

Martin Kirschner  
Dr. med.

## **Nachweis von Mutationen in der Kinase-Domäne des B-raf Onkogens in kutanen/subkutanen und Lymphknotenmetastasen kutaner Melanome**

Geboren am 21.11.78 in Leverkusen  
Staatsexamen am 30.11.05 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Dermatologie  
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. Martin Deichmann

Das Melanom ist für 90% der Mortalität aller Hautmalignome verantwortlich und weist in den letzten Jahren eine steigende Inzidenz auf. In der vorliegenden Arbeit wurden 60 Kutan-/Subkutan- und 54 Lymphknoten-Metastasen von kutanen Melanomen auf das Vorliegen von Mutationen der Kinase-Domäne (Exon 15) des *B-raf*-Onkogens untersucht.

Aus Paraffin-eingebetteten Operations-Resektaten wurde genomische DNA aufgereinigt und nachfolgend mit PCR-SSCP (polymerase chain reaction - single strand conformation polymorphism), Klonierung und DNA-Sequenzierung analysiert.

Bei den Subkutanmetastasen weisen von 60 untersuchten Präparaten 24 (40%) eine Mutation in der Kinase-Domäne des *B-raf* Gens auf. DNA-Sequenzierungen der 24 positiven Kutan/Subkutanresektaten ergaben 44 Punktmutationen des *B-raf* Exon 15. In allen 24 positiven Resektaten fand sich die als onkogen beschriebene Mutation T1796A (Davies et al., 2002). 6 Kutan-/Subkutanmetastasen wiesen zusätzlich die g1795A-Mutation auf. Insgesamt fanden wir eine Gesamtzahl von 16 verschiedenen *B-raf* Exon 15-Mutationen. Die resultierenden Proteinsequenzen zeigten folgendes Mutationsmuster: 19/60 (32%) Fälle hatten die V599E und 6/60 (10%) die V599K-Mutation. Insgesamt traten 9 verschiedene Proteinmutationen auf. Von 8 akrolentiginösen Melanomen ausgehende Kutan-Subkutanmetastasen zeigten unerwartet in keinem Fall eine V599- bzw. V599E-Substitution („Fishers exact“-Test:  $p = 0,02$  bzw.  $0,04$ ).

56/60 Patienten mit in dieser Arbeit analysierten kutanen/subkutanen Melanom-Metastasen nahmen an Nachsorge-Untersuchungen teil, und bei 55 Patienten kam es nachfolgend zu weiteren Metastasen (11 Patienten mit kutanen, 9 mit Lymphknoten-, 35 mit Organmetastasen). Eine statistisch signifikante Assoziation zwischen dem Auftreten der V599- bzw. V599E-Mutation und nachfolgender Metastasierung zeigte sich nicht. Nebenbefundlich war festzustellen, dass die Zeitspanne zwischen der Exzision des Primärtumors und dem Auftreten der von uns untersuchten Kutan-/Subkutanmetastasen statistisch signifikant länger ist als der Zeitraum zwischen der Exzision der von uns

untersuchten Kutan-/Subkutanmetastase bis zu einer weiteren Metastasierung (Wilcoxon Exact- Summenrangtest:  $p < 0,001$ ; geschätzte mittlere Differenz 49 Monate). Nach einer langen Zeit ohne Krankheitsmanifestation kann das Auftreten von Kutan-/Subkutanmetastasen daher als ein erster Indikator für die weitere Progression des Melanoms angesehen werden mit häufig kurz darauf folgender weiterer Metastasierung bei den meisten Patienten.

24 von 54 (44%) der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Lymphknotenresektaten waren positiv für eine Mutation in der Kinase-Domäne des *B-raf*-Gens. 20/54 (37%) Lymphknotenresektate zeigten die aktivierende Mutation T1796A. In 5/54 Resektaten (9%) bestand zusätzlich die G1795A Mutation. Es lagen von 45 der 54 Patienten mit Lymphknoten-Metastasierung Daten zum klinischen Verlauf vor, wobei sich herausstellte, dass das Vorkommen von Mutationen an dem "hot spot"-Kodon (V599) signifikant mit einer weiteren Organmetastasierung assoziiert ist („Fisher exact“-Test:  $p = 0,033$ ).

Sowohl die 60 Kutan-/Subkutan-Metastasen (9 verschiedene Protein-Mutationen, Fisher exact-Test,  $p = 0,04$ ) als auch die 54 Lymphknoten-Metastasen (6 verschiedene Protein-Mutationen, Fisher exact-Test,  $p = 0,0063$ ) zeigten ein reduziertes Mutationsspektrum, wenn die Daten mit den 50 Melanom-Primärtumoren statistisch verglichen werden, in denen in einer vorausgehenden Arbeit 16 verschiedene Protein-Mutationen identifiziert werden konnten (Deichmann et al, 2004).

Bemerkenswert ist, dass mit einer einzigen Ausnahme in den von uns untersuchten Melanomen nie C→T oder CC→TT Transitionen vorkommen, die bei anderen kutanen Neoplasien wie z.B. den Spinaliomen oder Basaliomen als UV-typisch angesehen werden (Dava-Grosjean et al, 1995; Greenblatt et al, 1994).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass Mutationen in der Kinase-Domäne des *B-raf*-Onkogens, und hier insbesondere die aktivierende V599E-Mutation, nicht nur in Melanom-Primärtumoren sondern auch in Resektaten von kutan/subkutanen und Lymphknoten-Metastasen vorkommen. Der Nachweis von V599-Proteinmutationen in Lymphknoten-Metastasen zeigt sich für den weiteren klinischen Verlauf als statistisch signifikant prognostisch ungünstig. Da B-raf im Rahmen des MAP-Kinase-Pfades bei Proliferation und Differenzierung humaner Zellen partizipiert, ist aktuell die Hemmung der B-raf-Aktivität als neue Option zur Therapie des Melanoms in klinischer Entwicklung (Tuveson et al, 2003; Phase-II-Studie mit B-raf-Inhibitor Onyx<sup>R</sup>).