voraussichtlich in naher Zukunft technisch durchführbar sein [55, 59].

Merke

Diese genetische Heterogenität ist nach heutiger Vorstellung eine wesentliche Ursache der sekundären Therapieresistenz bei verschiedenen Tumoren. Jüngere, eher mathematisch orientierte Analysen haben für das Melanom eine ganze Reihe an Kandidaten für sogenannte *Subclonal Drivers* entdeckt, die zumindest theoretisch unter zielgerichteter Therapie gegen den dominanten Klon das Wachstum des jeweiligen Subklons fördern können.

Ausblick

Basierend auf den aktuellen Erkenntnissen hinsichtlich der genetischen Ursachen von malignen Tumoren werden in Zukunft sicher größere Sequenzierungs-Panels bei der Mutationsanalyse eingesetzt. Dies betrifft auch das maligne Melanom. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse werden aber nur dann Sinn machen, wenn die Zahl der verfügbaren Substanzen für eine zielgerichtete Therapie mit dieser Entwicklung Schritt hält. Es ist zu erwarten, dass in naher Zukunft klinische Studien aufgelegt werden, die, basierend auf dem Mutationsmuster, eine individuelle Kombination von Inhibitoren einsetzen. Bei möglichen Rezidiven muss dann erneut eine entsprechende genetische Analyse durchgeführt werden. Untersuchungen mittels Einzelzellsequenzierungen unterstreichen die genetische Heterogenität von Tumoren. Sie können auch für Tumorzellen eingesetzt werden, die aus dem peripheren Blut isoliert werden (*Liquid Biopsy*). Es wird allerdings nur sehr schwer möglich sein, mit einem vertretbaren Aufwand alle Subklone in einer Melanomprobe zu identifizieren.

Neuere Daten zeigen, dass Patienten mit Melanomen mit einer hohen Mutationslast bei einer Immuntherapie gegen CTLA-4 und PD-1 eine deutlich bessere Prognose haben [60, 61]. Patienten mit hoher Mutationslast scheinen unter einer Monotherapie gegen PD-1 bereits ein so gutes Ansprechen zu zeigen, dass eine Kombination mit einem CTLA-4-Inhibitor möglicherweise nicht mehr erforderlich ist [62]. Die Kenntnis der Mutationslast und die Kenntnis immunologisch relevanter mutierter Antigene (Neoantigene) könnten in Zukunft als Entscheidungskriterium für die Immun-Checkpoint-Therapie mit herangezogen werden. Dies wäre ein weiterer wichtiger Schritt in Richtung einer Präzisionsmedizin.

Fazit für die Praxis

- Basierend auf Ergebnissen der Sequenzierung mittels *Next-Generation Sequencing* weiß man heute, dass es beim malignen Melanom hunderte verschiedener Mutationen gibt, deren Bedeutung sich uns erst langsam erschließt.
- Die gegenwärtigen zielgerichteten BRAF-spezifischen Therapien sind nach aktuellen klinischen Erkenntnissen gegenüber der *BRAF-V600E*-Mutation und zumindest auch gegenüber der *BRAF-V600K*-Mutation wirksam.
- Obwohl aktuell im Fokus des Interesses, scheinen Genfusionen nach gegenwärtigem Kenntnisstand nur beim spitzoiden Melanom eine Rolle zu spielen.
- Für die Routinediagnostik werden in der näheren Zukunft wahrscheinlich spezifische Antikörper gegen mutiertes BRAF und NRAS Bedeutung erlangen.
- Das maligne Melanom ist wie auch andere solide Tumoren ein genetisch heterogener Tumor. Die Tumorerheterogenität scheint wesentlich an der sekundären Behandlungsresistenz beteiligt zu sein.
- Spezifische Mutationspanels werden in Zukunft voraussichtlich die Mutationsanalyse beim malignen Melanom wesentlich erweitern.

ZUSAMMENFASSUNG

In der jüngeren Vergangenheit hat die dermatologische Onkologie beim malignen Melanom große Fortschritte im Hinblick auf neue diagnostische und therapeutische Möglichkeiten gemacht. Erstmals ist es seit langer Zeit gelungen, durch zielgerichtete Therapieansätze gegen das mutierte *BRAF*-Onkogen und den davon abhängigen MAP-Kinase-Signalweg das Überleben von Melanompatienten zu verbessern. Im Wesentlichen beruhen die Fortschritte auf genetischen Analysen, die gegenwärtig eine wichtige Rolle in der Tumordiagnostik spielen. Obwohl sich die Therapieentscheidungen beim malignen Melanom im Moment noch auf den Nachweis von *BRAF*-, *NRAS*- oder *KIT*-Mutationen beschränken, gibt es bereits erste Ansätze, das Panel der untersuchten Gene zu erweitern. Es stellt sich dabei auch die Frage, ob alle möglichen genetischen Variationen langwierigen prä-klinischen und klinischen Untersuchungen unterzogen werden oder ob man, basierend auf Fortschritten bei anderen Tumoren, rasch vielversprechende Therapien auch beim Melanom in der Klinik einsetzen wird. Ein neuerdings vielbeachtetes Phänomen bei malignen Tumoren wie auch beim malignen Melanom ist die Tumorerheterogenität. Sie wird unter anderem verantwortlich gemacht für die häufigen Rezidive nach zielgerichteter Therapie, obwohl direkte Beweise dafür noch nicht vorliegen. Auch hier haben genetische Untersuchungen wichtige Hinweise geliefert.

In diesem kurzen Übersichtsartikel wird auf die aktuelle Entwicklung in der molekularen Diagnostik beim malignen Melanom eingegangen, die aller Voraussicht nach schon in naher Zukunft Einfluss auf Therapieentscheidungen nehmen könnte.

ABSTRACT

In recent years, dermatologic oncology of melanoma has made major progress regarding diagnostic and therapeutic opportunities. For the first time, the overall survival of melanoma patients has been improved using targeted therapy directed against the mutated *BRAF* oncogene and the downstream MAP kinase signaling pathway. In principle, these advances rely on genetic analyses, which currently play an important role in tumor diagnostics. Although treatment decisions in melanoma are currently confined to the detection of mutations in *BRAF*, *NRAS* and *KIT* genes, there are preliminary approaches to expand this panel of genes. This poses the question whether all possible genetic variants will subsequently be subjected to tedious pre-clinical and clinical studies, or whether – based on progresses attained in other tumor entities – promising targeted treatment options of other tumor entities will be rapidly transferred into clinical settings in melanoma. A recently much-noticed phenomenon in malignant tumors such as melanoma is tumor heterogeneity. Among other things, tumor heterogeneity is made responsible for frequent recurrences after targeted treatment, although direct evidence has not yet been provided for a causative role. Again genetic analyses have provided important evidence in this area.

This short review article addresses to the current development in the molecular diagnostics of melanoma, which may have an impact on treatment decisions in the near future.

Literatur

- [1] Davies H, Bignell GR, Cox C et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; 417: 1–13
- [2] Hersey P, Bastholt L, Chiarion-Sileni V et al. Small molecules and targeted therapies in distant metastatic disease. *Ann Oncol* 2009 (Suppl. 06): vi35–40
- [3] Sullivan RJ, Flaherty KT. New strategies in melanoma: entering the era of combinatorial therapy. *Clin Cancer Res* 2015; 21: 2424–2435
- [4] Schadendorf D, Fisher DE, Garbe C et al. Melanoma. *Nature Rev Dis Primers* 2015; 1: 1–20
- [5] McArthur GA, Chapman PB, Robert C et al. Safety and efficacy of vemurafenib in BRAF(V600E) and BRAF(V600K) mutation-positive melanoma (BRIM-3): extended follow-up of a phase 3, randomised, open-label study. *Lancet Oncol* 2014; 15: 323–332
- [6] Klein O, Clements A, Menzies AM et al. BRAF inhibitor activity in V600R metastatic melanoma. *Eur J Cancer* 2013; 49: 1073–1079
- [7] Gentilcore G, Madonna G, Mozzillo N et al. Effect of dabrafenib on melanoma cell lines harbouring the BRAF (V600D/R) mutations. *BMC Cancer* 2013; 13: 17
- [8] Larkin J, Ascierto PA, Dréno B et al. Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med* 2014; 371: 1867–1876
- [9] Long GV, Stroyakovskiy D, Gogas H et al. Dabrafenib and trametinib versus dabrafenib and placebo for Val600 BRAF-mutant melanoma: a multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet* 2015; 386: 444–451
- [10] Robert C, Karaszewska B, Schachter J et al. Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and trametinib. *N Engl J Med* 2015; 372: 30–39
- [11] Thota R, Johnson DB, Sosman JA. Trametinib in the treatment of melanoma. *Expert Opin Biol Ther* 2015; 15: 735–747
- [12] Krauthammer M, Kong Y, Ha BH et al. Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nat Genet* 2012; 44: 1006–1014
- [13] Hodis E, Watson IR, Kryukov GV et al. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell* 2012; 150: 251–263
- [14] Cancer Genome Atlas Network. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell* 2015; 161: 1681–1696
- [15] Grob JJ, Long GV, Schadendorf D et al. Disease kinetics for decision-making in advanced melanoma: a call for scenario-driven strategy trials. *Lancet Oncol* 2015; 16: e522–526
- [16] Ascierto PA, Marincola FM, Atkins MB. What's new in melanoma? Combination! *J Transl Med* 2015; 13: 213
- [17] Metzker ML. Sequencing technologies – the next generation. *Nat Rev Genet* 2010; 11: 31–46
- [18] Rizzo JM, Buck MJ. Key principles and clinical applications of “next-generation” DNA sequencing. *Cancer Prev Res (Phila)* 2012; 5: 887–900
- [19] Pleasance ED, Cheetham RK, Stephens PJ et al. A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. *Nature* 2010; 463: 191–196
- [20] Prickett TD, Agrawal NS, Wei X et al. Analysis of the tyrosine kinome in melanoma reveals recurrent mutations in ERBB4. *Nat Genet* 2009; 41: 1127–1132
- [21] Wei X, Walia V, Lin JC et al. Exome sequencing identifies GRIN2A as frequently mutated in melanoma. *Nat Genet* 2011; 43: 442–446
- [22] Prickett TD, Wei X, Cardenas-Navia I et al. Exon capture analysis of G protein-coupled receptors identifies activating mutations in GRM3 in melanoma. *Nat Genet* 2011; 43: 1119–1126
- [23] Johnson DB, Menzies AM, Zimmer L et al. Acquired BRAF inhibitor resistance: A multicenter meta-analysis of the spectrum and frequencies, clinical behaviour, and phenotypic associations of resistance mechanisms. *Eur J Cancer* 2015; 51: 2792–2799
- [24] Manca A, Lissia A, Cossu A et al. Mutations in ERBB4 may have a minor role in melanoma pathogenesis. *J Invest Dermatol* 2013; 133: 1685–1687
- [25] Berger MF, Hodis E, Heffernan TP et al. Melanoma genome sequencing reveals frequent PREX2 mutations. *Nature* 2012; 485: 502–506
- [26] Zhang T, Dutton-Regester K, Brown KM et al. The genomic landscape of cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 2016; 29: 266–283
- [27] Horn S, Figl A, Rachakonda PS et al. TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science* 2013; 339: 959–961
- [28] Akincilar SC, Unal B, Tergaonkar V. Reactivation of telomerase in cancer. *Cell Mol Life Sci* 2016; 73: 1659–1670
- [29] Shain AH, Yeh I, Kovalyshyn I et al. The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions. *N Engl J Med* 2015; 373: 1926–1936
- [30] Greuber EK, Smith-Pearson P, Wang J et al. Role of ABL family kinases in cancer: from leukaemia to solid tumours. *Nat Rev Cancer* 2013; 13: 559–571
- [31] Bunting SF, Nussenzweig A. End-joining, translocations and cancer. *Nat Rev Cancer* 2013; 13: 443–454
- [32] Mertens F, Johansson B, Fioretos T et al. The emerging complexity of gene fusions in cancer. *Nat Rev Cancer* 2015; 15: 371–381
- [33] Berger MF, Levin JZ, Vijayendran K et al. Integrative analysis of the melanoma transcriptome. *Genome Res* 2010; 20: 413–427
- [34] Wiesner T, He J, Yelensky R et al. Kinase fusions are frequent in Spitz tumours and spitzoid melanomas. *Nat Commun* 2014; 5: 3116
- [35] Hutchinson KE, Lipson D, Stephens PJ et al. BRAF fusions define a distinct molecular subset of melanomas with potential sensitivity to MEK inhibition. *Clin Cancer Res* 2013; 19: 6696–6702
- [36] Cheng S, Koch WH, Wu L. Co-development of a companion diagnostic for targeted cancer therapy. *N Biotechnol* 2012; 29: 682–688
- [37] Janku F, Claes B, Huang HJ et al. BRAF mutation testing with a rapid, fully integrated molecular diagnostics system. *Oncotarget* 2015; 6: 26886–26894
- [38] Chang GA, Polsky D. Mutational Heterogeneity in Melanoma: An Inconvenient Truth. *J Invest Dermatol* 2015; 135: 2913–2918
- [39] Riveiro-Falkenbach E, Villanueva CA, Garrido MC et al. Intra- and Inter-Tumoral Homogeneity of BRAF(V600E) Mutations in Melanoma Tumors. *J Invest Dermatol* 2015; 135: 3078–3085
- [40] Ilie M, Long-Mira E, Funck-Brentano E et al. Immunohistochemistry as a potential tool for routine detection of the NRAS Q61R mutation in patients with metastatic melanoma. *J Am Acad Dermatol* 2015; 72: 786–793

- [41] Just PA, Pouliquen C, Audebourg A et al. High specificity and sensitivity of NRAS Q61R immunohistochemistry (IHC) in melanomas. *J Am Acad Dermatol* 2016; 74: 572–573
- [42] Van Allen EM, Wagle N, Sucker A. Dermatologic Cooperative Oncology Group of Germany (DeCOG). et al. The genetic landscape of clinical resistance to RAF inhibition in metastatic melanoma. *Cancer Discov* 2014; 4: 94–109
- [43] Shi H, Hugo W, Kong X et al. Acquired resistance and clonal evolution in melanoma during BRAF inhibitor therapy. *Cancer Discov* 2014; 4: 80–93
- [44] Moriceau G, Hugo W, Hong A et al. Tunable-combinatorial mechanisms of acquired resistance limit the efficacy of BRAF/MEK cotargeting but result in melanoma drug addiction. *Cancer Cell* 2015; 27: 240–256
- [45] Johannessen CM, Johnson LA, Piccioni F et al. A melanocyte lineage program confers resistance to MAP kinase pathway inhibition. *Nature* 2013; 504: 138–142
- [46] Konieczkowski DJ, Johannessen CM, Abudayyeh O et al. A melanoma cell state distinction influences sensitivity to MAPK pathway inhibitors. *Cancer Discov* 2014; 4: 816–827
- [47] Müller J, Krijgsman O, Tsoi J et al. Low MITF/AXL ratio predicts early resistance to multiple targeted drugs in melanoma. *Nat Commun* 2014; 5: 5712
- [48] Aparicio S, Caldas C. The implications of clonal genome evolution for cancer medicine. *N Engl J Med* 2013; 368: 842–851
- [49] Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 2012; 366: 883–892
- [50] Diaz LA Jr, Williams RT, Wu J et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature* 2012; 486: 537–540
- [51] Obenauf AC, Zou Y, Ji AL et al. Therapy-induced tumour secretomes promote resistance and tumour progression. *Nature* 2015; 520: 368–372
- [52] Waclaw B, Bozic I, Pittman ME et al. A spatial model predicts that dispersal and cell turnover limit intratumour heterogeneity. *Nature* 2015; 525: 261–264
- [53] McGranahan N, Favero F, de Bruin EC et al. Clonal status of actionable driver events and the timing of mutational processes in cancer evolution. *Sci Transl Med* 2015; 7: 283ra54
- [54] Held MA, Langdon CG, Platt JT et al. Genotype-selective combination therapies for melanoma identified by high-throughput drug screening. *Cancer Discov* 2013; 3: 52–67
- [55] Gawad C, Koh W, Quake SR. Single-cell genome sequencing: current state of the science. *Nat Rev Genet* 2016; 17: 175–188
- [56] Patel AP, Tirosh I, Trombetta JJ et al. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science* 2014; 344: 1396–1401
- [57] Suzuki A, Matsushima K, Makinoshima H et al. Single-cell analysis of lung adenocarcinoma cell lines reveals diverse expression patterns of individual cells invoked by a molecular target drug treatment. *Genome Biol* 2015; 16: 66
- [58] Ennen M, Keime C, Kobi D et al. Single-cell gene expression signatures reveal melanoma cell heterogeneity. *Oncogene* 2015; 34: 3251–3263
- [59] Hou Y, Wu K, Shi X et al. Comparison of variations detection between whole-genome amplification methods used in single-cell resequencing. *Gigascience* 2015; 4: 37
- [60] Van Allen EM, Miao D, Schilling B et al. Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma. *Science* 2015; 9: 350: 207–211

- [61] Hugo W, Zaretsky JM, Sun L et al. Genomic and Transcriptomic Features of Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Melanoma. *Cell* 2016; 165: 35–44
- [62] Johnson DB, Frampton GM, Rieth MJ et al. Hybrid capture-based next-generation sequencing (HC NGS) in melanoma to identify markers of response to anti-PD-1/PD-L1. *J Clin Oncol* 2016; 34 (suppl; abstr 105)

Über die Autoren



Prof. Dr. Manfred Kunz

Jahrgang 1957. 1979–1985 Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes in Homburg/Saar und an der Universität Heidelberg. 1991–1996 Facharzt Ausbildung Dermatologie, Venerologie und Allergologie. 1996 Facharzt für Dermatologie, Venerologie und Allergologie. Seit 2010 Oberarzt und seit 2011 stellvertretender Direktor an der Hautklinik der Universität Leipzig. Schwerpunkte: Allgemeine Ambulanz, Onkologie, Autoimmunerkrankungen.

Interessenkonflikt

Der Autor hat in der Vergangenheit Vortragshonore und Reisekostenunterstützungen der Fa. Roche Pharma AG und Reisekostenunterstützungen der Firmen Novartis Pharma GmbH und Bristol-Myers Squibb GmbH erhalten.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Manfred Kunz
Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
Universität Leipzig
Philipp-Rosenthal-Str. 23
04103 Leipzig
E-Mail: manfred.kunz@medizin.uni-leipzig.de

Punkte sammeln auf CME.thieme.de



Diese Fortbildungseinheit ist 12 Monate online für die Teilnahme verfügbar. Sollten Sie Fragen zur Online-Teilnahme haben, finden Sie unter <http://cme.thieme.de/hilfe> eine ausführliche Anleitung. Wir wünschen viel Erfolg beim Beantworten der Fragen!

Unter <https://eref.thieme.de/ZZWHIUU> oder über den QR-Code kommen Sie direkt zum Artikel zur Eingabe der Antworten.

VNR 2760512017152373520



Frage 1

Welche ist die häufigste beim malignen Melanom vorkommende *BRAF*-V600-Mutation?

- A *BRAF*-V600R
- B *BRAF*-V600K
- C *BRAF*-V600E
- D *BRAF*-V600D
- E *BRAF*-V600M

Frage 2

Für welche der folgenden *BRAF*-V600-Mutationen wurde in klinischen Untersuchungen eine ähnliche Wirksamkeit gegenüber *BRAF*-Inhibitoren gefunden wie für *BRAF*-V600E?

- A *BRAF*-V600L
- B *BRAF*-V600K
- C *BRAF*-V600G
- D *BRAF*-V600D
- E *BRAF*-V600M

Frage 3

Durch das sogenannte *Next-Generation Sequencing* wurden beim malignen Melanom in der jüngeren Vergangenheit neue Mutationen entdeckt. Welche der folgenden Aussagen ist *nicht richtig*?

- A Es handelt sich überwiegend um Mutationen, die auf eine Verursachung durch UV-Licht hindeuten.
- B Eine rekurrente Mutation wurde im *GRIN2A*-Gen gefunden.
- C Eine rekurrente Mutation wurde im *RAC1*-Gen gefunden.
- D Hinsichtlich aktivierender Mutationen im *ERBB4*-Gen wurde bereits eine klinische Studie aufgelegt, bei der die Substanz Lapatinib getestet wurde.
- E Das *TERT*-Gen zeigt beim malignen Melanom häufig Promotormutationen.

Frage 4

Spitzoide Melanome zeigen häufig Genfusionen. Welches Gen gehört nicht zu den dabei kürzlich beschriebenen Fusionen?

- A *ROS*
- B *ALK*
- C *PDGFR*
- D *BRAF*
- E *RET*

Frage 5

Welche der folgenden Aussagen zu Genfusionen bei klassischen (nicht-spitzoiden) malignen Melanomen trifft zu?

- A Genfusionen kommen nicht vor.
- B Genfusionen kommen wesentlich häufiger vor als bei anderen Tumoren.
- C Genfusionen betreffen immer das *BRAF*-Gen.
- D Genfusionen betreffen immer das *MITF*-Gen.
- E Die bislang gefundenen Genfusionen sind in ihrer pathogenetischen Bedeutung noch nicht erforscht.

Frage 6

Welche der folgenden Gene werden heutzutage üblicherweise beim malignen Melanom hinsichtlich ihres Mutationsstatus' untersucht?

- A *KRAS*, *BRAF*, *EGFR*
- B *BRAF*, *NRAS*, *KIT*
- C *NOTCH1*, *KIT*, *ERBB2*
- D *EGFR*, *PDGFR*, *KIT*
- E *PTCH*, *SMO*, *GLI*

Frage 7

Im Moment werden durch verschiedene Konsortien groß angelegte Sequenzierungsanalysen für maligne Tumoren durchgeführt. Welche der folgenden Aussagen ist richtig?

- A Solche Mutationsanalysen können in Zukunft zur Etablierung von Mutationspanels für einzelne Tumorentitäten dienen.
- B Die Mutationsanalyse beim malignen Melanom ist auch für seltene Mutationen bereits abgeschlossen.
- C Für das maligne Melanom ist bereits ein Mutationspanel fest etabliert.
- D Es gibt bereits ein Gesamtpanel mit allen Mutationen der verschiedenen Tumorentitäten.
- E Solche Tumorpanels werden bei vielen Tumorentitäten bereits regelmäßig für Therapieentscheidungen herangezogen.

Frage 8

Genetische Untersuchungen zur Behandlungsresistenz beim malignen Melanom auf die Behandlung mit BRAF- und MEK1/2-Inhibitoren haben folgende Ergebnisse gezeigt:

- A Mutationen in resistenten Proben sind die gleichen wie in der ursprünglichen Probe.
- B Resistenzen werden fast immer durch eine erniedrigte *MITF*-Expression verursacht.
- C Mutationen in resistenten Proben betreffen oft den MAPK- oder den PI3K/Akt-Signalweg.
- D Unter *Drug Addiction* versteht man, dass der Tumor nach einer Therapiepause wieder auf die Therapie anspricht.
- E Resistenzen werden stets durch eine Aktivierung der Proteinkinase A vermittelt.

Frage 9

Welche Aussagen zur Tumorheterogenität treffen zu?

- A Die meisten soliden Tumore, wie auch das maligne Melanom, zeigen eine genetisch homogene Zellpopulation.
- B Die Tumorheterogenität wird für das Auftreten sekundärer Resistenzen verantwortlich gemacht.
- C Nach gegenwärtiger Kenntnis aus Tierexperimenten müssen subklonale und resistente Zellpopulationen mindestens 10–20% der Gesamtpopulation ausmachen, um zum Rezidiv unter Therapie zu führen.
- D Untersuchungen zur Tumorheterogenität gibt es bislang nur beim Nierenzellkarzinom.
- E Nach heutiger Erkenntnis spiegelt sich die Tumorheterogenität vor allem auf epigenetischer Ebene wider.

Frage 10

Gegen welches der folgenden Proteine gibt es für die klinische Routine einen spezifischen Antikörper gegen die im Melanom häufig mutierte Form?

- A BRAF
- B KIT
- C ERBB4
- D RAC1
- E GRM3