

DISSERTATION

Proteinexpression, DNA Methylierung und Kopienzahlvariation
von zellzyklusassoziierten und immunomodulatorischen
Proteinen in Melanomen der Haut und Schleimhaut

Investigation of protein expression, DNA methylation and copy
number status of cell cycle-related and immunomodulatory
genes in mucosal and cutaneous melanomas

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Niklas Wrede

Datum der Promotion: 30.11.2023

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
Zusammenfassung	2
1. Einleitung	5
1.1 Epidemiologie	5
1.2 Therapie	6
1.2.1 Tyrosinkinaseinhibitoren bei Mutationen der MAPK-Kaskade und <i>KIT</i> -Mutationen	6
1.2.2 Zellzyklus und CDK-Inhibitoren	7
1.2.3 Immuncheckpoint-Inhibitoren	9
1.3 Regulation der Proteinexpression	10
1.3.1 Genetische Veränderungen	10
1.3.2 Epigenetische Modifikationen	11
1.4 Fragestellung	11
2 Methodik	13
2.1 Patienten und Proben	13
2.2 Immunohistochemie	13
2.3 Extraktion der DNA	14
2.4 Gezieltes Next-Generation-Sequencing (NGS)	14
2.5 DNA Methylierungsanalyse	15
2.6 Statistische Analyse	15
3. Ergebnisse	16
3.1 Allgemeine Charakterisierung	16
3.2 Validierung der automatisierten IHC-Auswertung	17
3.3 Vergleich der IHC-Expression	17
3.4 Einfluss der Kopienzahlvariation und Promotormethylierung auf die Proteinexpression	18
3.5 Überlebensanalyse	19

4. Diskussion	21
4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse	21
4.2 Immuncheckpointinhibition	22
4.3 Prädiktive und prognostische Marker	22
4.4 Differenzialdiagnostische Marker	24
4.5 Stärken und Schwächen der Studie	25
4.6 Implikationen für Praxis und zukünftige Forschung	26
5. Schlussfolgerungen	27
Literaturverzeichnis	28
Eidesstattliche Versicherung	39
Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen	40
Auszug aus der Journal Summary List	41
Druckexemplar der Publikation	42
Lebenslauf	50
Publikationsliste	52
Danksagung	53

Abkürzungsverzeichnis

BCL2	B-cell lymphoma 2
CD	Cluster of differentiation
CM	Hautmelanome
CXCL9	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9
CDKN1C	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1C
CDK	Cyclin-abhängigen Kinase
EGFR	Epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor
FAMMM	Familiäres atypisches multiples Muttermal- und Melanomsyndrom
FFPE	In Formalin fixiert und in Paraffin eingebettete
ICI	Immuncheckpoint-Inhibition
IHC	Immunohistochemie
MM	Schleimhautmelanome
PD-1	Programmed cell death protein 1
PD-L1	Programmed death-ligand 1
Rb	Retinoblastoma protein
TMA	Tissue-Microarrays
TILs	Tumorinfiltrierenden Lymphozyten
TKIs	Tyrosinkinaseinhibitoren

Zusammenfassung

Einleitung: Schleimhautmelanome sind eine seltene Untergruppe der Melanome, die in verschiedenen Schleimhautregionen des Körpers entstehen können und eine schlechte klinische Prognose aufweisen. Auf Grund ihrer ungeklärten Ätiologie und einem Mangel an differenzialdiagnostischen und prognostischen Markern, besteht der Bedarf einer genaueren molekularbiologischen Charakterisierung. Prädiktive Marker für das Therapieansprechen, beispielsweise auf Immuncheckpoint-Therapie, werden im Zeitalter der personalisierten Therapie ebenfalls benötigt.

Methoden: Wir haben in unserer Studie die Proteinexpression an 47 Schleimhautmelanomen und 28 Hautmelanomen untersucht. Dafür haben wir ein automatisiertes Auswertungsprogramm für immunohistochemische Färbungen validiert, um die Proteinexpression von Zellzyklus- und Immuncheckpoint-assoziierten Proteinen zu bestimmen. Außerdem haben wir den Einfluss von Kopienzahlvariationen und DNA-Promotermethylierung auf das Expressionsprofil untersucht.

Ergebnisse: Die Proteinexpression von CD117, Ki67 und p16 war höher in Schleimhautmelanomen, während die BCL2, Cyclin D1, PD-1 und PD-L1 Expression höher in Hautmelanomen war. Die häufigste Kopienzahlvariation der Melanome war die Deletion von *CDKN2A*, die mit einer verminderten p16 Expression assoziiert war. Der komplette Expressionsverlust von p16 war höher in Hautmelanomen. *CCND1* Amplifikationen waren mit einer vermehrten Cyclin D1 Expression korreliert. *KIT* Amplifikationen wurden vermehrt in Schleimhautmelanomen gefunden, waren aber nicht mit der CD117 Expression assoziiert. Eine erhöhte PD-1 Expression in Immunzellen und die vermehrte *PD-L1* Promotormethylierung war ein positiver prognostischer Faktor in Patienten mit Schleimhautmelanomen. In der Gesamtgruppe der Melanompatienten war eine vermehrte PD-L1 Expression mit dem Ansprechen auf Immuncheckpoint-Inhibition assoziiert.

Schlussfolgerung: Schleimhautmelanome zeigen ein von Hautmelanomen unterschiedliches Expressionsmuster von Proteinen des Zellzyklus und der Immunomodulation. Diese sind zum Teil durch Kopienzahlvariationen und Promotormethylierung bedingt. Die p16 Expression ist ein potenzieller klinischer Marker

bei der pathologischen Unterscheidung von Schleimhautmelanomen und Hautmelanomen. Die PD-1 Expression und die *PD-L1* Promotormethylierung können möglicherweise als prognostische Marker für Patienten mit Schleimhautmelanomen eingesetzt werden.

Abstract

Introduction: Mucosal melanomas are a rare, but clinically aggressive subtype of melanomas, that can originate from various mucosal linings. Because of the lack of diagnostic and prognostic markers, there is a need for the further characterization of this cancer on the molecular level. Considering the growing importance of personalized therapy, the evaluation of the expression and regulation of molecular targets and their predictive value is of great importance.

Methods: We analyzed the protein expression profile of 47 mucosal and 28 cutaneous melanomas. We validated an automated IHC scoring system for the analysis of cell cycle and immune checkpoint related proteins as well as the effect of copy number alterations and DNA promoter methylation on the expression profiles.

Results: The expression of CD117, Ki67 and p16 was higher in mucosal melanoma, while the expression of BCL2, Cyclin D1, PD-1 and PD-L1 was higher in cutaneous melanoma. *CDKN2A* deletion was the most common copy number variation in cutaneous and mucosal melanomas and lead to a decreased expression of p16. The complete loss of p16 expression was more common in cutaneous melanomas. There was an association between *CCND1* amplifications and increased Cyclin D1 expression. *KIT* amplifications were more common in mucosal melanomas and did not lead to increased CD117 expression. Increased PD-1 expression on immune cells and *PD-L1* promoter methylation was a positive prognostic factor in mucosal melanoma patients. In the combined group of melanoma patients, there was an association between PD-L1 expression and response to immune-checkpoint inhibition.

Conclusion: There are differences in protein expression of cell cycle associated and immunomodulatory proteins between mucosal and cutaneous melanomas, that are partly caused by copy number variations and promoter methylation. p16 expression might be clinically relevant for distinguishing mucosal and cutaneous melanomas. PD-1 expression and *PD-L1* promoter methylation might be prognostic markers for mucosal melanoma patients.

1. Einleitung

Schleimhautmelanome (MM) sind eine seltene Unterform des Melanoms. Wie auch Melanome der Haut (CM) entstehen sie aus Melanozyten. Die „klassischen Melanozyten“ sind dendritische Zellen innerhalb der Epidermis und Dermis der Haut und sind dort mittels Produktion des Pigmentes Melanin für die Pigmentierung von Haut und Haaren verantwortlich. Es gibt allerdings auch Melanozyten in anderen Geweben, wie dem Innenohr, den Augen, den Hirnhäuten, dem Herz und den Schleimhäuten (Barrett and Raja, 1997; Colombo et al., 2011). MM entstehen vor allem in den Schleimhäuten der Atemwege, des Gastrointestinaltrakts oder des Urogenitaltrakts. Sie unterscheiden sich von CM durch ihre deutlich schlechtere Prognose. Diese ist vermutlich auch durch die spätere Diagnosestellung, die häufig erst im metastasierten Stadium erfolgt, bedingt (Chang et al., 1998).

1.1 Epidemiologie

Die Ätiologie von MM ist noch weitgehend unbekannt, ebenso ist wenig darüber bekannt welche Risikofaktoren ihre Entwicklung begünstigen. Der primäre Risikofaktor für die Entstehung von CM ist die UV-Exposition, meist in Form von Sonnenlicht (Tucker and Goldstein, 2003). Dieses bedingt die Entstehung von DNA-Schäden durch die Bildung von Pyrimidin-Dimeren, die einen karzinogenen Effekt haben (Jhappan et al., 2003). Da die Ursprungslokalisationen der MM dem Sonnenlicht größtenteils nicht ausgesetzt sind, scheint dieser Faktor bei ihrer Entstehung nicht entscheidend zu sein. Dies konnte in Gensequenzierungsstudien bestätigt werden, da UV-assoziierte Mutationssignaturen in CM häufiger gefunden wurden als in MM (Furney et al., 2013). Andere etablierte Risikofaktoren für die Entstehung von CM sind eine familiäre Disposition, männliches Geschlecht und die ethnische Zugehörigkeit (Goldstein and Tucker, 2001; Rastrelli et al., 2014). MM treten dagegen häufiger bei Frauen auf, während die familiäre Disposition und ethnische Zugehörigkeit nur eine geringere Rolle zu spielen scheint (Postow et al., 2012). Es wurden Tabakrauch und Formaldehyd-Exposition als Risikofaktoren für MM der oralen und respiratorischen Schleimhäute postuliert. Tabakrauch kann zu oraler Hyperpigmentierung führen, die Assoziation mit MM ist allerdings unklar (Axeix and Hedin, 1982). Außerdem wurden von Holmstrom und Lund drei Patienten beschrieben,

die nasale MM nach Formalaldehyd-Exposition entwickelten (Holmstrom and Lund, 1991).

1.2 Therapie

Aus der späteren Diagnosestellung folgt, dass bei MM häufiger auf eine systemische Therapie zurückgegriffen werden muss, da eine alleinige Resektion den Tumor nicht mehr vollständig entfernen kann. Die zielgerichtete Therapie hat sich in den letzten Jahren zu einem wichtigen Standbein der systemischen Krebstherapie entwickelt. Hierbei greifen die Medikamente an spezifischen Zielstrukturen der Tumorzellen an.

1.2.1 Tyrosinkinaseinhibitoren bei Mutationen der MAPK-Kaskade und *KIT*-Mutationen

Von dem Fortschritt der personalisierten Therapie haben Patienten mit CM profitiert, da in bis zu 66% aller CM eine Mutation im *BRAF*-Gen auftritt, die mit Hilfe von *BRAF*-Tyrosinkinaseinhibitoren (TKIs) als Therapieziel genutzt werden kann (Davies et al., 2002a). Das *BRAF*-Gen kodiert für die RAF-Kinase, die Teil der mitogen-aktivierten Kinase (MAPK)-Kaskade ist. Die Proteine dieser Signalkaskade aktivieren sich gegenseitig, indem sie sich in einer bestimmten Reihenfolge phosphorylieren. Physiologisch wird die Kaskade durch die extrazelluläre Bindung eines Liganden, beispielsweise eines Wachstumsfaktors, an eine Rezeptortyrosinkinase, wie den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR), initiiert. Diese Ligandenbindung führt zu einer Autophosphorylierung der Rezeptortyrosinkinase. Anschließend wird ein Proteinkomplex mit GRB2 und SOS gebildet. Diese Komplexbildung aktiviert SOS, welches wiederum ein RAS Protein aktiviert. Dieses aktiviert dann die RAF-Tyrosinkinase, welche die MEK-Tyrosinkinase aktiviert. MEK phosphoryliert dann das Protein MAPK, welches verschiedene Transkriptionsfaktoren, wie Myc, aktiviert und so die Genexpression der Zelle verändert. Dies bedingt beispielsweise eine vermehrte Zellproliferation (Avruch, 2001).

Die häufigste *BRAF*-Mutation, V600E, führt dazu, dass RAF unabhängig von der Stimulation durch die RAS-Kinase aktiv ist und bedingt eine dauerhafte Aktivierung der MAPK-Kaskade und damit einen anhaltenden Wachstumsreiz (Zaman et al., 2019). In

Patienten mit metastasierten Melanomen und einer *BRAF*-Mutation konnte der Einsatz von BRAFTKIs die durchschnittliche Überlebensdauer steigern (Chapman et al., 2017; Davies et al., 2002b). MM haben im Vergleich zu CM seltener *BRAF*-Mutationen. Newell et al. beschrieben elf *BRAF* Mutationen in einer Kohorte von 67 MM-Patienten (16%) (Newell et al., 2019), während etwa die Hälfte aller CM Patienten *BRAF* Mutationen aufweist (Sanchez-Vega et al., 2018). BRAF-TKIs zeigten sich aber auch bei der Therapie von *BRAF*-mutierten MM als wirksam (Bai et al., 2017). NRAS-Mutationen sind die zweithäufigsten Mutationen in CM. Sie sind ebenfalls häufiger in CM als in MM (Hayward et al., 2017). MEK-Inhibitoren sind eine weitere Möglichkeit in die MAPK-Kaskade einzugreifen (Cheng and Tian, 2017). In fortgeschrittenen CM Patienten mit *BRAF* V600E Mutationen konnte die kombinierte BRAF- und MEK-Inhibition das Überleben, im Vergleich zur alleinigen BRAF-Inhibition, signifikant verlängern (Long et al., 2015). Dummer et al. konnten in einer Phase 3 Studie zeigen, dass eine Therapie mit MEK-Inhibitoren das Überleben bei Patienten mit fortgeschrittenem CM und NRAS-Mutationen im Vergleich zu einer Chemotherapie mit Dacarbazin, signifikant verlängern konnte (Dummer et al., 2017).

MM haben häufig *KIT* Amplifikationen oder Mutationen, die von spezifischen TKIs als Ziel genutzt werden können (Tacastacas et al., 2014). Curtin et al. beschrieben in ihrer Kohorte *KIT*-Amplifikationen und Mutationen in 15 (39%) von 38 MM Patienten (Curtin et al., 2005). Das *KIT* Gen kodiert für die Rezeptortyrosinkinase c-KIT (CD117), welches beispielsweise bei gastrointestinalen Stromatumoren häufig mutiert ist und dort erfolgreich mit TKIs therapiert wird (Siehl and Thiel, 2007). Ugurel et al. beschrieben eine Kohorte von zwölf Patienten mit *KIT*-mutierten, metastasierten CM, bei der KIT-TKIs keine Wirksamkeit zeigten. Außerdem beobachteten sie, dass eine vermehrte Expression des Zielproteins c-KIT nicht mit der Wirksamkeit von KIT-TKI korrelierte (Ugurel et al., 2005). Andere Phase II Studien konnten eine Wirksamkeit von KIT-TKIs in Patienten mit metastasierten Melanomen beschreiben, die mit einem positiven *KIT* Mutationsstatus korrelierte, nicht aber mit einer Amplifikation von *KIT* (Tacastacas et al., 2014).

1.2.2 Zellzyklus und CDK-Inhibitoren

Die Regulatorproteine des Zellzyklus sind ebenfalls mögliche Angriffspunkte für zielgerichtete Therapien. Der Zellzyklus besteht aus der G1-, S-, G2- und M-Phase. In der G1Phase bereitet sich die Zelle auf die Verdoppelung der DNA in der S-Phase vor. Anschließend wird die Mitose in der G2-Phase vorbereitet. Der Übergang dieser Phasen ineinander wird durch Checkpoints reguliert. Wenn Fehler bei der DNA-Synthese oder anderen Schritten der Zellteilung während einem Checkpoint erkannt werden, werden verschiedene Regulatorproteine wie p53, Rb, p21 und p16 aktiv (Schafer, 1998). P53 kann verschiedene Arten von DNA-Schädigung erkennen und als Reaktion die Transkription des p21 Proteins initiieren. Das p53 Protein ist auch als „Wächter des Genoms“ bekannt, und Mutationen die zu einem Funktionsverlust führen, sind in einem großen Anteil der Malignome zu finden (Zhu et al., 2020). Verschiedene Proteine der p21- und p16-Familien regulieren die Interaktion von Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) und Cyclinen. Wenn CDKs an Cycline binden, können sie das Protein Rb an verschiedenen Stellen phosphorylieren (pRb). Dies führt zur Dissoziation des E2F Transkriptionsfaktors von pRb. E2F vermittelt dann die Transkription von Proteinen, die zum Voranschreiten des Zellzyklus benötigt werden. Die Proteine der p16 Familie binden die CDKs und die Proteine der p21 Familie binden an die Cycline. So wird die Interaktion von den CDKs und den Cyclinen verhindert. Dies führt zum Arrest des Zellzyklus und initiiert die Behebung des Fehlers, beispielsweise durch die Reparatur von mutierter DNA. Kann der Fehler nicht behoben werden, wird die Apoptose eingeleitet (Schafer, 1998).

Die Gene, die diese Regulatorproteine kodieren, werden auch Tumorsuppressorgene genannt, da sie die Entstehung von Krebs verhindern. In bösartigen Tumoren werden häufig somatischen Mutationen in diesen Genen nachgewiesen, die eine verminderte Funktionalität bedingen. Dies verhindert einen physiologischen Ablauf der Checkpoints und kann so zu einer unregulierten Replikation der Krebszellen beitragen (Kastan and Bartek, 2004; Romagosa et al., 2011). Somatische Mutationen sind im Laufe des Lebens auftretende Erbgutveränderungen, die nicht in den Keimzellen vorkommen. Ihnen gegenüber stehen Keimbahnmutationen, die explizit in Keimzellen vorhanden sind und so an den Nachwuchs weitergegeben werden können. Keimbahnmutationen in Tumorsuppressorgenen können Betroffene empfänglicher für Krebserkrankungen machen. Das familiäre atypische multiple Muttermal- und Melanomsyndrom (FAMMM) ist zu 40% durch *CDKN2A*-Keimbahnmutationen ausgelöst. Betroffene weisen meist mehr

als 50 melanozytische Nävi auf und entwickeln mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit Melanome (Eckerle Mize et al., 2009).

Amplifikationen oder Mutationen, die zur vermehrten Aktivität des Cyclin-CDK Komplexes führen, können ebenfalls eine unregulierte Zellreplikation, und damit die Entstehung von Krebs, bedingen. Deshalb bezeichnet man die Gene, die für die CDKs und Cycline kodieren als Protoonkogene (Peyressatre et al., 2015). Wenn Tumoren Mutationen in diesen Protoonkogenen aufweisen, stellt die Inhibition der veränderten oder vermehrt vorliegenden Proteine einen möglichen Therapieansatz dar. Bei Patienten mit fortgeschrittenem Hormonrezeptor-positivem Brustkrebs werden CDK4/6 Inhibitoren bereits erfolgreich eingesetzt (Shah et al., 2018). Erste Fallberichte und Ergebnisse aus frühen klinischen Studien weisen auf eine Wirksamkeit von CDK4/6 Inhibitoren bei CM Patienten hin (Garutti et al., 2021).

Dies könnte auch ein möglicher Ansatz für die Therapie von MM sein, da Amplifikationen von *CDK4* und *CCND1* (kodiert für Cyclin D1) sowie Deletionen von *CDKN2A* (kodiert für mehrere Isoformen, unter anderem p16) in MM-Patienten beschrieben sind (Newell et al., 2019). Xu et al. konnten außerdem die Sensitivität eines MM Zellkulturmodells gegen einen pan-CDK-Inhibitor nachweisen (Xu et al., 2019).

1.2.3 Immuncheckpoint-Inhibitoren

Eine weitere zielgerichtete Therapiemodalität, die die Prognose von metastasierten CM verbessern konnte, ist die Immuncheckpoint-Inhibition (ICI) (Larkin et al., 2019; Wolchok et al., 2017). Die zytotoxischen T-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Verhinderung der Krebsentstehung. Der T-Zell-Rezeptor erkennt Tumorantigene, die sich durch die genetischen Veränderungen der Tumorzelle von den Selbstantigenen unterscheiden. Dies aktiviert die T-Zelle und diese vermitteln die Zerstörung der Tumorzelle. Um die Selbsttoleranz der zytotoxischen T-Zellen zu gewährleisten, wird ihre Aktivität durch verschiedene aktivierende und inaktivierende Mechanismen reguliert. Die inaktivierenden Mechanismen werden Immuncheckpoints genannt. PD-1 und CTLA4 sind Proteine, die sich auf der Zelloberfläche der T-Zellen befinden. Die Bindung von PD-1 an PD-L1 und CTLA4 an CD80 oder CD86 führen zur Aktivierung des Immuncheckpoints und der Inhibition der T-Zelle. Tumorzellen können Proteine wie PD-L1 exprimieren und so die

Immuncheckpoints aktivieren. Dies führt zur Hemmung der zytotoxischen Aktivität der T-Zellen und ermöglicht es so der Tumorzelle der anti-neoplastischen Aktivität des Immunsystems zu entkommen (Chen et al., 2012).

1.3 Regulation der Proteinexpression

1.3.1 Genetische Veränderungen

Die Krebszelle kann auf verschiedenen molekularbiologischen Ebenen charakterisiert werden. In unserer Arbeit beschreiben wir die Proteinbiosynthese. Die Proteinbiosynthese wird durch die DNA-Sequenz und ihre epigenetischen Modifikationen determiniert. Verschiedene genetische Veränderungen können hierbei die Entstehung von Krebs bedingen. Wie bereits erläutert wird hier zwischen Keimbahnmutationen und somatischen Mutationen unterschieden. Darüber hinaus lassen sich Genabschnitte grob in Exon- und Intron-Bereiche aufteilen. Die Sequenz der Exon-DNA enthält die Information der Aminosäuresequenzen der verschiedenen Proteine der Zelle. Die Intron-DNA kodiert nicht für Proteine, sondern hat regulatorische Funktionen (Gilbert, 1978). Bei genetischen Alterationen kann die Gensequenz auf verschiedene Arten verändert sein. Beispielsweise ist bei einer Punktmutation nur eine organische Base verändert. Punktmutationen in ExonDNA werden anhand ihres Einflusses auf das gebildete Protein klassifiziert. Eine stumme Mutation verändert das gebildete Protein nicht. Eine missense Mutation verändert eine Aminosäure des Proteins, während eine nonsense Mutation die Translation der DNA vorzeitig abbricht, so dass ein verkürztes Protein gebildet wird (Cooper and Nature Publishing Group, 2003). Die *BRAF-V600E*-Mutation ist eine häufige Punktmutation in CM. Es handelt sich um eine missense Mutation, bei der die Aminosäure Valin gegen Glutaminsäure ausgetauscht wird. Dies verhindert die Inaktivierung der BRAF Tyrosinkinase und führt so zu einer konstitutiven Aktivierung der MAPK Signalkaskade (Davies et al., 2002b). Kopienzahlvariationen beschreiben eine quantitative Veränderung der Gene. Amplifikationen beschreiben dabei eine erhöhte Kopienanzahl eines Gens und Deletionen beschreiben den Verlust eines Gens. Amplifikationen können so zu einer erhöhten Proteinexpression führen, während Deletionen eine verminderte Expression oder den Verlust der Expression bedingen (Albertson, 2006). Zu den in MM häufig auftretenden Kopienzahlvariationen gehören *CCND1* Amplifikationen, die von Xu et al. bei 59 (27.7%) von 213 Patienten beschrieben

wurden (Xu et al., 2019). *KIT* Amplifikationen wurden ebenfalls häufig in MM berichtet, Yun et al. konnten diese in 8 von 26 (31%) MM Patienten nachweisen [46]. *CDKN2A* Deletionen werden sowohl in CM als auch in MM regelmäßig beschrieben (Hilke et al., 2020; Newell et al., 2019).

1.3.2 Epigenetische Modifikationen

Epigenetische Modifikationen der DNA sind ein regulatorischer Mechanismus der Proteinexpression. Diese umfasst verschiedene chemische Modifikationen der DNA-Basen oder der Histone. Die Methylierung der organischen Base Cytosin am fünften Kohlenstoff Atom ist eine der häufigsten epigenetischen Modifikationen. Oft folgt eine Guanosin Base einer so modifizierten Cytosin Base. Diese sogenannten CpG-Methylierungen finden sich häufig in Promotorregionen der DNA. Promotorregionen sind DNA-Sequenzen, an die regulatorische Proteine binden, um den Prozess der DNA-Transkription zu initiieren. Promotormethylierungen resultieren in einer reduzierten Expression von den durch den Promotor kontrollierten Genen (Laird, 2010). Ein verändertes Methylierungsprofil mit vermehrten Hypermethylierungen wurde bei verschiedenen Krebsarten beschrieben (Das and Singal, 2004). Bei CM ist die Hypermethylierung des Promotors des Tumorsuppressorgens *CDKN2A* ein häufiges epigenetischen Ereignis, das mit einem reduzierten Überleben der betroffenen Patienten assoziiert ist (Straume et al., 2002).

Wir haben in einer anderen Studie das Methylierungsprofil von MM und CM verglichen, und dabei weniger *CDKN2A* Promotor-Hypermethylierungen in MM gefunden (Jurmeister et al., 2021).

Es gibt bereits zugelassene DNA-Methyltransferase Inhibitoren, die zur Demethylierung der DNA führen. Sie werden bei der Therapie von hämatologischen Neoplasien bereits eingesetzt (Bohl et al., 2018). Ihre Wirksamkeit wird aktuell auch in verschiedenen soliden Malignomen, wie Ovarialkarzinomen, getestet (Fu et al., 2011).

1.4 Fragestellung

Die Proteinexpression der Zellen ist das Resultat des Zusammenspiels zwischen Gensequenz und epigenetischen Modifikationen. Um die Tumorbiologie von MM zu verstehen, müssen die verschiedenen Ebenen untersucht werden. Deshalb kombinieren

wir zur Charakterisierung der Melanomzellen immunohistochemische Färbungen mit der Kopienzahl- und der Methylierungsanalyse. So möchten wir herausfinden, welche Einflüsse Kopienzahlvariationen und die Promotormethylierung auf die Expression von Zellzyklus- und Immuncheckpoint-assoziierten Proteinen hat.

Außerdem untersuchen wir, wie molekularbiologischen Charakteristika der Tumoren mit dem klinischen Verlauf der Patienten – wie beispielsweise dem Therapieansprechen und der Überlebensdauer – zusammenhängen. Dabei erhoffen wir uns, neue prognostische und prädiktive Zusammenhänge zu finden, die im besten Fall als klinische Marker genutzt werden können. Dies könnte ein wichtiger Schritt auf dem Weg zur personalisierten Therapie von MM sein.

Darüber hinaus ist die Unterscheidung von CM und MM im klinischen und histopathologischen Alltag in Einzelfällen schwierig bis unmöglich. So kann es sich beispielsweise bei Melanomen des gastroösophagealen Überganges um eine Metastase oder eben den Primarius handeln. Durch den molekularbiologischen Vergleich von MM und CM erhoffen wir uns Marker zu finden, die eine bessere und genauere Differenzierung dieser Tumorentitäten erlaubt.

2 Methodik

2.1 Patienten und Proben

Die Patientenproben wurden aus dem Institut für Pathologie der Charité Universitätsmedizin Berlin ausgewählt. Dabei handelte es sich um in Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete (FFPE) Gewebelöcke von chirurgisch resezierten Melanomen. Es wurden 53 MM Proben und 28 CM Proben ausgewählt. Sechs MM Proben mussten wegen unzureichender Qualität ausgeschlossen werden.

Gewebeschnitte der Gewebelöcke wurden lichtmikroskopisch auf das Vorhandensein von Pigmentierung und das histomorphologische Wachstumsmuster (epitheloid, sarkomatoid oder gemischt) untersucht. Zudem wurden lichtmikroskopisch repräsentative Tumorareale identifiziert. Von jeder Gewebeprobe wurden zwei 1 mm durchmessende Stanzen aus den ausgewählten Bereichen auf Tissue-Microarrays (TMAs) übertragen. TMAs sind Paraffinlöcke, in die viele kleine Gewebestänzen (Cores) platziert werden. Durch die Verwendung von TMAs können viele Gewebeproben gleichzeitig immunohistochemisch auf ihre Proteinexpression untersucht werden.

2.2 Immunohistochemie

Es wurden 13 immunohistochemische (IHC) Färbungen an den TMAs durchgeführt. Mit Hilfe der IHC kann die Proteinexpression von Zellen durch spezifische, an Farbstoffe gekoppelte Antikörper, semiquantitativ bestimmt werden (Matos et al., 2010). Es wurde ein rotes Chromogen (Farbstoff) verwendet, um die Differenzierung von Pigmentierung und positiver Färbereaktion zu erleichtern.

Dabei wurden zehn Zellzyklus assoziierte Proteine (BCL2, Cyclin D1, Cyclin D3, CDK4, CDKN1C, CD117, p16, phospho-Rb und Ki67) und drei Proteine, die mit der ImmunCheckpoint Inhibition in Verbindung stehen (PD-1, PD-L1 und CXCL9) angefärbt. Zur Färbung wurden die automatischen Färbeautomaten Leica BOND-MAX (Leica Biosystems, Nußloch, Deutschland) und Ventana BenchMark XT (Roche, Basel,

Schweiz) verwendet. Die gefärbten TMAs wurden für die automatisierte Auswertung digitalisiert.

Die Auswertung der IHC Färbungen erfolgte mit der digitalen Bildanalysesoftware QuPath (Bankhead et al., 2017). Hiermit wurde entweder der Prozentsatz der positiv gefärbten Zellen (Ki67, PD-1, PD-L1) oder der H-Score bestimmt. Der H-Score wird berechnet, indem der Anteil der Zellen ohne, mit leichter, mit mittlerer und mit starker Farbreaktion bestimmt wird und die Anteile anschließend mit Werten von null (leichte Farbreaktion) bis drei (starke Farbreaktion) multipliziert werden. Die Bildanalysesoftware wurde verwendet, damit die Expressionsdaten quantitativ und objektiv erhoben werden womit ein möglicher systematischer Fehler durch den Auswertenden ausgeschlossen wird.

2.3 Extraktion der DNA

DNA aus repräsentativen Tumorarealen wurde semiautomatisch an einem Maxwell RSC Instrument mit dem Maxwell RSC FFPE Plus DNA Purification Kit (Custom, Ax4920; Promega, Madison, WI, USA) extrahiert. Mit Hilfe des Qubit HS DNA Assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) wurde die Gesamtmenge der DNA bestimmt.

2.4 Gezieltes Next-Generation-Sequencing (NGS)

Es wurden 10 ng genomischer DNA genutzt um eine DNA Library mit dem Ion AmpliSeq Library Kit 2.0 (Thermo Fisher Scientific) und dem Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2 (Thermo Fisher Scientific) herzustellen. Die Quantifizierung wurde mit dem Ion Library Quantification Kit (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Die Proben wurden mit dem Ion S5 Instrument mit den Ion 540 Chips (Thermo Fisher Scientific) sequenziert. Die Daten wurden mit der IonReporter (Thermo Fisher Scientific) und der Sequence Pilot (JSI Medical Systems, Ettenheim, Deutschland) Software analysiert.

2.5 DNA Methylierungsanalyse

Zur Verbesserung der Qualität der durch die Fixierung mittels Formalin zum Teil degradierten DNA wurde das Illumina Infinium HD FFPE DNA Restore Kit verwendet. Mittels des EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) wurde eine Bisulfitkonvertierung vorgenommen. Die DNA Methylierungsanalyse wurde mit dem Illumina Infinium MethylationEPIC BeadChip nach den Herstellerprotokollen durchgeführt.

Die rohen DNA Methylierungsdaten wurden in RStudio (Version 1.4.1103) mit dem *minfi* Paket prozessiert. Dabei wurden die *pfilter* und *rmSNPandCH* Funktionen aus den *wateRmelon* und *DMRcate* Paketen genutzt um CpG Positionen mit einer schlechten Qualität (durchschnittlicher „detection p-value“ ≥ 0.05), Kreuzreaktivität und Assoziation mit SNPs oder Geschlechtschromosomen herauszufiltern. Proben mit einem „detection pvalue“ ≥ 0.05 in mehr als 5% der gesamten validen CpGs wurden komplett ausgeschlossen.

Promotor-assoziierte CpG Stellen wurden ausgewählt auf Basis der „UCSC_RefGene_Group“ Spalte der IlluminaHumanMethylationEPIC Anmerkungsdatei (v1.0 B4), die auf der offiziellen Illumina-Website zu finden ist. Promotor-assoziierte CpGs die mit „TSS200“, „TSS1500“, „1stExon“ oder „5'UTR“ annotiert waren, wurden zur weiteren Analyse ausgewählt.

2.6. Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mit R Version 4.0.3 in RStudio Version 1.4.1103. durchgeführt. Korrelationsmatrizen wurden mit dem *ggcorrpot* Paket generiert (Kassambara, 2019). Die kontinuierlichen Variablen wurden mit dem Wilcoxon Test oder dem KruskalWallis Test für Vergleiche mit mehr als zwei Kategorien auf Signifikanz getestet. Kategorische Variablen wurden mit dem Chi-Quadrat Test auf Signifikanz getestet. Das Coxsche Regressionsmodell wurde für die univariate Überlebensanalyse verwendet. Die Überlebenskurven wurden mit der Kaplan-Meier Methode erstellt und mit dem Log-Rank Test auf Signifikanz getestet.

3. Ergebnisse

3.1 Allgemeine Charakterisierung

In der MM Kohorte waren 17 (36%) Männer und 30 (64%) Frauen. 14 (30%) MM waren in der Nasenhöhle lokalisiert. Jeweils 12 (26%) MM waren anorektal oder genital lokalisiert. Außerdem befanden sich 3 (6%) MM im Ösophagus und 6 (12%) in der Mundhöhle. Das mediane Alter betrug 66 Jahre, es variierte zwischen 23 und 83 Jahren. Die Erstdiagnosen wurden zwischen 2002 und 2019 gestellt. 28 (45%) MM wiesen in der lichtmikroskopischen Untersuchung eine Pigmentierung auf. In der Histologie zeigten 33 (70%) ein epitheloides Wachstumsmuster, 8 (17%) ein sarkomatoides Wachstumsmuster und 6 (12%) ein gemischtes Wachstumsmuster. In der Gensequenzierung zeigten sich 5 (10%) *TP53* Mutationen, 4 (8%) *NRAS* Mutationen und 3 (6%) *BRAF* Mutationen. 14 (29%) Patienten wurden mit Checkpoint-Inhibitoren behandelt, 15 (31%) erhielten eine Chemotherapie und 8 (16%) wurden mit einer Interferon-Therapie behandelt. Kein Patient wurde mit *BRAF*-Inhibitoren behandelt.

In der CM Kohorte waren 20 (71%) Männer und acht (29%) Frauen. Das durchschnittliche Alter war 71 Jahre, es reichte von 42 bis 85 Jahre. Die Erstdiagnosen waren zwischen 2010 und 2019. In der lichtmikroskopischen Untersuchung wiesen zwölf (41%) der CM eine Pigmentierung auf. 20 (71%) zeigten ein epitheloides, sechs (21%) ein sarkomatoides und zwei (7%) ein gemischtes Wachstumsmuster. In der Gensequenzierung zeigten sich elf (38%) *NRAS* Mutationen, zehn (35%) *BRAF* Mutationen und drei (10%) *TP53* Mutationen. 16 (55%) Patienten wurden mit Checkpoint-Inhibitoren behandelt, sieben (24%) erhielten einen *BRAF*-Inhibitor, vier (14%) wurden mit einer Chemotherapie behandelt und zwei (7%) Patienten erhielten eine Interferon-Therapie.

In der MM Gruppe waren 17 (36%) Männer und 30 (64%) Frauen. Frauen waren in der MM-Kohorte überrepräsentiert ($p=0.005$). Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Kohorten in Bezug auf Alter, Pigmentierung und histologische Morphologie. *BRAF* Mutationen wurden häufiger in CM als in MM detektiert ($p = 0.003$). *NRAS* Mutationen fanden sich ebenfalls häufiger in CM als in MM ($p = 0.003$).

Zwischen *TP53* Mutationsraten gab es keinen signifikanten Unterschied. Es wurden keine zusätzlichen Mutationen in Genen, die von dem NGS Panel erfasst wurden, gefunden. CM Patienten wurden häufiger mit Checkpoint-Inhibitoren behandelt ($p = 0.036$). Außerdem wurden nur CM Patienten mit BRAF-Inhibitoren behandelt ($p = 0.001$), was mit der höheren Prävalenz von *BRAF* Mutationen bei CM Patienten übereinstimmt. Bei der Gabe von Chemotherapie, am häufigsten in Form von Dacarbazin, und Interferontherapie, gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Wrede et al., 2022).

3.2 Validierung der automatisierten IHC-Auswertung

Um die automatisierte Auswertung der TMAs mit der Bildanalysesoftware QuPath zu validieren, haben wir einen nukleären (Ki67) und einen zytoplasmatischen (BCL2) Marker ausgewählt. Beide Marker haben wir sowohl manuell als auch automatisiert ausgewertet. Dabei zeigte sich eine hohe Korrelation zwischen der manuellen und der automatischen Auswertung von Ki67 ($R = 0.79$) und BCL2 ($R = 0.9$) (Wrede et al., 2022).

3.3 Vergleich der IHC-Expression

Um potenzielle Korrelationen zwischen den untersuchten IHC-Markern zu identifizieren, haben wir eine Korrelationsmatrix für MM und CM berechnet. In der MM Kohorte gab es eine positive Korrelation zwischen der Expression von Cyclin D3 und Ki67 und zwischen der Expression von CDK4 und CXCL9. Außerdem wurde eine signifikante negative Korrelation zwischen der Expression von BCL2 und Ki67 beobachtet. In CM Proben wurde eine signifikante positive Korrelation zwischen der Expression von p16 und Rb und zwischen der Expression von CDK4 und CDKN1C gefunden.

Anschließend wurde die mittlere Expression der untersuchten IHC Marker zwischen den MM und CM Kohorten verglichen. Die Expression von CD117 ($p = 0.045$) und die

nukleäre und zytoplasmatische Expression von p16 ($p = 0.002$) war signifikant höher in MM als in CM. Außerdem war die durchschnittliche Expression von Ki67 mit 31.7% signifikant höher als in CM (9.7%, $p = 0.002$). Die Expression von BCL2 ($p = 0.045$), Cyclin D1 ($p = 0.003$), PD-1 ($p = 0.011$) und PD-L1 ($p = 0.021$) war signifikant höher in CM verglichen mit MM. PD-1 wurde nur von Immunzellen (vor allem CD3 positive T-Zellen) exprimiert und nicht von Tumorzellen. Es wurde kein signifikanter Unterschied in /oder bei/ der CXCL9 Expression zwischen MM und CM festgestellt. Die Expression von CXCL9 in nasalen MM war signifikant höher als in MM anderer Lokalisationen ($p = 0.02$).

Wir haben eine erhöhte Proliferation (Ki67) in *NRAS*-mutierten MM ($p = 0.038$) und CM ($p = 0.049$) im Vergleich mit *NRAS*-Wildtyp Melanomen beobachtet. *NRAS* Mutationen in MM waren mit einer höheren *CDKN1C*, *CXCL9* und Cyclin D3 Expression assoziiert (Wrede et al., 2022).

3.4 Einfluss der Kopienzahlvariation und Promotormethylierung auf die Proteinexpression

Für 69 der 75 (92%) Tumorproben waren DNA Methylierungsdaten in hoher Qualität verfügbar. Die genomweiten Kopienzahlprofile wurden bioinformatisch aus den DNA Methylierungsdaten berechnet.

CDKN2A Deletionen waren die häufigsten numerischen chromosomalen Veränderungen in MM (18/24; 27%) und CM (7/25; 28%). *KIT* Amplifikationen waren signifikant ($p = 0.026$) häufiger in MM (10/44; 23%) und kamen in CM nicht vor.

Der Verlust von *CDKN2A* war erwartungsgemäß mit einer signifikant niedrigeren p16 Expression in MM ($p = 0.007$) und CM ($p = 0.027$) assoziiert. Außerdem haben *CCND1* Amplifikationen zu einer signifikant ($p = 0.013$) höheren Cyclin D1 Expression in MM geführt. Es wurden keine weiteren signifikanten Assoziationen zwischen numerischen chromosomalen Veränderungen und der Proteinexpression beobachtet.

Nachdem Proben mit Amplifikationen oder Deletionen in den jeweiligen Gen-Regionen ausgeschlossen wurden, haben wir den durchschnittlichen Promotor Methylierungsstatus berechnet, der mit den Protein Expressionswerten verglichen wurde. Eine hohe durchschnittliche *CDKN2A* Promotor-Methylierung war mit einer geringeren p16 Expression sowohl in MM ($R = -0.34$; $p = 0.05$), als auch CM ($R = -0.44$; $p = 0.064$) assoziiert. Die statistische Signifikanz wurde also in beiden Gruppen knapp verfehlt. Die kombinierte Analyse von MM und CM zeigte aber eine signifikante Korrelation ($R = -0.42$; $p = 0.003$). Dies deutet auf eine zu kleine Stichprobengröße hin. Für die anderen untersuchten Marker konnten wir keine signifikanten Korrelationen zwischen Promotor Methylierungsstatus und Proteinexpression feststellen (Wrede et al., 2022).

3.5 Überlebensanalyse

Mit dem Cox Regressionsmodell wurden univariate Überlebensanalysen durchgeführt. Wir haben ein signifikant längeres krankheitsspezifisches Überleben in MM Patienten mit hoher PD-1 Expression ($HR = 0.36$; $p = 0.02$) beobachtet. Dies konnte auch mit Hilfe der Kaplan Meier Kurven und einer Logrank Analyse beobachtet werden ($p = 0.009$). Die PD1 Expression war auch in der Untergruppe der nasalen MM ein signifikanter prognostischer Marker ($HR = 0.78$; $\log \text{rank } p = 0.009$). Weitere Assoziationen zwischen Proteinexpression und Überleben wurden nicht beobachtet.

Außerdem haben wir untersucht, ob Kopienzahlvariationen und Promotor Methylierungsraten einen unabhängigen prognostischen Effekt auf das krankheitsspezifische Überleben hatten. Eine hohe PD-L1 Promotor-Methylierungsrate war ein positiver prognostischer Faktor bei MM Patienten ($HR = 0.64$; $p = 0.021$). In CM konnte dies nicht beobachtet werden ($p = 0.26$). Wir haben keine weiteren Assoziationen zwischen Überleben und DNA Methylierungsraten oder Kopienzahlvariationen festgestellt.

Ein komplettes oder partielles Ansprechen auf ICI-Therapie wurde in drei (21%) MM Patienten und in neun (56%) CM Patienten beobachtet ($p = 0.052$). CM Patienten, die mit ICI therapiert wurden, zeigten ein besseres Gesamtüberleben ($p = 0.04$). Für MM

Patienten war dies nicht der Fall ($p = 0.600$). In der kombinierten Gruppe aus MM und CM Patienten gab es eine signifikante Korrelation zwischen dem Ansprechen auf ICI-Therapie und der Expression von PD-L1 ($p = 0.036$) (Wrede et al., 2022).

4. Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Schleimhautmelanome sind eine seltene Unterform der Melanome, die sich besonders durch ihre schlechte klinische Prognose von anderen Melanomen differenzieren (Chang et al., 1998). Wir haben in unserer Studie die Proteinexpression von MM Patienten und CM Patienten verglichen. Dabei haben wir ein automatisiertes IHC Auswertungsprogramm validiert, um die Proteinexpression von Zellzyklus- und Immuncheckpoint-assoziierten Proteinen zu bestimmen. Außerdem haben wir den Einfluss von Kopienzahlvariationen und DNA-Promotermethylierung auf das Expressionsprofil untersucht. Die erhobenen Daten haben wir anschließend mit den klinischen Informationen der Patienten korreliert, um mögliche prognostische oder therapierelevante Faktoren ausfindig zu machen. In der MM Kohorte war die Proteinexpression von CD117, Ki67 und p16 höher als bei der CM Kohorte. Dagegen war die BCL2, Cyclin D1, PD-1 und PD-L1 Expression höher bei CM. Bei der Kopienzahlvariationen-Analyse der Melanome wurden *CDKN2A* Deletionen am häufigsten beobachtet. Die Cyclin D1 Expression korrelierte mit *CCND1* Amplifikationen. In MM wurden häufig *KIT* Amplifikationen gefunden, die aber keinen Einfluss auf die CD117 Expression hatten. Einen positiven prognostischen Wert hatten eine erhöhte PD1 Expression und die vermehrte *PD-L1* Promotormethylierung in der MM Kohorte. Eine erhöhte PD-L1 Expression war ein prädiktiver Marker für das Therapieansprechen auf ICI in der Gesamtgruppe der Melanompatienten.

Das Expressionsmuster der Zellzyklus- und Immuncheckpoint-assoziierten Proteine von CM und MM weist Unterschiede auf, die zum Teil durch Kopienzahlvariationen und Promotormethylierungen bedingt sind. Die eindeutige histopathologische Unterscheidung von MM und CM anhand des Expressionsprofils scheint aktuell noch nicht möglich zu sein. Der p16 Expressionverlust könnte klinisch am ehesten als differenzialdiagnostischer Hinweis auf ein CM genutzt werden. Als prognostische Marker für MM Patienten kommen die PD-1 Expression und die *PD-L1* Promotormethylierung in Frage.

4.2 Immuncheckpointinhibition

Die Entwicklung der Immuncheckpoint-Inhibitoren hat in den letzten Jahren die Prognose von fortgeschrittenen Melanomen verbessert. Allerdings ist die Effektivität der ICI bei MM Patienten noch nicht so eindeutig etabliert wie bei CM. Beispielsweise beschrieben Kuo et al. in einem Fallbericht von 21 Patienten mit fortgeschrittenem MM ein Therapieansprechen auf ICI in 12% der Fälle (Kuo, 2017). Shoushtarie et al. Beschrieben /oder beobachteten/ in einer retrospektiven Kohortenanalyse von 35 MM Patienten ein Therapieansprechen auf ICI von 23% (Shoushtari et al., 2016).

In unseren Kohorten zeigten drei (21%) MM Patienten ein Ansprechen auf ICI. Das Gesamtüberleben von MM Patienten, die mit ICI therapiert wurden, unterschied sich nicht von anders therapierten Patienten. In der CM Kohorte haben wir dagegen einen signifikanten Effekt der ICI auf das Gesamtüberleben beobachtet (Wrede et al., 2022).

Ein möglicher Erklärungsansatz für das bessere Ansprechen auf ICI von CM als von MM Patienten ist die erhöhte Mutationsrate der CM. Auf Grund der häufigen UV-Assoziierten Mutationen weisen CM eine hohe Gesamtmutationslast auf (Akbari et al., 2015). Diese beschreibt die Anzahl der somatischen Mutationen pro DNA Megabase (1 Million Basenpaare) und kann als Surrogatparameter für die Menge an Neoantigenen verwendet werden. Neoantigene sind veränderte Proteine, die durch die somatischen Mutationen der Tumorzellen entstehen, und von dem T-Zell-Rezeptor als fremd erkannt werden können (Klempner et al., 2020).

In einer retrospektiven Untersuchung von CM Tumorproben konnten Johnson et al. zeigen, dass die Gesamtmutationslast positiv mit dem Ansprechen auf ICI und dem Gesamtüberleben korrelierte (Johnson et al., 2016).

4.3 Prädiktive und prognostische Marker

Aktuell fehlen prognostische Marker, um den Krankheitsverlauf von MM Patienten einschätzen zu können. In unserer MM Kohorte hat die PD-1 Expression der Tumordinfiltrierenden Lymphozyten (TILs) mit einem längeren Überleben korreliert. In nasalen MM war dieser prognostische Wert besonders ausgeprägt (Wrede et al., 2022). Bei Triple-negativen Mammakarzinomen und kolorektalen Karzinomen wurde bereits ein

positiver prognostischer Wert der PD-1 Expression der TILs beschrieben (Lee et al., 2016; Ren et al., 2018). In MM sind wir nach unserem Kenntnisstand die ersten, die diesen prognostischen Effekt beobachtet haben. Eine erhöhte Promotormethylierung von PD-L1 war in unserer MM-Kohorte ebenfalls ein positiver prognostischer Marker (Wrede et al., 2022).

Um einschätzen zu können, ob MM Patienten von einer ICI profitieren, ist es wichtig, prädiktive Marker für das Therapieansprechen zu etablieren. Auf Grund von möglichen Nebenwirkungen der ICI, wie beispielsweise Pneumonitis, Hepatitis und verschiedenen Endokrinopathien (Martins et al., 2019), wäre ein prädiktiver Marker zur Indikationsstellung klinisch relevant. In CM konnte eine Assoziation zwischen einer erhöhten PD-L1 Expression der Tumorzellen mit einem besseren Ansprechen auf ICI gezeigt werden (Morrison et al., 2018; Patel and Kurzrock, 2015). In unserer Kohorte war die PD-L1 Expression der MM Patienten niedriger als bei der CM Kohorte (Wrede et al., 2022). Dies stimmt mit Ergebnissen von Thierauf et al. überein, die eine niedrigere PD-L1 Expression bei MM Patienten (13% von 23) als bei CM Patienten (100% von 9) beschrieben haben (Thierauf et al., 2015). In der kombinierten Gruppe der MM und CM Kohorte konnten wir eine Korrelation zwischen ICI Therapieansprechen und PD-L1 Expression feststellen. In Zukunft benötigt es größere, mit ICI behandelte MM Kohorten, um die die PD-L1 Expression als prädiktiven Marker für das Therapieansprechen auf ICI zu etablieren.

Die Expression von CXCL9 wurde von House et al. als prädiktiver Marker für die therapeutische Effektivität von ICI-Therapie vorgeschlagen (House et al., 2020). Soweit uns bekannt ist, sind wir die ersten, die die Expression von CXCL9 in MM untersucht haben (Wrede et al., 2022). CXCL9 ist ein Chemokin-Ligand, der die chemotaktische Rekrutierung von TILs vermittelt (Gorbachev et al., 2007). In Ovarialkarzinomen wurde ein positiver prognostischer Effekt der CXCL9-Expression und eine Korrelation mit der Menge an TILs beschrieben (Bronger et al., 2016). Tumeh et al. haben in einer Kohorte von metastasierten CM Patienten eine positive Korrelation von CD8+ TILs und dem Anti-PD-1 Therapieansprechen nachgewiesen (Tumeh et al., 2014). In einer Metaanalyse von Fu et al. wurde beschrieben, dass die Anwesenheit von TILs in CM und Aderhautmelanomen einen positiven Einfluss auf die Überlebensdauer hat (Fu et al., 2019). Es wäre möglich, dass die beobachteten positiven prognostischen Effekte der

CXCL9 Expression durch die Rekrutierung von TILs vermittelt werden. In unserer MM Kohorte war die signifikant erhöhte CXCL9 Expression von nasalen MM im Vergleich zu MM der anderen Lokalisationen auffällig (Wrede et al., 2022). Dies ist interessant, da der positive prognostische Effekt der PD-1 Expression der TILs in nasalen Melanomen ebenfalls besonders stark war. Eine mögliche Hypothese ist, dass nasale MM, verglichen mit MM der anderen Lokalisationen, besonders immunogen sind und deshalb eine erhöhte Expression von immunoregulatorischen Proteinen induzieren. Eine Korrelation zwischen der Expression von CXCL9 und dem Gesamtüberleben oder dem Ansprechen auf ICI konnten wir in unserer Kohorte nicht feststellen, wobei für entsprechende sichere Rückschlüsse eine größere Kohorte erforderlich wäre (Wrede et al., 2022).

4.4 Differenzialdiagnostische Marker

In einer anderen Studie haben wir die Unterschiede der Methylierungsprofile von MM und CM untersucht. Diese zeigten große Ähnlichkeiten und lassen eine Differenzierung von MM und CM vermutlich nicht zu (Jurmeister et al., 2021). Obwohl MM und CM verschiedene Proteine in unterschiedlichen Mengen exprimiert haben, scheint auch eine Unterscheidung von MM und CM anhand des Expressionsprofils der untersuchten Proteine aktuell noch nicht möglich zu sein, da sich viele Überschneidungen zeigten. Der vielversprechendste Marker, der die pathologische Differenzierung erleichtern könnte, ist p16. Der komplette Expressionsverlust von p16 wurde häufiger in CM als in MM beobachtet (Wrede et al., 2022). Wenn ein Melanom in der Schleimhaut entdeckt wird, könnte eine fehlende Expression von p16 als Hinweis auf einen metastatischen Ursprung dienen.

Obwohl sich diese unterschiedlichen Expressionsmuster von p16 zeigten, hatten *CDKN2A* Deletionen in MM und CM eine ähnliche Häufigkeit. *CDKN2A* Promotor-Hypermethylierungen wurden häufiger in CM als in MM beobachtet, was zu der insgesamt höheren Expression von p16 in MM beiträgt.

Auffällig war, dass ungefähr 15% der MM und CM die keine p16 Expression aufwiesen, keine zugrundeliegenden Veränderungen im Mutationsprofil zeigten (Wrede et al., 2022). Dies weist darauf hin, dass weitere Mechanismen eine Rolle bei der Suppression von p16 spielen. Beispielsweise könnten post-translationale Mechanismen, wie microRNAs, zu

der verminderten Expression beitragen (Huntzinger and Izaurrealde, 2011). Es verbleibt also der Bedarf nach eindeutigen differenzialdiagnostischen Markern, um zwischen MM und CM zu unterscheiden.

4.5 Stärken und Schwächen der Studie

Eine Limitation der Arbeit ist die Größe der Kohorte. Da es sich bei MM um eine sehr seltene Erkrankung handelt, ist es schwierig, größere Kohorten von Patienten zusammenzustellen. Dabei ist unsere Kohortengröße von 47 MM Patienten vergleichbar zu ähnlichen Untersuchungen, die in der Vergangenheit durchgeführt wurden. Nur wenige Studien, wie beispielsweise die genetische Untersuchung von 213 MM Patienten von Xu et al., konnten deutlich größere MM-Kohorten aufweisen (Xu et al., 2019).

Eine weitere Limitation ist der größere Anteil von weiblichen Patienten in unserer MMKohorte im Vergleich zu der CM-Kohorte. Dies ist durch die höhere Prävalenz von genitalen MM bei Frauen und CM bei Männern zu erklären (Goldstein and Tucker, 2001; Rastrelli et al., 2014).

Eine Stärke unserer Studie ist die Vielfalt der angewandten Methoden, um die Melanome zu charakterisieren. Durch die Untersuchung häufiger Mutationen, Kopienzahlvariationen und Methylierungsprofile, konnte der Einfluss von genetischen und epigenetischen Veränderungen auf die Proteinexpression untersucht werden. Dies führt zu einem vollständigeren Verständnis der Tumorbilogie als die alleinige Charakterisierung der Proteinexpression. Allerdings erlaubt die IHC Färbung nur eine semiquantitative Expression der exprimierten Proteine. Es wäre interessant, ob sich unsere Ergebnisse mit anderen Methoden, beispielsweise massenspektrometrie-basierter Proteomik bestätigen lassen. Positiv hervorzuheben ist die Auswertung der IHC Färbungen mit dem digitalen Bildanalyseprogramm QuPath, welches wir erst bei nukleären und zytoplasmatischen Färbungen im Vergleich zur manuellen Auswertung etabliert haben und anschließend zur Auswertung der Färbungen genutzt haben. Durch die automatisierte Auswertung konnten wir diese objektivieren und einen möglichen Bias durch den Auswertenden ausschließen.

4.6 Implikationen für Praxis und zukünftige Forschung

Es wäre für zukünftige Studien interessant, ob sich die beobachteten prognostischen und prädiktiven Marker auch in größeren Kohorten bestätigen lassen. Die Kohortengröße limitiert auch die Subgruppenanalyse von MM der verschiedenen Ursprungslokalisationen. Dies ist in Bezug auf die personalisierte Therapie relevant, da MM mit verschiedenen Ursprungslokalisationen ein unterschiedliches Therapieansprechen zeigen könnten. Beispielsweise könnte die auf Basis unserer Ergebnisse von uns postulierte gesteigerte Immunogenität der nasalen MM zu einem besseren Therapieansprechen auf ICI führen. Eventuell könnten die nötigen Fallzahlen für eine Analyse der MM Subgruppen durch eine Metaanalyse erreicht werden.

Ein vielversprechendes Forschungsgebiet ist die Charakterisierung der TILs und ihr Einfluss auf die Eigenschaften von Melanomen. Die genauere molekularbiologische Untersuchung der TILs ist ein möglicher Ansatzpunkt für zukünftige Forschungsprojekte. Dabei könnte beispielsweise die Durchflusszytometrie angewandt werden, um isolierte TILs genauer zu untersuchen.

Weiterhin besteht außerdem der Bedarf nach differenzialdiagnostischen Markern, die eine Unterscheidung von MM und CM durch den Pathologen ermöglicht. In zukünftigen Studien könnte die Expression von weiteren Proteinen untersucht werden. Aber auch die genauere Untersuchung der Genome von MM und CM könnte zielführend sein.

5. Schlussfolgerungen

Zusammenfassend haben wir eine umfassende Untersuchung der Proteinexpression von zellzyklusassoziierten und immunomodulatorischen Proteinen in MM und CM durchgeführt. Dabei sind wir auf ihre regulierenden Faktoren eingegangen und haben die Ergebnisse mit den klinischen Daten korreliert. Unsere Ergebnisse heben die mögliche klinische Bedeutung der p16 Expression als differentialdiagnostischen Marker und der PD-1 Expression der TILs als prognostischen Marker für MM hervor. Sie liefert verschiedene Ansatzpunkte für zukünftige Studien und wirft interessante Fragestellungen. Beispielsweise sind die immunologischen Unterschiede von MM der verschiedenen Lokalisationen und der prognostische Effekt der PD-1 Expression Themengebiete, an die angeknüpft werden können. Unsere Studie bietet Einblicke in die Biologie eines noch unzureichend charakterisierten Subtyps des Melanoms und trägt zu der Abgrenzung von MM von CM bei.

Literaturverzeichnis

Akbani, R., Akdemir, K.C., Aksoy, B.A., Albert, M., Ally, A., Amin, S.B., Arachchi, H., Arora, A., Auman, J.T., Ayala, B., Baboud, J., Balasundaram, M., Balu, S., Barnabas, N., Bartlett, J., Bartlett, P., Bastian, B.C., Baylin, S.B., Behera, M., Belyaev, D., Benz, C., Bernard, B., Beroukhim, R., Bir, N., Black, A.D., Bodenheimer, T., Boice, L., Boland, G.M., Bono, R., Bootwalla, M.S., Bosenberg, M., Bowen, J., Bowlby, R., Bristow, C.A., Brockway-Lunardi, L., Brooks, D., Brzezinski, J., Bshara, W., Buda, E., Burns, W.R., Butterfield, Y.S.N., Button, M., Calderone, T., Cappellini, G.A., Carter, C., Carter, S.L., Cherney, L., Cherniack, A.D., Chevalier, A., Chin, L., Cho, J., Cho, R.J., Choi, Y.-L., Chu, A., Chudamani, S., Cibulskis, K., Ciriello, G., Clarke, A., Coons, S., Cope, L., Crain, D., Curley, E., Danilova, L., D'Atri, S., Davidsen, T., Davies, M.A., Delman, K.A., Demchok, J.A., Deng, Q.A., Deribe, Y.L., Dhalla, N., Dhir, R., DiCara, D., Dinikin, M., Dubina, M., Ebrom, J.S., Egea, S., Eley, G., Engel, J., Eschbacher, J.M., Fedosenko, K.V., Felau, I., Fennell, T., Ferguson, M.L., Fisher, S., Flaherty, K.T., Frazer, S., Frick, J., Fulidou, V., Gabriel, S.B., Gao, J., Gardner, J., Garraway, L.A., Gastier-Foster, J.M., Gaudioso, C., Gehlenborg, N., Genovese, G., Gerken, M., Gershenwald, J.E., Getz, G., Gomez-Fernandez, C., Gribbin, T., Grimsby, J., Gross, B., Guin, R., Gutschner, T., Hadjipanayis, A., Halaban, R., Hanf, B., Haussler, D., Haydu, L.E., Hayes, D.N., Hayward, N.K., Heiman, D.I., Herbert, L., Herman, J.G., Hersey, P., Hoadley, K.A., Hodis, E., Holt, R.A., Hoon, D.S.B., Hoppough, S., Hoyle, A.P., Huang, F.W., Huang, M., Huang, S., Hutter, C.M., Ibbis, M., Iype, L., Jacobsen, A., Jakrot, V., Janning, A., Jeck, W.R., Jefferys, S.R., Jensen, M.A., Jones, C.D., Jones, S.J.M., Ju, Z., Kakavand, H., Kang, H., Kefford, R.F., Khuri, F.R., Kim, J., Kirkwood, J.M., Klode, J., Korkut, A., Korski, K., Krauthammer, M., Kucherlapati, R., Kwong, L.N., Kycler, W., Ladanyi, M., Lai, P.H., Laird, P.W., Lander, E., Lawrence, M.S., Lazar, A.J., Łażniak, R., Lee, D., Lee, J.E., Lee, J., Lee, K., Lee, S., Lee, W., Leporowska, E., Leraas, K.M., Li, H.I., Lichtenberg, T.M., Lichtenstein, L., Lin, P., Ling, S., Liu, J., Liu, O., Liu, W., Long, G.V., Lu, Y., Ma, S., Ma, Y., Mackiewicz, A., Mahadeshwar, H.S., Malke, J., Mallery, D., Manikhas, G.M., Mann, G.J., Marra, M.A., Matejka, B., Mayo, M., Mehrabi, S., Meng, S., Meyerson, M., Mieczkowski, P.A., Miller, J.P., Miller, M.L., Mills, G.B., Moiseenko, F., Moore, R.A., Morris, S., Morrison, C., Morton, D., Moschos, S., Mose, L.E., Muller, F.L., Mungall, A.J., Murawa, D., Murawa, P., Murray, B.A., Nezi, L., Ng, S., Nicholson, D., Noble, M.S., Osunkoya, A., Owonikoko, T.K., Ozenberger, B.A., Pagani, E., Paklina, O.V., Pantazi, A., Parfenov, M., Parfitt, J., Park, P.J., Park, W.-Y., Parker, J.S., Passarelli, F., Penny, R., Perou, C.M., Pihl, T.D., Potapova, O., Prieto, V.G., Protopopov, A., Quinn, M.J., Radenbaugh, A., Rai, K., Ramalingam, S.S., Raman, A.T., Ramirez, N.C., Ramirez, R., Rao, U., Rathmell, W.K., Ren, X., Reynolds, S.M., Roach, J., Robertson, A.G., Ross, M.I., Roszik, J., Russo, G., Saksena, G., Saller, C., Samuels, Y., Sander, Chris, Sander, Cindy, Sandusky, G., Santoso, N., Saul, M., Saw, R.P.M., Schadendorf, D., Schein, J.E., Schultz, N., Schumacher, S.E., Schwallier, C., Scolyer, R.A., Seidman, J., Sekhar, P.C., Sekhon, H.S., Senbabaoglu, Y., Seth, S., Shannon, K.F., Sharpe, S., Sharpless, N.E., Shaw, K.R.M., Shelton, C., Shelton, T., Shen, R., Sheth, M., Shi, Y., Shiau, C.J., Shmulevich, I., Sica, G.L., Simons, J.V., Sinha, R., Sipahimalani, P., Sofia, H.J.,

- Soloway, M.G., Song, X., Sougnez, C., Spillane, A.J., Spychala, A., Stretch, J.R., Stuart, J., Suchorska, W.M., Sucker, A., Sumer, S.O., Sun, Y., Synott, M., Tabak, B., Tabler, T.R., Tam, A., Tan, D., Tang, J., Tarnuzzer, R., Tarvin, K., Tatka, H., Taylor, B.S., Teresiak, M., Thiessen, N., Thompson, J.F., Thorne, L., Thorsson, V., Trent, J.M., Triche, T.J., Tsai, K.Y., Tsou, P., Van Den Berg, D.J., Van Allen, E.M., Veluvolu, U., Verhaak, R.G., Voet, D., Voronina, O., Walter, V., Walton, J.S., Wan, Y., Wang, Y., Wang, Z., Waring, S., Watson, I.R., Weinhold, N., Weinstein, J.N., Weisenberger, D.J., White, P., Wilkerson, M.D., Wilmott, J.S., Wise, L., Wiznerowicz, M., Woodman, S.E., Wu, C.-J., Wu, C.-C., Wu, J., Wu, Y., Xi, R., Xu, A.W., Yang, D., Yang, Liming, Yang, Lixing, Zack, T.I., Zenklusen, J.C., Zhang, H., Zhang, J., Zhang, W., Zhao, X., Zhu, J., Zhu, K., Zimmer, L., Zmuda, E., Zou, L., 2015. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell* 161, 1681–1696. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.044>
- Albertson, D.G., 2006. Gene amplification in cancer. *Trends in Genetics* 22, 447–455. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2006.06.007>
- Avruch, J., 2001. Ras Activation of the Raf Kinase: Tyrosine Kinase Recruitment of the MAP Kinase Cascade. *Recent Progress in Hormone Research* 56, 127–156. <https://doi.org/10.1210/rp.56.1.127>
- Axeix, T., Hedin, C.A., 1982. Epidemiologic study of excessive oral melanin pigmentation with special reference to the influence of tobacco habits. *Eur J Oral Sci* 90, 434–442. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.1982.tb00760.x>
- Bai, X., Mao, L.L., Chi, Z.H., Sheng, X.N., Cui, C.L., Kong, Y., Dai, J., Wang, X., Li, S.M., Tang, B.X., Lian, B., Zhou, L., Yan, X.Q., Guo, J., Si, L., 2017. BRAF inhibitors: efficacious and tolerable in BRAF-mutant acral and mucosal melanoma. *neo* 64, 626–632. https://doi.org/10.4149/neo_2017_419
- Bankhead, P., Loughrey, M.B., Fernández, J.A., Dombrowski, Y., McArt, D.G., Dunne, P.D., McQuaid, S., Gray, R.T., Murray, L.J., Coleman, H.G., James, J.A., SaltoTellez, M., Hamilton, P.W., 2017. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep* 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17204-5>
- Barrett, A.W., Raja, A.M.H., 1997. The immunohistochemical identification of human oral mucosal melanocytes. *Archives of Oral Biology* 42, 77–81. [https://doi.org/10.1016/S0003-9969\(96\)00113-6](https://doi.org/10.1016/S0003-9969(96)00113-6)
- Bohl, S.R., Bullinger, L., Rücker, F.G., 2018. Epigenetic therapy: azacytidine and decitabine in acute myeloid leukemia. *Expert Review of Hematology* 11, 361–371. <https://doi.org/10.1080/17474086.2018.1453802>
- Bronger, H., Singer, J., Windmüller, C., Reuning, U., Zech, D., Delbridge, C., Dorn, J., Kiechle, M., Schmalfeldt, B., Schmitt, M., Avril, S., 2016. CXCL9 and CXCL10 predict survival and are regulated by cyclooxygenase inhibition in advanced serous ovarian cancer. *Br J Cancer* 115, 553–563. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.172>
- Chang, A.E., Karnell, L.H., Menck, H.R., 1998. The National Cancer Data Base report on cutaneous and noncutaneous melanoma. *Cancer* 83, 1664–1678. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0142\(19981015\)83:8<1664::AIDCNCR23>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0142(19981015)83:8<1664::AIDCNCR23>3.0.CO;2-G)
- Chapman, P.B., Robert, C., Larkin, J., Haanen, J.B., Ribas, A., Hogg, D., Hamid, O., Ascierto, P.A., Testori, A., Lorigan, P.C., Dummer, R., Sosman, J.A., Flaherty, K.T., Chang, I., Coleman, S., Caro, I., Hauschild, A., McArthur, G.A., 2017. Vemurafenib in patients with BRAFV600 mutation-positive metastatic melanoma: final overall survival results of the randomized BRIM-3 study. *Ann Oncol* 28, 2581–2587. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx339>

- Chen, D.S., Irving, B.A., Hodi, F.S., 2012. Molecular Pathways: Next-Generation Immunotherapy—Inhibiting Programmed Death-Ligand 1 and Programmed Death-1. *Clin Cancer Res* 18, 6580–6587. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-1362>
- Cheng, Y., Tian, H., 2017. Current Development Status of MEK Inhibitors. *Molecules* 22, E1551. <https://doi.org/10.3390/molecules22101551>
- Colombo, S., Berlin, I., Delmas, V., Larue, L., 2011. Classical and Nonclassical Melanocytes in Vertebrates, in: Borovanský, J., Riley, P.A. (Eds.), *Melanins and Melanosomes*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, pp. 21–61. <https://doi.org/10.1002/9783527636150.ch2>
- Cooper, D.N., Nature Publishing Group (Eds.), 2003. *Nature encyclopedia of the human genome*. Nature Pub. Group, London ; New York.
- Curtin, J.A., Fridlyand, J., Kageshita, T., Patel, H.N., Busam, K.J., Kutzner, H., Cho, K.H., Aiba, S., Bröcker, E.-B., LeBoit, P.E., Pinkel, D., Bastian, B.C., 2005. Distinct Sets of Genetic Alterations in Melanoma. *New England Journal of Medicine* 353, 2135–2147. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa050092>
- Das, P.M., Singal, R., 2004. DNA Methylation and Cancer. *JCO* 22, 4632–4642. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.07.151>
- Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., Bottomley, W., Davis, N., Dicks, E., Ewing, R., Floyd, Y., Gray, K., Hall, S., Hawes, R., Hughes, J., Kosmidou, V., Menzies, A., Mould, C., Parker, A., Stevens, C., Watt, S., Hooper, S., Wilson, R., Jayatilake, H., Gusterson, B.A., Cooper, C., Shipley, J., Hargrave, D., Pritchard-Jones, K., Maitland, N., Chenevix-Trench, G., Riggins, G.J., Bigner, D.D., Palmieri, G., Cossu, A., Flanagan, A., Nicholson, A., Ho, J.W.C., Leung, S.Y., Yuen, S.T., Weber, B.L., Seigler, H.F., Darrow, T.L., Paterson, H., Marais, R., Marshall, C.J., Wooster, R., Stratton, M.R., Futreal, P.A., 2002a. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417, 949–954. <https://doi.org/10.1038/nature00766>
- Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., Bottomley, W., Davis, N., Dicks, E., Ewing, R., Floyd, Y., Gray, K., Hall, S., Hawes, R., Hughes, J., Kosmidou, V., Menzies, A., Mould, C., Parker, A., Stevens, C., Watt, S., Hooper, S., Wilson, R., Jayatilake, H., Gusterson, B.A., Cooper, C., Shipley, J., Hargrave, D., Pritchard-Jones, K., Maitland, N., Chenevix-Trench, G., Riggins, G.J., Bigner, D.D., Palmieri, G., Cossu, A., Flanagan, A., Nicholson, A., Ho, J.W.C., Leung, S.Y., Yuen, S.T., Weber, B.L., Seigler, H.F., Darrow, T.L., Paterson, H., Marais, R., Marshall, C.J., Wooster, R., Stratton, M.R., Futreal, P.A., 2002b. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417, 949–954. <https://doi.org/10.1038/nature00766>
- Dummer, R., Schadendorf, D., Ascierto, P.A., Arance, A., Dutriaux, C., Di Giacomo, A.M., Rutkowski, P., Del Vecchio, M., Gutzmer, R., Mandalà, M., Thomas, L., Demidov, L., Garbe, C., Hogg, D., Liskay, G., Queirolo, P., Wasserman, E., Ford, J., Weill, M., Sirulnik, L.A., Jehl, V., Bozón, V., Long, G.V., Flaherty, K., 2017. Binimetinib versus dacarbazine in patients with advanced NRAS-mutant melanoma (NEMO): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *The Lancet Oncology* 18, 435–445. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30180-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30180-8)
- Eckerle Mize, D., Bishop, M., Resse, E., Sluzevich, J., 2009. Familial Atypical Multiple Mole Melanoma Syndrome, in: Riegert-Johnson, D.L., Boardman, L.A., Hefferon,

- T., Roberts, M. (Eds.), *Cancer Syndromes*. National Center for Biotechnology Information (US), Bethesda (MD).
- Fu, Q., Chen, N., Ge, C., Li, R., Li, Z., Zeng, B., Li, C., Wang, Y., Xue, Y., Song, X., Li, H., Li, G., 2019. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Oncolmmunology* 8, e1593806. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2019.1593806>
- Fu, S., Hu, W., Iyer, R., Kavanagh, J.J., Coleman, R.L., Levenback, C.F., Sood, A.K., Wolf, J.K., Gershenson, D.M., Markman, M., Hennessy, B.T., Kurzrock, R., Bast, R.C., 2011. Phase 1b-2a study to reverse platinum resistance through use of a hypomethylating agent, azacitidine, in patients with platinum-resistant or platinumrefractory epithelial ovarian cancer. *Cancer* 117, 1661–1669. <https://doi.org/10.1002/cncr.25701>
- Furney, S.J., Turajlic, S., Stamp, G., Nohadani, M., Carlisle, A., Thomas, J.M., Hayes, A., Strauss, D., Gore, M., van den Oord, J., Larkin, J., Marais, R., 2013. Genome sequencing of mucosal melanomas reveals that they are driven by distinct mechanisms from cutaneous melanoma. *J Pathol* 230, 261–269. <https://doi.org/10.1002/path.4204>
- Garutti, M., Targato, G., Buriolla, S., Palmero, L., Minisini, A.M., Puglisi, F., 2021. CDK4/6 Inhibitors in Melanoma: A Comprehensive Review. *Cells* 10, 1334. <https://doi.org/10.3390/cells10061334>
- Gilbert, W., 1978. Why genes in pieces? *Nature* 271, 501–501. <https://doi.org/10.1038/271501a0>
- Goldstein, A.M., Tucker, M.A., 2001. Genetic Epidemiology of Cutaneous Melanoma: A Global Perspective. *Arch Dermatol* 137. <https://doi.org/10.1001/archderm.137.11.1493>
- Gorbachev, A.V., Kobayashi, H., Kudo, D., Tannenbaum, C.S., Finke, J.H., Shu, S., Farber, J.M., Fairchild, R.L., 2007. CXC Chemokine Ligand 9/Monokine Induced by IFN- γ Production by Tumor Cells Is Critical for T Cell-Mediated Suppression of Cutaneous Tumors. *J Immunol* 178, 2278–2286. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.4.2278>
- Hayward, N.K., Wilmott, J.S., Waddell, Nicola, Johansson, P.A., Field, M.A., Nones, K., Patch, A.-M., Kakavand, H., Alexandrov, L.B., Burke, H., Jakrot, V., Kazakoff, S., Holmes, O., Leonard, C., Sabarinathan, R., Mularoni, L., Wood, S., Xu, Q., Waddell, Nick, Tembe, V., Pupo, G.M., De Paoli-Iseppi, R., Vilain, R.E., Shang, P., Lau, L.M.S., Dagg, R.A., Schramm, S.-J., Pritchard, A., Dutton-Regester, K., Newell, F., Fitzgerald, A., Shang, C.A., Grimmond, S.M., Pickett, H.A., Yang, J.Y., Stretch, J.R., Behren, A., Kefford, R.F., Hersey, P., Long, G.V., Cebon, J., Shackleton, M., Spillane, A.J., Saw, R.P.M., López-Bigas, N., Pearson, J.V., Thompson, J.F., Scolyer, R.A., Mann, G.J., 2017. Whole-genome landscapes of major melanoma subtypes. *Nature* 545, 175–180. <https://doi.org/10.1038/nature22071>
- Hilke, F.J., Sinnberg, T., Gschwind, A., Niessner, H., Demidov, G., Amaral, T., Ossowski, S., Bonzheim, I., Röcken, M., Riess, O., Garbe, C., Schroeder, C., Forschner, A., 2020. Distinct Mutation Patterns Reveal Melanoma Subtypes and Influence Immunotherapy Response in Advanced Melanoma Patients. *Cancers* 12, 2359. <https://doi.org/10.3390/cancers12092359>
- Holmstrom, M., Lund, V.J., 1991. Malignant melanomas of the nasal cavity after occupational exposure to formaldehyde. *Occupational and Environmental Medicine* 48, 9–11. <https://doi.org/10.1136/oem.48.1.9>

- House, I.G., Savas, P., Lai, J., Chen, A.X.Y., Oliver, A.J., Teo, Z.L., Todd, K.L., Henderson, M.A., Giuffrida, L., Petley, E.V., Sek, K., Mardiana, S., Gide, T.N., Quek, C., Scolyer, R.A., Long, G.V., Wilmott, J.S., Loi, S., Darcy, P.K., Beavis, P.A., 2020. Macrophage-Derived CXCL9 and CXCL10 Are Required for Antitumor Immune Responses Following Immune Checkpoint Blockade. *Clin Cancer Res* 26, 487–504. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-1868>
- Huntzinger, E., Izaurralde, E., 2011. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet* 12, 99–110. <https://doi.org/10.1038/nrg2936>
- Jhappan, C., Noonan, F.P., Merlino, G., 2003. Ultraviolet radiation and cutaneous malignant melanoma. *Oncogene* 22, 3099–3112. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206450>
- Johnson, D.B., Frampton, G.M., Rioth, M.J., Yusko, E., Xu, Y., Guo, X., Ennis, R.C., Fabrizio, D., Chalmers, Z.R., Greenbowe, J., Ali, S.M., Balasubramanian, S., Sun, J.X., He, Y., Frederick, D.T., Puzanov, I., Balko, J.M., Cates, J.M., Ross, J.S., Sanders, C., Robins, H., Shyr, Y., Miller, V.A., Stephens, P.J., Sullivan, R.J., Sosman, J.A., Lovly, C.M., 2016. Targeted Next Generation Sequencing Identifies Markers of Response to PD-1 Blockade. *Cancer Immunol Res* 4, 959–967. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-16-0143>
- Jurmeister, P., Wrede, N., Hoffmann, I., Vollbrecht, C., Heim, D., Hummel, M., Wolkenstein, P., Koch, I., Heynol, V., Schmitt, W.D., Thieme, A., Teichmann, D., Sers, C., Deimling, A., Thierauf, J.C., Laffert, M., Klauschen, F., Capper, D., 2021. Mucosal melanomas of different anatomic sites share a common global DNA methylation profile with cutaneous melanoma but show location-dependent patterns of genetic and epigenetic alterations. *J. Pathol.* path.5808. <https://doi.org/10.1002/path.5808>
- Kassambara, A., 2019. ggcorrplot: Visualization of a Correlation Matrix using “ggplot2.”
- Kastan, M.B., Bartek, J., 2004. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432, 316–323. <https://doi.org/10.1038/nature03097>
- Klempner, S.J., Fabrizio, D., Bane, S., Reinhart, M., Peoples, T., Ali, S.M., Sokol, E.S., Frampton, G., Schrock, A.B., Anhorn, R., Reddy, P., 2020. Tumor Mutational Burden as a Predictive Biomarker for Response to Immune Checkpoint Inhibitors: A Review of Current Evidence. *The Oncologist* 25, e147–e159. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2019-0244>
- Kuo, J.C., 2017. Immune checkpoint inhibitors in the treatment of advanced mucosal melanoma. *Melanoma Manag* 4, 161–167. <https://doi.org/10.2217/mmt-2017-0014>
- Laird, P.W., 2010. Principles and challenges of genome-wide DNA methylation analysis. *Nat Rev Genet* 11, 191–203. <https://doi.org/10.1038/nrg2732>
- Larkin, J., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Grob, J.-J., Rutkowski, P., Lao, C.D., Cowey, C.L., Schadendorf, D., Wagstaff, J., Dummer, R., Ferrucci, P.F., Smylie, M., Hogg, D., Hill, A., Márquez-Rodas, I., Haanen, J., Guidoboni, M., Maio, M., Schöffski, P., Carlino, M.S., Lebbé, C., McArthur, G., Ascierto, P.A., Daniels, G.A., Long, G.V., Bastholt, L., Rizzo, J.I., Balogh, A., Moshyk, A., Hodi, F.S., Wolchok, J.D., 2019. Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *New England Journal of Medicine* 381, 1535–1546. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1910836>

- Lee, L.H., Cavalcanti, M.S., Segal, N.H., Hechtman, J.F., Weiser, M.R., Smith, J.J., Garcia-Aguilar, J., Sadot, E., Ntiamoah, P., Markowitz, A.J., Shike, M., Stadler, Z.K., Vakiani, E., Klimstra, D.S., Shia, J., 2016. Patterns and prognostic relevance of PD-1 and PD-L1 expression in colorectal carcinoma. *Mod Pathol* 29, 1433–1442. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2016.139>
- Long, G.V., Stroyakovskiy, D., Gogas, H., Levchenko, E., de Braud, F., Larkin, J., Garbe, C., Jouary, T., Hauschild, A., Grob, J.-J., Chiarion-Sileni, V., Lebbe, C., Mandalà, M., Millward, M., Arance, A., Bondarenko, I., Haanen, J.B.A.G., Hansson, J., Utikal, J., Ferraresi, V., Kovalenko, N., Mohr, P., Probachai, V., Schadendorf, D., Nathan, P., Robert, C., Ribas, A., DeMarini, D.J., Irani, J.G., Swann, S., Legos, J.J., Jin, F., Mookerjee, B., 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, 444–451. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60898-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60898-4)
- Martins, F., Sofiya, L., Sykiotis, G.P., Lamine, F., Maillard, M., Fraga, M., Shabafrouz, K., Ribi, C., Cairoli, A., Guex-Crosier, Y., Kuntzer, T., Michielin, O., Peters, S., Coukos, G., Spertini, F., Thompson, J.A., Obeid, M., 2019. Adverse effects of immunecheckpoint inhibitors: epidemiology, management and surveillance. *Nat Rev Clin Oncol* 16, 563–580. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0218-0>
- Matos, L.L. de, Trufelli, D.C., de Matos, M.G.L., da Silva Pinhal, M.A., 2010. Immunohistochemistry as an important tool in biomarkers detection and clinical practice. *Biomark Insights* 5, 9–20. <https://doi.org/10.4137/bmi.s2185>
- Morrison, C., Pabla, S., Conroy, J.M., Nesline, M.K., Glenn, S.T., Dressman, D., Papanicolau-Sengos, A., Burgher, B., Andreas, J., Giamo, V., Qin, M., Wang, Y., Lenzo, F.L., Omilian, A., Bshara, W., Zibelman, M., Ghatalia, P., Dragnev, K., Shirai, K., Madden, K.G., Tafe, L.J., Shah, N., Kasuganti, D., de la Cruz-Merino, L., Araujo, I., Saenger, Y., Bogardus, M., Villalona-Calero, M., Diaz, Z., Day, R., Eisenberg, M., Anderson, S.M., Puzanov, I., Galluzzi, L., Gardner, M., Ernstoff, M.S., 2018. Predicting response to checkpoint inhibitors in melanoma beyond PD-L1 and mutational burden. *J. Immunotherapy Cancer* 6, 32. <https://doi.org/10.1186/s40425018-0344-8>
- Newell, F., Kong, Y., Wilmott, J.S., Johansson, P.A., Ferguson, P.M., Cui, C., Li, Z., Kazakoff, S.H., Burke, H., Dodds, T.J., Patch, A.-M., Nones, K., Tembe, V., Shang, P., van der Weyden, L., Wong, K., Holmes, O., Lo, S., Leonard, C., Wood, S., Xu, Q., Rawson, R.V., Mukhopadhyay, P., Dummer, R., Levesque, M.P., Jönsson, G., Wang, X., Yeh, I., Wu, H., Joseph, N., Bastian, B.C., Long, G.V., Spillane, A.J., Shannon, K.F., Thompson, J.F., Saw, R.P.M., Adams, D.J., Si, L., Pearson, J.V., Hayward, N.K., Waddell, N., Mann, G.J., Guo, J., Scolyer, R.A., 2019. Whole-genome landscape of mucosal melanoma reveals diverse drivers and therapeutic targets. *Nat Commun* 10, 3163. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11107-x>
- Patel, S.P., Kurzrock, R., 2015. PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy. *Mol Cancer Ther* 14, 847–856. <https://doi.org/10.1158/15357163.MCT-14-0983>
- Peyressatre, M., Prével, C., Pellerano, M., Morris, M.C., 2015. Targeting cyclin-dependent kinases in human cancers: from small molecules to Peptide inhibitors. *Cancers (Basel)* 7, 179–237. <https://doi.org/10.3390/cancers7010179>

- Postow, M.A., Hamid, O., Carvajal, R.D., 2012. Mucosal Melanoma: Pathogenesis, Clinical Behavior, and Management. *Curr Oncol Rep* 14, 441–448. <https://doi.org/10.1007/s11912-012-0244-x>
- Rastrelli, M., Tropea, S., Rossi, C.R., Alaibac, M., 2014. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. *In Vivo* 28, 1005–1011.
- Ren, X., Wu, H., Lu, J., Zhang, Y., Luo, Y., Xu, Q., Shen, S., Liang, Z., 2018. PD1 protein expression in tumor infiltrated lymphocytes rather than PDL1 in tumor cells predicts survival in triple-negative breast cancer. *Cancer Biology & Therapy* 19, 373–380. <https://doi.org/10.1080/15384047.2018.1423919>
- Romagosa, C., Simonetti, S., López-Vicente, L., Mazo, A., Lleonart, M.E., Castellvi, J., Ramon y Cajal, S., 2011. p16Ink4a overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors. *Oncogene* 30, 2087–2097. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.614>
- Sanchez-Vega, F., Mina, M., Armenia, J., Chatila, W.K., Luna, A., La, K.C., Dimitriadoy, S., Liu, D.L., Kantheti, H.S., Saghafinia, S., Chakravarty, D., Daian, F., Gao, Q., Bailey, M.H., Liang, W.-W., Foltz, S.M., Shmulevich, I., Ding, L., Heins, Z., Ochoa, A., Gross, B., Gao, J., Zhang, Hongxin, Kundra, R., Kandoth, C., Bahceci, I., Dervishi, L., Dogrusoz, U., Zhou, W., Shen, H., Laird, P.W., Way, G.P., Greene, C.S., Liang, H., Xiao, Y., Wang, C., Iavarone, A., Berger, A.H., Bivona, T.G., Lazar, A.J., Hammer, G.D., Giordano, T., Kwong, L.N., McArthur, G., Huang, C., Tward, A.D., Frederick, M.J., McCormick, F., Meyerson, M., Van Allen, E.M., Cherniack, A.D., Ciriello, G., Sander, C., Schultz, N., Caesar-Johnson, S.J., Demchok, J.A., Felau, I., Kasapi, M., Ferguson, M.L., Hutter, C.M., Sofia, H.J., Tarnuzzer, R., Wang, Z., Yang, L., Zenklusen, J.C., Zhang, J. (Julia), Chudamani, S., Liu, J., Lolla, L., Naresh, R., Pihl, T., Sun, Q., Wan, Y., Wu, Y., Cho, J., DeFreitas, T., Frazer, S., Gehlenborg, N., Getz, G., Heiman, D.I., Kim, J., Lawrence, M.S., Lin, P., Meier, S., Noble, M.S., Saksena, G., Voet, D., Zhang, Hailei, Bernard, B., Chambwe, N., Dhankani, V., Knijnenburg, T., Kramer, R., Leinonen, K., Liu, Y., Miller, M., Reynolds, S., Shmulevich, I., Thorsson, V., Zhang, W., Akbani, R., Broom, B.M., Hegde, A.M., Ju, Z., Kanchi, R.S., Korkut, A., Li, J., Liang, H., Ling, S., Liu, W., Lu, Y., Mills, G.B., Ng, K.-S., Rao, A., Ryan, M., Wang, Jing, Weinstein, J.N., Zhang, J., Abeshouse, A., Armenia, J., Chakravarty, D., Chatila, W.K., de Bruijn, I., Gao, J., Gross, B.E., Heins, Z.J., Kundra, R., La, K., Ladanyi, M., Luna, A., Nissan, M.G., Ochoa, A., Phillips, S.M., Reznik, E., Sanchez-Vega, F., Sander, C., Schultz, N., Sheridan, R., Sumer, S.O., Sun, Y., Taylor, B.S., Wang, Jioajiao, Zhang, Hongxin, Anur, P., Peto, M., Spellman, P., Benz, C., Stuart, J.M., Wong, C.K., Yau, C., Hayes, D.N., Parker, J.S., Wilkerson, M.D., Ally, A., Balasundaram, M., Bowlby, R., Brooks, D., Carlsen, R., Chuah, E., Dhalla, N., Holt, R., Jones, S.J.M., Kasaian, K., Lee, D., Ma, Y., Marra, M.A., Mayo, M., Moore, R.A., Mungall, A.J., Mungall, K., Robertson, A.G., Sadeghi, S., Schein, J.E., Sipahimalani, P., Tam, A., Thiessen, N., Tse, K., Wong, T., Berger, A.C., Beroukhim, R., Cherniack, A.D., Cibulskis, C., Gabriel, S.B., Gao, G.F., Ha, G., Meyerson, M., Schumacher, S.E., Shih, J., Kucherlapati, M.H., Kucherlapati, R.S., Baylin, S., Cope, L., Danilova, L., Bootwalla, M.S., Lai, P.H., Maglinte, D.T., Van Den Berg, D.J., Weisenberger, D.J., Auman, J.T., Balu, S., Bodenheimer, T., Fan, C., Hoadley, K.A., Hoyle, A.P., Jefferys, S.R., Jones, C.D., Meng, S., Mieczkowski, P.A., Mose, L.E., Perou, A.H., Perou, C.M., Roach, J., Shi, Y., Simons, J.V., Skelly, T., Soloway, M.G., Tan, D.,

Veluvolu, U., Fan, H., Hinoue, T., Laird, P.W., Shen, H., Zhou, W., Bellair, M., Chang, K., Covington, K., Creighton, C.J., Dinh, H., Doddapaneni, H., Donehower, L.A., Drummond, J., Gibbs, R.A., Glenn, R., Hale, W., Han, Y., Hu, J., Korchina, V., Lee, S., Lewis, L., Li, W., Liu, X., Morgan, M., Morton, D., Muzny, D., Santibanez, J., Sheth, M., Shinbrot, E., Wang, L., Wang, M., Wheeler, D.A., Xi, L., Zhao, F., Hess, J., Appelbaum, E.L., Bailey, M., Cordes, M.G., Ding, L., Fronick, C.C., Fulton, L.A., Fulton, R.S., Kandoth, C., Mardis, E.R., McLellan, M.D., Miller, C.A., Schmidt, H.K., Wilson, R.K., Crain, D., Curley, E., Gardner, J., Lau, K., Mallery, D., Morris, S., Paulauskis, J., Penny, R., Shelton, C., Shelton, T., Sherman, M., Thompson, E., Yena, P., Bowen, J., Gastier-Foster, J.M., Gerken, M., Leraas, K.M., Lichtenberg, T.M., Ramirez, N.C., Wise, L., Zmuda, E., Corcoran, N., Costello, T., Hovens, C., Carvalho, A.L., de Carvalho, A.C., Fregnani, J.H., LongattoFilho, A., Reis, R.M., Scapulatempo-Neto, C., Silveira, H.C.S., Vidal, D.O., Burnette, A., Eschbacher, J., Hermes, B., Noss, A., Singh, R., Anderson, M.L., Castro, P.D., Ittmann, M., Huntsman, D., Kohl, B., Le, X., Thorp, R., Andry, C., Duffy, E.R., Lyadov, V., Paklina, O., Setdikova, G., Shabunin, A., Tavobilov, M., McPherson, C., Warnick, R., Berkowitz, R., Cramer, D., Feltmate, C., Horowitz, N., Kibel, A., Muto, M., Raut, C.P., Malykh, A., Barnholtz-Sloan, J.S., Barrett, W., Devine, K., Fulop, J., Ostrom, Q.T., Shimmel, K., Wolinsky, Y., Sloan, A.E., De Rose, A., Giuliante, F., Goodman, M., Karlan, B.Y., Hagedorn, C.H., Eckman, J., Harr, J., Myers, J., Tucker, K., Zach, L.A., Deyarmin, B., Hu, H., Kvecher, L., Larson, C., Mural, R.J., Somiari, S., Vicha, A., Zelinka, T., Bennett, J., Iacocca, M., Rabeno, B., Swanson, P., Latour, M., Lacombe, L., Têtu, B., Bergeron, A., McGraw, M., Staugaitis, S.M., Chabot, J., Hibshoosh, H., Sepulveda, A., Su, T., Wang, T., Potapova, O., Voronina, O., Desjardins, L., Mariani, O., Roman-Roman, S., Sastre, X., Stern, M.-H., Cheng, F., Signoretti, S., Berchuck, A., Bigner, D., Lipp, E., Marks, J., McCall, S., McLendon, R., Secord, A., Sharp, A., Behera, M., Brat, D.J., Chen, A., Delman, K., Force, S., Khuri, F., Magliocca, K., Maithel, S., Olson, J.J., Owonikoko, T., Pickens, A., Ramalingam, S., Shin, D.M., Sica, G., Van Meir, E.G., Zhang, Hongzheng, Eijckenboom, W., Gillis, A., Korpershoek, E., Looijenga, L., Oosterhuis, W., Stoop, H., van Kessel, K.E., Zwarthoff, E.C., Calatozzolo, C., Cuppini, L., Cuzzubbo, S., DiMeco, F., Finocchiaro, G., Mattei, L., Perin, A., Pollo, B., Chen, C., Houck, J., Lohavanichbutr, P., Hartmann, A., Stoehr, C., Stoehr, R., Taubert, H., Wach, S., Wullich, B., Kycler, W., Murawa, D., Wiznerowicz, M., Chung, K., Edenfield, W.J., Martin, J., Baudin, E., Bublely, G., Bueno, R., De Rienzo, A., Richards, W.G., Kalkanis, S., Mikkelsen, T., Noushmehr, H., Scarpace, L., Girard, N., Aymerich, M., Campo, E., Giné, E., Guillermo, A.L., Van Bang, N., Hanh, P.T., Phu, B.D., Tang, Y., Colman, H., Evason, K., Dottino, P.R., Martignetti, J.A., Gabra, H., Juhl, H., Akeredolu, T., Stepa, S., Hoon, D., Ahn, K., Kang, K.J., Beuschlein, F., Breggia, A., Birrer, M., Bell, D., Borad, M., Bryce, A.H., Castle, E., Chandan, V., Cheville, J., Copland, J.A., Farnell, M., Flotte, T., Giama, N., Ho, T., Kendrick, M., Kocher, J.-P., Kopp, K., Moser, C., Nagorney, D., O'Brien, D., O'Neill, B.P., Patel, T., Petersen, G., Que, F., Rivera, M., Roberts, L., Smallridge, R., Smyrk, T., Stanton, M., Thompson, R.H., Torbenson, M., Yang, J.D., Zhang, L., Brimo, F., Ajani, J.A., Gonzalez, A.M.A., Behrens, C., Bondaruk, J., Broaddus, R., Czerniak, B., Esmaeli, B., Fujimoto, J., Gershenwald, J., Guo, C., Lazar, A.J., Logothetis, C., Meric-Bernstam, F., Moran, C., Ramondetta, L., Rice, D., Sood, A., Tamboli, P., Thompson, T., Troncoso, P., Tsao, A., Wistuba, I., Carter, C., Haydu,

L., Hersey, P., Jakrot, V., Kakavand, H., Kefford, R., Lee, K., Long, G., Mann, G., Quinn, M., Saw, R., Scolyer, R., Shannon, K., Spillane, A., Stretch, J., Synott, M., Thompson, J., Wilmott, J., Al-Ahmadie, H., Chan, T.A., Ghossein, R., Gopalan, A., Levine, D.A., Reuter, V., Singer, S., Singh, B., Tien, N.V., Broudy, T., Mirsaidi, C., Nair, P., Drwiega, P., Miller, J., Smith, J., Zaren, H., Park, J.-W., Hung, N.P., Kebebew, E., Linehan, W.M., Metwalli, A.R., Pacak, K., Pinto, P.A., Schiffman, M., Schmidt, L.S., Vocke, C.D., Wentzensen, N., Worrell, R., Yang, H., Moncrieff, M., Goparaju, C., Melamed, J., Pass, H., Botnariuc, N., Caraman, I., Cernat, M., Chemencedji, I., Clipca, A., Doruc, S., Gorincioi, G., Mura, S., Pirtac, M., Stancul, I., Tcaciuc, D., Albert, M., Alexopoulou, I., Arnaout, A., Bartlett, J., Engel, J., Gilbert,

S., Parfitt, J., Sekhon, H., Thomas, G., Rassl, D.M., Rintoul, R.C., Bifulco, C., Tamakawa, R., Urba, W., Hayward, N., Timmers, H., Antenucci, A., Facciolo, F., Grazi, G., Marino, M., Merola, R., de Krijger, R., Gimenez-Roqueplo, A.-P., Piché, A., Chevalier, S., McKercher, G., Birsoy, K., Barnett, G., Brewer, C., Farver, C., Naska, T., Pennell, N.A., Raymond, D., Schilero, C., Smolenski, K., Williams, F., Morrison, C., Borgia, J.A., Liptay, M.J., Pool, M., Seder, C.W., Junker, K., Omberg, L., Dinkin, M., Manikhas, G., Alvaro, D., Bragazzi, M.C., Cardinale, V., Carpino, G., Gaudio, E., Chesla, D., Cottingham, S., Dubina, M., Moiseenko, F., Dhanasekaran, R., Becker, K.-F., Janssen, K.-P., Slotta-Huspenina, J., Abdel-Rahman, M.H., Aziz, D., Bell, S., Cebulla, C.M., Davis, A., Duell, R., Elder, J.B., Hilty, J., Kumar, B., Lang, J., Lehman, N.L., Mandt, R., Nguyen, P., Pilarski, R., Rai, K., Schoenfeld, L., Senecal, K., Wakely, P., Hansen, P., Lechan, R., Powers, J., Tischler, A., Grizzle, W.E., Sexton, K.C., Kastl, A., Henderson, J., Porten, S., Waldmann, J., Fassnacht, M., Asa, S.L., Schadendorf, D., Couce, M., Graefen, M., Huland, H., Sauter, G., Schlomm, T., Simon, R., Tennstedt, P., Olabode, O., Nelson, M., Bathe, O., Carroll, P.R., Chan, J.M., Disaia, P., Glenn, P., Kelley, R.K., Landen, C.N., Phillips, J., Prados, M., Simko, J., Smith-McCune, K., VandenBerg, S., Roggin, K., Fehrenbach, A., Kendler, A., Sifri, S., Steele, R., Jimeno, A., Carey, F., Forgie, I., Mannelli, M., Carney, M., Hernandez, B., Campos, B., Herold-Mende, C., Jungk, C., Unterberg, A., von Deimling, A., Bessler, A., Galbraith, J., Jacobus, L., Knudson, M., Knutson, T., Ma, D., Milhem, M., Sigmund, R., Godwin, A.K., Madan, R., Rosenthal, H.G., Adebamowo, C., Adebamowo, S.N., Boussioutas, A., Beer, D., Giordano, T., Mes-Masson, A.-M., Saad, F., Bocklage, T., Landrum, L., Mannel, R., Moore, K., Moxley, K., Postier, R., Walker, J., Zuna, R., Feldman, M., Valdivieso, F., Dhir, R., Luketich, J., Pinero, E.M.M., Quintero-Aguilo, M., Carlotti, C.G., Dos Santos, J.S., Kemp, R., Sankarankuty, A., Tirapelli, D., Catto, J., Agnew, K., Swisher, E., Creaney, J., Robinson, B., Shelley, C.S., Godwin, E.M., Kendall, S., Shipman, C., Bradford, C., Carey, T., Haddad, A., Moyer, J., Peterson, L., Prince, M., Rozek, L., Wolf, G., Bowman, R., Fong, K.M., Yang, I., Korst, R., Rathmell, W.K., Fantacone-Campbell, J.L., Hooke, J.A., Kovatich, A.J., Shriver, C.D., DiPersio, J., Drake, B., Govindan, R., Heath, S., Ley, T., Van Tine, B., Westervelt, P., Rubin, M.A., Lee, J.I., Aredes, N.D., Mariamidze, A., 2018. Oncogenic Signaling Pathways in The Cancer Genome Atlas. *Cell* 173, 321-337.e10.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.035>

Schafer, K.A., 1998. The cell cycle: a review. *Vet Pathol* 35, 461–478. <https://doi.org/10.1177/030098589803500601>

- Shah, M., Nunes, M.R., Stearns, V., 2018. CDK4/6 Inhibitors: Game Changers in the Management of Hormone Receptor–Positive Advanced Breast Cancer? *Oncology (Williston Park)* 32, 216–222.
- Shoushtari, A.N., Munhoz, R.R., Kuk, D., Ott, P.A., Johnson, D.B., Tsai, K.K., Rapisuwon, S., Eroglu, Z., Sullivan, R.J., Luke, J.J., Gangadhar, T.C., Salama, A.K.S., Clark, V., Burias, C., Puzanov, I., Atkins, M.B., Algazi, A.P., Ribas, A., Wolchok, J.D., Postow, M.A., 2016. The efficacy of anti-PD-1 agents in acral and mucosal melanoma: PD-1 in Acral or Mucosal Melanoma. *Cancer* 122, 3354–3362. <https://doi.org/10.1002/cncr.30259>
- Siehl, J., Thiel, E., 2007. C-kit, GIST, and Imatinib, in: Dietel, M. (Ed.), *Targeted Therapies in Cancer, Recent Results in Cancer Research*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 145–151. https://doi.org/10.1007/978-3-540-46091-6_12
- Straume, O., Smeds, J., Kumar, R., Hemminki, K., Akslen, L.A., 2002. Significant Impact of Promoter Hypermethylation and the 540 C>T Polymorphism of CDKN2A in Cutaneous Melanoma of the Vertical Growth Phase. *The American Journal of Pathology* 161, 229–237. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64174-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64174-0)
- Tacastacas, J.D., Bray, J., Cohen, Y.K., Arbesman, J., Kim, J., Koon, H.B., Honda, K., Cooper, K.D., Gerstenblith, M.R., 2014. Update on primary mucosal melanoma. *J Am Acad Dermatol* 71, 366–375. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2014.03.031>
- Thierauf, J., Veit, J.A., Affolter, A., Bergmann, C., Grünow, J., Laban, S., Lennerz, J.K., Grünmüller, L., Mauch, C., Plinkert, P.K., Hess, J., Hoffmann, T.K., 2015. Identification and clinical relevance of PD-L1 expression in primary mucosal malignant melanoma of the head and neck. *Melanoma Res* 25, 503–509. <https://doi.org/10.1097/CMR.0000000000000197>
- Tucker, M.A., Goldstein, A.M., 2003. Melanoma etiology: where are we? *Oncogene* 22, 3042–3052. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206444>
- Tumeh, P.C., Harview, C.L., Yearley, J.H., Shintaku, I.P., Taylor, E.J.M., Robert, L., Chmielowski, B., Spasic, M., Henry, G., Ciobanu, V., West, A.N., Carmona, M., Kivork, C., Seja, E., Cherry, G., Gutierrez, A.J., Grogan, T.R., Mateus, C., Tomasic, G., Glaspy, J.A., Emerson, R.O., Robins, H., Pierce, R.H., Elashoff, D.A., Robert, C., Ribas, A., 2014. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* 515, 568–571. <https://doi.org/10.1038/nature13954>
- Ugurel, S., Hildenbrand, R., Zimpfer, A., La Rosée, P., Paschka, P., Sucker, A., Keikavoussi, P., Becker, J.C., Rittgen, W., Hochhaus, A., Schadendorf, D., 2005. Lack of clinical efficacy of imatinib in metastatic melanoma. *Br J Cancer* 92, 1398–1405. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602529>
- Wolchok, J.D., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Rutkowski, P., Grob, J.-J., Cowey, C.L., Lao, C.D., Wagstaff, J., Schadendorf, D., Ferrucci, P.F., Smylie, M., Dummer, R., Hill, A., Hogg, D., Haanen, J., Carlino, M.S., Bechter, O., Maio, M., MarquezRodas, I., Guidoboni, M., McArthur, G., Lebbé, C., Ascierto, P.A., Long, G.V., Cebon, J., Sosman, J., Postow, M.A., Callahan, M.K., Walker, D., Rollin, L., Bhorre, R., Hodi, F.S., Larkin, J., 2017. Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med* 377, 1345–1356. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1709684>
- Wrede, N., Hoffmann, I., Vollbrecht, C., Koch, I., Wolkenstein, P., Klauschen, F., Capper, D., von Laffert, M., Jurmeister, P., 2022. Comparative investigation of cell cycle and immunomodulatory genes in mucosal and cutaneous melanomas: Preliminary data suggest a potential promising clinical role for p16 and the PD-1/PD-L1 axis.

- Pathology - Research and Practice 229, 153689.
<https://doi.org/10.1016/j.prp.2021.153689>
- Xu, L., Cheng, Z., Cui, C., Wu, X., Yu, H., Guo, J., Kong, Y., 2019. Frequent genetic aberrations in the cell cycle related genes in mucosal melanoma indicate the potential for targeted therapy. *J Transl Med* 17, 245.
<https://doi.org/10.1186/s12967019-1987-z>
- Yun, J., Lee, J., Jang, J., Lee, E.J., Jang, K.T., Kim, J.H., Kim, K.-M., 2011. KIT amplification and gene mutations in acral/mucosal melanoma in Korea: KIT AMPLIFICATION AND GENE MUTATIONS IN ACRAL/MUCOSAL MELANOMA. *APMIS* 119, 330–335. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2011.02737.x>
- Zaman, Wu, Bivona, 2019. Targeting Oncogenic BRAF: Past, Present, and Future. *Cancers* 11, 1197. <https://doi.org/10.3390/cancers11081197>
- Zhu, G., Pan, C., Bei, J.-X., Li, B., Liang, C., Xu, Y., Fu, X., 2020. Mutant p53 in Cancer Progression and Targeted Therapies. *Front. Oncol.* 10, 595187. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.595187>

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Niklas Wrede, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Proteinexpression, DNA Methylierung und Kopienzahlvariation von zellzyklusassoziierten und immunomodulatorischen Proteinen in Melanomen der Haut und Schleimhaut“ – „Investigation of protein expression, DNA methylation and copy number status of cell cyclereLATED and immunomodulatory genes in mucosal and cutaneous melanomas“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

13.03.2022

Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Wrede N, Hoffmann I, Vollbrecht C, Koch I, Wolkenstein P, Klauschen F, Capper D, von Laffert M, Jurmeister P. Comparative investigation of cell cycle and immunomodulatory genes in mucosal and cutaneous melanomas: Preliminary data suggest a potential promising clinical role for p16 and the PD-1/PD-L1 axis. *Pathology - Research and Practice*. 2022 Jan

Der Promovend hat die klinischen Patientendaten bezüglich des Krankheitsverlauf und des Therapieansprechens aus der SAP-Datenbank der Charité zusammengetragen. Darüber hinaus hat er grundlegende histopathologische Merkmale aus den Berichten des Befundsystems Nexus des Instituts für Pathologie gesammelt, wie in 2.1 beschrieben. Darauf aufbauend hat Herr Wrede die Tabelle 1 erstellt. Zur Auswahl der untersuchten immunhistologischen Marker hat Herr Wrede eine eigenständige Literaturrecherche durchgeführt und diese zusammen mit seinen Betreuern ausgewählt. Darüber hinaus hat er unter Supervision wesentliche fehlende / aus den Vorbefunden nicht ersichtliche bzw. nicht berichtete histologische Merkmale (z.B. Pigmentierung, Wachstumsmuster) nachbestimmt. Die manuelle Auswertung einzelner ausgewählter immunhistologischer Färbungen erfolgte zunächst vom Doktoranden selbst und wurde durch die Betreuer kontrolliert. Herr Wrede hat die für die digitale Bildanalyse verwendete Software QuPath einschließlich der verwendeten Auswertungsmethoden selbstständig etabliert und alle computergestützten Analysen durchgeführt, wie in 2.2 und 3.2 beschrieben. Hierunter fiel auch die eigenständige Prüfung der Ergebnisse auf Plausibilität und das manuelle Aus- oder Einschließen von Gewebearealen bei fehlerhafter Interpretation durch den Algorithmus. Gemeinsam mit Herrn Dr. Jurmeister hat er auf Basis der Ergebnisse die Abbildung 1 und 3 erstellt. Die Ergebnisse der DNA Sequenzierung wurden vom Doktoranden unter Anleitung der Betreuer ausgewertet (z.B. Bewertung der biologischen Relevanz der detektierten Mutation) und Tabelle 2 wurde dabei erstellt. Die gesammelten Daten hat Herr Wrede unter Anleitung von Herrn Dr. Jurmeister statistisch mit der Analysesoftware RStudio ausgewertet, wie in 2.6 beschrieben. Der Promovend hat zudem das Publikationsmanuskript eigenständig erstellt und in Zusammenarbeit mit den Koautoren überarbeitet.

Auszug aus der Journal Summary List

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2020** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: **"PATHOLOGY"** Selected Category Scheme: WoS
Gesamtanzahl: 77 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
21	AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY	43,729	4.307	0.017360
22	JOURNAL OF ORAL PATHOLOGY & MEDICINE	6,375	4.253	0.004060
23	VIRCHOWS ARCHIV	7,825	4.064	0.007930
24	ENDOCRINE PATHOLOGY	1,734	3.943	0.001890
25	ADVANCES IN ANATOMIC PATHOLOGY	1,955	3.875	0.002150
26	JOURNAL OF NEUROPATHOLOGY AND EXPERIMENTAL NEUROLOGY	11,189	3.685	0.006630
27	HUMAN PATHOLOGY	15,964	3.466	0.012570
28	SEMINARS IN DIAGNOSTIC PATHOLOGY	1,754	3.464	0.002020
29	DISEASE MARKERS	5,699	3.434	0.007650
30	JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY	13,032	3.411	0.006770
31	EXPERIMENTAL AND MOLECULAR PATHOLOGY	4,792	3.362	0.003690
32	Brain Tumor Pathology	866	3.298	0.001020
33	PATHOLOGY RESEARCH AND PRACTICE	6,336	3.250	0.006620

Wrede N, Hoffmann I, Vollbrecht C, Koch I, Wolkenstein P, Klauschen F, Capper D, von Laffert M, Jurmeister P. Comparative investigation of cell cycle and immunomodulatory genes in mucosal and cutaneous melanomas: Preliminary data suggest a potential promising clinical role for p16 and the PD-1/PD-L1 axis. *Pathology - Research and Practice*. 2022 Jan
<https://doi.org/10.1016/j.prp.2021.153689>

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht

Publikationsliste

Wrede N, Hoffmann I, Vollbrecht C, Koch I, Wolkenstein P, Klauschen F, Capper D, von Laffert M, Jurmeister P. Comparative investigation of cell cycle and immunomodulatory genes in mucosal and cutaneous melanomas: Preliminary data suggest a potential promising clinical role for p16 and the PD-1/PD-L1 axis. *Pathology - Research and Practice*. 2022 Jan *Impact-Factor: 3,25 (2021)*

Jurmeister P, **Wrede N**, Hoffmann I, Vollbrecht C, Heim D, Hummel M, Wolkenstein P, Koch I, Heynol V, Schmitt W, Thieme A, Teichmann D, Sers C, Deimling A, Thierauf JC, von Laffert M, Klauschen F, Capper D. Mucosal melanomas of different anatomic sites share a common global DNA methylation profile with cutaneous melanoma but show location-dependent patterns of genetic and epigenetic alterations. *J Pathol*. 2021 Sep 26 *Impact-Factor: 7,996 (2021)*

Danksagung

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Philipp Jurmeister für seine zuverlässige und herzliche Betreuung und Unterstützung während des gesamten Promotionsvorhabens. Er hat mir spannende Einblicke in die Pathologie ermöglicht und ich konnte mich immer mit allen Fragen an Ihn wenden.

Ebenfalls möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Maximilian von Laffert für die freundliche Betreuung und das hilfreiche fachliche Feedback bedanken.

Die Anfertigung dieser Arbeit war nur durch die umfassende Unterstützung durch meine beiden Betreuer möglich. Ich danke Ihnen ebenfalls für die Überlassung des Themas. Ich habe mich in jedem Schritt der Arbeit gut betreut gefühlt.

Ich bedanke mich bei meiner ganzen Familie für ihre Unterstützung. Ich bedanke mich bei meinem Bruder Jonathan für seine hilfreichen informatischen Kenntnisse und dafür, dass ich häufig auf seinen Computer zugreifen durfte. Meinen Eltern Michaela und Rolf danke ich für die Ermöglichung meines Studiums und dieser Arbeit. Meiner Schwester Marlene und meiner Freundin Lisa danke ich dafür, dass sie immer für mich da sind.