

Judith Parwane Hassanzadeh

Dr. med.

Geboren am 22.03.1981 in Saarbrücken

Staatsexamen am 24.04.2007 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Dermatologie

Doktorvater: Herr Prof. Dr. med. M. Deichmann

Das Melanom ist für 90% der Mortalität an Hautkrebs verantwortlich mit weltweit steigender Inzidenz. In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir, ob Mutationen des *B-raf*-Onkogens in Melanom-Resektaten assoziiert sind mit der Proliferationsrate der Tumorzellen bzw. mit der anatomischen Lokalisation, die auf chronische oder intermittierende UV-Exposition schließen lässt.

Aus 101 in Paraffin-eingebetteten Melanom-Primärtumoren wurde genomische DNA aufgereinigt und anschließend mittels PCR-SSCP-Gelelektrophorese, Klonierung und DNA-Sequenzierung analysiert. Von den 101 untersuchten Präparate wiesen 32 (32%) Mutationen in der Kinase-Domäne des *B-raf*-Gens auf. Die aktivierende Mutation T1796A (Davies et al., 2002) wurde in 26 der 32 Melanomresektate mit *B-raf*-Exon-15-Mutationen (81%) nachgewiesen, gefolgt von der G1795A-Mutation in 6 Fällen (19%) und den T1746C-, A1773G-, A1755G- und T1781C-Mutationen, die in jeweils 2 Fällen positiv waren (6%). Die onkogene V599E-Mutation wurde dabei in 21 der 31 positiven Melanome (66%) nachgewiesen, gefolgt von der V599K-Mutation in 5 von 31 Gewebeproben (16%). In 27 dieser 31 (87%) Melanomresektate mit *B-raf*-Exon-15-Proteinmutation war die Aminosäure Valin an der Proteinsequenz 599 durch eine andere Aminosäure ersetzt.

Von den 101 untersuchten Primärtumoren waren insgesamt 23 in Körperregionen mit chronischer UV-Exposition lokalisiert. Von diesen 23 Fällen wies nur ein einziger Tumor die *B-raf* V599E-Mutation (4%) auf, wohingegen in 20 der 78 (26%) Melanome in vor chronischer UV-Exposition geschützten Körperregionen die V599E-Mutation zeigten. Demzufolge entstehen *B-raf* V599E-Mutationen fast achtmal so häufig in vor chronischer Lichteinstrahlung geschützten Körperregionen (Odds Ratio = 7,59, $p = 0,038$).

Unsere Untersuchungen zeigten keine Assoziation zwischen der V599E-Mutation und dem histologischen Melanom-Typ ($p = 0,39$), der Tumordicke nach Breslow ($p = 0,65$) sowie dem Invasionslevel nach Clark ($p = 0,31$).

Im zweiten Teil der Arbeit wurde das Proliferationsverhalten von Melanomen mit *B-raf*-Exon-15-Mutationen mit dem von Melanomen ohne diese Mutationen verglichen. Hierfür wurden immunhistochemische Experimente zum Nachweis der Proliferationsmarker Ki-67 und PCNA durchgeführt und die an den HE-Schnitten ermittelte Mitose-Rate verwendet. In der Analyse wurden insgesamt 73 Melanom-Primärtumoren, 56 Kutan-/Subkutanmetastasen und 52 Lymphknotenmetastasen untersucht. In der Analyse resultierte eine statistisch signifikant erhöhte Mitose-Rate in Melanomen, die die onkogene Aminosäuremutation V599E aufwiesen ($p = 0,009$). Für Melanome mit einer *B-raf*-Exon-15-DNA-Mutation, der T1796A-Mutation oder einer *B-raf*-Exon-15-Protein-Mutation konnte ebenfalls ein Trend zu einem höheren Anteil mitotischer Zellen verglichen zu Melanomen ohne diese Mutationen festgestellt werden, der allerdings statistisch nicht signifikant war.

In den immunhistochemischen Experimenten wurde die Expression der Proliferationsmarker Ki-67 und PCNA bestimmt und der Anteil positiver Zellen an der Gesamttumorzellzahl ermittelt. Statistisch zeigte sich keine signifikante Assoziation zwischen dem Vorliegen einer *B-raf*-Exon-15-DNA-Mutation ($p = 0,88$), einer T1796A-Mutation ($p = 0,39$), einer *B-raf*-Exon-15-Protein-Mutation ($p = 0,75$) oder der V599E-Mutation ($p = 0,83$) und erhöhten Indices für Ki-67. Ein Zusammenhang zwischen einer hohen Rate PCNA-positiver Tumorzellen und Melanomen mit *B-raf*-Exon-15-DNA-Mutation ($p = 0,84$), T1796A-Mutation ($p = 0,65$), *B-raf*-Exon-15-Protein-Mutation ($p = 0,96$) oder V599E-Mutation ($p = 0,39$) wurde durch die statistische Analyse ebenfalls ausgeschlossen.

56 der 123 nachuntersuchten Patienten bildeten weitere Organmetastasen aus. Eine statistisch signifikante Assoziation zwischen dem Auftreten einer *B-raf*-Exon-15-DNA-Mutation ($p = 0,85$), der T1796A-Mutation ($p = 0,85$), einer *B-raf*-Exon-15-Protein-Mutation ($p = 0,85$) oder der V599E-Mutation ($p = 0,50$) und nachfolgender Metastasierung zeigte sich nicht. Des Weiteren ergaben unsere Untersuchungen, dass weder der Nachweis einer *B-raf*-Exon-15-DNA-Mutation ($p = 0,074$), der T1796A-Mutation ($p = 0,46$), einer *B-raf*-Exon-15-Proteinmutation ($p = 0,33$) noch der V599E-Mutation ($p = 0,46$) mit dem frühen Auftreten von Lymphknotenmetastasen im Zusammenhang stehen. Zwischen einer frühzeitigen Entwicklung von Kutan-

/Subkutanmetastasen und dem Auftreten von einer *B-raf*-Exon-15-DNA-Mutation ($p = 0,38$), einer T1796A-Mutation ($p = 0,38$), einer B-raf-Exon-15-Proteinmutation ($p = 0,38$) oder einer V599E-Mutation ($p = 0,929$) bestand ebenfalls keine statistisch signifikante Korrelation.