

Aus dem Institut für Pathologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

## DISSERTATION

Vergleich von zwei Methoden zur Detektion aktivierender  
BRAF V600-Mutationen im malignen Melanom

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Laura Kristin Parlow

aus Berlin

Datum der Promotion: 10. März 2017

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abstrakt</b> .....	<b>5</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>7</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>9</b>
1.1. Sequenzierung von Tumorzellen.....	9
1.2. Das maligne Melanom .....	11
1.2.1. Risikofaktoren und Epidemiologie .....	12
1.2.2. Diagnostik und histopathologische Merkmale .....	14
1.2.3. Stadieneinteilung und Prognose .....	15
1.2.4. Therapie .....	16
1.2.5. BRAF-Mutationen .....	16
1.3. Funktionsweise der Mutationsanalysen .....	19
1.3.1. Sanger-Sequenzierung.....	20
1.3.2. Pyrosequenzierung .....	20
1.3.3. Quantitative Echtzeit-PCR .....	21
1.3.4. Idylla-Methode .....	22
1.3.5. Next-Generation-Sequencing.....	24
<b>2. Methodik</b> .....	<b>25</b>
2.1. Auswahl der Proben .....	25
2.2. Histologische Beurteilung .....	25
2.3. Mutationsanalyse.....	26
2.3.1. Aufbereitung der DNA für die Pyrosequenzierung .....	26
2.3.2. Pyrosequenzierung .....	29
2.3.3. Idylla-Methode .....	31
2.3.4. Next Generation Sequencing .....	33
2.4. Statistische Auswertung.....	37

<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>38</b>
3.1.	Probenkollektiv .....	38
3.2.	Vergleich von Idylla-Analyse und Pyrosequenzierung .....	41
3.2.1.	Ergebnisse der Analysen.....	41
3.2.2.	Automatische Berichterstellung .....	44
3.2.3.	Wiederholte und manuell bewertete Ergebnisse .....	47
3.2.4.	Zeit- und Arbeitsaufwand der Methoden .....	47
3.3.	Überprüfung der Ergebnisse mittels Next Generation Sequencing und erneuter Pyrosequenzierung.....	48
3.4.	Auswertung der Mutationsanalysen in Bezug auf Mutationsfrequenzen und klinisch-pathologische Parameter .....	53
3.4.1.	Frequenzen der BRAF V600-Mutationen .....	55
3.4.2.	Korrelationen klinisch-pathologischer Parameter mit dem Sequenzierungsergebnis .....	55
3.5.	Methodische Abweichungen.....	64
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>65</b>
4.1.	Vergleich von Idylla-Analyse und Pyrosequenzierung .....	65
4.1.1.	Primäre Übereinstimmung der Ergebnisse von Pyrosequenzierung und Idylla-Analyse.....	65
4.1.2.	Detaillierte Betrachtung der mittels Next-Generation-Sequencing überprüften Ergebnisse .....	65
4.1.3.	Übereinstimmung der Methoden in Zusammenschau aller Analysen .....	68
4.1.4.	Vergleich der Methoden in Bezug auf Aufwand und Ergebnisqualität.....	68
4.2.	Probenkollektiv .....	69
4.3.	Mutationsfrequenzen und klinisch-pathologische Parameter .....	70
4.3.1.	Frequenzen der BRAF V600-Mutationen .....	70
4.3.2.	Korrelationen zwischen klinisch-pathologischen Parametern und Sequenzierungsergebnis .....	71

<b>4.4. Mögliche Fehler durch methodische Abweichungen .....</b>	<b>74</b>
<b>4.5. Beurteilung der Idylla-Methode und mögliche Perspektiven .....</b>	<b>74</b>
<b>4.6. Fazit .....</b>	<b>79</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>80</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>81</b>
<b>Lebenslauf .....</b>	<b>93</b>
<b>Publikationsliste .....</b>	<b>94</b>
<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>95</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>97</b>

# **Abstrakt**

## ***Einleitung***

Die molekulargenetische Analyse von Tumorgewebe ist von wachsender Relevanz für die onkologische Forschung, Diagnostik und Therapie.

Aktivierende Mutationen des BRAF-Gens im malignen Melanom können zielgerichtet therapiert werden und werden daher auch in der molekularpathologischen Routine-Diagnostik untersucht. Zur Bestimmung des BRAF-Mutationsstatus werden aktuell vor allem die Pyrosequenzierung sowie in größeren Einrichtungen auch neuere, jedoch vergleichsweise aufwendigere parallele Sequenzierverfahren verwendet. Schnellere und einfachere Analysemethoden könnten die Mutationsdiagnostik dezentralisieren und einen eventuellen Therapiebeginn beschleunigen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein solches neuartiges PCR-basiertes Verfahren zur BRAF-Mutationsdiagnostik an Gewebeproben maligner Melanome getestet und mit der Pyrosequenzierung verglichen.

## ***Methodik***

249 Formalin-fixierte, Paraffin-eingebettete Gewebeproben von malignen Melanomen wurden einerseits mit einer automatischen Methode, basierend auf einer Echtzeit-PCR mittels Amplification-refractory-mutation-system-(ARMS)-Primern, (Idylla, Biocartis), andererseits mittels Pyrosequenzierung (therascreen BRAF Pyro Kit, Qiagen) analysiert.

Die Ergebnisse der Mutationsanalysen beider Methoden wurden miteinander verglichen und zu klinisch-pathologischen Parametern in Beziehung gesetzt. Abweichende Ergebnisse wurden zusätzlich mit Panel-basierter Sequenzierung (Ion Torrent, Life Technologies) untersucht.

## ***Ergebnisse***

236 Proben lieferten mit beiden Methoden technisch valide Ergebnisse, davon zeigten 231 Proben (97,9%) ein übereinstimmendes Ergebnis. In den übrigen fünf Fällen detektierte die Idylla-Methode eine Mutation, während die Pyrosequenzierung einen Wildtyp zeigte. Die Reanalyse dieser Proben mittels Panel-Sequenzierung bestätigte in drei Fällen das mutationspositive Ergebnis der Idylla-Analyse. Im vierten Fall konnte die von Idylla detektierte Mutation auf ein Fixierungsartefakt zurückgeführt werden, im

fünften Fall zeigten sich nach Überprüfung und Korrektur eines initial fehlerhaft ausgewählten Gewebeareals keine abweichenden Ergebnisse mehr.

Insgesamt zeigten 43,8% der Tumoren eine der untersuchten BRAF V600-Mutationen. Hierbei wiesen jüngere Patienten ( $\leq 59$  Jahre) mit 52,7% zu einem signifikant höheren Anteil BRAF-Mutationen auf als ältere Patienten ( $\geq 60$  Jahre) (37,4%). Der Anteil an BRAF-Mutationen vom Typ V600E lag bei insgesamt 84,7% und nahm mit steigendem Alter ab.

### ***Diskussion***

Die Idylla-Methode funktionierte zuverlässig, zeigte eine höhere Sensitivität als die Pyrosequenzierung und ließ sich einfach und schnell durchführen. Allerdings wird die Mutationsfrequenz innerhalb eines Tumors nicht ermittelt. Dies ist zurzeit zwar ohne klinische Konsequenz, könnte in Zukunft jedoch eine Einschränkung bedeuten, sofern sich in klinischen Studien unterschiedliche Ansprechraten in Abhängigkeit von der Mutationsfrequenz zeigen.

Trotz der steigenden Verbreitung von parallelen Sequenzierungstechniken bleibt der Vorteil des Idylla-Verfahrens der im Vergleich deutlich geringere Zeit- und Arbeitsaufwand, wodurch sich der Einsatz auch für kleinere Laboreinrichtungen eignet.

### ***Fazit***

Die Idylla-Methode ist eine im Vergleich zur Pyrosequenzierung sensitivere, schnellere und einfacher durchzuführende Möglichkeit zur Detektion aktivierender BRAF V600-Mutationen und damit für den Routineeinsatz auch außerhalb von Speziallaboren geeignet.

# **Abstract**

## **Background**

*Molecular pathological analyses of tumor tissue are of increasing relevance to oncological research, diagnostics and therapy. Activating BRAF V600 mutations in malignant melanoma can be targeted therapeutically and are therefore examined in routine molecular pathology. At present, BRAF mutation status is predominantly determined through pyrosequencing, whereas larger labs also apply novel, but more costly parallel sequencing methods. Faster and easier methods to determine mutations could enable also smaller labs to perform testing and expedite the beginning of a potential treatment.*

*Here, we test a novel PCR-based method for BRAF mutation analysis with malignant melanoma tissue samples and compare it to pyrosequencing.*

## **Methods**

*249 formalin-fixed, paraffin-embedded malignant melanoma tissue samples were analyzed by an automated method that relies on amplification-refractory-mutation-system (ARMS) primers (Idylla, Biocartis) on one hand, and by pyrosequencing (therascreen BRAF Pyro kit, Qiagen) on the other.*

*Technically valid results for both methods (236 samples) were compared and correlated with clinicopathological parameters. Discordant results were further analyzed with next-generation panel-sequencing (Ion Torrent, Life Technologies).*

## **Results**

*Agreement between Idylla and pyrosequencing was reached in 231 out of 236 samples (97.9%). The five discrepant samples showed a BRAF mutation with Idylla and a wildtype sequence with pyrosequencing. Reanalysis of these samples by panel-sequencing confirmed the Idylla result in 3 cases. In the 4th case the mutation detected by Idylla was determined to be a fixation artifact. For the 5th case a review of the selected tissue region prompted a reanalysis yielding a concordant result.*

*In total, 43.9% of tumors showed BRAF V600 mutations. Younger patients ( $\leq 59$  years) had a significantly higher proportion of BRAF mutations than older patients ( $\geq 60$  years) (52.7% vs. 37.4%).*

*The overall proportion of V600E mutations was 84.7% and decreased with older age.*

## **Discussion**

*The Idylla method worked reliably and fast and was more sensitive in detecting BRAF V600 mutations than pyrosequencing. However, Idylla does not provide mutation frequencies. While this has no immediate clinical consequences, it may be a limitation in the future, in case clinical studies show different response rates depending on mutation frequency.*

*Despite the increasing use of parallel sequencing methods, the advantage of Idylla is its ease-of-use, speed and the suitability even for smaller labs.*

## **Conclusion**

*Compared to pyrosequencing the PCR-based Idylla method is a more sensitive, faster and easier approach to detect activating BRAF V600 mutations in FFPE-tissue samples and is therefore suitable for routine use also beyond specialized laboratories.*



# 1. Einleitung

## 1.1. Sequenzierung von Tumorzellen

Die Verbesserung der Therapie von Krebserkrankungen ist eine wichtige Aufgabe der aktuellen biomedizinischen Forschung.

Dabei genügt, sobald Zellen eines soliden Tumors Anschluss an das Lymph- oder Blutsystem gefunden haben, die operative Entfernung des Tumors oft nicht mehr aus, um alle Tumorzellen aus dem Körper zu eliminieren, und eine Heilung wird unwahrscheinlicher.

In der Regel wird dann eine systemische Therapie mit Medikamenten durchgeführt, die möglichst selektiv die verbliebenen Tumorzellen schädigen sollen. Die „Selektivität“ der klassischen Zytostatika ist jedoch auf die Beeinflussung aller schnell proliferierenden Zellen ausgelegt, woraus auch entsprechende unerwünschte Wirkungen auf gesunde Zellen resultieren.

Um die Selektivität der Therapien zu erhöhen, d.h. alle Tumorzellen zu eliminieren, ohne gesunde Zellen zu schädigen, möchte man sich molekulare Veränderungen der Tumorzellen zunutze machen. Dabei wird in Krebszellen die Regulation des Zellwachstums durch verschiedene Mutationen in Richtung Proliferation (Onkogene) und/oder Apoptosehemmung (Tumorsuppressorgene) beeinflusst. Diese mutierten Gene bzw. ihre Genprodukte bieten Angriffspunkte für sogenannte zielgerichtete Therapien (engl.: *targeted therapies*), die in den letzten Jahren begonnen haben, die Krebstherapie zu verändern, und in die große Hoffnung gesetzt wird<sup>1,2</sup>. Sie können das Therapieansprechen deutlich erhöhen und in Einzelfällen die Prognose bereits deutlich verbessern, wie zum Beispiel der BCR-ABL-Proteinkinase-Inhibitor Imatinib bei der Therapie der Philadelphia-Chromosom-positiven Chronischen Myeloischen Leukämie<sup>3</sup>. Genauso kann von der Gabe bestimmter Medikamente abgesehen werden, wenn die jeweiligen Zielstrukturen nicht in den Zellen vorhanden sind, wodurch unnötige Nebenwirkungen umgangen werden können. Die Prädiktion eines Therapieerfolgs kann insgesamt verbessert werden, je genauer man den individuellen Tumor molekular charakterisieren kann und je besser man die entsprechenden Mechanismen der Pathogenese versteht.

Im Rahmen von Biopsien oder Operationen entnommenes Tumorgewebe für jeden Patienten individuell auf klinisch relevante Mutationen zu untersuchen, ist daher bereits bei mehreren Krebsarten zu einem Routine-Vorgehen der pathologischen Krebsdiagnostik geworden. Damit einhergehend gewinnen die Verbesserung der Kosten- und Zeiteffektivität dieser Untersuchungen an Bedeutung.

In dieser Arbeit sollen daher ein neues Verfahren (Idylla™ *BRAF* mutation test (Biocartis, Mechelen, Belgien), siehe Abschnitt 1.3.4) und eine aktuelle Routine-Methode (Pyrosequenzierung, siehe Abschnitt 1.3.2) zur genetischen Untersuchung von Tumorgewebe miteinander verglichen werden.

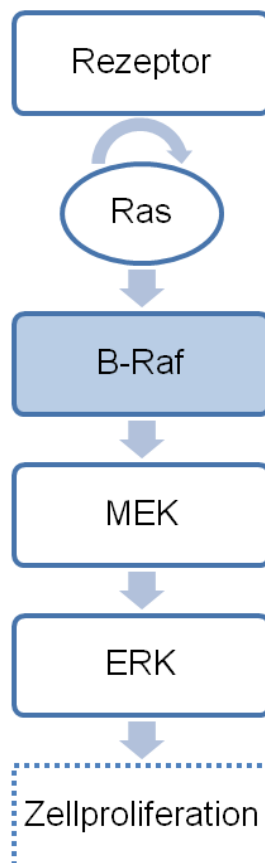
### ***Der MAPK-Signalweg***

In Tumorzellen häufig mutiert (und damit als potentielle Angriffspunkte spezifischer Therapeutika geeignet) sind Gene, die für Komponenten von intrazellulären Wachstums-regulierenden Signalkaskaden (engl. *pathways*) kodieren. Diese Signalwege induzieren, beginnend mit der Aktivierung eines Rezeptors (zum Beispiel Rezeptor-Tyrosin-Kinasen) und im Folgenden weiterer intrazellulärer Proteine (zum Beispiel weitere Kinasen) die Transkription von Genen, deren Produkte verschiedene Prozesse wie Zelldifferenzierung und -wachstum steuern <sup>4</sup>.

Ein wichtiges Beispiel hierfür ist der mitogen-activated protein kinase (MAPK) bzw. extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway (siehe Abbildung 1). Hier führt die Bindung von Botenstoffen, die die Zellteilung stimulieren (zum Beispiel des Wachstumsfaktors epidermal growth factor (EGF)), an verschiedenen Rezeptoren (zum Beispiel dem epidermal growth factor receptor (EGFR)) zunächst zur Autophosphorylierung dieses Rezeptors durch seine Tyrosin-Kinase-Aktivität. Durch Konformationsänderungen assoziierter Proteine wird ein Guanosindiphosphat (GDP)-Molekül an einer kleinen Guanosintriphosphat (GTP)-ase der Ras-Familie (KRAS, HRAS oder NRAS; Ras für rat sarcoma) gegen ein GTP-Molekül ausgetauscht, wodurch Ras aktiviert wird <sup>5</sup>. Das aktivierte Ras kann nun wiederum weitere Kinasen aktivieren. Nacheinander sind dies die Raf-Kinasen (A-Raf, B-Raf oder C-Raf; Raf für rapidly accelerated fibrosarcoma oder rat fibrosarcoma) als MAPK-Kinase-Kinase (MAP3K), die mitogen-activated protein kinase kinase (MEK) als MAPK-Kinase (MAP2K) und letztlich die MAPK/ERK <sup>5</sup>. Phosphoryliertes ERK transloziert in den

Zellkern und führt dort über die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren und anderen Regulator-Proteinen zur Zellproliferation <sup>6</sup>.

Mutationen in den Genen aller beteiligten Proteine können zur Überaktivierung dieser Signalkaskade und damit zu unkontrollierter, übermäßiger Zellteilung führen. Beispiele hierfür sind EGFR-Mutationen im Bronchialkarzinom, Her2-Überexpression im Mamma- und Magenkarzinom sowie BRAF-Mutationen im malignen Melanom <sup>7-9</sup>.



**Abbildung 1** MAPK/ERK-pathway. Aus der Rezeptor-Aktivierung resultiert die Aktivierung von Proteinen der Ras-Familie. Diese wiederum aktivieren Proteinkinasen der Raf-Familie, im Beispiel B-Raf, welches die Kinase MEK phosphoryliert, die, dadurch aktiviert, ihrerseits die Kinase ERK phosphoryliert. Aktivierte ERK induziert verschiedene Mechanismen für Zellwachstum und –proliferation.

## 1.2. Das maligne Melanom

Das maligne Melanom, der sogenannte schwarze Hautkrebs, geht aus Melaninpigment-produzierenden Zellen (Melanozyten) hervor. Diese finden sich in der basalen Schicht der Epidermis sowie in Auge, Ohr und den Schleimhäuten des Magen-Darm- und Urogenitaltrakts <sup>10,11</sup>. Prinzipiell können primäre Melanome an all diesen Lokalisationen

auftreten, allerdings gehen etwa 95% Prozent der Melanome von den Melanozyten der Haut aus <sup>12</sup> - daher wird hier, wenn nicht anders erwähnt vornehmlich auf das Melanom der Haut eingegangen. Da UV-Strahlung ein potenter Induktor von DNA-Schäden ist, ist die Sonnenlicht-exponierte Haut besonders gefährdet für Mutationen <sup>13</sup>. Das von den Melanozyten produzierte Melanin stellt hiergegen einen möglichen Schutzmechanismus dar. Es wird in der Haut von Keratinozyten aufgenommen und oberhalb ihres Zellkerns eingelagert. Dabei kann man verschiedene Melanintypen unterscheiden, die die Hautfarbe sowie die Vulnerabilität gegenüber UV-induzierten Hautschäden und damit das Entartungsrisiko der Zellen beeinflussen: dunkelhäutige Individuen weisen eine starke Produktion des bräunlich-schwarzen Eumelanins auf, das gelb-rötliche Phäomelanin liegt dagegen einer roten Haarfarbe sowie Sommersprossen zugrunde. Insgesamt sinkt mit zunehmend heller werdender Hautfarbe die Melaninproduktion der Melanozyten (nicht die Melanozytenzahl) und das Risiko für eine maligne Entartung von Hautzellen steigt an <sup>14</sup>.

Maligne entartete Melanozyten bzw. daraus resultierende Melanome metastasieren bereits bei geringer Tumorgroße und weisen dann eine äußerst schlechte Prognose auf (siehe dazu Abschnitt 1.2.3). Das maligne Melanom ist dabei für 90% der Todesfälle durch Hauttumoren verantwortlich <sup>15</sup>.

### **1.2.1. Risikofaktoren und Epidemiologie**

Für die Entstehung von Melanomen sind sowohl Umwelt- als auch genetische Risikofaktoren bekannt. Wie bereits beschrieben scheint zum einen die UV-Strahlung der Sonne eine Rolle bei der malignen Transformation von Melanozyten zu spielen. Dafür spricht, dass parallel zur Veränderung des Lebens- und Freizeitverhaltens sowie des vorherrschenden Schönheitsideals (in Richtung ausgiebiger Sonnenbäder im Urlaub oder Sonnenstudio mit möglichst wenig bedeckter Haut und ganzjähriger Ganzkörperbräune) die Inzidenzzahlen des malignen Melanoms vor allem unter der weißen Weltbevölkerung in den letzten fünf Dekaden deutlich angestiegen sind <sup>16,17</sup>.

Eine hohe UV-Exposition (vor allem in Kindheit und Jugend, die Datenlage ist hierzu jedoch teilweise nicht eindeutig <sup>18,19</sup>) gilt als erwiesener Risikofaktor für die Entwicklung eines malignen Melanoms, auch wenn noch andere Entstehungsmechanismen vorhanden sein müssen <sup>20,21</sup>. Dabei scheint vor allem intermittierende starke Sonneneinstrahlung (vor allem Sonnenbrände auf ungebräunter Haut) die Entstehung

zu begünstigen, während kontinuierliche Sonneneinstrahlung (berufliche Exposition, d. h. Arbeit im Freien) eher mit einer geringeren Melanominzidenz assoziiert ist <sup>19,22</sup>.

Insgesamt stellen somit als genetische Einflussfaktoren ein heller Hauttyp und eine Neigung zu Sonnenbränden ein besonderes Risiko dar, vor allem aber sind auch multiple gewöhnliche melanozytäre Nävi (Nävus = Muttermal), dysplastische (atypische) Nävi und Melanome in der eigenen oder familiären Vorgeschichte wichtige erwiesene Risikofaktoren <sup>20,23</sup>.

Aktuell zeigen die Krebsregisterdaten des Robert-Koch-Instituts für Deutschland für das Jahr 2010 eine rohe Inzidenzrate von 24,0 bei Männern bzw. 23,1 pro 100.000 Einwohner bei Frauen sowie eine nach Europastandard standardisierte Inzidenzrate von 18,2 bei Männern bzw. 17,9 pro 100.000 Einwohner bei Frauen. Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Frauen bei 58, für Männer bei 66 Jahren <sup>24</sup>.

Weltweit wird die standardisierte Inzidenz mit 3,3 für Männer bzw. 2,8 pro 100.000 Einwohner für Frauen angegeben <sup>25</sup>.

Insgesamt zeigte sich eine Entwicklung von einer einst seltenen Tumorentität zur fünfthäufigsten Krebserkrankung in Deutschland (ca. 4% von allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2010, ohne nicht-melanotischen Hautkrebs), was die große klinische Relevanz dieser Erkrankung und ihrer Therapie deutlich macht <sup>24</sup>. Unter den 20- bis 30-jährigen Frauen stellt sie sogar die häufigste, unter den jungen Männern die zweithäufigste Krebserkrankung dar <sup>26</sup>.

Bei immer wieder geführten Diskussionen über das Vorliegen einer "Melanom-Epidemie" ist jedoch stets der generelle Anstieg von Krebserkrankungen im Rahmen der steigenden Lebenserwartung sowie die höhere Detektionsrate durch bessere diagnostische Methoden, systematische Früherkennungsuntersuchungen (seit 2008 in Deutschland) und ein steigendes Bewusstsein in der Bevölkerung zu bedenken <sup>17,27</sup>. So zeigt sich auch bereits vielfach eine Stabilisierung oder sogar ein Rückgang der Inzidenzen als wahrscheinlicher Erfolg dieser Präventionsmaßnahmen <sup>16,27,28</sup>.

Im Gegensatz dazu ist die Mortalität des malignen Melanoms in den vergangenen Jahren nur geringfügig angestiegen, was insgesamt eine Verbesserung des Überlebens darstellt und ebenfalls auf die verbesserte Früherkennung zurückzuführen sein kann, da

der Anteil der sehr früh detektierten Fälle (Tumorstadium T1) seit 2008 (Einführung des Früherkennungsprogramms) kontinuierlich auf über 50% angestiegen ist <sup>24</sup>.

Die Krebsregisterdaten des Robert-Koch-Instituts zeigen für das Jahr 2010 eine rohe Mortalitätsrate von 3,9 für Männer bzw. 2,7 pro 100.000 Einwohner für Frauen sowie eine standardisierte Mortalitätsrate von 2,8 bei Männern bzw. 1,6 pro 100.000 Einwohner bei Frauen <sup>24</sup>.

Weltweit liegt die standardisierte Mortalität bei 0,9 für Männer bzw. 0,6 pro 100.000 Einwohner für Frauen <sup>25</sup>.

### **1.2.2. Diagnostik und histopathologische Merkmale**

In der Diagnostik des malignen Melanoms stellt die dermatologische Untersuchung verdächtiger Hautläsionen meist den ersten Schritt dar.

Bei der klinischen Differenzierung zwischen Melanom und gutartigem melanozytärem Nävus spielt die Erfahrung des Dermatologen die wichtigste Rolle. Hilfsmittel sind z.B. die ABCDE-Regel (Merkmale verdächtiger Hautläsionen, die besonderen Verdacht auf das Vorliegen eines Melanoms ergeben: A - Asymmetrie, B - unregelmäßige Begrenzung, C - vielfältiges Colorit, D - Durchmesser > 0,5 cm, E - Erhabenheit), sowie das Dermatoskop (Auflichtmikroskopie).

Die Sicherung der Diagnose erfolgt nach chirurgischer Exzision ausschließlich durch die histopathologische Begutachtung.

Bei Bestätigung der Verdachtsdiagnose werden hierbei die Tumordicke (modifiziert nach Breslow <sup>29</sup>) und das Tumorlevel nach Clark bestimmt. Die Tumordicke wird in Millimetern ausgehend vom Stratum granulosum der Epidermis angegeben (in vier Bereichen von <1 bis >4 mm) das Clark-Level nach Eindringen von Tumorzellen in die verschiedenen Hautschichten <sup>20,30</sup>.

Melanome können sowohl aus gesunder Haut als auch aus verschiedenen Nävi, vor allem kongenitalen und dysplastischen Nävi, hervorgehen. Dabei verläuft das Wachstum meist zunächst horizontal intraepidermal im Sinne eines Melanoma in situ und erst später vertikal mit Durchbruch der Basalmembran sowie Gefahr der Metastasierung. Ein zweites Wachstumsmuster stellt das primär koriale von unter der Epidermis liegenden Melanozyten dar <sup>31</sup>.

Morphologisch werden vier häufige Melanomtypen (Superfiziell spreitendes Melanom, Noduläres Melanom, Lentigo-Maligna-Melanom, Akrolentiginöses Melanom) und einige weitere seltene Melanomtypen unterschieden. Sie alle zeichnen sich durch eine nicht nur makro- sondern auch mikroskopische Heterogenität, ein asymmetrisches Wachstum sowie zytologische Atypien aus. Unterschiede bestehen in der Konfiguration der atypischen Melanozyten (z.B. spindelzellig, polygonal, epitheloid, pagetoid), einer Nesterbildung, dem Ausmaß eines lymphohistiozytären Begleitinfiltrats, dem Zustand der umgebenden Epidermis, Vaskularisierungen, Ulzerationen u. Ä. <sup>31</sup>.

Lymphknoten- und andere Metastasen stellen sich ebenfalls vielgestaltig in Bezug auf die Melanozytenkonfiguration, die Nesterbildung u. Ä. dar, eindrucklichstes Erkennungsmerkmal ist die Pigmentierung der Tumorzellen. Da sie in vielen Fällen fehlt, werden im Zweifel immunhistologische Färbungen zur Diagnosesicherung durchgeführt, wobei z.B. S-100, HMB-45 und Melan-A dargestellt werden <sup>32</sup>.

### **1.2.3. Stadieneinteilung und Prognose**

Nach histologischer Sicherung eines primären Melanoms der Haut erfolgt die Stadieneinteilung nach der TNM-Klassifikation sowie in Anlehnung daran nach der Klassifikation des American Joint Committee for Cancer (AJCC) von 2009 (Stadien I – IV) <sup>33</sup>. Diese erfordern die Integration der Tumordicke, des Vorhandenseins von Ulzerationen, der Mitoserate und des Vorhandenseins von regionären Metastasen (Satelliten-/In-Transit- und regionäre Lymphknotenmetastasen) sowie Fernmetastasen und deren Lokalisation. Bei Vorhandensein von Fernmetastasen wird außerdem die Blutserumkonzentration der Laktatdehydrogenase zur Klassifikation herangezogen. Die histologischen Parameter sind vom Pathologen zu erfassen (Tumordicke, Ulzerationen, Mitoserate, Residualtumor (R)).

Abhängig vom TNM- bzw. AJCC-Stadium variiert die Prognose des malignen Melanoms stark. Vor allem die Tumordicke hat einen prognostischen Einfluss. Während das 5-Jahres-Überleben im Stadium IA > 95% beträgt, nimmt es auf etwa 60% im Stadium IIIB und nur noch etwa 10-30% im Stadium IV (je nach der Lokalisation der Fernmetastasen) ab. Damit beträgt die durchschnittliche Überlebenszeit im Stadium IV 8 Monate ( $\pm$  2 Monate) <sup>33</sup>. Dies zeigt deutlich die unterschiedlich gute Behandelbarkeit in frühen und späten Krankheitsstadien und damit die Wichtigkeit einer frühen Detektion.

Des Weiteren sind weibliches Geschlecht, jüngeres Lebensalter und eine Tumorlokalisation an den Extremitäten mit einer günstigeren Prognose verbunden<sup>34</sup>.

#### **1.2.4. Therapie**

Die operative Entfernung des Primärtumors ohne Residualtumor (gegebenenfalls auch mehrzeitig) steht vor allem in den frühen Stadien therapeutisch an erster Stelle und stellt die einzige kurative Therapiemöglichkeit dar<sup>20</sup>. Aber auch Metastasen können bei R0-Resektabilität oder zur Symptomkontrolle operativ versorgt werden. Bei nicht oder nicht vollständig gegebener Operabilität (R1 oder 2) aufgrund der anatomischen Verhältnisse bzw. zur Anschlusstherapie nach Operation können gemäß der S3-Leitlinien lokale Therapien zum Einsatz kommen<sup>20</sup>.

Ab Stadium IIA kann eine adjuvante Therapie mit Interferon alpha (IFN- $\alpha$ ) in Erwägung gezogen werden, hier liegt allerdings kein Konsens für ein genaues Therapieschema vor<sup>20</sup>. Ab Stadium IV bzw. nicht operablem Stadium III wird eine systemische medikamentöse Therapie durchgeführt, meist im Rahmen von Studien. Je nach der Positivität für spezifische zelluläre Zielstrukturen (zum Beispiel BRAF, siehe Abschnitt 1.2.5), der Tumorlast, der Progressionsrate und dem individuellen Patientenwillen stehen gemäß aktueller Leitlinie spezifische Kinase-Inhibitoren (zum Beispiel Vemurafenib, siehe Abschnitt 1.2.5), die Immunaugmentation mit dem monoklonalen Immunglobulin G1-Antikörper Ipilimumab und verschiedene Mono- und Polychemotherapie-Schemata (mit Dacarbazin als etabliertester Substanz, wenn auch keine überlegene Wirksamkeit in einer randomisierten kontrollierten Studie nachgewiesen wurde<sup>35</sup>) zur Auswahl<sup>20,23</sup>. Kürzlich zugelassen wurden die programmed death 1 (PD-1)-Rezeptor-Antikörper Nivolumab und Pembrolizumab, die allein bzw. in Kombination mit Ipilimumab Vorteile gegenüber der Monotherapie mit Ipilimumab zeigten<sup>36,37</sup>. Weiterentwicklungen in der klinischen Praxis sind hier zu erwarten, wobei die klassischen Chemotherapeutika in Zukunft an Bedeutung verlieren könnten<sup>38</sup>.

#### **1.2.5. BRAF-Mutationen**

Für die molekularpathologische Melanom-Diagnostik und zielgerichtete Therapie ist zurzeit in erster Linie die BRAF V600-Mutation relevant, die in ca. 45% der Melanome nachgewiesen werden kann<sup>39-42</sup>. Diese Mutation wird daher im Folgenden genauer beschrieben.



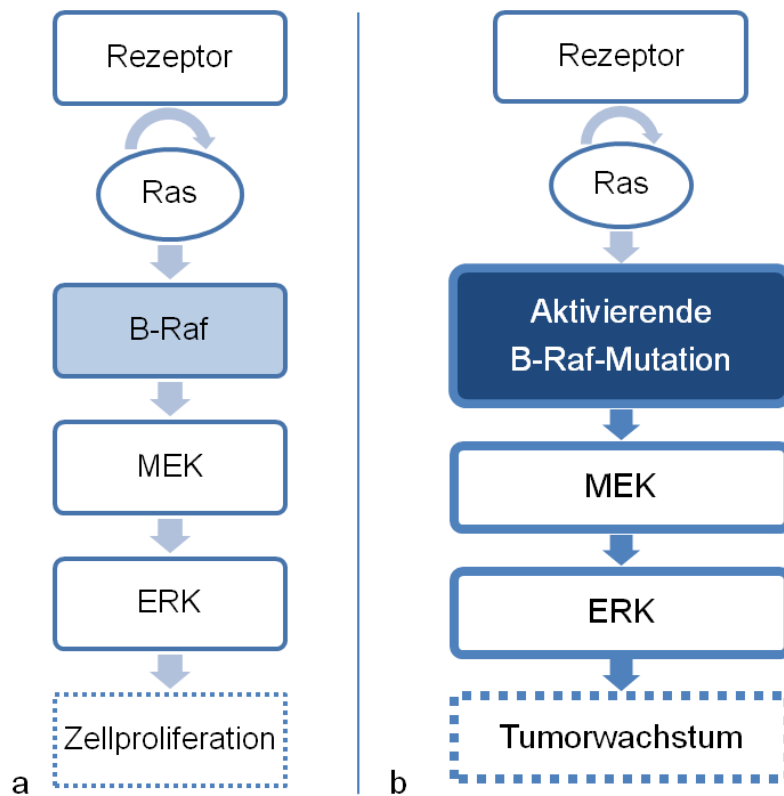
BRAF (bzw. proto-oncogene B-Raf oder v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B) kodiert für die Serin/Threonin-Kinase B-Raf, ein Mitglied der Raf-Kinase-Familie, und ist damit ein Bestandteil des MAP-Kinase-Signaltransduktionsweges (siehe Abschnitt 1.1).

Das BRAF-Gen befindet sich auf dem langen Arm von Chromosom 7 in Bande 34 (7q34) (7:140,415,748 - 140,624,563) und umfasst 20 Exons. Eine COSMIC-Abfrage am 27.09.2014 zu BRAF-Mutationen im malignen Melanom lieferte 176 Einträge<sup>43</sup>. Die meisten davon sind Missense-Substitutionen im Exon 15, Codon 600. Davies et al. fanden im Jahr 2002 BRAF-Mutationen in Zelllinien diverser Tumortypen, davon mit 59% den höchsten Anteil im malignen Melanom<sup>7</sup>. Häufigkeiten von 40-50% wurden in diversen Arbeiten bestätigt<sup>39-42</sup>. 80-90% dieser Mutationen sind Punktmutationen im Codon 600 mit einem Basenaustausch von Thymin durch Adenin an Position 1799 und folgender Substitution der Aminosäure Valin durch Glutaminsäure (V600E nach International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)). Eine Übersicht über die häufigsten BRAF-Mutationen findet sich in Tabelle 1.

**Tabelle 1** Häufige Mutationen des BRAF-Gens im malignen Melanom. CDS = kodierende DNA-Sequenz, AS = Aminosäureaustausch, Häufigkeit bezogen auf den Anteil der in den angegebenen Studien untersuchten Melanomproben mit der jeweiligen Mutation<sup>7,41,44,45</sup>

Bezeichnung	Mutation (CDS)	Mutation (AS)	COSMIC-ID	Häufigkeit
V600E	c.1799T>A	p.V600E	COSM476	ca. 80%
V600K	c.1798_1799GT>AA	p.V600K	COSM473	ca. 15%
V600R	c.1798_1799GT>AG	p.V600R	COSM474	< 5%
V600E-complex/E2	c.1799_1800TG>AA	p.V600E	COSM475	< 2%
V600D	c.1799_1800TG>AT	p.V600D	COSM477	< 5%
V600M	c.1798G>A	p.V600M	COSM1130	< 2%
V600G	c.1799T>G	p.V600G	COSM6137	< 2%

Die genannten substituierten Aminosäuren befinden sich im Protein B-Raf in der Aktivierungsschleife der Proteindomäne (Conserved Region (CR)) 3, die normalerweise durch hydrophobe Wechselwirkungen mit der P-Schleife derselben Domäne die Kinase-Untereinheit blockiert. Durch die Mutationen werden diese Wechselwirkungen gestört und die Kinase-Domäne ist konstitutiv aktiviert<sup>46,47</sup>. Dadurch steigt die Menge an phosphoryliertem MEK und MAPK in der Zelle und die Zellproliferation wird übermäßig stimuliert. Es kommt zum Tumorwachstum (siehe Abbildung 2).



**Abbildung 2** MAPK/ERK-pathway ohne (a) und mit (b) BRAF-Mutation. **a** Aus der Rezeptor-Aktivierung resultiert die Aktivierung von Proteinen der Ras-Familie. Diese wiederum aktivieren Proteinkinasen der Raf-Familie, im Beispiel B-Raf, welches die Kinase MEK phosphoryliert, die, dadurch aktiviert, ihrerseits die Kinase ERK phosphoryliert. Aktiviertes ERK induziert verschiedene Mechanismen für Zellwachstum und -proliferation. **b** Aktivierende BRAF-Mutationen führen zu einer permanenten Überaktivierung der folgenden Schritte der Signalkaskade mit daraus resultierendem übermäßigem Zell- bzw. in der Folge Tumorstadium.

Nachdem die Bedeutung der BRAF-Mutationen bekannt geworden war, wurde gezielt nach Inhibitoren der B-Raf-Kinase gesucht. Tsai et al. stellten 2008 die erste V600E-spezifische Substanz vor: propane-1-sulfonic acid [3-(5-chloro-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine-3-carbonyl)-2,4-difluoro-phenyl]-amide (PLX4720). Es bindet an die Adenosintriphosphat (ATP)-Bindungsstelle der aktiven Form der Kinase, in der die V600E-mutierte Variante bevorzugt vorliegt, und verringert dadurch die Menge an phosphoryliertem ERK und damit die Zellproliferation<sup>48,49</sup>.

Das Analogon PLX4032 (Vemurafenib) wurde unter dem Namen Zelboraf (Genentech, South San Francisco, Kalifornien, USA) von den Firmen Roche und Plexxicon (heute Daiichi-Sankyo) weiter entwickelt und vermarktet. Die schnell folgende Phase III Studie (657 Patienten mit unbehandeltem, metastasiertem Melanom mit V600E-Mutation) zeigte im Vergleich zu Dacarbazin eine signifikant höhere Ansprechrate von 48% (95%

Konfidenzintervall (CI) 42-55) statt 5% (95% CI 3-9) und eine 6-Monats-Gesamtüberlebensrate von 84% (95% CI 78 - 89) statt 64% (95% CI 56-73) <sup>50</sup>, die weitere Auswertung ein signifikant erhöhtes medianes Gesamtüberleben von 13,6 Monaten (95% CI 12,0-15,2) statt 9,7 Monaten (95% CI 7,9-12,8) (hazard ratio (HR) =0,7, 95% CI=0,57-0,97, p=0,0008) <sup>51</sup>.

Somit wurde Vemurafenib bereits 2011 von der Food and Drug Administration (FDA) für die Behandlung des metastasierten malignen Melanoms mit gesicherter BRAF V600-Mutation zugelassen. 2013 folgte Dabrafenib (GSK2118436) als weiterer BRAF-Inhibitor mit ähnlich guten Studienergebnissen <sup>52</sup>.

Häufige unerwünschte Arzneimittelwirkungen der beiden Substanzen sind vor allem Gelenkschmerzen, Fieber, Müdigkeit, Lichtempfindlichkeit und Hautausschläge; besonders zu erwähnen ist aber die Ausbildung anderer bösartiger Neubildungen der Haut, vor allem Plattenepithelkarzinomen und Keratoakanthomen, in 19 (Plattenepithelkarzinom) bzw. 10% (Keratoakanthom) der Patienten unter Vemurafenib- und 17% (Plattenepithelkarzinom und Keratoakanthom) unter Dabrafenib-Therapie <sup>51,53</sup>. Dies könnte auf eine konsekutive C-Raf- und damit paradoxe MAPK-Weg-Aktivierung zurückzuführen sein, die damit gleichzeitig auch eine mögliche Erklärung für eine im Schnitt nach 6-7 Monaten auftretende Resistenzentwicklung (d. h. Tumorprogression) der Tumoren gegen BRAF-Inhibitoren bietet <sup>46</sup>.

Die Therapie mit einem BRAF-Inhibitor ermöglicht also keine Heilung, die Studienergebnisse zeigen jedoch eine Steigerung der medianen Gesamtüberlebenszeit um ca. 4 Monate. Daher ist die molekulargenetische Untersuchung des BRAF-Mutationsstatus zu einer Routinemaßnahme bei der pathologischen Untersuchung von metastasierten Melanomen geworden.

### **1.3. Funktionsweise der Mutationsanalysen**

Zur gezielten genetischen Untersuchung von Tumorgewebe auf therapierelevante Mutationen wie die BRAF-Mutation im Malignen Melanom bestimmt man die Basenabfolge der DNA der Tumorzellen (Sequenzierung) oder weist gesuchte Sequenzen gezielt nach. Im Folgenden sollen nun die Grundprinzipien der genetischen Untersuchungsmethoden erläutert werden, die zum Verständnis der in dieser Arbeit verwendeten Methoden notwendig sind.

### **1.3.1. Sanger-Sequenzierung**

Die erste routinemäßig angewandte und in den letzten 25 Jahren wichtigste Sequenzierungsmethode ist die Kettenabbruchmethode nach Frederick Sanger<sup>54</sup>. Sie wurde 1977 von Sanger, Nicklen und Coulson vorgestellt und stellt einen Meilenstein der biomedizinischen Forschung und Praxis dar<sup>55</sup>.

DNA wird hierbei durch eine DNA-Polymerase repliziert, wobei im Reaktionsansatz auch Didesoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTPs) vorhanden sind, welche bei Einbau die weitere Kettensynthese verhindern. Es entstehen verschieden lange DNA-Fragmente, die durch früher radioaktive, heute vor allem Fluoreszenz-Markierung der Nukleotide sichtbar gemacht werden können. Ordnet man die Bruchstücke mittels Elektrophorese nach ihrer Länge, kann man anhand der jeweils letzten eingebauten Base auf die komplementäre Basensequenz zurück schließen.

Um die vier Nukleotide zu unterscheiden müssen entweder vier Ansätze mit jeweils nur einem ddNTP oder vier verschiedene Markierungen verwendet werden, wie es bei der Fluoreszenz-Markierung möglich ist.

### **1.3.2. Pyrosequenzierung**

Die Methode der Pyrosequenzierung wurde 1996 von Ronaghi et al. vorgestellt und ermöglicht im Vergleich zur Sanger-Sequenzierung bereits einen höheren Durchsatz an Proben sowie eine Zeit- und Aufwandsersparnis<sup>56-58</sup>.

Die zu untersuchende DNA wird ebenfalls von einer DNA-Polymerase repliziert, jedoch wird der Einbau jeder einzelnen Base in Echtzeit über ein Enzymsystem in ein Lichtsignal umgesetzt, das von einem Detektor gemessen werden kann.

Dazu wird ausgenutzt, dass bei der Verbindung der Nukleotide durch die DNA-Polymerase Pyrophosphat entsteht. Dieses wird hier vom Enzym ATP-Sulfurylase zur ATP-Synthese genutzt, welches wiederum bei der Konversion von Luciferin zu Oxyluciferin durch die Luciferase unter Lichtemission gespalten wird. Die Differenzierung der verschiedenen Basen erfolgt über die Zugabe immer nur eines der vier Nukleotide und die vor jeder neuen Zugabe erfolgende Eliminierung der zuvor zugegebenen Nukleotide.

Passt das aktuell zugegebene Nukleotid zur als nächstes zu replizierenden Base der DNA-Matrize, wird Licht emittiert. Bei homopolymeren DNA-Abschnitten erhält man ein entsprechend stärkeres Signal. Außerdem wird die Peakhöhe durch das Verhältnis mutierter und nicht mutierter DNA-Kopien beeinflusst und erlaubt somit einen Schluss

auf den Anteil der mutierten Gene in der Probe (im Folgenden Mutationshäufigkeit ( $v$ ) genannt).

### **1.3.3. Quantitative Echtzeit-PCR**

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine molekularbiologische Methode zur Vervielfältigung spezifischer DNA-Abschnitte<sup>59</sup>. Dabei wird doppelsträngige DNA bei ca. 96°C in Einzelstränge gespalten, bei ca. 68°C werden kurze Nukleotidsequenzen, die komplementär zu bekannten Sequenzen auf der zu vervielfältigenden DNA sind (sogenannte Primer), angelagert. An diesen Primern beginnend synthetisiert eine thermostabile DNA-Polymerase (Taq, da ursprünglich aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen) bei ca. 72°C einen zweiten DNA-Strang an jeden der beiden alten Stränge. Dieser Vorgang wird in einem speziellen Gerät (Thermozykler) automatisch etwa 30-mal wiederholt, dabei verdoppelt sich in jedem Zyklus die DNA-Menge. Der vervielfältigte Abschnitt kann durch gezielte Auswahl der Primer bestimmt werden.

Die quantitative Echtzeit- (engl. real time) PCR (qPCR) ermöglicht zusätzlich zu einer qualitativen DNA-Analyse auch eine quantitative<sup>60</sup>. Während der PCR wird über Fluoreszenzfarbstoffe die Menge an vervielfältigter DNA sichtbar gemacht, was einen Rückschluss auf die ursprünglich vorhandene DNA-Menge erlaubt.

Durch spezifische Primer und Sonden kann man mit der qPCR neben einer DNA-Quantifizierung auch bestimmte gesuchte Sequenzen durch Fluoreszenzmessungen direkt nachweisen. Dabei wird meist der Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)-Mechanismus genutzt, bei dem in Abhängigkeit von ihrer räumlichen Entfernung Energie zwischen zwei Farbstoffen übertragen wird. Beispiele hierfür sind Hybridisierungs- und Hydrolyse- (bzw. TaqMan-)Sonden.

Hierbei wird häufig ein Grenzwert der Fluoreszenz festgesetzt, bei dem die DNA-Quantität als ausreichend für weitere Analysen angenommen wird, und die Zyklenzahl, bei der dieser Wert erreicht wird als Cycle of Quantification ( $C_q$ ) angegeben.

Werden in einer Probe zwei oder mehrere unterschiedliche Sequenzen gleichzeitig detektiert, z. B. durch Verwendung unterschiedlicher Sonden, d. h. mit unterschiedlichen Sequenzen und unterschiedlichen Rezeptor-Farbstoffen, spricht man von Duplex- bzw. Multiplex-Analysen.

#### 1.3.4. Idylla-Methode

Die zumeist aufwendige genetische Untersuchung von diversen Patientenproben (zum Beispiel die Untersuchung von Melanomproben auf BRAF-Mutationen oder der Erregernachweis von Mykobakterien bei Tuberkuloseverdacht) bleibt bisher größeren Kliniken bzw. Universitätskliniken vorbehalten. Nur hier sind aufgrund des großen Probenumsatzes durch die Sammlung von eigenen sowie Fremd-Einsendungen der Betrieb der Geräte und die Einarbeitung der Mitarbeiter realisierbar.

Das von der Firma Biocartis entwickelte Idylla-Verfahren soll molekulargenetische Untersuchungen auch für kleine Krankenhäuser oder niedergelassene Ärzte erlauben, da Patientenproben einzeln und vollautomatisch untersucht werden können.

Dabei wird eine Duplex real time PCR unter Verwendung von sogenannten Amplification refractory mutation system (ARMS)-Primern durchgeführt <sup>61</sup>. Bei diesen Primern ist die DNA-Vervielfältigung hoch spezifisch nur dann möglich, wenn die 3'-terminale Base des Primers komplementär zur Proben-DNA ist. Dies wird durch eine nicht passende Base an der vorletzten Position erreicht. Wählt man die letzte Base passend zu einer gesuchten Mutation, erfolgt die Synthese nur, wenn diese Mutation in der Probe vorhanden ist, nicht jedoch bei Vorliegen der Wildtyp-Sequenz. Damit sind ARMS-Primer besonders zur Detektion einzelner Basenaustausche oder kleiner Deletionen geeignet <sup>62</sup>.

Zur Quantifizierung sind die Primer außerdem mit Fluoreszenzfarbstoffen im Sinne von TaqMan-Sonden (siehe Abschnitt 1.3.3) gekoppelt. Hierbei schwächt ein sogenannter Quencher (engl. *to quench* - auslöschen) am 3'-Ende des Primers das Fluoreszenzsignal eines sogenannten Reporter-Farbstoffs am 5'-Ende zunächst ab. Sobald die Taq-Polymerase allerdings den Folgestrang synthetisiert, die Sequenz der vorhandenen DNA also die gesuchte Mutation aufweist und damit komplementär zur Primer-Sequenz ist, baut die Polymerase die Sonde mittels ihrer Exonuklease-Aktivität in einzelne Nukleotide ab. Dadurch entfernen sich Reporter und Quencher voneinander, das Fluoreszenzsignal des Reporters wird verstärkt und kann in Echtzeit detektiert werden.

Abbildung 3 zeigt ein Idylla-Gerät bestehend aus einer Steuerkonsole und einem Instrument.



**Abbildung 3** Idylla-Konsole und –Instrument. Quelle: Biocartis NV, Mechelen, Belgien.

Mit einer Steuerkonsole können bis zu 8 Instrumente bedient werden. Diese werden mit Kartuschen bestückt, in die verschiedene Probenmaterialien eingebracht werden können (z.B. Blut, benetzte Wattestäbchen oder Formalin-fixierte Paraffin-eingebettete Gewebeschnitte (FFPE-Schnitte)).

Die technische Leistung und Durchführbarkeit des Idylla-Systems soll in dieser Arbeit mit der in der Routinediagnostik des Instituts für Pathologie der Charité Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Deutschland, verwendeten Pyrosequenzierungsmethode (PyroMark Q24, Qiagen) verglichen werden.

Dabei werden das BRAF-Gen in Gewebeproben maligner Melanome analysiert, die Ergebnisse in Bezug auf das Vorliegen des Wildtyps bzw. einer Mutation und den Typ der Mutation ausgewertet und die Übereinstimmung der beiden Methoden untersucht. Limitationen der beiden Methoden werden vergleichend diskutiert sowie die übereinstimmenden Analyseergebnisse mit den erfassten Patienten- und Tumoreigenschaften korreliert.

### 1.3.5. Next-Generation-Sequencing

Unter dem Next-Generation-Sequencing (NGS) versteht man neue Sequenzierungsmethoden, die es im Vergleich zu konventionellen Methoden erlauben, multiple Mutationen simultan oder „parallel“ zu analysieren, und daher einen hohen Sequenzierungs-Durchsatz ermöglichen.

Die Anzahl der NGS-Methoden und -Geräte steigt zur Zeit stetig <sup>63</sup>. Ein Beispiel ist die Halbleitersequenzierung, die von der Firma Life Technologies unter dem Gerätenamen Ion Torrent entwickelt wurde und die auch für diese Arbeit verwendet wird <sup>64</sup>. Hierbei werden über pH-Wert- bzw. Spannungsänderungen, die durch die Freisetzung von Protonen bei der Nukleotidinkorporation durch die DNA-Polymerase entstehen, von einem Halbleiter-Chip detektiert.

Einzelne DNA-Fragmente werden hierfür mit probenspezifischen Erkennungssequenzen legiert (Barcode-Markierung) und an je einem magnetischen Bead (engl. *bead*: Kügelchen zur DNA-Bindung) vervielfältigt. Jedes Bead passt in ein Well (engl. *well*: Vertiefung) auf dem Analysechip. Wie bei der Pyrosequenzierung werden nun auch hier die Nukleotide nacheinander einzeln hinzugegeben und wieder komplett ausgewaschen, um die verschiedenen Basen differenzieren zu können. Pro eingebauter Base wird bei der Bildung der Phosphodiesterbindung ein Proton frei, das den pH-Wert um 0,02 reduziert. Diese Potentialänderung kann über einen Ionensensitiven Feldeffekt-Transistor (ISFET) messbar gemacht und für jedes Well einzeln analysiert werden.

Die Analyse benötigt daher im Gegensatz zu anderen Sequenzierungsmethoden keine optischen Komponenten und Analyseschritte oder chemisch modifizierte Nukleotide, was insgesamt eine Vereinfachung der Detektionstechnik mit einem positiven Einfluss auf die praktischen und finanziellen Konsequenzen darstellt <sup>64</sup>.

Eventuelle Abweichungen im Vergleich von Idylla-Verfahren und Pyrosequenzierung sollen im Anschluss mittels Ion Torrent-Analyse überprüft werden.



## **2. Methodik**

### **2.1. Auswahl der Proben**

Es wurden Formalin-fixierte Paraffin-eingebettete zeitlich aktuelle Gewebeproben aus der pathologischen Routine-Diagnostik des Instituts für Pathologie der Charité Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Deutschland, des Instituts für Pathologie sowie der Klinik für Dermatologie, Venerologie, Allergologie und Phlebologie des Johannes Wesling Klinikums Minden, Minden, Deutschland und des Universitätskrankenhauses Antwerpen, Antwerpen, Belgien verwendet. Einschlusskriterien waren das Vorhandensein von Melanomgewebe in der Probe, eine ausreichend große Tumorphläche (siehe Abschnitt 2.2) mit mindestens 50% Tumorzellanteil und ein Patientenalter von mehr als 18 Jahren zum Zeitpunkt der pathologischen Untersuchung. Da aufgrund der klinischen Anwendung von Vemurafenib in späten Krankheitsstadien vorwiegend Metastasen eingeschlossen werden sollten, wurden vor allem metastatische Gewebeproben ausgewählt.

Aus Berlin und Minden wurden 209 Proben eingeschlossen.

Aus Antwerpen wurden 40 Proben von der Firma Biocartis zur Verfügung gestellt, die dort bereits mit dem Idylla-Gerät untersucht worden waren, ohne die Ergebnisse der Untersuchungen zu übermitteln.

Für die Studie liegt ein Ethikvotum vor (EA1/199/14).

### **2.2. Histologische Beurteilung**

Von den ausgewählten FFPE-Blöcken aus Berlin und Minden wurden von der Firma pro vitro zwei 2,5 bis 4 sowie dazwischen liegend fünf 10 µm Gewebeschnitte angefertigt. Je der erste und letzte Schnitt wurden mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Von den Proben aus Antwerpen wurden zwei 2,5 bis 4 sowie dazwischen liegend fünf 5 µm Gewebeschnitte zur Verfügung gestellt.

Zur histologischen Überprüfung der Melanom-Diagnose sowie Evaluation der histologischen Eigenschaften der Tumoren wurden alle HE-Start-Schnitte unter dem Mikroskop beurteilt.

Dabei wurden der Pigmentierungsgrad und der Nekroseanteil bestimmt sowie die Diagnose „Malignes Melanom“ überprüft.

In 25-, 100- und 200-facher Vergrößerung wurde je ein Foto mit dem Programm ProgRes® Capture Pro Camera Control Software (Jenoptik, Jena, Deutschland) angefertigt und unter fortlaufender Nummerierung abgespeichert.

Auf dem Deckglas wurde das Tumorareal annotiert, das für die genetische Analyse verwendet werden sollte. Dabei wurde die verwendete Fläche auf mindestens 50 mm<sup>2</sup> bei 5 µm bzw. 25 mm<sup>2</sup> bei 10 µm Schnitten festgelegt. Bei kleiner Tumorgröße wurde das gesamte Tumorareal markiert, bei großer Tumorgröße wurde ein ca. 6x6mm großes Rechteck eingezeichnet. Damit wurde die mindestens benötigte Fläche von 25 mm<sup>2</sup> bei 10 µm Schnitten sicher erreicht. Die letztendlich markierte Fläche wurde mit einem Lineal ausgemessen und die entsprechende benötigte Anzahl an Schnitten notiert.

Folgende histologische Eigenschaften wurden erfasst:

- Größe der markierten Gewebefläche
- prozentualer Nekroseanteil am Gesamttumor in Zehnerschritten
- prozentualer Tumorzellanteil am markierten Bereich in Zehnerschritten
- Pigmentierungslevel in vier Kategorien (Niedrig (engl. low) (L): ≤10% pigmentierte Tumorzellen, Mittel (engl. medium) (M): 11-24% pigmentierte Tumorzellen, Hoch (engl. high) (H): 25-50% pigmentierte Tumorzellen, Sehr hoch (engl. very high) (VH): > 50% pigmentierte Tumorzellen)

## **2.3. Mutationsanalyse**

### **2.3.1. Aufbereitung der DNA für die Pyrosequenzierung**

Die Aufbereitung der DNA für die Pyrosequenzierung erfolgte im Wesentlichen gemäß den Verfahrensanweisungen des Labors für Molekularpathologie des Instituts für Pathologie der Charité Universitätsmedizin Berlin, die den Herstellervorgaben der jeweiligen Geräte entsprechend erstellt und den Voraussetzungen und Erfahrungen des Labors entsprechend angepasst und optimiert wurden.

Die DNA-Präparation erfolgte mit dem QIAmp DNA Mini Kit und der QIAvac 24 (beides Qiagen, Venlo, Niederlande), die DNA-Konzentrationsbestimmung mit dem NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) (verwendetes Computerprogramm: ND-1000 V3.7.0), die PCR und die Pyrosequenzierung selbst mit dem thetascreen BRAF Pyro Kit sowie letztere mit dem PyroMark Q24 (beides Qiagen).

Die genauen Arbeitsabläufe sind den folgenden Abschnitten zu entnehmen.

### ***DNA-Präparation***

Die benötigten HE-Schnitte (Anzahl entsprechend der markierten Tumorfläche) werden durch Erhitzen auf 80°C und Tauchbad in Xylol (J. T. Baker, Avantor Performance Materials, Center Valley, Pennsylvania, USA) und absolutem (abs.) Ethanol (Herbeta, Berlin, Deutschland) deparaffiniert und luftgetrocknet.

Mit einem mit ATL-Puffer (alle Reagenzien aus dem QIAmp DNA Mini Kit, zur genauen Zusammensetzung siehe Handbuch des Herstellers) benetzten Skalpell (Feather disposable scalpel No. 11, Feather Safety Razor Co. LTD, Osaka, Japan) wird der der Tumormarkierung entsprechende Bereich auf den deparaffinierten Schnitten je Tumorprobe makrodisseziert und in ein beschriftetes, mit 180 µl ATL-Puffer befülltes 1,5 ml-Röhrchen mit Schraubverschluss überführt.

Die Röhrchen werden fest verschlossen und entweder bei -20°C eingefroren oder direkt weiter aufbereitet: In einem Arbeitsablauf werden je 20 Proben im Thermomixer (Eppendorf Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 95°C hydratisiert, abgekühlt und kurz zentrifugiert. Im Anschluss werden sie mit 20 µl Proteinase K versetzt, gemischt und etwa eine Stunde bei 55°C inkubiert, anschließend kurz zentrifugiert, mit 200 µl AL-Puffer versetzt, gemischt und 10 min bei 55°C denaturiert sowie erneut kurz zentrifugiert.

Nun werden die Proben mit gestopfter Spitze mit 210 µl absolutem Ethanol gemischt und auf die jeweiligen Minisäulen des Kits überführt, die zuvor beschriftet und auf dem Vakuum-Kollektor (QIAvac 24) vorbereitet wurden.

Im ersten Wasch-Schritt werden nun der ATL-Puffer sowie das Ethanol abgesaugt. Für den zweiten Wasch-Schritt werden 600 µl Waschpuffer 1 (AW 1) auf jede Säule überführt und ebenfalls abgesaugt. Dies wiederholt sich für den dritten Wasch-Schritt mit AW 2.

Nun werden die Säulen verschlossen, in die zugehörigen Röhrchen gestellt und 2 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert, anschließend in ein neues, zuvor beschriftetes 1,5 ml-Eppendorf-Röhrchen gestellt und das alte Röhrchen verworfen.

Auf die Filtermembranen der Minisäule werden nun je 50 µl auf 70°C vorgewärmter AE-Puffer gegeben. Die Minisäulen in den Röhrchen werden 5-10 min auf 70°C temperiert und anschließend 3 min bei 11000 rpm zentrifugiert.

Nun befindet sich die DNA im Eluat im Eppendorf-Röhrchen. Die Minisäule wird verworfen, das Eluat kann im Eppendorf-Röhrchen bei 6 °C gelagert werden.

Während des gesamten Arbeitsablaufes werden die Probennummern auf den Gefäßen immer wieder auf Übereinstimmung kontrolliert.

### ***DNA-Konzentrationsbestimmung***

Für die DNA-Konzentrationsbestimmung wird das NanoDrop-Gerät zunächst kalibriert und AE-Puffer aus dem DNA-Präparations-Kit als Leerprobe vermessen. Alle Messungen werden mit 2,5 µl DNA-Eluat durchgeführt.

### ***PCR***

Je 1 µl DNA-Eluat wird in einem 0,5 ml-Röhrchen entsprechend der gemessenen DNA-Konzentrationen mit AE-Puffer auf eine Konzentration von etwa 1 ng/µl verdünnt und wieder kühl gestellt.

Zur Herstellung des PCR-Mixes werden nun je Probe sowie für je eine Positiv- und zwei Negativ-Kontrollen (AE-Puffer und Wasser) folgende Reagenzien gemischt und kurz zentrifugiert:

- 12,5 µl PyroMark PCR Master Mix, 2x
- 2,5 µl CoralLoad Concentrate, 10x
- 1,0 µl PCR-Primer BRAF codon 600
- 4,0 µl Wasser.

Die entsprechende Anzahl 0,2 ml-Röhrchen wird mit den Probennummern beschriftet. In jedes Röhrchen werden 20 µl PCR-Mix vorgelegt. Nun werden jeweils 5 µl DNA-Verdünnung bzw. Puffer, Wasser und Positivkontrolle hinzu pipettiert und mit Öl überschichtet.

Die Proben werden in den Thermozykler (T3000 Thermocycler, Biometra, Göttingen, Deutschland) eingesetzt und das passende Programm (Denaturierung Beginn: 15 min, 95 °C; 42 Zyklen: Denaturierung: 20 min, 95 °C, Annealing: 30 min, 53 °C, Elongation: 20 min, 72 °C; Extension: 5 min, 72 °C) gestartet.

### ***Agarosegelelektrophorese***

Mit der Agarosegelelektrophorese werden das Gelingen der PCR sowie die Reinheit ihrer Produkte überprüft.

Zur Herstellung des Agarosegels werden am Vortag der Verwendung 100 ml TAE-Puffer Gebrauchslösung (20 ml 50-fach TAE Buffer (Gennaxxon, Ulm, Deutschland) und 980 ml demineralisiertes Wasser (A. dem.)), 1,65 g Agarose Sieve low melting (Biozym,

Hessisch Oldendorf, Deutschland) und 1,65 g Agarose (Serva, Heidelberg, Deutschland) in einen 500 ml Erlenmeyerkolben gefüllt, quellen gelassen, in der Mikrowelle aufgekocht (Verluste werden mit weiterem A. dem. ausgeglichen) und mit 5 µl Ethidiumbromid 10 mg/ml (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) versetzt. Nach Abkühlen im mit Kämmen versehenen Gelträger wird das Gel in Aluminiumfolie verpackt im Kühlschrank gelagert.

Am Tag der Analyse werden die Elektrophoresekammer mit TAE-Puffer Gebrauchslösung befüllt, der Gelträger mit dem Gel eingesetzt und die Kämmen entfernt. Ein 100 bp-Marker sowie jeweils 5 µl PCR-Produkt werden entsprechend der auf dem Versuchsprotokoll vordokumentierten Verteilung in die Taschen pipettiert. Der Deckel wird geschlossen und das Gerät für ca. 15 min eingeschaltet.

Sind die PCR-Produkte und Marker ausreichend weit gelaufen, wird das Ergebnis mit dem Geldokumentationssystem GenoSmart (VWR, West Chester, Pennsylvania, USA) unter UV-Licht fotodokumentiert. Das Bild wird gespeichert, ausgedruckt und ins Versuchsprotokoll übernommen.

### **2.3.2. Pyrosequenzierung**

Für die Pyrosequenzierung mit dem PyroMark Q24 müssen die PCR-Produkte zunächst auf Streptavidin-Sepharose-Beads immobilisiert werden. Dies geschieht über die starke Bindung (Kristallstruktur, Wasserstoffbrücken, Van-der-Waals-Kräfte) zwischen Streptavidin und Biotin. Die PCR-Primer sind zwecks dessen biotinyliert.

Weiterhin wird dazu ein Master-Mix mit folgenden Komponenten je Probe angesetzt:

- 2 µl Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare, München, Deutschland)
- 40 µl PyroMark Bindungspuffer
- 28 µl Wasser

Je Probe werden 70 µl des Master-Mixes in eine 24 Well-PCR-Platte pipettiert. Jeweils 10 µl der Proben (inklusive Positiv- und Negativkontrollen) werden hinzu gegeben, die Platte mit selbst klebenden Folien (LightCycler 480 Sealing Foil, Roche, Mannheim, Deutschland) verschlossen und 5-10 min bei 1400 U/min auf einem Plattenschüttler (Monoshake, H+P Labortechnik AG, Oberschleißheim, Deutschland) geschüttelt.

Währenddessen wird die PyroMark Q24 Vakuum-Arbeitsstation gemäß dem Hersteller-Protokoll mit abs. Ethanol, Denaturierungslösung, verdünntem Waschpuffer (225 ml

Wasser und 25 ml 10x PyroMark Waschpuffer) und hochreinem Wasser (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) befüllt sowie ein PyroMark Q24 Plattenhalter auf einem Heizblock auf 80°C vorgeheizt.

Je Probe werden 0,8 µl des Sequenzierungsprimers mit je 24,2 µl PyroMark Annealing Buffer verdünnt und in jedes benötigte Well einer PyroMark Q24-Platte gegeben.

Die PCR-Platte sowie die PyroMark Q24-Platte werden in die vorgesehenen Halterungen gestellt.

Nun werden unter anliegendem Vakuum die Filternadeln des Saugkopfes ca. 10 s mit Wasser benetzt und für ca. 15 s in die PCR-Platte abgesenkt, um die Sepharose-Beads mit der immobilisierten DNA anzusaugen. Anschließend wird der Saugkopf direkt hintereinander 5 s in 70%-igem Ethanol, 5 s in Denaturierungslösung und 10 s in Waschpuffer gespült. Nach den Spülschritten wird er 5 s in einer senkrechten Position und dann wieder waagrecht über die PyroMark Q24-Platte gehalten. In dieser Position wird die Vakuumpumpe ausgeschaltet und die Beads durch vorsichtiges Schütteln in die PyroMark Q24-Platte mit den Sequenzierungsprimern überführt.

Zur Reinigung der Filternadeln wird der Saugkopf nun in hochreinem Wasser 10 Sekunden geschüttelt und in einer zweiten Wanne mit hochreinem Wasser und dort angelegtem Vakuum gespült. Anschließend wird er 5 s in senkrechter Position gehalten, bevor die Vakuumpumpe wieder ausgeschaltet und der Saugkopf in die Parkposition überführt wird.

Die PyroMark Q24-Platte wird auf dem vorgewärmten PyroMark Q24-Plattenhalter 2 min lang bei 80°C erhitzt und auf einem zweiten, kalten Plattenhalter 15 min bei Raumtemperatur abgekühlt, damit der Sequenzierungsprimer binden kann.

Für den Betrieb des PyroMark Q24 wird das Programm PyroMark Q24 am Computer geöffnet sowie eine neue Datei mit den entsprechenden Einstellungen (BRAAF Assay, Instrumenten-Methode passend zur verwendeten Kartusche (hier immer 008), Eintragung der Probennummern) erstellt und auf einem Universal Serial Bus (USB)-Stick gespeichert. Das Programm erstellt diesen Voreinstellungen entsprechend Vorabinformationen mit Angabe der erforderlichen Volumina für die Befüllung der Kartusche. Diese werden ausgedruckt.

Die zu verwendende Kartusche wird mit hochreinem Wasser gespült und gemäß der Vorabinformationen mit Enzym-, Substratgemisch (gefriergetrocknet geliefert, jeweils in 620 µl Wasser gelöst) und den vier Nukleotiden beladen und mit dem Etikett nach vorne in den PyroMark Q24 eingesetzt.

Der USB-Stick mit der erstellten Datei wird mit dem PyroMark Q24 verbunden. Die Datei wird am Gerät ausgewählt und der Lauf gestartet. Der Fortschritt kann auf einem kleinen Bildschirm am Gerät verfolgt werden. Nach Abschluss des Laufs (etwa 17 min) muss dieser auf dem USB-Stick gespeichert werden und kann nun am Computer geöffnet, analysiert und ausgedruckt werden.

Für die genetische Analyse wird das Pyrogramm vom Gerät mit einem speziellen Plug-In ausgewertet. Dabei wird eine Mutationshäufigkeit unterhalb der Detektionsgrenze (engl. limit of detection (LOD)) als Wildtyp, eine Mutationshäufigkeit  $\geq$ LOD aber  $\leq$ LOD + 3Prozenteinheiten als potenziell niedrigfrequente Mutation und eine Mutationshäufigkeit  $\geq$ LOD + 3Prozenteinheiten als Mutation gewertet. Das LOD wird vom Hersteller für die V600E-Mutation mit 2,4%, für V600G mit 2,1%, für V600A mit 2,2% und für V600M mit 2,4% angegeben.

Dabei können die Pyrogramme für andere, komplexe BRAF-Mutationen sehr ähnlich aussehen. Es ist also eine Prüfung der automatischen Analyseergebnisse, ein kritischer Abgleich mit den Mutationsdefinitionen des Plug-Ins und im Zweifel eine Wiederholung der Analyse erforderlich.

Therapieentscheidungen dürfen daher nicht ausschließlich aufgrund des Analyse-Ergebnisses getroffen werden.

Alle Proben wurden zuerst mit der Pyrosequenzierung analysiert und von zwei Personen ausgewertet, um eine Beeinflussung durch das Idylla-Ergebnis zu vermeiden.

### **2.3.3. Idylla-Methode**

Für die Analyse mit dem Idylla-Gerät wird das FFPE-Gewebe nicht deparaffiniert in die Kartusche gegeben. Aus Gründen der besseren Vergleichbarkeit wurde auch hierfür der markierte Tumorbereich makrodisseziert, obwohl dies laut Hersteller nicht nötig wäre. Allerdings muss das abgekratzte Gewebe zur Verhinderung elektrostatischer Aufladung zwischen zwei kleinen Filterpapieren fixiert und zwischen diesen in die Kartuschenöffnung eingesetzt werden.

Dazu wird das entsprechende Gewebe mit einem mit DNase-freiem Wasser benetzten Skalpell auf die mit etwa 45 µl DNase-freiem Wasser befeuchteten Filterpapiere, die auf

einem zweiten, sauberen Objektträger vorbereitet wurden, übertragen. Die Papiere werden mit einer Pinzette zusammengeklappt und in eine nun geöffnete und mit der entsprechenden Probennummer beschriftete Kartusche eingelegt. Die Lage der Probe wird überprüft, das Siegel der Kartusche entfernt und die Kartusche geschlossen.

Vor Beginn der Analyse können die geschlossenen Kartuschen bis zu 2 h bei Raumtemperatur aufbewahrt werden. Somit können im direkten Anschluss weitere Proben vorbereitet werden, entsprechend der Anzahl der zur Verfügung stehenden Instrumente.

Zum Starten der Analyse meldet man sich mit seinem persönlichen Benutzernamen an der Konsole an und wählt den Menüpunkt „New Test“ an. Unter dem Bildschirm befindet sich ein Barcodeleser mit dem man den 2D-Code auf der Kartusche scannt. Diese ist nun dem aktuellen Lauf zugeordnet und kann nicht noch einmal verwendet werden. Die Verknüpfung mit der Probennummer (Run-ID) kann nun auch über das Scannen eines Strich- oder 2D-Codes erfolgen, oder die Nummer wird per Hand eingegeben.

Nach Bestätigung dieser Eingaben kann ein Instrument durch leichten Druck auf den Öffnungsknopf geöffnet, die Kartusche eingesetzt und das Instrument durch erneuten leichten Druck auf den Öffnungsknopf geschlossen werden. Das Programm startet nun automatisch.

Dabei laufen beim untersuchten Idylla-BRAF-Assay im Inneren jeder Kartusche folgende Prozesse ab:

1. FFPE-Verflüssigung und Zelllyse: Die Probe wird in einer Lysekammer durch chemische Reagenzien, Enzyme, Hitze und hoch-intensiven fokussierten Ultraschall (HIFU) deparaffiniert, verflüssigt und homogenisiert. Dabei wird das Gewebe aufgelöst, die Zellen werden lysiert, die freigesetzten Nukleinsäuren durch Hitze von Enzymresten befreit und in fünf Detektionskammern gespült, von denen drei die entsprechenden PCR-Reagenzien enthalten.
2. Duplex TaqMan real-time PCR unter Verwendung von ARMS-Primern: In den Detektionskammern sind alle Reagenzien in getrockneter Form vorhanden. Es erfolgt je eine Allel-spezifische Duplex-PCR mit endogenem Kontrollgen (sample processing control (SPC)). Die drei amplifizierten Sequenzen sind BRAF Wildtyp,



BRAF c.1799T>A (p.V600E, E2 und D) und BRAF c.1798G>A (p.V600K, R und M).

3. Automatische Ergebnis-Interpretation: Durch eine Ausgleichsrechnung über alle PCR-Signalkurven wird zunächst die Validität der PCR-Signale überprüft. Ist in einer oder mehreren der Kammern kein valides Signal vorhanden, wird die Analyse als „Invalid“ gekennzeichnet und nicht genotypisiert. Für alle validen Fluoreszenzkurven werden die  $C_q$ -Werte der BRAF- sowie SPC-Signale berechnet. Die SPC-Signale werden als interne Kontrolle verwendet. Anhand der Differenz zwischen den BRAF Wildtyp- und Mutations- $C_q$ -Werten ( $\Delta C_q$ ) wird zwischen den Ergebnissen „Mutation vorhanden“ (innerhalb eines validierten Bereichs von  $\Delta C_q$ ) und „keine Mutation vorhanden“ (außerhalb eines validierten Bereichs von  $\Delta C_q$ ) unterschieden. Die Mutations-negativen Ergebnisse werden zusätzlich anhand der BRAF Wildtyp- $C_q$ -Werte eingeteilt in „No mutation detected in BRAF codon 600“ (BRAF Wildtyp- $C_q$  unterhalb des Grenzwertes 1), „No mutation detected in BRAF codon 600, mutations < 5% may not be detected“ (BRAF Wildtyp- $C_q$  unterhalb des Grenzwertes 2) und „Insufficient DNA input“ (BRAF Wildtyp-  $C_q$  oberhalb des Grenzwertes 2).

Im Dialogfeld „Status overview“ kann der erfolgreiche Beginn sowie der Fortschritt aller gestarteten Läufe überprüft werden.

Nach Abschluss der Läufe (1,5 h pro Lauf) meldet man sich erneut an der Konsole an und erstellt über die Befehle „report“ und „generate report“ eine PDF-Datei mit allen Informationen über den Lauf sowie dem Ergebnis, welche über Netzwerk an verbundenen Computern geöffnet, verwaltet und ausgedruckt werden kann.

#### **2.3.4. Next Generation Sequencing**

Zur Validierung abweichender Ergebnisse wurden die betroffenen Proben sowie einige weitere Fälle ebenfalls mit einer Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) und dem am Institut für Pathologie der Charité Universitätsmedizin Berlin standardmäßig verwendeten Ion AmpliSeq Colon Lung Cancer Panel v2 (beides Firma Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA) analysiert.

Dieses Panel umfasst mit 90 Amplicons ca. 500 Mutationen von 22 für diese Tumorentitäten relevanten Genen, darunter auch das BRAF-Gen. Die Auswertung erfolgte mit der Torrent Suite Software v4.2 (Life Technologies) und dem Integrative Genomics Viewer (IGV), in dem die Sequenz der Codons 599-601 des BRAF-Gens für jede Probe betrachtet wurde<sup>65</sup>. Eine Coverage (engl. *coverage*: Abdeckung der DNA-Fragmente durch die Sequenzierung) von 5000 Reads (engl. *reads*: Anzahl der Sequenz-Ablesevorgänge für den jeweiligen DNA-Abschnitt während der Sequenzierung) über der Base 1798 wurde als Zielwert für Wildtyp-Sequenzen festgelegt, da mit einer höheren Anzahl an Reads die Wahrscheinlichkeit sinkt, mutierte Allele nicht abzulesen.

Es wurden die für die Pyrosequenzierung hergestellten DNA-Extrakte verwendet. Im Verlauf der Überprüfungen wurde außerdem die Entscheidung getroffen, die extrahierte DNA von Proben mit schlechter DNA-Qualität mit einem Verfahren zur Entfernung von PCR-Inhibitoren (z.B. Melanin) zu behandeln (mittels OneStep PCR Inhibitor Removal Kit (Zymo Research, Irvine, Kalifornien, USA) sowie alle abweichenden Proben nach einer zweiten DNA-Extraktion mit dem Maxwell 16 FFPE Tissue LEV DNA Purification Kit (Promega, Mannheim, Deutschland) erneut zu pyrosequenzieren. Dieses Kit zeigte sich während der Integration der PGM-Analyse in die pathologische Routine-Diagnostik der Charité Universitätsmedizin Berlin als zuverlässigere Methode im Vergleich zur Qiagen-Extraktion.

### ***Library-Erstellung***

Vor der Analyse wird zunächst die Qualität der DNA mittels einer PCR mit anschließender Polyacrylamidgelelektrophorese überprüft. Hierbei sollten Fragmente mit einer Länge von mindestens 100 bp, besser 300 oder 400 bp, als deutliche Bande zur Darstellung kommen.

Nach einer DNA-Konzentrationsmessung mit einem Qubit Fluorometer der Firma Life Technologies wird eine sogenannte Library (Bibliothek von durch eine Multiplex-PCR vorselektierten Sequenzen der zu untersuchenden Proben, jeweils mit spezifischen Adaptoren versehen) mit dem Ion AmpliSeq Library Kit 2.0 erstellt. Dazu wird die genomische DNA zunächst amplifiziert (Ansatz für das Colon Lung Panel pro Probe: 4 µl 5x Ion AmpliSeq HiFi Master Mix, 10 µl 2x Ion AmpliSeq Primer Pool, die ihrer Konzentration entsprechende Menge an DNA und die einer Gesamtmenge von 20 µl entsprechende Menge Nuklease-freien Wassers). Die PCR wird mit 22-30 Zyklen (je

nach Stärke der Banden in der Gelelektrophorese) bei 99 °C und einer Annealing-Temperatur von 60 °C durchgeführt.

Nun werden 2 µl FuPa-Reagenz zum partiellen Verdau der Primer-Sequenzen hinzugegeben und ein entsprechendes Thermozykler-Programm ausgeführt.

Die Ligation der Adapter sowie von Barcode-Sequenzen zur Identifikation der Proben erfolgt mittels 4 µl Switch Solution, 2 µl Barcode-Adapter-Mix (1,25 µl IonXpress P1 Adapter, 1,25 µl IonXpress Barcode und 2,5 µl Nuklease-freies Wasser) und 2 µl DNA-Ligase im Thermozykler.

Die nun noch nicht amplifizierte Library wird an magnetischen Beads (Agencourt AMPure XP Reagenz, Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) mit 70%-igem Ethanol gereinigt und in 50 µl LowTE Puffer von den Beads gelöst.

Anschließend werden alle erstellten Libraries mittels TaqMan real-time qPCR und dem Ion Library Quantification Kit quantifiziert. Dazu werden die Proben, eine Negativkontrolle und drei Standards mit dem 7900 HT Fast System analysiert. Bei Quantitäten außerhalb der Standardreihe oder unter 20 pM müssen die Verdünnung bzw. die Library-Erstellung sowie die Quantifizierung wiederholt werden

### ***Amplifizierung***

Vor der Beladung des Analysechips müssen die Libraries aller gewünschten Proben gemischt und die DNA-Fragmente an je einem Bead amplifiziert werden. Dazu werden die Library Stocks mit LowTE auf eine ca. 100 picomolare Konzentration verdünnt und zu je 5 µl zum Library Pool gemischt. Aus diesem Pool werden 6 µl mit 44 µl Nuklease-freiem Wasser versetzt. 25 µl dieses verdünnten Library Pools werden mit 25 µl Nuklease-freiem Wasser, 500 µl Ion PGM Template OT2 200 Reagent Mix, 300 µl PCR Reagent B und 50 µl Enzyme Mix versetzt und mit 100 µl Ion Spheres Particles gemischt. Mit dieser Amplifikationslösung wird der Ion OneTouch 2 nach den Anweisungen des Gerätes beladen. Für den anschließenden Lauf des Enrichment Moduls werden kurz vor Ende des OneTouch-Laufs Melt-Off-Solution (280 µl Tween Solution und 40 µl 1Mol NaOH) und Dynabeads (13 µl MyOne Streptavidin C1 Beads und 130 µl MyOne Beads Wash Solution) in die entsprechend gekennzeichneten Wells eines vorbereiteten Reaktionsschlittens im Modul gegeben. Ebenso wird mit den fertigen Ion Spheres Particles aus dem OneTouch (Überstand muss zuvor in beiden Tubes bis auf je 50 µl entfernt werden) und 3x300 µl Ion OneTouch Wash Solution verfahren und das Enrichment gestartet.

### ***PGM-Beladung***

Für den eigentlichen Ion Torrent-Lauf muss dieser zunächst auf dem Ion Server angelegt werden. Dann werden 5 µl der angereicherten template-positiven (d. h. mit PCR-Produkt beladenen) Ion Spheres Particles zentrifugiert, der Überstand wird bis auf 15 µl entfernt, 12 µl Sequencing Primer hinzu gegeben und ein kurzer Thermozykler-Lauf durchgeführt. Nun kann der angelegte Lauf auf dem PGM ausgewählt werden. Nach dem Chip-Check und Befolgung der Anweisungen auf dem Geräte-Touchscreen wird die Flüssigkeit aus dem Chip mittels Pipette und Zentrifugation entfernt. Zur Probe werden nun außerdem 5 µl Polymerase gegeben und diese 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend kann der Chip sehr langsam mit einer Pipette beladen werden. Um eine bestmögliche Verteilung der Partikel ohne Luftblasen zu ermöglichen wird der Chip nun erneut zentrifugiert und auf den Tisch geklopft, der Überstand wird entfernt. Der Chip kann jetzt in den PGM eingesetzt und der Lauf gestartet werden.

### ***Initialisierung***

Nach je drei Läufen muss außerdem eine Initialisierung des PGM durchgeführt werden. Dafür werden einmal die Woche eine Chlorid-, ansonsten eine Wasser-Waschung mit Chlorlösung und 1 Mol NaOH bzw. 18 MΩ Wasser gemäß der Geräte-Anweisungen durchgeführt und die zu wechselnden Zuberhörteile ausgetauscht.

Die Reagenzienbehälter werden mit 350 µl 100 Millimol NaOH (Waschflasche 1), 50 ml Sequencing v2 1x W3 Solution (Waschflasche 3) bzw. nach Stickstoff-Begasung mit 18 MΩ Wasser, 200 v2 W2 Solution und 70 µl 100 Millimol NaOH (Waschflasche 2) befüllt. Durch die Begasung sollen kleinste pH-Wert-Verschiebungen durch Oxidation durch den Luftsauerstoff verhindert werden. Je 20 µl der vier dNTPs werden in die entsprechenden Tubes überführt und diese sowie die Waschflaschen an den entsprechenden Stellen des Geräts befestigt.

### ***Uracil-DNA-Glykosylase-Verdau***

Da bei einer Probe zahlreiche C:G>T:A-Substitutionen nachweisbar waren, wie sie typisch für Artefakte durch Formalin-Fixierung sind, wurde die DNA dieser Probe zur Reduzierung von fixierungsbedingten Artefakten mit Uracil-DNA-Glykosylase (UDG) (Antarctic Thermolabile UDG, New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, USA) vorbehandelt. Hierfür wurden 120 ng genomische DNA mit 6 µl UDG verdaut (2 h, 37 °C) sowie eine Hitzedeaktivierung der UDG (10 min, 95 °C) und eine Aufreinigung über XP-

Beads im Verhältnis 1:1,5 gemäß des Protokolls für die Library-Erstellung durchgeführt, dann gemäß Protokoll mit der Library-Erstellung begonnen

## 2.4. Statistische Auswertung

Die Studiendokumentation sowie die Übersichtstabellen über die Proben- und Ergebniszahlen wurden mit Microsoft Office Excel 2007 geführt und erstellt.

Die Berechnung der Übereinstimmung beider Methoden erfolgte wie in Tabelle 2 beschrieben, die Berechnung der zugehörigen Konfidenzintervalle nach Wilson und Newcombe<sup>66</sup>.

**Tabelle 2** Prozentuale Übereinstimmung der Ergebnisse von Pyrosequenzierung und Idylla auf dichotomer Ebene (Mutation ja oder nein)

Maßzahl	Berechnung
% Gesamtübereinstimmung	$100 \times (\text{Anzahl konkordante Ergebnisse}) / (\text{Anzahl alle Ergebnisse})$
% Positive Übereinstimmung	$100 \times (\text{Anzahl konkordante mutationspositive Ergebnisse}) / (\text{Anzahl mutationspositive Ergebnisse Referenztest})$
% Negative Übereinstimmung	$100 \times (\text{Anzahl konkordante mutationsnegative Ergebnisse}) / ((\text{Anzahl mutationsnegative Ergebnisse Referenztest}) + (\text{Anzahl mutationspositive Ergebnisse Referenztest mit durch Idylla nicht detektierbaren Mutationen}))$

Es wurde entschieden, dass in der vergleichenden Statistik nur die Proben berücksichtigt werden, für die mit beiden Methoden technisch valide Ergebnisse erhalten wurden, und dass Mutationen, die von den Idylla-Primern nicht erkannt werden können, als übereinstimmendes Ergebnis der Gruppe der mutationsnegativen Ergebnisse gewertet werden, da durch das System hier keine andere Aussage möglich ist.

Die klinisch-pathologischen Korrelationen wurden mit dem Programm IBM SPSS Statistics 20 mittels der Funktionen Crosstabs sowie dem Chi-Quadrat-Test für nominalskalierte Variablen und dem Gamma-Test für ordinalskalierte Variablen ausgewertet. Mit demselben Programm wurden auch die Diagramme erstellt.

## **3. Ergebnisse**

### **3.1. Probenkollektiv**

Insgesamt wurden 249 Melanomproben auf das Vorliegen von Mutationen des BRAF-Gens im Codon 600 untersucht. Davon wurden 40 Proben in Antwerpen histologisch ausgewertet und mit dem Idylla-Gerät untersucht, alle Proben in Berlin (erneut) histologisch ausgewertet und mittels Pyrosequenzierung analysiert und 209 Proben mit beiden Methoden in Berlin untersucht.

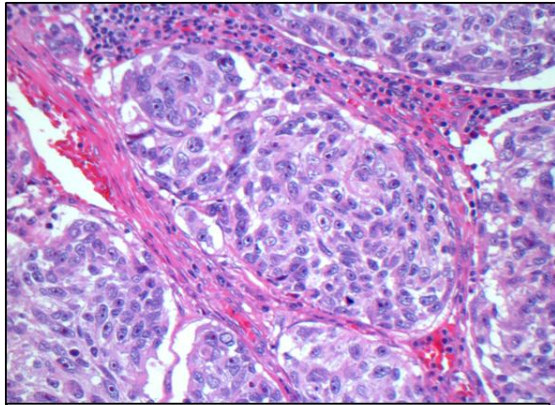
Unter allen verwendeten Schnitten waren 18 Primärtumoren der Haut, 8 Primärtumoren anderer Lokalisation, 123 Lymphknotenmetastasen, 98 Metastasen anderer Lokalisation (In-Transit- und Fernmetastasen) und 2 Melanome unbekanntem Ursprungs.

Die Proben stammten aus der pathologischen Routine-Diagnostik der Jahre 2008 - 2014 und von 234 Patienten (97 weiblich, 137 männlich) im Alter von 20 - 95 Jahren (mittleres Alter 61,6 Jahre), darunter sechs Patienten mit Proben von zwei Lymphknotenmetastasen, drei Patienten mit Proben von zwei Metastasen anderer Lokalisation, zwei Patienten mit Proben einer Lymphknoten- und einer Metastase anderer Lokalisation und ein Patient mit Proben einer Lymphknoten- und vier Metastasen anderer Lokalisation, entnommen 2009 und 2010. Insgesamt stammten 100 Proben von weiblichen und 149 Proben von männlichen Patienten.

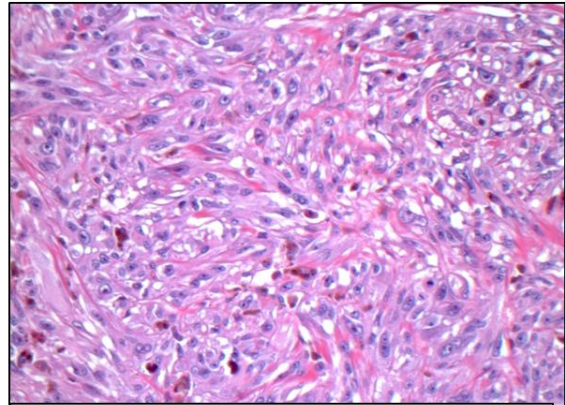
#### ***Klinisch-pathologische Parameter***

Die miterfassten klinisch-pathologischen Parameter sind der Ursprung des Tumorgewebes (Primärtumor (Haut ja oder nein) oder Metastase (Lymphknoten ja oder nein) oder unbekannter Ursprung), das Probenalter, das Patientenalter zum Zeitpunkt der pathologischen Untersuchung, das Patientengeschlecht, der Nekroseanteil und der Pigmentierungsgrad des Tumors sowie der Tumorzellanteil der makrodissezierten Gewebefläche.

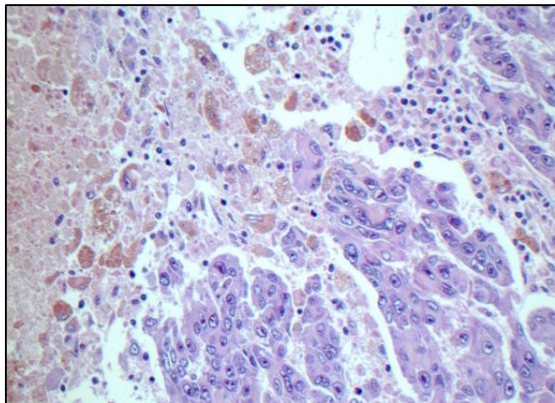
Die gesamte histologische Dokumentation ist für einige repräsentative Proben beispielhaft in Abbildung 4 zusammengefasst.



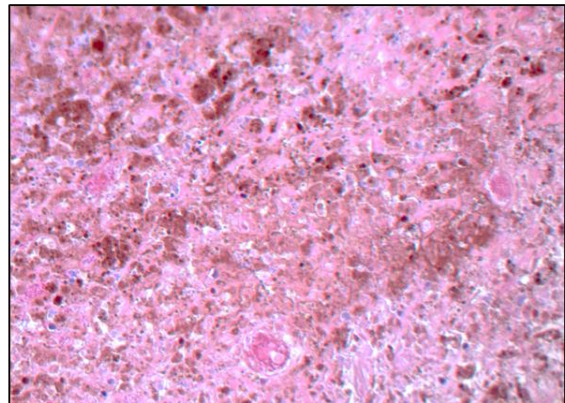
B081: Nekroseanteil 0-10%, Tumorzellanteil 61-70%, Pigmentierungsgrad niedrig (0-10%)



B053: Nekroseanteil 11-20%, Tumorzellanteil 81-90%, Pigmentierungsgrad mittel (11-25%)



B022: Nekroseanteil 31-40%, Tumorzellanteil 81-90%, Pigmentierungsgrad hoch (26-50%)



B172: Nekroseanteil 71-80%, Tumorzellanteil 91-100%, Pigmentierungsgrad sehr hoch (> 50%)

**Abbildung 4** Übersicht über die erfassten histologischen Parameter mit repräsentativen Beispielen, 200-fache Vergrößerung

Die Verteilung aller Proben auf die betrachteten klinisch-pathologischen Merkmale ist in Tabelle 3 dargestellt.

**Tabelle 3** Proben- und Patientencharakteristika aller Proben (klinisch-pathologische Parameter)

<b>Charakteristikum</b>		<b>Anzahl Proben</b>	<b>% Proben</b>
<b>Geschlecht</b>	männlich	149	59,8%
	weiblich	100	40,2%
<b>Alter</b>	<39	21	8,4%
	40-59	86	34,5%
	60-79	116	46,6%
	>80	26	10,4%
<b>Gewebeursprung</b>	Metastase Lymphknoten	123	49,4%
	Metastase anderer Lokalisation	98	39,4%
	Primärtumor Haut	18	7,2%
	Primärtumor anderer Lokalisation	8	3,2%
	unbekannt	2	0,8%
<b>Pigmentierungsgrad</b>	0-10%	206	82,7%
	11-25%	22	8,8%
	26-50%	15	6,0%
	>50%	6	2,4%
<b>Tumorzellanteil der makrodissezierten Gewebefläche</b>	51-60%	8	3,2%
	61-70%	6	2,4%
	71-80%	24	9,6%
	81-90%	50	20,1%
	91-100%	161	64,7%
<b>Nekroseanteil</b>	0-10%	198	79,5%
	11-20%	17	6,8%
	21-30%	16	6,4%
	31-40%	11	4,4%
	41-50%	2	0,8%
	51-60%	3	1,2%
	61-70%	0	0,0%
	71-80%	2	0,8%
<b>Entnahmedatum der Probe</b>	2008	21	8,4%
	2009	21	8,4%
	2010	34	13,7%
	2011	29	11,6%
	2012	57	22,9%
	2013	77	30,9%
	2014	10	4,0%

Für die Proben aus Antwerpen wurden bei bis auf drei Proben, deren HE-Schnittqualität für die zweite histologische Begutachtung unzureichend war, aufgrund der besseren Vergleichbarkeit die von uns erhobenen histologischen Parameter verwendet.



### **3.2. Vergleich von Idylla-Analyse und Pyrosequenzierung**

Für die Idylla-Methode ergaben sich nach allen Tests und etwaigen Wiederholungen 237 technisch valide Ergebnisse, 12 Proben (12/249 (4,8%)) wiesen nicht ausreichend DNA für die Analyse auf (Ergebnismeldung „Insufficient DNA input“). Von diesen 12 Proben konnten fünf auch mittels Pyrosequenzierung nicht analysiert werden (5/249 Proben (2%)), da diese zweimal (auch nach erneuter DNA-Extraktion) kein oder nur ein schwaches PCR-Produkt lieferten.

Für eine Probe, die in Antwerpen mit der Idylla-Methode untersucht worden war, standen für die Pyrosequenzierung keine Schnitte zur Verfügung.

Somit ergeben sich 13 Proben, für die mit mindestens einem der beiden Verfahren kein technisch valides Mutationsergebnis gewonnen wurde, und die aufgrund dessen nicht in die vergleichende statistische Auswertung eingeschlossen wurden. Diese wurde mit den 236 Proben durchgeführt, für die technisch valide Ergebnisse mit beiden Methoden vorliegen.

Die sieben Proben, die nicht mit dem Idylla-Gerät, aber mittels Pyrosequenzierung analysiert werden konnten, zeigten hierbei folgende Ergebnisse: In sechs Proben wurde keine Mutation nachgewiesen, eine Probe zeigte die seltene V600M-Mutation mit einem niedrigen Anteil mutierter DNA (7,5%). Drei dieser Proben (zweimal Wildtyp, einmal V600M) stammen vom selben Patienten.

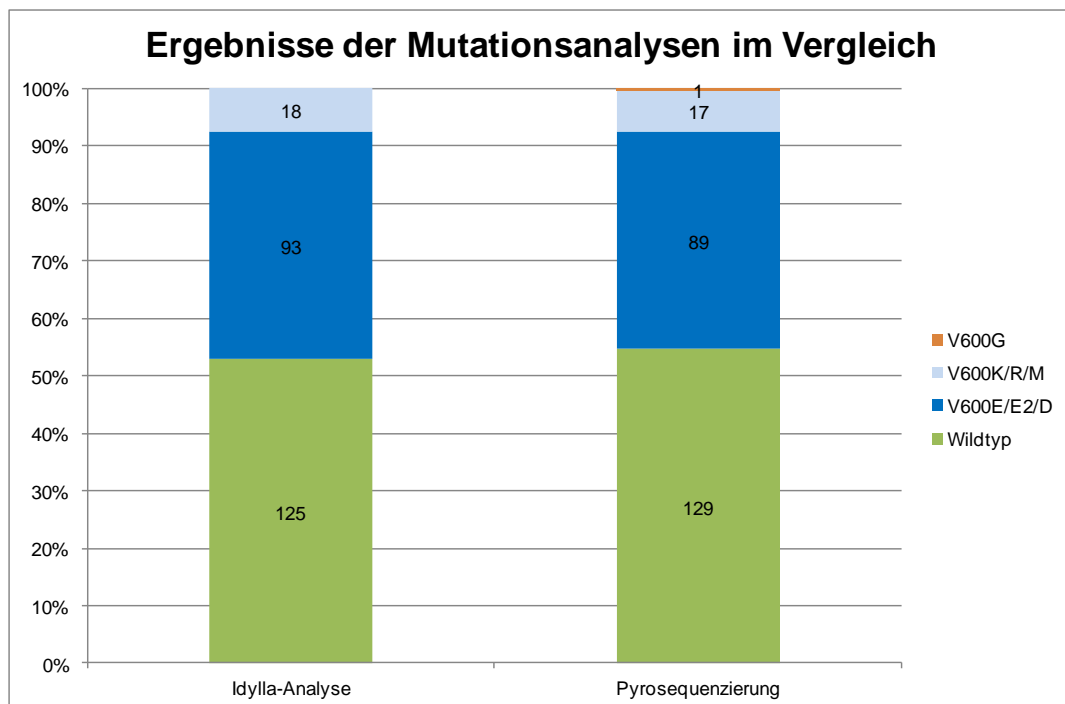
#### **3.2.1. Ergebnisse der Analysen**

Die Ergebnisse der genetischen Untersuchungen mittels Idylla-Analyse und Pyrosequenzierung stellen sich in folgender Weise dar:

Von 236 Proben detektierte die Pyrosequenzierung in 129 Fällen einen Wildtyp und in 107 Fällen eine Mutation, davon 87-mal V600E (inklusive einer niedrigpotenten V600E-Mutation), zweimal V600E complex bzw. E2, 15-mal V600K, zweimal V600R und einmal V600G.

Die Idylla-Methode detektierte in 125 von 236 Proben einen Wildtyp und in 111 Fällen eine Mutation, davon 93-mal V600E/E2/D und 18-mal V600K/R/M. Zum Vergleich: In

der Gruppe V600E/E2/D befinden sich für die Pyrosequenzierung 89 Proben, in der Gruppe V600K/R/M 17 Proben. Siehe hierzu Abbildung 5.



**Abbildung 5** Ergebnisse der Idylla-Analyse sowie Pyrosequenzierung im Vergleich: Die Pyrosequenzierung detektierte in 107 Proben eine Mutation, davon 89 in der Gruppe V600E/E2/D (87-mal V600E, zweimal V600E2), 17 in der Gruppe V600K/R/M (15-mal V600K, zweimal V600R) sowie eine V600G-Mutation, die Idylla-Methode detektierte in 111 Proben eine Mutation, davon 93 in der Gruppe V600E/E2/D und 18 in der Gruppe V600K/R/M.

Dies bedeutet für die Pyrosequenzierung das Vorliegen von BRAF V600-Mutationen in 45,3% der Fälle, für die Idylla-Methode in 47,0% der Fälle.

Demnach stimmen die Ergebnisse beider Methoden für 230 Proben überein, in sechs Fällen ergeben sich Abweichungen zwischen dem Ergebnis der Idylla-Analyse und dem der Pyrosequenzierung. Diese stellen sich so dar, dass die Idylla-Methode in fünf Fällen Mutationen detektierte, in denen die Pyrosequenzierung keine Mutation erfasste, darunter vier Mal V600E/E2/D und einmal V600K/R/M. Die Pyrosequenzierung detektierte in einem Fall die Mutation V600G, während die Idylla-Methode keine Mutation detektierte. Letzteres Ergebnis wird jedoch dem festgelegten Vorgehen entsprechend als übereinstimmend gewertet, da der Idylla-Assay keine Primer zur Detektion der V600G-Mutation beinhaltet und daher beide Methoden übereinstimmend keine V600E/E2/D/K/R/M-Mutation detektierten.

Dies bedeutet insgesamt 231 von 236 Proben mit übereinstimmendem Ergebnis im Vergleich der zwei Methoden.

Die hier beschriebenen Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

**Tabelle 4** Verteilung und Übereinstimmung der Ergebnisse der Mutationsanalysen mittels Pyrosequenzierung und Idylla-Methode in absoluten Zahlen. Dunkelgrüne Färbung = übereinstimmende Ergebnisse, hellgrüne Färbung = übereinstimmend keine Proben mit diesem Ergebnis mit beiden Methoden, rote Färbung = abweichende Ergebnisse: vier Proben mit dem Ergebnis Wildtyp in der Pyrosequenzierung und Mutation V600E/E2/D in der Idylla-Analyse, eine Probe mit dem Ergebnis Wildtyp in der Pyrosequenzierung und Mutation V600K/R/M in der Idylla-Analyse.

			Ergebnis Pyrosequenzierung							Gesamt			
			Mutation						Keine Mutation				
			V600E	V600E2	V600D	V600K	V600R	V600M					
Ergebnis Idylla	Mutation	V600E/E2/D	87	2	0	0	0	0	0	4	93	111	
		V600K/R/M	0	0	0	15	2	0	0	1	18		
	Keine Mutation		0	0	0	0	0	0	1	124	125		
Gesamt			87	2	0	15	2	0	1				
			89			17		1					
			107						129	236			

Der Anteil der übereinstimmenden Ergebnisse an allen Ergebnissen und damit die Gesamtübereinstimmung auf dichotomer Ebene beträgt somit 97,9% (90%CI 95,7% - 99,0%). Die positive Übereinstimmung, also der Anteil der konkordanten mutationspositiven Ergebnisse des Referenztests (Pyrosequenzierung) an allen positiven Ergebnissen des Referenztests beträgt 100% (90% CI 97,5% - 100,0%). Die negative Übereinstimmung, d. h. der Anteil der konkordanten mutationsnegativen Ergebnisse des Referenztests an allen negativen Ergebnissen des Referenztests sowie den Ergebnissen V600A/G, da diese auf dem Idylla-Gerät nicht detektiert werden können, beträgt 96,2% (90% CI 92,3% - 98,1%).

Siehe hierzu Tabelle 5 sowie zur Berechnung dieser Werte Tabelle 2 in Abschnitt 2.4.

**Tabelle 5** Prozentuale Übereinstimmung der Ergebnisse von Pyrosequenzierung und Idylla auf dichotomer Ebene (Mutation ja oder nein)

<b>Maßzahl</b>	<b>Ergebnis</b>
% Gesamtübereinstimmung	97,9% (90%CI 95,7%-99,0%)
% Positive Übereinstimmung	100% (90%CI 97,5%-100,0%)
% Negative Übereinstimmung	96,2% (90%CI 92,3%-98,1%)

### **3.2.2. Automatische Berichterstellung**

Abbildung 6 zeigt Beispiele für einen erstellten Bericht mit dem PyroMark Q24. Hierbei werden die technischen Grundinformationen angegeben sowie eine Detailauswertung für jedes Well, in der man die während der Analyse gemessene Lichtemission in zeitlichem Zusammenhang mit der Zugabe der einzelnen Nukleotide ablesen kann. Des Weiteren werden die automatische Ergebnisinterpretation angegeben sowie Aussagen zur Qualität der Messung getroffen und eventuelle Fehlermeldungen oder Warnungen genannt.

Abbildung 7 zeigt ein Beispiel für einen erstellten Bericht mit dem Idylla-Gerät.

Hierbei werden ebenfalls für jeden Test alle technischen Grundinformationen angegeben. Das Testergebnis wird ausschließlich automatisch ausgewertet, bei detektierter Mutation werden die zugrundeliegenden genomischen Veränderungen sowie die Aminosäuresequenzen gemäß der Empfehlungen der Human Genome Variation Society (HGVS) angegeben.



## Analysis of Mutations in Codons 600 and 464-469 in BRAF

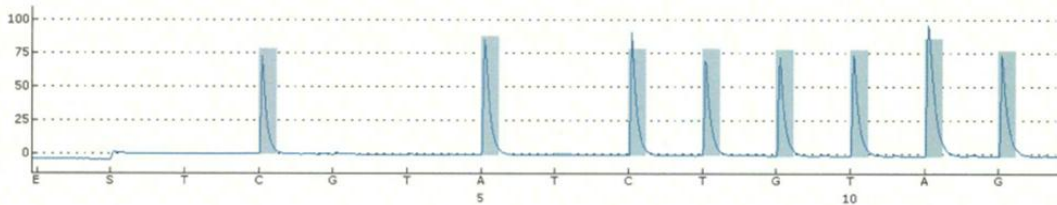
NOTE: This BRAF report is intended to be used only in combination with the dedicated BRAF Pyro Kits (cat.no 971470 and 970470) for applications described in the respective BRAF Pyro Kit handbook.

### Run Info

Run Name	2014-04-25-01 BRAF Pyro
Operator	CHARITE\patho-pcr
Run Date/Time	25.04.2014 10:36:54
Instrument Method	PyroMark Q24 Method 008

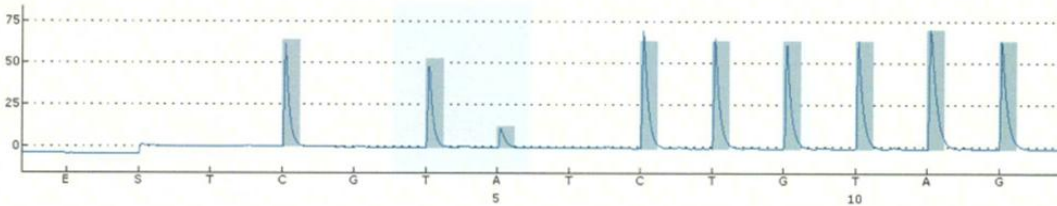
### Detailed Results

**Well: A1**  
 Assay: BRAF-codon600  
 Sample ID: B021



Result	No mutation detected	<i>O.k. 25.4.14 M</i>
Quality	Passed	<i>R</i>

**Well: A2**  
 Assay: BRAF-codon600  
 Sample ID: B022



Result	<b>Mutation</b>	
Frequency	82,3 % units (LOD: 2,4 % units)	
Nucleotide Substitution	1799T>A	
Amino Acid Substitution	V600E	<i>O.k. 25.4.14 M</i>
Quality	Passed	<i>R</i>

Abbildung 6 Beispielbericht PyroMark Q24

## TEST RESULT REPORT

Test performed at Charite, Berlin, Chariteplatz 1, Berlin, Markus Moebis, +491709341179, markus.moebis@charite.de



Sample ID B174  
Sample type FFPE tissue  
Cartridge ID 16735129  
Test type BRAF IUO  
Lot ID 00000056  
TTP Version 1.1  
Expiration date 16 Oct 2014

Instrument serial number SER416  
Instrument software version 20140320\_1532  
Console software version 2.0  
Test request completed 15 May 2014 (11:39)  
Test started 15 May 2014 (11:40)  
Test ended 15 May 2014 (13:14)  
Test status Released result: Automatic  
15 May 2014 (13:14)  
Operator LP

Test Result (1) For Investigational Use Only. The performance characteristics of this product have not been established.

### Idylla™ BRAF Mutation Test

BRAF GENOTYPE	MUTATION DETECTED IN BRAF CODON 600
Mutation	V600E/V600E2/V600D
Protein HGVS	p.(Val600Glu)/p.(Val600Glu)/p.(Val600Asp)
Base Change	c.1799T>A/c.1799_1800TG>AA/ c.1799_1800TG>AT;c.1799_1800TG>AC

Error  
None

### Comments/Annotations

(1) Information concerning the purpose of the investigational use is available in the study plan.



**Abbildung 7** Beispielbericht Idylla. Angabe der Aminosäuresequenz gemäß der Empfehlungen der Human Genome Variation Society (HGVS).

### **3.2.3. Wiederholte und manuell bewertete Ergebnisse**

In der Pyrosequenzierung werden auch in der Routine-Diagnostik und besonders bei einer hohen Anzahl parallel analysierter Proben häufig potentiell niedrigfrequent vorhandene V600A-Mutationen angezeigt, was eventuell durch Störsignale aus benachbarten Wells bedingt ist. Dieses Ergebnis wurde dem Routine-Vorgehen entsprechend für insgesamt 64 Proben als Wildtyp bewertet.

Elf Proben, für die die Pyrosequenzierung potentiell niedrigfrequent vorhandene V600E- oder V600D-Mutationen, V600A-Mutationen mit Mutationsfrequenzen im Bereich des LOD oder eine sehr geringe Peak-Höhe ergab, wurden wiederholt analysiert und alle Ergebnisse in der Zusammenschau betrachtet. Dabei wurde der vollständige Arbeitsprozess (d.h. inklusive DNA-Extraktion) wiederholt, wenn eine der auf der Mikrotiter-Platte benachbarten Proben eine Mutation aufwies. War dies nicht der Fall, wurden lediglich die PCR und die Pyrosequenzierung wiederholt.

Für 13 weitere Proben wurde die Pyrosequenzierung aufgrund technisch nicht auswertbarer Messungen wiederholt, die Reanalyse nach erneuter PCR verlief erfolgreich.

Die Idylla-Analyse wurde aufgrund von Fehlermeldungen für zehn Proben erfolgreich wiederholt.

Eine Probe konnte bei zu geringer DNA-Menge in der ersten Idylla-Analyse erfolgreich wiederholt werden.

### **3.2.4. Zeit- und Arbeitsaufwand der Methoden**

Für die Pyrosequenzierung war für alle Arbeitsschritte vom FFPE-Gewebeschnitt bis zum endgültigen Ergebnis für 24 Proben, die jeweils zeitgleich bearbeitet wurden, ein Zeitaufwand von ca. 25 Stunden nötig mit einer „Hands-on-time“ von ca. 19 Stunden. Für die Bearbeitung nur einer Probe läge die „Hands-on-time“ bei ca. 6 Stunden, die „Time-to-result“ damit bei ca. 12 Stunden. Dabei sind die Tätigkeiten nur von ausgebildeten Fachkräften durchzuführen.

Für die Idylla-Analyse war vom FFPE-Gewebeschnitt bis zum endgültigen Ergebnis für 24 Proben ein Zeitaufwand von ca. 40 Stunden mit einer „Hands-on-time“ von ca. 4 Stunden von Nöten, d.h. pro Probe ca. 10 min Vorbereitungszeit („Hands-on-time“) und 1,5 Stunden Gerätelaufzeit, was zusammen auch der „Time-to-result“ für eine Probe

entspricht. Der Arbeitsablauf zeigte sich hierbei einfach und schnell auch von nicht labortechnisch ausgebildetem Personal zu erlernen.

### **3.3. Überprüfung der Ergebnisse mittels Next Generation Sequencing und erneuter Pyrosequenzierung**

Zur weiteren Überprüfung und Erkenntnisgewinnung wurden nach Abschluss aller Pyrosequenzierungen und Idylla-Analysen folgende Proben zusätzlich mittels Ion Torrent PGM sequenziert:

- alle fünf Proben mit abweichenden Ergebnissen zwischen Idylla-Analyse und Pyrosequenzierung. Dies sind die Proben B109, B123, B165 und A026, die mit der Idylla-Methode eine V600E/E2/D-Mutation, mit der Pyrosequenzierung jedoch einen Wildtyp zeigten, sowie die Probe B129, die mit der Idylla-Methode eine V600K/R/M-Mutation und mit der Pyrosequenzierung einen Wildtyp zeigte.
- weitere Proben:
  - fünf zufällig ausgewählte Proben mit eindeutigem Wildtyp-Ergebnis beider Methoden (B006, B169, B191 B196 und B202).
  - sechs Proben mit eindeutigen mutationspositiven Ergebnissen beider Methoden. Dabei wurden für alle detektierten Mutationen zufällig Proben ausgewählt, darunter drei V600E-Mutationen mit unterschiedlichen Mutationshäufigkeiten ( $v$ ) (B052 mit  $v=97,3\%$ , B139 mit  $v=9,6\%$  und B152 mit  $v=28,8\%$ ), eine V600E-complex-Mutation mit einer Mutationshäufigkeit von  $v=42\%$  (B206), eine V600K-Mutation (B205) mit  $v=51,1\%$  und eine V600R-Mutation (B175) mit  $v=60,8\%$ .
  - eine niedrigfrequente V600E-Mutation mit  $v=4,7\%$  (B209) (Idylla-Ergebnis: Mutation V600E/E2/D) und eine mit dem Idylla-Verfahren nicht analysierbare V600M-Mutation mit  $v=7,5\%$  (B140) als sonstige interessante Fälle
  - drei zufällig ausgewählte Proben mit als Wildtyp gewerteten potentiell niedrigfrequent vorhandenen V600A-Mutationen (B005, B071, B195 und B204), um das angenommene Vorliegen der Wildtyp-Sequenz zu überprüfen.

Nach Abschluss aller Analysen stellten sich die ausgewählten Proben wie folgt dar (zur Übersicht siehe Tabelle 6):



### **Proben mit abweichenden Ergebnissen**

- Probe B109 (Idylla-Ergebnis: Mutation V600E/E2/D, Pyrosequenzierungs-Ergebnis: Wildtyp) wies in der Qualitäts-Kontroll-PCR eine sehr schlechte DNA-Qualität (sehr schwache 100bp-Bande) und eine für die NGS-Analyse unzureichende DNA-Konzentration von 0,7 ng/µl auf. Nach einer bereits hierfür durchgeführten zweiten DNA-Extraktion mit dem Maxwell-Kit aus zwei neuen Schnitten sowie einer Entfernung von PCR-Inhibitoren zeigte sie in der NGS-Analyse eine V600E-Mutation in  $v=43,1\%$  der DNA. Außerdem wurden hier insgesamt 192 weitere genomische Variationen im durch das Panel abgedeckten Bereich des Genoms detektiert.  
Für eine erneute Pyrosequenzierung wurde wiederum aus zwei neuen Schnittstufen DNA mit dem Maxwell-Kit extrahiert, und nun auch hier eine V600E-Mutation ( $v=62,6\%$ ) gezeigt.
- Für Probe B123 (Idylla-Ergebnis: Mutation V600E/E2/D, Pyrosequenzierungs-Ergebnis: Wildtyp) ließen sich wie für Probe B109 ebenfalls nur Fragmente von maximal 100 bp sequenzieren und die Probe wies eine ungenügende DNA-Menge auf (1,23 ng/µl), sodass auch hier eine Maxwell-Extraktion aus neuen Schnitten und eine Entfernung von PCR-Inhibitoren durchgeführt wurden. Es zeigte sich eine V600E-Mutation in  $v=6,2\%$  der DNA sowie auch hier zahlreiche weitere genomische Variationen im durch das Panel abgedeckten Bereich des Genoms ( $n=144$ ).  
Eine erneute Pyrosequenzierung nach Maxwell-Extraktion zeigte eine V600E-Mutation in  $v=25,4\%$  der DNA.
- Für Probe B165 (Idylla-Ergebnis: Mutation V600E/E2/D, Pyrosequenzierungs-Ergebnis: Wildtyp) wurde mittels PGM eine V600E-Mutation detektiert, und zwar mit einer Mutationshäufigkeit von  $v=3,4\%$ .  
Eine erneute Pyrosequenzierung nach Maxwell-Extraktion zeigte ebenfalls eine V600E-Mutation mit  $v=3,8\%$ .
- Probe B129 (Idylla-Ergebnis: Mutation V600K/R/M, Pyrosequenzierungs-Ergebnis: Wildtyp) zeigte in der NGS-Analyse eine V600M-Mutation (c.1798G>A)

mit  $v = 2,3\%$ , und außerdem viele weitere niedrigfrequente C:G>T:A-Substitutionen mit Mutationshäufigkeiten zwischen 0,1 und 2,5% an ca. 50 anderen Positionen, was für eine Vielzahl von Fixierungsartefakten spricht, da eine Formalinfixierung zu C:G>T:A-Austauschen durch Desaminierungen von Cytosin zu Uracil im fixierten Gewebe führt<sup>67</sup>. Um die Frage zu beantworten, ob der Basenaustausch im BRAF-Gen also eine echte Mutation ist oder eines der vielen Fixierungsartefakte, wurde die NGS-Analyse aus mittels Maxwell-Kit neu isolierter DNA und nach einem Uracil-DNA-Glykosylase(UDG)-Verdau wiederholt. Dieser Verdau kann Fixierungsartefakte in FFPE-Gewebe deutlich reduzieren<sup>67</sup>.

Die Probe wurde nun einmal mit und einmal ohne UDG-Verdau erneut PGM-analysiert und zeigte nun auch ohne Verdau V600M-Mutationen in nur noch 0,3% der Reads, mit UDG-Verdau keine Mutation mehr. (Dies spricht dafür, dass es sich beim detektierten Basenaustausch um Fixierungsartefakte handelt, siehe auch Abschnitt 4.1.2.)

Für diese Probe wurde keine erneute Pyrosequenzierung durchgeführt.

- Für Probe A026 (Idylla-Ergebnis: Mutation V600E/E2/D, Pyrosequenzierungsergebnis: Wildtyp) wurde nach einer Sichtkontrolle der für die Analysen verwendeten Areale festgestellt, dass für die Idylla-Analyse eine deutlich andere Gewebefläche makrodisseziert worden war als für die Pyrosequenzierung und die NGS-Analyse (Ergebnis: Wildtyp). Die erneute Pyrosequenzierung nach Maxwell-Extraktion aus demselben Tumorareal, das für die Idylla-Analyse verwendet worden war, zeigte eine V600E-Mutation in  $v = 7,7\%$  der DNA und somit eine Übereinstimmung von Idylla- und Pyrosequenzierungsergebnis.

Insgesamt konnten in drei Fällen mittels Idylla Mutationen nachgewiesen und durch weitere Analysen bestätigt werden, die durch die Pyrosequenzierung nicht detektiert worden waren. In einem Fall konnte eine von Idylla detektierte Mutation nicht bestätigt werden.

### **Weitere Proben**

Insgesamt ergaben sich hier keine Widersprüche zwischen den Ergebnissen aller drei Untersuchungen:

- Für die fünf Wildtyp-Proben konnte die Halbleitersequenzierung die Ergebnisse der Idylla-Analyse sowie der Pyrosequenzierung in allen Fällen bestätigen, die Coverage lag hier bei mindestens 5652 Reads.
- Ebenso wurde für alle Beispiele mit Mutationsnachweis jeweils dieselbe Mutation detektiert. Für die Probe B052 (V600E) lag die Mutationshäufigkeit bei  $v=41,7\%$ , in der Pyrosequenzierung bei  $v=97,3\%$ . Für alle anderen Proben lagen auch die Mutationshäufigkeiten in einem ähnlichen Bereich: B139 (V600E):  $v=11,8\%$  (Pyrosequenzierung:  $9,6\%$ ), B152 (V600E):  $v=39,8\%$  ( $28,8\%$ ), B206 (V600E-complex):  $v=52,3\%$  ( $42\%$ ), B205 (V600K):  $v=44,1\%$  ( $51,1\%$ ), B175 (V600R):  $v=65\%$  ( $60,8\%$ ).
- Die niedrigfrequente Mutation V600E (Mutationshäufigkeit:  $v=4,7\%$ ) (B209) (Idylla-Ergebnis: Mutation V600E/E2/D) zeigte in der Halbleitersequenzierung ebenfalls eine V600E-Mutation mit einer Mutationshäufigkeit von  $v=3,4\%$ . Die Probe B140 (Idylla-Analyse nicht möglich wegen zu geringer DNA-Menge, Pyrosequenzierungs-Ergebnis V600M,  $v=7,5\%$ ) wies eine sehr schlechte DNA-Qualität auf (schwache 100bp-Bande in Qualitäts-Kontroll-PCR), und ergab auch nach Entfernung von PCR-Inhibitoren eine Coverage von nur 17 Reads. Diese Probe wurde nicht weiter analysiert.
- Die drei als Wildtyp gewerteten potentiell niedrigfrequent vorhandenen V600A-Mutationen zeigten keine Mutationen auf mindestens 4882 Reads

**Tabelle 6** Ergebnisse aller Analysen (Idylla, Pyrosequenzierung, NGS, erneute Pyrosequenzierung nach Maxwell-Extraktion) für die Proben mit abweichenden Ergebnissen und einige repräsentative Beispiele. WT = Wildtyp.

Proben-ID	Idylla (Biocartis)	Pyrosequenzierung (Qiagen)	NGS PGM (Life Tech.)	Pyrosequenzierung nach Maxwell-Extraktion	Bemerkungen
B109	V600E/E2/D	WT	V600E (43,1%)	V600E (62,6%)	NGS: Detektion von insgesamt 192 Mutationen
B123	V600E/E2/D	WT	V600E (6,2%)	V600E (25,4%)	NGS: Detektion von insgesamt 144 Mutationen
B165	V600E/E2/D	WT	V600E (3,4%)	V600E (3,8%)	
B129	V600K/R/M	WT	V600M (2,3%), nach UDG-Verdau WT		NGS: viele low-level-C>T-Substitutionen; detektierter Basenaustausch vermutlich Fixierungsartefakt
A26	V600E/E2/D	WT	WT	V600E (7,7%)	Unterschiedliches Tumorareal mikrodisseziert für Idylla und erste Pyrosequenzierung/NGS
5 Proben	WT	WT	WT		
B052	V600E/E2/D	V600E (97,3%)	V600E (41,7%)		
B139	V600E/E2/D	V600E (9,6%)	V600E (11,8%)		
B152	V600E/E2/D	V600E (28,8%)	V600E (39,8%)		
B206	V600E/E2/D	V600E2 (42%)	V600E2 (52,3%)		
B205	V600K/R/M	V600K (51,1%)	V600K (44,1%)		
B175	V600K/R/M	V600R (60,8%)	V600R (65%)		
B209	V600E/E2/D	V600E (4,7%)	V600E (3,4%)		
B140	ungenügende DNA-Menge	V600M (7,5%)	WT (unsicher)		
3 Proben	WT	WT (potentiell niedrigfrequent vorhandene Mutation V600A)	WT		

### **3.4. Auswertung der Mutationsanalysen in Bezug auf Mutationsfrequenzen und klinisch-pathologische Parameter**

Für die Auswertung der Ergebnisse der Mutationsanalysen in Bezug auf die klinisch-pathologischen Parameter wurden die 236 Proben mit technisch validen Ergebnissen für beide Methoden (siehe Abschnitt 3.2) in die Auswertung mit eingeschlossen und von den 12 Patienten, von denen mehrere Proben untersucht wurden, je eine gültige Probe ausgewählt. Diese Auswahl wurde zufällig getroffen, da hier keine Widersprüche zwischen den Patienten in Bezug auf das Vorhandensein einer BRAF-Mutation auftraten und lediglich geringfügige Abweichungen zwischen den zusammengehörigen Proben in Bezug auf den Nekroseanteil und das Pigmentierungslevel vorliegen. Ebenso befinden sich unter den Proben eines Patienten, von dem fünf Proben untersucht wurden, drei der 12 ungültigen Ergebnisse aufgrund ungenügender DNA-Menge für die Idylla-Analyse, die aus diesem Grund bereits ausgeschlossen wurden.

Insgesamt wurden also 224 Proben im Hinblick auf klinisch-pathologische Charakteristika ausgewertet. Die Verteilung auf die erhobenen Parameter für diese 224 Proben findet sich in Tabelle 7.

Hierbei wurden die Ergebnisse der Pyrosequenzierung verwendet, da insgesamt geringe Unterschiede zwischen den Ergebnissen der beiden Methoden bestehen und die Pyrosequenzierung die Referenz- und Routinemethode darstellt.

**Tabelle 7** Proben- und Patientencharakteristika der für die Auswertung der klinisch-pathologischen Korrelationen verwendeten Proben (nur technisch valide Ergebnisse mit beiden Methoden und je nur eine Probe pro Patient)

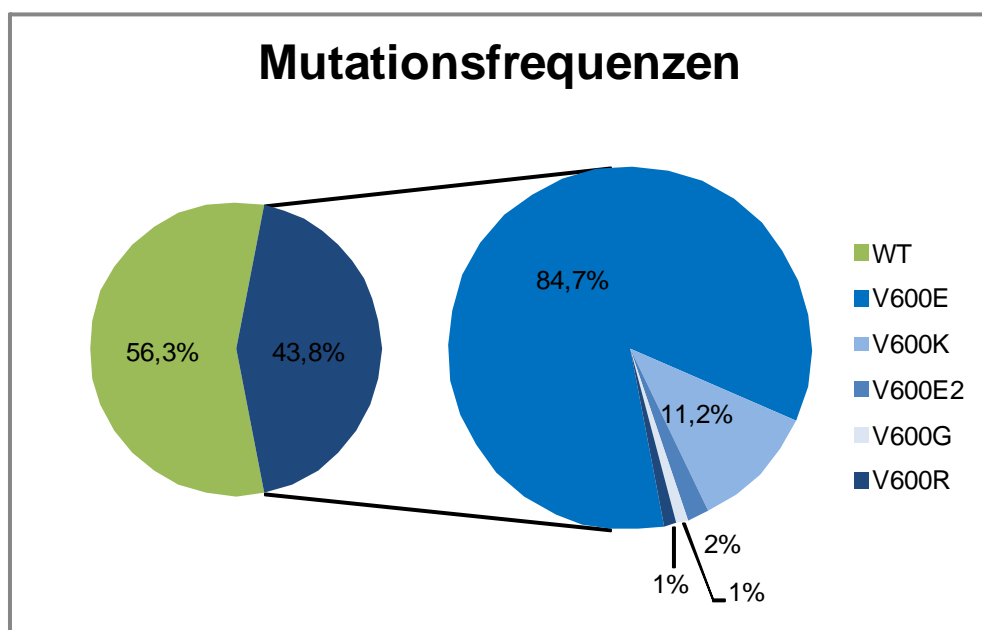
<b>Charakteristikum</b>		<b>Anzahl Proben</b>	<b>% Proben</b>
<b>Geschlecht</b>	männlich	132	58,9%
	weiblich	92	41,1%
<b>Alter</b>	<39	19	8,5%
	40-59	74	33,0%
	60-79	108	48,2%
	>80	23	10,3%
<b>Gewebeursprung</b>	Metastase Lymphknoten	112	50,0%
	Metastase anderer Lokalisation	89	39,7%
	Primärtumor Haut	13	5,8%
	Primärtumor anderer Lokalisation	8	3,6%
	unbekannt	2	0,9%
<b>Pigmentierungsgrad</b>	0-10%	186	83,0%
	11-25%	19	8,5%
	26-50%	14	6,3%
	>50%	5	2,2%
<b>Tumorzellanteil der makrodissezierten Gewebefläche</b>	51-60%	6	2,7%
	61-70%	5	2,2%
	71-80%	20	8,9%
	81-90%	44	19,6%
	91-100%	149	66,5%
<b>Nekroseanteil</b>	0-10%	176	78,6%
	11-20%	17	7,6%
	21-30%	14	6,3%
	31-40%	10	4,5%
	41-50%	2	0,9%
	51-60%	3	1,3%
	61-70%	0	0,0%
	71-80%	2	0,9%
<b>Entnahmedatum der Probe</b>	2008	16	7,1%
	2009	19	8,5%
	2010	28	12,5%
	2011	26	11,6%
	2012	54	24,1%
	2013	73	32,6%
	2014	8	3,6%

### 3.4.1. Frequenzen der BRAF V600-Mutationen

Die Ergebnisse der Pyrosequenzierung zeigen eine Frequenz der untersuchten BRAF-Mutationen im Codon 600 von 43,8% (98 Proben) im untersuchten Probenkollektiv (n=224).

An diesen Mutationen beträgt der Anteil der V600E-Mutationen (inklusive niedrigfrequente Mutationen) 84,7% (83 Proben), der Anteil der V600E2-Mutationen 2% (2 Proben). Der Anteil der V600K-Mutationen beträgt 11,2% (11 Proben), der Anteil der V600R- und V600G-Mutationen liegt bei je 1% (je eine Probe).

Diese Verteilung ist in Abbildung 8 dargestellt.



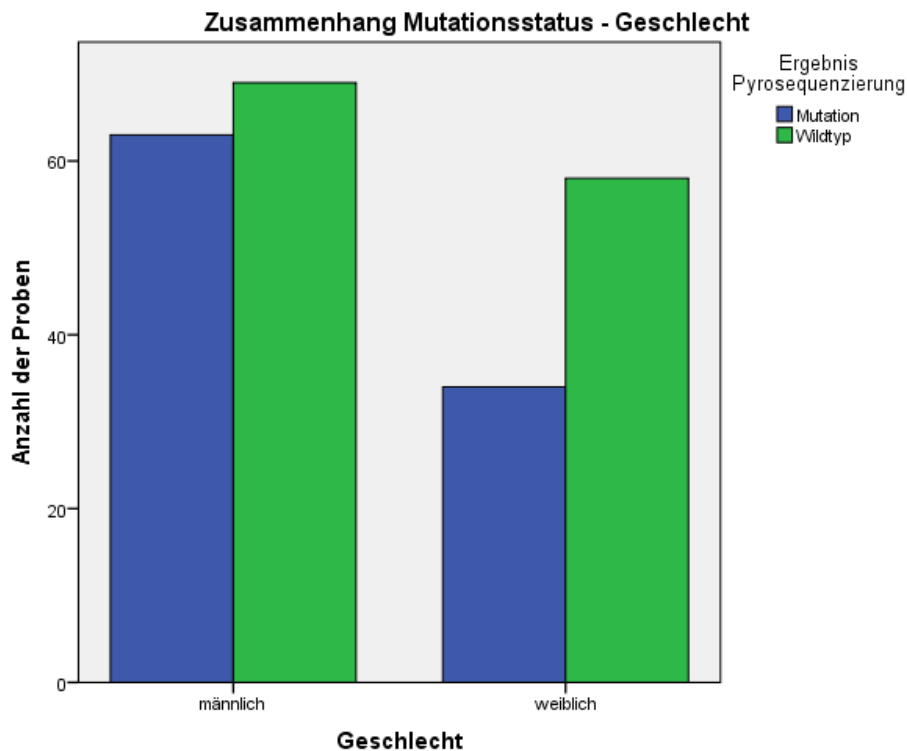
**Abbildung 8** Anteil mutierter Melanomproben sowie Verteilung der einzelnen detektierten Mutationen gemäß Pyrosequenzierungsergebnis für die in die klinisch-pathologische Auswertung eingeschlossenen Proben. 43,8% der untersuchten Proben wiesen aktivierende BRAF V600-Mutationen auf. Davon waren 84,7% V600E-Mutationen, 11,2% V600K-Mutationen, 2% V600E2-Mutationen und je 1% V600G- und V600R-Mutationen.

### 3.4.2. Korrelationen klinisch-pathologischer Parameter mit dem Sequenzierungsergebnis

Für mögliche Zusammenhänge zwischen den erfassten klinisch-pathologischen Parametern (siehe Abschnitt 3.1) und den Ergebnissen der genetischen Analyse ergeben sich die unten folgenden Korrelationen.

## Patientengeschlecht

Zwischen den Geschlechtern besteht kein signifikanter Unterschied in Bezug auf den Mutationsstatus ( $p=0,09$ , 2-seitig). Der Anteil aller Patienten ( $n=224$ ), die eine BRAF V600-Mutation aufwiesen, lag bei 43,8% (98 Patienten). Der Anteil der männlichen Patienten mit einer Mutation lag bei 48,5% (64 von 132 Patienten) und der Anteil der weiblichen Patientinnen mit einer Mutation bei 37,0% (34 von 92 Patientinnen). Siehe hierzu Abbildung 9.



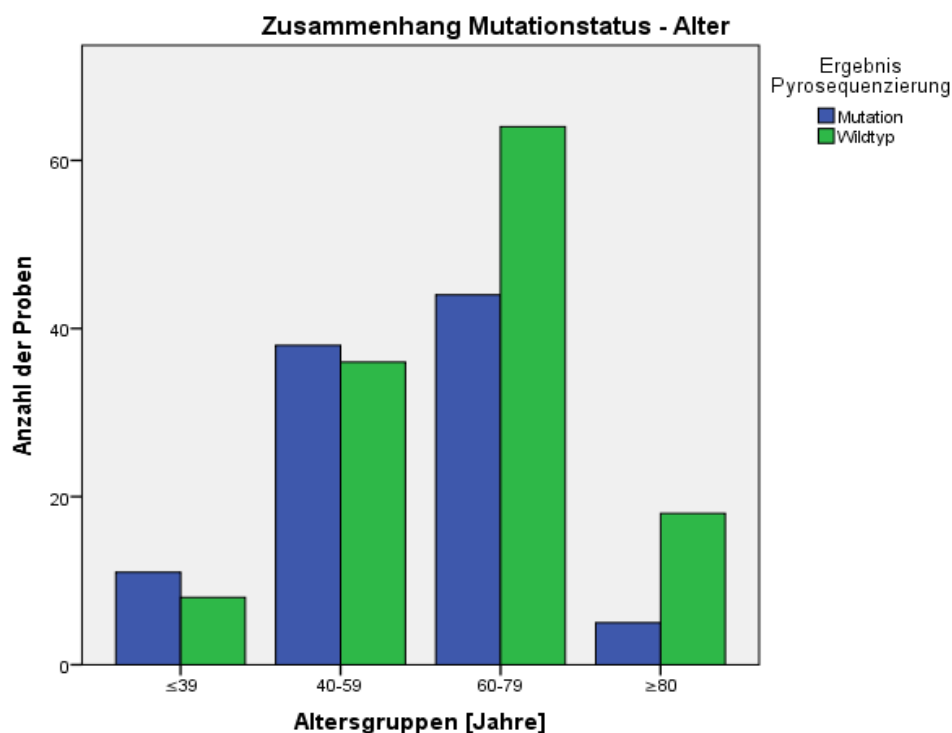
**Abbildung 9** Zusammenhang zwischen dem Mutationsstatus und dem Geschlecht: Insgesamt wiesen 98 der untersuchten Melanom-Proben (43,8% aller Patienten ( $n = 224$ )) eine BRAF-Mutation im Codon 600 auf. Darunter waren 64 männliche Patienten (48,5% aller männlichen Patienten (132 Proben)) und 34 weibliche Patientinnen (37,0% aller weiblichen Patientinnen (92 Proben)). Dabei besteht zwischen den Gruppen nach Geschlecht kein signifikanter Unterschied in Bezug auf den Mutationsstatus ( $p = ,09$ ).



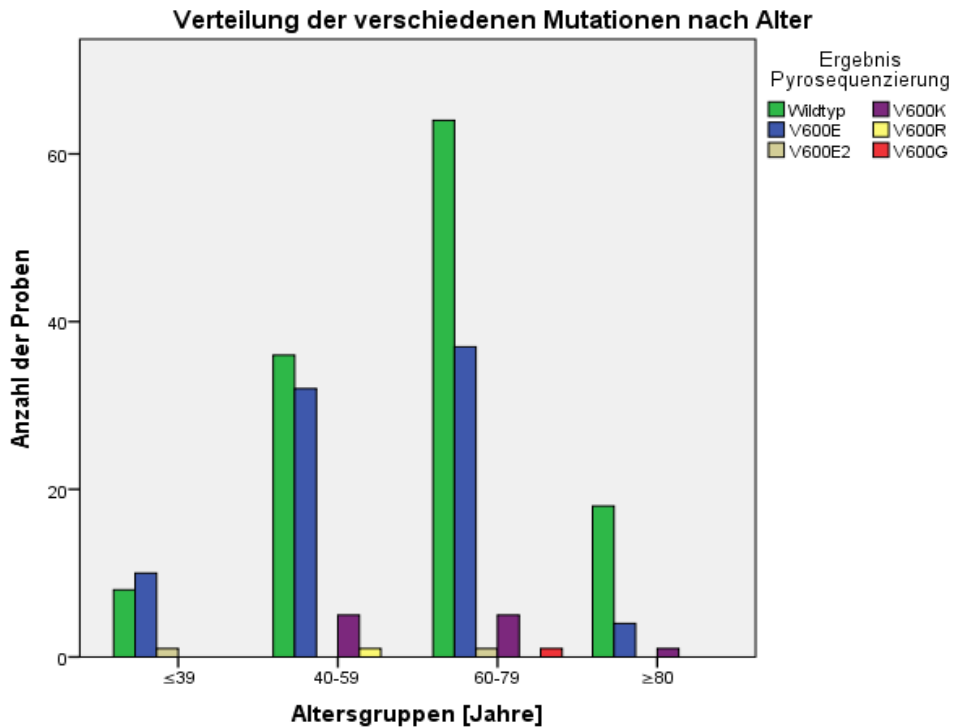
## Patientenalter

Unter den jüngeren Patienten waren BRAF-Mutationen signifikant häufiger als unter den älteren Patienten des untersuchten Kollektivs. In vier Altersgruppen von je 20 Jahren wies die Gruppe der Patienten jünger als 39 Jahre (19 Patienten) zu 57,9% BRAF V600-Mutationen auf, die Gruppe zwischen 40 und 59 Jahren (74 Patienten) zu 51,4%, die Gruppe zwischen 60 und 79 Jahren (108 Patienten) zu 40,7% und die Gruppe der Patienten älter als 80 Jahre (23 Patienten) zu 21,7% ( $p=0,005$ ) (siehe Abbildung 10).

Dabei machten V600E-Mutationen in allen Gruppen den größten Anteil aus. Dieser lag bei 90,9% (10/11 Proben) in der ersten, 84,2% (32/38 Proben) in der zweiten, 84,1% (37/44 Proben) in der dritten und 80% (4/5 Proben) in der vierten Altersgruppe, der Anteil der V600K-Mutationen lag in derselben Reihenfolge bei 0% (0/11 Proben), 13,2% (5/38 Proben), 11,4% (5/44 Proben) und 20% (1/5 Proben) ( $p=0,007$ ). Von den seltenen V600E2-, R- und G-Mutationen fanden sich je eine V600E2-Mutation in der ersten und dritten, die V600R-Mutation in der zweiten und die V600G-Mutation in der dritten Altersgruppe (siehe Abbildung 11).



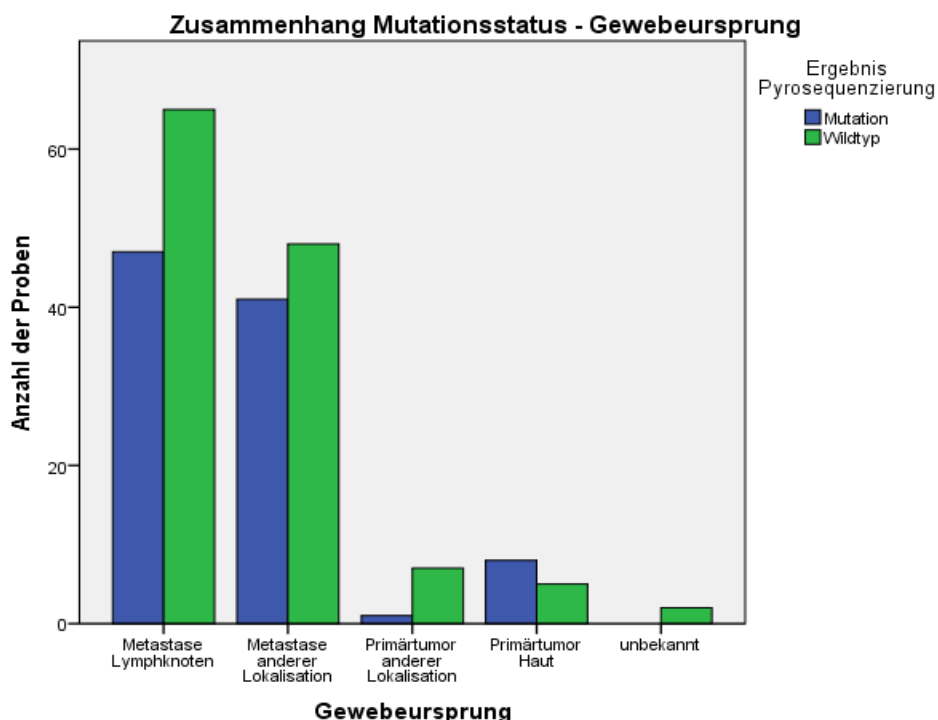
**Abbildung 10** Zusammenhang zwischen dem Mutationsstatus und dem Alter ( $n=224$ ): In der Altersgruppe jünger als 39 Jahre wiesen 11 Patienten eine BRAF-Mutation im Codon 600 auf (57,9% aller Patienten der Gruppe (19 Patienten)), in der Altersgruppe 40-59 Jahre 38 Patienten (51,4% aller Patienten der Gruppe (74 Patienten)), in der Altersgruppe 60-79 Jahre 44 Patienten (40,7% aller Patienten der Gruppe (108 Patienten)) und in der Altersgruppe älter als 80 Jahre 5 Patienten (21,7% aller Patienten der Gruppe (23 Patienten)). Damit besteht zwischen den Gruppen nach Alter ein signifikanter Unterschied in Bezug auf den Mutationsstatus ( $p=,005$ ).



**Abbildung 11** Verteilung der untersuchten Mutationen auf die Altersgruppen (n=224): In der Altersgruppe jünger als 39 Jahre (19 Proben): Anteil der V600E-Mutationen an allen Mutationen: 90,0% (10/11), Anteil der V600K-Mutationen: 0%, in der Altersgruppe 40-59 Jahre (74 Proben): V600E: 84,2% (32/38) V600K: 13,2% (5/38), in der Altersgruppe 60-79 Jahre (108 Proben): V600E: 84,1% (37/44) V600K: 11,4% (5/44), in der Altersgruppe älter als 80 Jahre: V600E: 80% (4/5), V600K 20% (1/5). V600E2-Mutationen fanden sich in zwei Proben (Altersgruppe jünger als 39 Jahre und Altersgruppe 60-79 Jahre), V600G- und V600R-Mutationen in je nur einer Probe (Altersgruppe 60-79 Jahre bzw. Altersgruppe 40-59 Jahre). Damit besteht zwischen den Gruppen nach Alter ein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Verteilung der untersuchten Mutationen ( $p = ,007$ ).

## Ursprung des Tumorgewebes

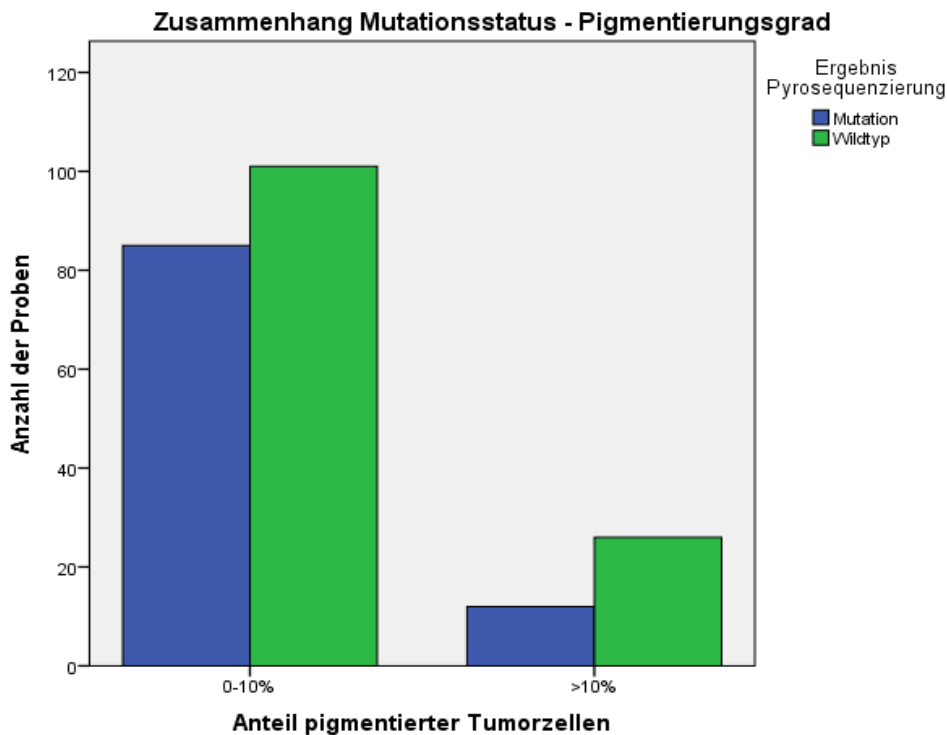
Hinsichtlich des Gewebsursprungs besteht kein signifikanter Unterschied in Bezug auf den Mutationsstatus ( $p=0,157$ ). Es zeigte sich hier ein Mutationsanteil von 42,9% unter den Lymphknotenmetastasen (insgesamt 112 Proben), ein Anteil von 46,1% unter den Metastasen anderer Lokalisation (insgesamt 89 Proben), ein Anteil von 61,5% unter den primären Hautmelanomen (insgesamt 13 Proben) und ein Anteil von 12,5% unter den Primärtumoren anderer Lokalisation (insgesamt 8 Proben). Die grafische Darstellung dieser Verteilung findet sich in Abbildung 12.



**Abbildung 12** Zusammenhang zwischen dem Mutationsstatus und dem Gewebsursprung: Insgesamt wiesen 98 der untersuchten Melanom-Proben (43,8% aller Patienten ( $n=224$ )) eine BRAF-Mutation im Codon 600 auf. Unter den Lymphknotenmetastasen (112 Proben) lag der Anteil der Proben mit Mutation bei 42,9% (48 Proben), unter den Metastasen anderer Lokalisation (In-Transit- und Fernmetastasen, 89 Proben) bei 46,1% (41 Proben), unter den Primärtumoren der Haut (13 Proben) bei 61,5% (8 Proben), unter den Primärtumoren anderer Lokalisation (8 Proben) bei 12,5% (eine Probe) und unter den Tumoren unbekanntes Ursprungs (2 Proben) bei 0%. Damit besteht zwischen den Gruppen nach Gewebsursprung kein signifikanter Unterschied in Bezug auf den Mutationsstatus ( $p=,157$ ).

### **Pigmentierungsgrad**

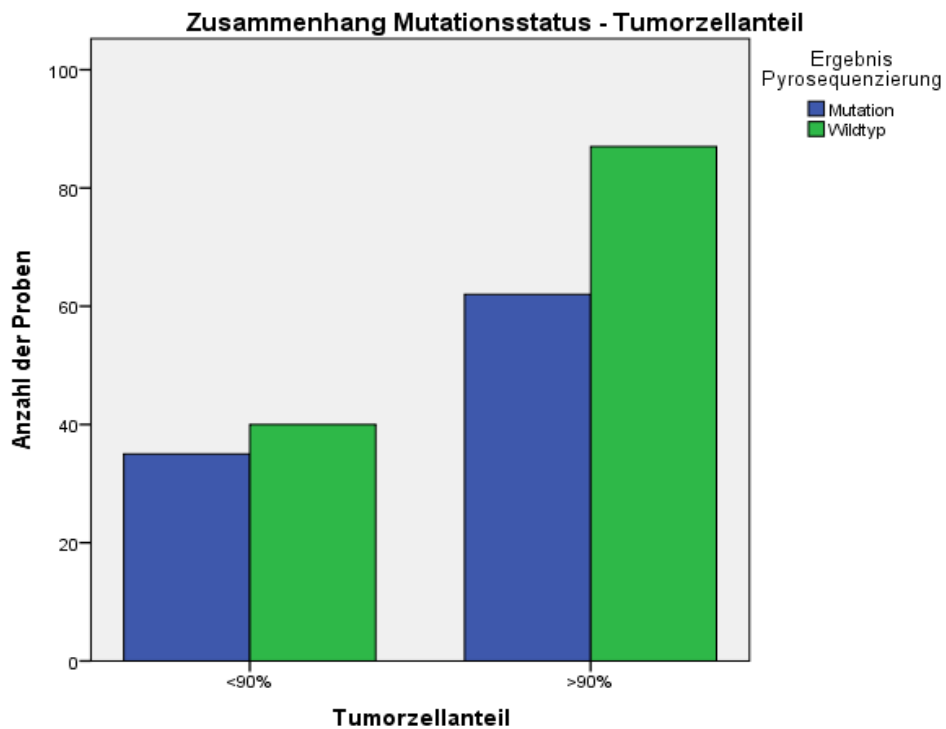
Die Gruppe der nicht oder niedrig pigmentierten Melanome (0-10% pigmentierte Tumorzellen, 186 Proben) wies zu 46,2% V600-Mutationen auf, die der pigmentierten Melanome (>10% pigmentierte Tumorzellen, 38 Proben) zu 31,6% ( $p=0,097$ ) (siehe Abbildung 13). Damit besteht zwischen den Gruppen kein signifikanter Unterschied ( $p=0,097$ ).



**Abbildung 13** Zusammenhang zwischen dem Mutationsstatus und dem Pigmentierungsgrad: Insgesamt wiesen 98 der untersuchten Melanom-Proben (43,8% aller Patienten ( $n=224$ )) eine BRAF-Mutation im Codon 600 auf. Unter den nicht oder niedrig pigmentierten Tumoren (0-10% pigmentierte Tumorzellen) (186 Proben) lag der Anteil der Proben mit Mutation bei 46,2% (86 Proben), unter den mittel bis sehr stark pigmentierten Tumoren (>10% pigmentierte Tumorzellen) (38 Proben) bei 31,6% (12 Proben). Damit besteht zwischen den Gruppen nach dem Pigmentierungsgrad kein signifikanter Unterschied in Bezug auf den Mutationsstatus ( $p=,097$ ).

## Tumorzellanteil

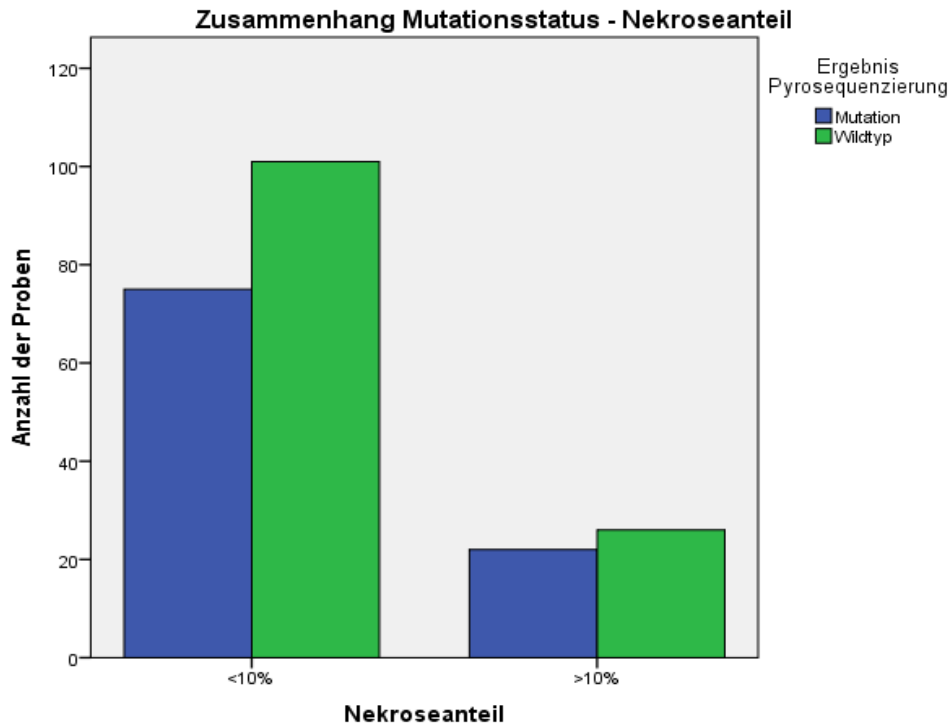
Die Gruppe der weniger tumorzellichten Melanome (<90% Tumorzellanteil, 75 Proben) wies mit 46,7% zu einem ähnlichen Anteil Mutationen auf wie die Gruppe der maximal tumorzellichten Melanome (>90% Tumorzellanteil, 149 Proben) mit 42,3% ( $p=0,53$ ) (siehe Abbildung 14).



**Abbildung 14** Zusammenhang zwischen dem Mutationsstatus und dem Tumorzellanteil: Insgesamt wiesen 98 der untersuchten Melanom-Proben (43,8% aller Patienten ( $n=224$ )) eine BRAF-Mutation im Codon 600 auf. Unter den Proben mit <90% Tumorzellanteil an der makrodissezierten Gewebefläche (75 Proben) lag der Anteil der Proben mit Mutation bei 46,7% (35 Proben), unter den Proben mit >90% Tumorzellanteil an der makrodissezierten Gewebefläche (149 Proben) bei 42,3% (63 Proben). Damit besteht zwischen den Gruppen nach Tumorzellanteil kein signifikanter Unterschied in Bezug auf den Mutationsstatus ( $p = ,53$ ).

## Nekroseanteil

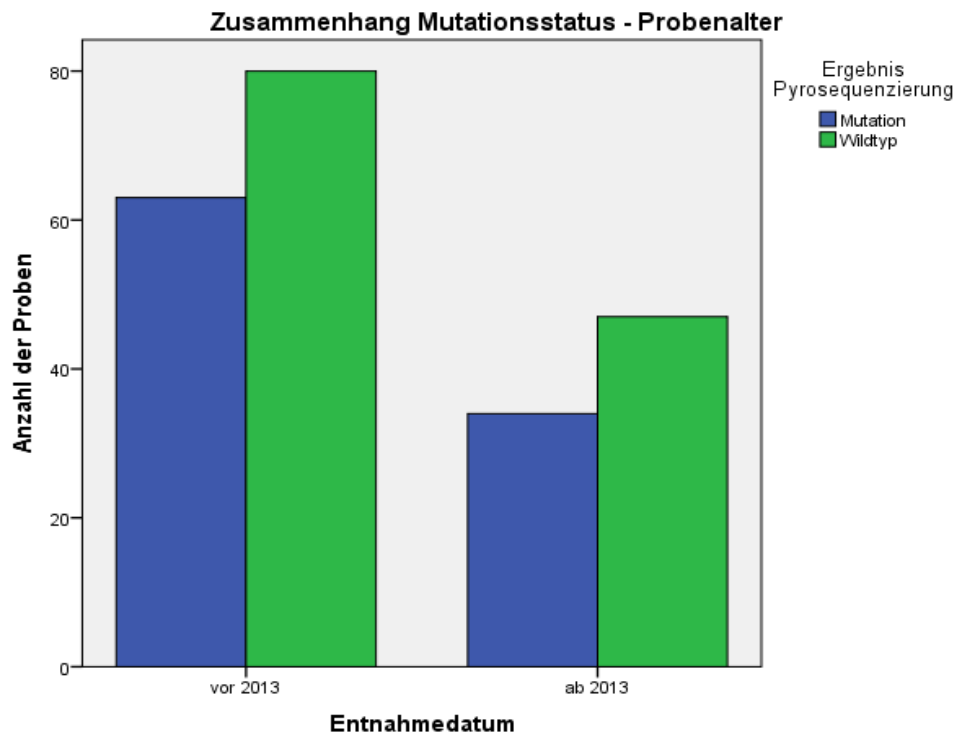
Die Tumoren ohne nekrotische Zellen (<10% Nekroseanteil, 176 Proben) zeigten zu 43,2% Mutationen, die Tumoren mit einem Nekroseanteil von über 10% (48 Proben) zu 45,8% ( $p=0,74$ ) (siehe Abbildung 15).



**Abbildung 15** Zusammenhang zwischen dem Mutationsstatus und dem Nekroseanteil: Insgesamt wiesen 98 der untersuchten Melanom-Proben (43,8% aller Patienten ( $n=224$ )) eine BRAF-Mutation im Codon 600 auf. Unter den Proben mit <10% Nekroseanteil an der makrodissezierten Gewebefläche (176 Proben) lag der Anteil der mutierten Proben bei 43,2% (76 Proben), unter den Proben mit >10% Tumorzellanteil an der makrodissezierten Gewebefläche (48 Proben) bei 45,8% (22 Proben). Damit besteht zwischen den Gruppen nach Nekroseanteil kein signifikanter Unterschied in Bezug auf den Mutationsstatus ( $p=,74$ ).

## Probenalter

Unter den älteren Proben (Entnahmedatum vor 2013, 143 Proben) zeigten 44,8% eine BRAF V600-Mutation, während unter den neueren Proben (Entnahmedatum ab Januar 2013, 81 Proben) 42% eine Mutation zeigten (siehe Abbildung 16). Dieser Unterschied ist nicht signifikant ( $p = 0,69$ ).



**Abbildung 16** Zusammenhang zwischen dem Mutationsstatus und dem Probenalter: Insgesamt wiesen 98 der untersuchten Melanom-Proben (43,8% aller Patienten ( $n=224$ )) eine BRAF-Mutation im Codon 600 auf. Unter den Proben aus den Jahren vor 2013 (143 Proben) lag der Anteil der mutierten Proben bei 44,8% (64 Proben), unter den Proben ab dem Jahr 2013 (81 Proben) bei 42% (34 Proben). Damit besteht zwischen den Gruppen nach Probenalter kein signifikanter Unterschied in Bezug auf den Mutationsstatus ( $p = ,69$ ).

### **3.5. Methodische Abweichungen**

Aufgrund eines nicht vorhandenen HE-Schnittpräparates konnte für einen Fall aus Antwerpen keine mikroskopische Auswahl der zu verwendenden Gewebefläche durchgeführt werden. Die makrodissezierte Gewebefläche wurde für diese Probe makroskopisch am ungefärbten Schnitt ausgewählt.

Ein Schnitt wurde vor der Idylla-Analyse versehentlich gemäß der Anleitung für die DNA-Extraktion für die Pyrosequenzierung deparaffiniert. Die Analyse konnte jedoch erfolgreich durchgeführt werden.



## 4. Diskussion

Die hier durchgeführten Analysen zeigen eine hohe Übereinstimmung der Ergebnisse der PCR-basierten Idylla-Methode mit den Ergebnissen der Pyrosequenzierung (97,9%, 90% CI 95,7%-99%) sowie der Überprüfung mittels Halbleitersequenzierung (Ion Torrent PGM) und wiederholter Pyrosequenzierung. In drei von vier Fällen mit abweichenden Ergebnissen wurden die Idylla-Ergebnisse bestätigt. In einem Fall lieferte die Idylla-Methode artefaktbedingt ein falsch-positives Ergebnis.

Die Idylla-Methode erwies sich als sehr sensitiv in der Detektion von BRAF V600-Mutationen, außerdem zeigte sie eine hohe Anwenderfreundlichkeit und einen deutlich geringeren Zeit- und Arbeitsaufwand als die Pyrosequenzierung.

Siehe hierzu Abschnitt 4.1.

Die detektierten Mutationsfrequenzen stimmten mit den Ergebnissen anderer Autoren überein <sup>7,41,44,45</sup>. Signifikante Korrelationen zwischen klinisch-pathologischen Parametern und dem Mutationsstatus ergaben sich in Bezug auf das Patientenalter. Siehe hierzu Abschnitt 4.3.

### 4.1. Vergleich von Idylla-Analyse und Pyrosequenzierung

#### 4.1.1. Primäre Übereinstimmung der Ergebnisse von Pyrosequenzierung und Idylla-Analyse

Die Gesamtübereinstimmungsrate von 97,9% mit einem 90%-Konfidenzintervall von 95,7%-99,0% bestätigt die Validität der neu entwickelten Idylla-Methode durch eine hohe Konkordanz mit der Standardmethode der Pyrosequenzierung.

#### 4.1.2. Detaillierte Betrachtung der mittels Next-Generation-Sequencing überprüften Ergebnisse

##### ***Proben mit abweichenden Ergebnissen***

Folgende Besonderheiten ergeben sich für die Betrachtung der diskordanten Proben:

B109 (Idylla-Ergebnis: Mutation V600E/E2/D, Pyrosequenzierungs-Ergebnis: Wildtyp, NGS-Ergebnis: Mutation V600E ( $v=43,1\%$ ), Ergebnis der erneuten Pyrosequenzierung: Mutation V600E ( $v=62,6\%$ )) und B123 (Idylla-Ergebnis: Mutation V600E/E2/D, Pyrosequenzierungs-Ergebnis: Wildtyp, NGS-Ergebnis: Mutation V600E

( $v=6,2\%$ ), Ergebnis der erneuten Pyrosequenzierung: Mutation V600E ( $v=25,4\%$ ): Für diese Proben konnten alle weiteren Analysen das Idylla-Ergebnis bestätigen. Die Pyrosequenzierung lieferte unter Verwendung des Säulenbasierten Qiagen-Kits für die DNA-Extraktion also ein falsch negatives Ergebnis.

Verantwortlich hierfür ist am ehesten die schlechte DNA-Qualität der beiden Proben, das heißt, dass möglicherweise aufgrund einer starken DNA-Fragmentierung in den Tumorzellen genomische DNA nur aus mitpräpariertem Normalgewebe, nicht aber aus den Tumorzellen erfolgreich amplifiziert werden konnte. Die Funktionsweise der Idylla-Methode wird hierdurch möglicherweise aufgrund der verwendeten Primer nicht gestört. Die im Vergleich zu anderen Proben zahlreichen weiteren genomischen Variationen, die in der NGS-Analyse gefunden wurden, könnten (ebenfalls aufgrund der schlechten DNA-Qualität) am ehesten Artefakte durch die Multiplex-PCR im Rahmen der Library-Erstellung für die PGM-Sequenzierung darstellen.

Die unterschiedliche detektierte Mutationshäufigkeit von NGS-Analyse und zweiter Pyrosequenzierung könnte bei Probe B109 ( $v=43,1\%$  bzw.  $62,6\%$ ) auf die Extraktion aus neu geschnittenem Gewebe zurück zu führen sein, bei Probe B123 ( $v=6,2\%$  bzw.  $25,4\%$ ) ist der Unterschied allerdings sehr deutlich und abgesehen von einer möglichen bestehenden Tumorheterogenität hier nicht erklärbar.

B165 (Idylla-Ergebnis: Mutation V600E/E2/D, Pyrosequenzierungs-Ergebnis: Wildtyp, NGS-Ergebnis: Mutation V600E ( $v=3,4\%$ ), Ergebnis der erneuten Pyrosequenzierung: Mutation V600E ( $v=3,8\%$ )): Für diese Probe bestätigten die NGS-Analyse sowie die erneute Pyrosequenzierung ebenfalls das Idylla-Ergebnis. Die Mutationshäufigkeit von ca. 3% liegt im Bereich der Detektionsgrenze der Pyrosequenzierung (2,4 % für die Detektion von V600E-Mutationen) und könnte auch aus diesem Grund während der ersten Analyse nicht detektiert worden sein. Dies würde bedeuten, dass die Idylla-Methode sensitiver ist.

B129 (Idylla-Ergebnis: Mutation V600K/R/M, Pyrosequenzierungs-Ergebnis: Wildtyp, NGS-Ergebnis vor UDG-Verdau: Mutation V600M (2,3%), NGS-Ergebnis nach UDG-Verdau: Wildtyp): Für diese Probe konnte mittels NGS-Analyse zwar initial ein dem Idylla-Ergebnis entsprechender niedrigfrequenter Basenaustausch detektiert werden. Dieser stellt jedoch höchst wahrscheinlich ein Fixierungsartefakt dar, da er nach UDG-Verdau nicht mehr nachweisbar war.

Die Idylla-Methode detektierte hier also vermutlich technisch korrekt den vorhandenen Basenaustausch, lieferte aber dennoch ein falsch-positives Ergebnis, das sich wahrscheinlich auf Artefakte durch die Formalin-Fixierung gründet.

A26 (Idylla-Ergebnis: Mutation V600E/E2/D, Pyrosequenzierungs-Ergebnis: Wildtyp, NGS-Ergebnis: Wildtyp, Pyrosequenzierungs-Ergebnis nach Korrektur des Tumorareals: Mutation V600E ( $v=7,7\%$ )): Für diese Probe liegt die Diskordanz zwischen beiden Ergebnissen in der Verwendung eines jeweils anderen Tumorareals für die Idylla-Analyse und die Pyrosequenzierung begründet. Die erneute Pyrosequenzierung zeigte eine Übereinstimmung mit dem Idylla-Ergebnis, es ist also davon auszugehen, dass die Idylla-Analyse ein der Standardmethode entsprechendes, richtiges Ergebnis lieferte.

### ***Konkordante Proben***

Die Übereinstimmung aller drei Methoden in Bezug auf die eindeutigen Ergebnisse sowohl mit als auch ohne Mutation bestätigen die Validität der beiden verglichenen Methoden. In Probe B052 (Idylla-Ergebnis: Mutation V600E/E2/D, Pyrosequenzierungs-Ergebnis: Mutation V600E ( $v=97,3\%$ ), NGS-Ergebnis: Mutation V600E ( $v=41,7\%$ )) ist die Allelfrequenz laut NGS-Analyse nur halb so hoch wie laut Pyrosequenzierung. Hier könnte eventuell auch eine Mutation auf dem Wildtyp-Allel im Bereich der Primer-Bindungsstelle der Pyrosequenzierungs-Primer vorliegen, die die Amplifikation nur dieses Allels verhindert hat.

Die zusätzlich untersuchte Probe B140 (Pyrosequenzierungs-Ergebnis V600M,  $v=7,5\%$ ) konnte im Rahmen der PGM-Analyse nicht ausreichend amplifiziert werden. Auch die Idylla-Analyse konnte aufgrund einer zu geringen DNA-Menge nicht durchgeführt werden und die Pyrosequenzierung war beim ersten Durchlauf nicht möglich. Das Pyrosequenzierungs-Ergebnis kann somit nicht überprüft und sicher eingeordnet werden. Eine Kontamination ist jedoch unwahrscheinlich, da zu keiner Zeit weitere V600M-Mutationen detektiert wurden.

Die Bestätigung der korrigierten potentiell niedrigfrequent vorhandenen V600A-Mutationen als Wildtyp konnte dieses Vorgehen als korrekt bestätigen.

#### **4.1.3. Übereinstimmung der Methoden in Zusammenschau aller Analysen**

In drei von vier Fällen mit abweichendem Ergebnis zwischen Idylla-Methode und Pyrosequenzierung konnten die weiteren Analysen (NGS-Analyse und/oder erneute Pyrosequenzierung nach Maxwell-Extraktion) die Ergebnisse der Idylla-Analyse bestätigen. In einem Fall war dies nicht möglich, wie oben erläutert. Ein fünfter Fall zeigte nach Überprüfung der verwendeten Tumoreareale keine abweichenden Ergebnisse mehr.

Die Pyrosequenzierung lieferte dementsprechend drei falsch-negative Ergebnisse. Die Idylla-Methode lieferte ein falsch-positives Ergebnis, vermutlich aufgrund von Fixierungsartefakten. Sie detektierte Mutationen im Bereich einzelner Basen also hoch sensitiv im Vergleich zur Pyrosequenzierung.

#### **4.1.4. Vergleich der Methoden in Bezug auf Aufwand und Ergebnisqualität**

Die Pyrosequenzierung ist für die BRAF-Analyse in der pathologischen Routinediagnostik etabliert, da sie im Vergleich zur Kettenabbruchmethode schneller, sensitiver, mit weniger Arbeitsaufwand und günstiger durchzuführen ist und eine geringere Detektionsgrenze aufweist<sup>58,68,69</sup>.

Die Länge der untersuchten Sequenz ist zwar auf bis zu 50 Basenpaare (bp) begrenzt, was die Methode jedoch ebenfalls für die BRAF-Untersuchung geeignet macht, da sich die überwiegende Mehrheit der klinisch relevanten Mutationen innerhalb eines Exons befindet<sup>69-71</sup>.

Dennoch ist die Methode mit einem relativ hohen Arbeits- und Zeitaufwand verbunden und kommt daher nur in größeren pathologischen Routinelaboren zum Einsatz. Die Wartezeit auf das Ergebnis kann dadurch verlängert und eine eventuelle Therapie verzögert werden.

Die Idylla-Methode zeigte sich mit einer „Hands-on-time“ von ca. 10 min und einer „Time-to-result“ von ca. 1,7 Stunden im Vergleich zur Pyrosequenzierung mit einer „Hands-on-time“ von ca. 6 Stunden und einer „Time-to-result“ von 12 Stunden deutlich weniger zeitaufwendig.

Da bei der Pyrosequenzierung einige Arbeitsschritte sowie die Gerätelaufzeit unabhängig von der Probenzahl sind, lässt sich durch gleichzeitige Bearbeitung mehrerer Proben der Zeitaufwand pro Probe reduzieren. Für 24 Proben, die in der

Routine-Anwendung noch gut handhabbar sind, ist der Zeitaufwand insgesamt mit ca. 25 Stunden daher geringer als der der Idylla-Analyse mit ca. 36 Stunden. Die „Hands-on-time“ ist dann mit ca. 19 Stunden (Pyrosequenzierung) statt 4 Stunden (Idylla) allerdings immer noch deutlich höher.

Des Weiteren zeigte sich der Arbeitsablauf des Idylla-Verfahrens deutlich einfacher und schnell zu erlernen.

Das Kontaminationsrisiko wird durch die Einmalverwendung und den Sicherheitsverschluss der Idylla-Kartuschen reduziert.

Mittels Pyrosequenzierung konnten für mehr Proben technisch valide Ergebnisse gewonnen werden als mit der Idylla-Methode, für die die DNA-Menge häufiger nicht ausreichend war. Alle Proben, für die die DNA im Rahmen der Pyrosequenzierung nicht amplifiziert werden konnte, konnten auch mittels Idylla-Methode nicht analysiert werden. Die Pyrosequenzierung scheint also auch bei geringeren DNA-Konzentrationen gültige Ergebnisse liefern zu können als die Idylla-Methode.

Des Weiteren ist der über die Feststellung einer Mutation hinausgehende Informationsgehalt der Idylla-Ergebnisse geringer als bei der Pyrosequenzierung: Die Methode liefert keine Informationen über die genaue Mutation oder die Mutationshäufigkeit, da nur zwischen Mutation und Nicht-Mutation unterschieden werden kann und die mutationsspezifischen Primer nur je V600E/E2/D oder V600K/R/M-Mutationen detektieren. Die Ergebnisse können nicht wie bei konventionellen Sequenzierungsverfahren auf Basensequenz-Ebene nachvollzogen werden.

Zudem bietet die Idylla-Methode bis auf die Variation der eingesetzten Materialmenge keine Möglichkeit die Analyseparameter für individuelle Fälle zu verändern, wie es bei den anderen verwendeten Methoden möglich ist.

## **4.2. Probenkollektiv**

Die untersuchten Melanomproben (n = 249) weisen eine heterogene Verteilung über die meisten der betrachteten klinisch-pathologischen Parameter auf.

Beim Patientengeschlecht überwog der Anteil der männlichen Patienten leicht mit fast 60% der Fälle. Dies passt jedoch zu der etwas höheren Inzidenzrate in der männlichen Bevölkerung<sup>24</sup>.

Der Gewebeansprung der untersuchten Proben ist zu beinahe 90% metastatisch. Dies entspricht zwar nicht der allgemeinen Verteilung resektierter Melanomproben, wohl aber am ehesten der klinischen Routine in Bezug auf BRAF-Analysen, da Vemurafenib bisher nur in metastasierten Krankheitsstadien eingesetzt wird. Für den rein technischen Methodenvergleich ist diese Ungleichverteilung also nicht relevant, jedoch sollte sie im Hinblick auf die biologischen Analysen in dieser Kategorie nicht als repräsentativ betrachtet werden.

Das mittlere Alter unserer Patienten (61,6 Jahre) liegt im Bereich des für 2010 vom Robert-Koch-Institut angegebenen mittleren Erkrankungsalters des malignen Melanoms (58 Jahre für Frauen bzw. 66 Jahre für Männer) <sup>24</sup>.

Die überwiegende Mehrheit (>80%) der untersuchten Melanomproben wies mit 0-10% pigmentierter Tumorzellen einen niedrigen Pigmentierungsgrad auf, eine ebenso große Mehrheit einen Tumorzellanteil von >80%. Ebenfalls ca. 80% der Proben wiesen einen Nekroseanteil von <10% der Zellen auf. Diese heterogenen Verteilungen decken sich mit den Ergebnissen von Marchant et al., die 113 Melanomproben aus der pathologischen Routinediagnostik untersuchten <sup>72</sup>. Hier wiesen >90% der Proben einen Pigmentierungsgrad von <5% der Zellen auf, >80% der Proben einen Tumorzellgehalt von >80% und >90% der Proben einen Nekroseanteil von <10% der Zellen.

Ca. 60% der Proben stammen aus den Jahren 2008-2012, ca. 40% sind jüngeren Datums (ab 2013). Der Routineeinsatz der Methoden erfolgt an aktuellen Proben, jedoch ist die Qualität der DNA nach Extraktion aus archivierten FFPE-Blöcken auch noch nach längeren Lagerungszeiträumen nicht relevant verändert <sup>73,74</sup>.

### **4.3. Mutationsfrequenzen und klinisch-pathologische Parameter**

#### **4.3.1. Frequenzen der BRAF V600-Mutationen**

Die Mutationsrate von 43,8% an allen ausgewerteten Proben stimmt mit den in anderen Studien angegebenen Mutationsraten von 40-50% überein <sup>39-42</sup>. Die einzelnen Anteile der verschiedenen Mutationen bestätigen ebenfalls die in der Literatur angegebenen Mutationsfrequenzen <sup>7,41,44,45</sup> (siehe auch Tabelle 1). Mit 84,7% zeigt sich auch in unseren Daten die V600E-Mutation als eindeutig häufigste Mutation. Die V600K-Mutation liegt mit einem Anteil von 11,2% an zweiter Stelle. V600R-, E2-, D-, M-, und G- sowie alle weiteren Mutationen waren auch hier selten bzw. gar nicht vorhanden.

#### **4.3.2. Korrelationen zwischen klinisch-pathologischen Parametern und Sequenzierungsergebnis**

##### ***Patientengeschlecht***

Unter den männlichen Patienten wiesen mit ca. 50% etwas mehr Patienten eine BRAF-Mutation auf als unter den weiblichen mit ca. 40%, allerdings ist dieser Unterschied hier nicht signifikant. Dieses Ergebnis stellt sich in der Tendenz konsistent zu den Befunden von Massad et al. (36,4% der männlichen und 29,3% der weiblichen Patienten mit BRAF-Mutation) sowie Long et al. (50% der männlichen und 44,1% der weiblichen Patienten mit BRAF-Mutation), jedoch diskrepant zu den Befunden von Viros et al. (42,8% der männlichen und 53,9% der weiblichen Patienten mit BRAF-Mutation) dar<sup>75-77</sup>. In keiner der angegebenen Studien war der Unterschied zwischen den Geschlechtern jedoch signifikant, sodass diese Diskrepanz vernachlässigbar ist.

##### ***Patientenalter***

In unseren Ergebnissen nahm der Anteil der mutierten Proben mit steigendem Alter ab. In den Gruppen der Patienten jünger als 59 Jahre wiesen über die Hälfte der Melanome BRAF-Mutationen auf, während es in der Gruppe der Patienten zwischen 60 und 79 Jahren 40,7% und in der Gruppe der Patienten älter als 80 Jahre sogar nur 21,7% waren.

Dies stimmt mit Ergebnissen von Long et al. überein, die ein jüngeres Lebensalter bei Diagnose von BRAF-mutierten Melanomen fanden sowie von Menzies et al., die in den jüngeren Altersgruppen vermehrt BRAF-Mutationen nachweisen konnten<sup>77,78</sup>. In letzterer Studie nahm der Anteil der V600E-Mutationen an allen Mutationen mit steigendem Alter ab, während V600K-Mutationen vor allem in höheren Altersklassen und auf chronisch UV-geschädigter Haut gefunden wurden. Dieser Trend liegt bei unseren Ergebnissen für die V600E-Mutationen ebenfalls vor, hier sank der Anteil der V600E-Mutationen mit dem Alter von >90% in der niedrigsten auf 80% in der höchsten Altersgruppe. Für den Anteil der V600K-Mutationen an allen Mutationen konnte tendenziell auch ein Anstieg von 0% in der niedrigsten auf 20% in der höchsten Altersgruppe gefunden werden, mit etwas weniger Mutationen in der dritten als in der zweiten Altersgruppe. Hier ist allerdings zu beachten, dass in der höchsten Altersgruppe die absolute Anzahl mutierter Proben mit fünf sehr gering ist.

Insgesamt scheint das Auftreten von BRAF-Mutationen mit dem Alter zusammenzuhängen, bzw. könnte ein Zusammenhang bestehen zwischen dem Auftreten von Mutationen in unterschiedlichen Altersgruppen sowie von Melanomen insgesamt. So konnten Viros et al. das Alter der Patienten mit einem Scheitelpunkt bei 55 Jahren als den am stärksten prädiktiven Faktor zur Vorhersage des BRAF-Mutationsstatus erfassen <sup>75</sup>.

Außerdem konnten sie ein Modell entwickeln, um den BRAF- und NRAS-Mutationsstatus mit Hilfe histomorphologischer Kriterien in 90% der Fälle korrekt vorherzusagen.

Diese und weitere Befunde deuten darauf hin, dass es verschiedene Arten von Melanomen gibt, die zwar nicht mit den bisher unterschiedenen morphologischen Typen übereinstimmen, wohl aber Parallelen aufweisen und insgesamt getrennte Entstehungsmechanismen für Melanome in verschiedenen Altersgruppen bzw. mit unterschiedlichen Charakteristika wahrscheinlich machen. So wird immer wieder angenommen, dass das maligne Melanom der Haut in eine frühe und eine späte Form unterteilt werden kann, die auch mit den in Abschnitt 1.2.1 beschriebenen verschiedenen Formen der Sonnenexposition zusammen hängen, wobei mit der frühen Form eher genetische Prädisposition, eine Neigung zu multiplen Nävi und intermittierende Sonnenexposition zusammenhängen könnten, mit der späten Form jedoch eine chronische UV-Schädigung <sup>79-83</sup>.

### ***Ursprung des Tumorgewebes***

Nicht nur die Inzidenz von Melanomen insgesamt, sondern auch die Häufigkeit von BRAF-Mutationen hängt unter anderem mit der Lokalisation des Primärtumors zusammen <sup>39,40</sup>. Ein Grund hierfür könnte auch hier die Dauer und Art der UV-Einstrahlung an den jeweiligen Körperstellen sein. So finden sich BRAF V600E-Mutationen vor allem an Körperstellen, die intermittierend starker, aber insgesamt weniger UV-Belastung ausgesetzt sind, wie dem Körperstamm sowie den Armen und Beinen, und weniger an Körperstellen, die kontinuierlicher UV-Strahlung ausgesetzt sind, wie dem Gesicht, oder sehr wenig Strahlung, wie den Hand- und Fußflächen und den Schleimhäuten, sowie der Aderhaut des Auges <sup>39-41</sup>. Letztere weisen vor allem Mutationen in den Genen GNAQ und GNA11 auf <sup>84</sup>. Allerdings scheinen hier Unterschiede zwischen den vorderen Aderhaut-Anteilen (Choroidea und Iris) und den



hinteren Anteilen zu bestehen, insofern, dass das Choroidal-Melanom im Hinblick auf BRAF-Mutationen eher Gemeinsamkeiten mit dem Melanom der Haut aufweist, was ebenfalls auf die UV-Strahlung als Pathogenesefaktor hindeuten könnte, da die vorderen Aderhautanteile dieser stärker ausgesetzt sind <sup>85,86</sup>.

Ferner sind BRAF-Mutationen häufiger beim Superfiziell spreitenden und beim Nodulären Melanom <sup>40,77</sup>.

Des Weiteren scheinen Lymphknotenmetastasen etwas häufiger BRAF-Mutationen aufzuweisen als Primärtumoren, was einen Hinweis auf einen zeitlichen oder auch funktionellen Zusammenhang zwischen Mutation und Metastasierung geben könnte <sup>77</sup>. Zwar detektierten Heinzerling et al. bei 10 von 53 Patienten einen unterschiedlichen Mutationsstatus im Vergleich mehrerer Proben <sup>42</sup>. Sigalotti et al. fanden jedoch einen konstanten BRAF-Status in Primärmelanomen und Metastasen verschiedener Lokalisationen bei 13 von 15 Patienten <sup>87</sup>. Edlundh-Rose et al. bestätigten einen konsistenten Mutationsstatus in mehreren Metastasen, was insgesamt darauf hindeuten könnte, dass die Mutation vor oder im Zuge der Metastasierung auftritt und danach bestehen bleibt <sup>88</sup>.

All dies konnte durch unsere Ergebnisse nicht bestätigt werden. Hier zeigten die Primärtumoren der Haut als einzige Gruppe in über der Hälfte der Proben BRAF-Mutationen. Lediglich die Befunde in der Gruppe der Primärtumoren anderer Lokalisationen könnte mit einem Mutationsanteil von nur 12,5% die Befunde von Curtin et al. sowie Greaves et al. unterstützen, die BRAF-Mutationen mit UV-Exposition in Verbindung bringen <sup>40,41</sup>.

Aufgrund der geringen Größe der Gruppen der Primärtumoren sollten diese Ergebnisse jedoch sehr kritisch interpretiert werden.

Da unter anderem von Pollock et al. sowie Poynter et al. auch in über 80% untersuchter Nävi BRAF-Mutationen gefunden wurden, kommt jedoch vielleicht eher eine gemeinsame Ursache für die Mutation, für das Vorhandensein von multiplen Nävi und für eine mögliche Melanomenstehung in Frage, als dass die Mutation als Ursache für die maligne Entartung angesehen werden sollte <sup>89,90</sup>. So kann für Melanome eine Progression aus einer benignen Vorläuferläsion im Sinne einer Adenom-Karzinom-

Frequenz nur teilweise beobachtet werden und die Entartungswahrscheinlichkeit eines einzelnen Nävus ist gering<sup>22,91</sup>.

Insgesamt sprechen auch die hier beschriebenen Forschungsergebnisse dafür, dass es mehrere Typen von Melanomen gibt, die sich im Entstehungsmechanismus unterscheiden und Unterschiede zwischen verschiedenen Körperregionen, der Art der Sonneneinstrahlung, der Hautfarbe, der Tumordicke, dem Patientenalter, dem Geschlecht und Ähnlichem in Bezug auf den Mutationsstatus erklären könnten<sup>83,92,93</sup>.

#### ***Pigmentierungslevel, Tumorzellanteil, Nekroseanteil***

Aufgrund der sehr unterschiedlichen Gruppengrößen können hier beim Vorliegen nicht signifikanter Unterschiede in allen Kategorien keine verallgemeinernden Aussagen getroffen werden. Marchant et al. fanden jedoch ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf diese Charakteristika<sup>72</sup>.

#### ***Probenalter***

Dass zwischen den Jahrgängen der Proben kein signifikanter Unterschied in Bezug auf den Mutationsstatus besteht, ist zu erwarten, da eine längere Archivierung die DNA-Qualität, wie in Abschnitt 4.2 beschrieben, nicht relevant beeinflusst<sup>73,74</sup>.

#### **4.4. Mögliche Fehler durch methodische Abweichungen**

Die nur makroskopische Auswahl eines Tumorareals bei fehlendem HE-Schnitt könnte zur Analyse von Nicht-Tumorgewebe geführt haben. Da in diesem Fall aber beide Analysen eine Mutation detektierten, ist dies unwahrscheinlich und des Weiteren für den technischen Methodenvergleich irrelevant.

Die Deparaffinierung eines Schnittes vor der Idylla-Analyse dürfte ebenfalls keine Auswirkungen auf die Untersuchung gehabt haben, da das Ethanol das Xylol entfernt und rückstandsfrei abtrocknet und die Idylla-Methode daher nicht beeinflusst wird.

#### **4.5. Beurteilung der Idylla-Methode und mögliche Perspektiven**

Der diagnostische Nutzen einer BRAF-Mutationsanalyse könnte neben dem malignen Melanom in Zukunft auch für andere Tumorentitäten relevant werden, bei denen BRAF-Mutationen eine pathogenetische Rolle spielen. So werden BRAF-Inhibitoren zum Beispiel für die Behandlung der Haarzelleukämie und des Schilddrüsenkarzinoms

erprobt, während sich für das Kolorektale Karzinom bereits ein fehlendes Ansprechen zeigte<sup>94-96</sup>.

Entsprechend der zunehmenden klinischen Relevanz stehen zur Detektion von BRAF V600-Mutationen bereits verschiedene PCR-basierte Methoden zur Verfügung<sup>72,97,98</sup>. Der zeit- und arbeitsaufwendige Schritt der DNA-Isolation muss allerdings auch hier durchgeführt werden. Ebenfalls verfügbar ist ein V600E-spezifischer monoklonaler Antikörper zur immunhistochemischen Färbung von FFPE-Schnitten, allerdings werden weitere BRAF V600-Mutationen nicht nachgewiesen und es sind bereits falsch positive und falsch negative Ergebnisse berichtet worden<sup>99-101</sup>.

Dagegen liegen die entscheidenden Vorteile der Idylla-Methode in der schnellen, einfachen Durchführbarkeit und im Vergleich zur Pyrosequenzierung sensitiveren Mutationsdetektion der wichtigsten BRAF V600-Mutationen.

Dies konnten inzwischen auch weitere Arbeiten bestätigen: Für einen Prototyp des Idylla-Gerätes und eine kleinere Probenzahl verschiedener Tumorarten (60 bzw. 100 Proben) konnten Janku et al. in einer kürzlich veröffentlichten Studie ähnliche Übereinstimmungsraten des Idylla-Gerätes mit dem cobas 4800 *BRAF* V600 Mutation Test (Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz) und dem MiSeq Sequenzierungssystem (Illumina, San Diego, Kalifornien, USA) bzw. verschiedenen anderen Untersuchungsmethoden zeigen (97 % und 100 % bzw. 96%)<sup>102</sup>. Untersuchungen von Melchior et al. zeigten für 139 FFPE-Gewebeproben verschiedener Tumorentitäten in 97,84 % der Fälle übereinstimmende Ergebnisse zwischen dem Idylla-Gerät und verschiedenen anderen Detektionsmethoden (Sanger-Sequenzierung und mehrere PCR-basierte Methoden)<sup>103</sup>. Für 100 FFPE-Gewebeproben kolorektaler Karzinome fanden Colling et al. ebenfalls eine sehr hohe Übereinstimmungsrate von 100 % für Untersuchungen mit dem Idylla-Gerät und dem cobas-Test<sup>104</sup>.

Eine Einschränkung der Idylla-Methode besteht allerdings in ihrem hohen Automatisierungsgrad in dem Sinne, dass keine zusätzlichen Informationen über die DNA-Qualität, den genauen Mutationstyp, weitere genetische Aberrationen und die Mutationshäufigkeit getroffen werden können. Insbesondere die fehlende Information über die Mutationshäufigkeit kann sich in Zukunft problematisch darstellen, falls es sich in klinischen Studien herausstellen sollte, dass unterschiedliche Mutationshäufigkeiten

innerhalb eines Tumors mit einem unterschiedlichen Therapieansprechen auf BRAF-Inhibitoren einhergehen. Zur Zeit gibt es zwar keine Daten, die die Frage beantworten, ob ein Zusammenhang zwischen der Mutationsfrequenz und dem Therapieansprechen besteht, wie es zum Beispiel im Fall des Adenokarzinoms der Lunge in Bezug auf niedrigfrequente KRAS-Mutationen unter Tyrosinkinase-Inhibitor-Therapie gezeigt werden konnte <sup>105</sup>. Allerdings konnten Poukilos et al. sowie Hatzivassiliou et al. eine paradoxe Aktivierung des MAPK-Weges über Dimer-Bildung von B-Raf- und C-Raf-Kinasen unter BRAF-Inhibitor-Therapie von BRAF-Wildtyp-Zellen bei gleichzeitiger RAS-Mutation feststellen <sup>106,107</sup>. Dieser Mechanismus könnte eine mögliche Erklärung für die Problematik der Resistenzentwicklung sowie Induktion anderer Hauttumoren unter BRAF-Inhibitor-Therapie darstellen und dann eine Anwendung bei sehr niedrigfrequent mutierten Tumoren verbieten. Der unzureichende Kenntnisstand erlaubt hier diesbezüglich allerdings keine klinischen Rückschlüsse.

Unabhängig davon könnte ein Eingreifen auf mehreren Ebenen des MAPK-Weges die Resistenzentwicklung und damit assoziierte Nebenwirkungen vermindern. So ist zum Beispiel der MEK-Inhibitor Trametinib für die Behandlung des fortgeschrittenen Melanoms mit V600E/K-Mutation zugelassen <sup>108</sup>. Für die Kombinationstherapie von Trametinib und Dabrafenib konnte bereits eine Verlängerung des medianen Gesamtüberlebens von im Durchschnitt ca. 6 Monaten im Vergleich zur Therapie mit Dabrafenib und Placebo gezeigt werden sowie ein vermindertes Auftreten von anderen Hauttumoren <sup>109</sup>. Ob auch Kombinationen der neuen Immun-Therapeutika (siehe Abschnitt 1.2.4) mit zielgerichteten Therapien weitere Therapie-Möglichkeiten bieten könnten, ist Inhalt aktueller Forschung <sup>110</sup>.

Gleichzeitig gewinnen auch noch weitere (z. T. auch in anderen Tumorentitäten) häufig mutierte Gene in der Erforschung des malignen Melanoms an Bedeutung: Für NRAS sind schon seit langem Mutationen in etwa 20% der malignen Melanome bekannt <sup>111,112</sup>. Versuche einer spezifischen Therapie waren hier bis jetzt jedoch nicht überzeugend <sup>113</sup>. Für die Tyrosinkinase KIT konnten in einigen Melanom-Subtypen Mutationen in bis zu 39% der untersuchten Proben nachgewiesen werden <sup>114</sup>. Auf den spezifischen KIT-Inhibitor Imatinib zeigten sich in hierzu bereits durchgeführten klinischen Studien Ansprechraten von etwa 20% <sup>115-117</sup>.

Des Weiteren wurden im malignen Melanom für den Transkriptionsfaktor microphthalmia-associated transcription factor (MITF), die Phosphatase phosphatase and tensin homolog (PTEN), die Cyclin-abhängige Kinase (CDK) 2/4 und Cyclin D in 10-50% der Fälle genetische Alterationen nachgewiesen <sup>118,119</sup>.

All dies zeigt, dass wahrscheinlich in Zukunft weitere Mutationen in die molekulare Diagnostik des malignen Melanoms einbezogen werden müssen.

Da das Wissen über klinisch relevante onkogene Mutationen derzeit insgesamt stark ansteigt, wird in der Krebsdiagnostik perspektivisch gesehen der Bedarf an flexiblen und umfassenderen Mutationsanalysen steigen und polygenetische Analysen bis hin zur Sequenzierung des ganzen Exoms oder womöglich Genoms (engl. whole exome/genome sequencing) werden immer bedeutsamer <sup>120,121</sup>. NGS-Methoden sind dabei auf dem Weg, das sogenannte „\$1000 Genome“ zu ermöglichen <sup>122,123</sup>. Das heißt, Whole Genome Sequencing soll für jeden Menschen zu einem angemessenen Preis, der mit 1000 US-Dollar veranschlagt wurde, und in angemessener Zeit möglich sein. Konsequenzen hiervon wären unter anderem ein besseres Verständnis von polygenetischen Erkrankungen, gezielte Präventionsmaßnahmen und allgemein eine individuellere, „personalisierte Medizin“ <sup>124,125</sup>.

Daher stellt sich vor allem in diesem Zusammenhang die Frage, ob Assays zur Detektion einzelner bis einiger Mutationen und andere monogenetische Analysen langfristig an Bedeutung verlieren werden, während Next Generation Sequencing immer zugänglicher wird.

Wahrscheinlich wird jedoch sogenanntes „panel-sequencing“, d.h. die parallele Sequenzierung einer Gruppe onkologisch relevanter Mutationen, für den Großteil der Routinediagnostik ausreichen. Hier bietet die Idylla-Methode auch entsprechende Möglichkeiten für polygenetische Analysen: Prinzipiell technisch durchführbar sind in einer Idylla-Kartusche Multiplex-Analysen mit bis zu 30 genetischen Markern, basierend auf der Idylla-Plattform können also weitere Mutationsassays implementiert werden. Denkbar und von besonderem Interesse wären hier also Assay-Kombinationen, die alle relevanten Mutationen eines spezifischen Tumors umfassen („cancer panel“).

Doch auch bereits in der vorliegenden Form würde das Idylla-System eine deutliche Ersparnis in Bezug auf die Arbeitszeit und den Aufwand ermöglichen und genetische

Untersuchungen auch in kleineren Praxen, theoretisch sogar in Krankenhäusern ohne vorhandene Labortechnik ermöglichen.

Die Wartezeit für die Patienten könnte dadurch in vielen Fällen deutlich reduziert und die richtige Therapie früher begonnen werden.

Betrachtet man Idylla außerdem nicht nur im Hinblick auf das maligne Melanom, sondern als erweiterbares System mit der Möglichkeit zur Assay-Entwicklung auch für Dritte und für verschiedenste Einsatzmöglichkeiten, ergeben sich neue Perspektiven individueller, „liberaler“ Gendiagnostik.

Denkbar wären hier vor allem Anwendungen in der Erregerdiagnostik. Hier könnte die Idylla-Methode für Erreger, die nicht durch Anzucht oder konventionell nur aufwendig nachgewiesen werden können, als Schnelltest fungieren, und somit den Therapiebeginn unter Umständen lebensentscheidend verkürzen. Van den Kieboom et al. veröffentlichten kürzlich Testergebnisse eines zweiten Assays für das Idylla-Gerät, mit dem sie erfolgreich das Expressionslevel von vier mRNA-Markern für die Schwere einer Infektion mit dem Respiratory-Syncytial-Virus (RSV) im Vollblut bestimmen konnten <sup>126</sup>.

Ferner wäre in weniger weit entwickelten Ländern oder in Krisengebieten der Einsatz des Idylla-Gerätes auch ohne ausgebildetes Laborpersonal praktikabel und könnte durch einen Nachweis oder Ausschluss einer bestimmten Infektion unter Umständen auch zur Epidemie-Kontrolle beitragen.

Die Testung weiterer Assays wäre für die Evaluation einer praktischen, alle Möglichkeiten ausschöpfenden Anwendbarkeit des Idylla-Gerätes also wünschenswert.

#### **4.6. Fazit**

Die Idylla-Methode ist eine im Vergleich zur Pyrosequenzierung sensitivere Methode zur Detektion aktivierender BRAF-Mutationen im malignen Melanom.

Die Vorteile der Methode bestehen in einer einfachen Handhabung, die den Einsatz auch außerhalb von Großlaboren erlaubt, und der kurzen Vorbereitungs- und Geräteaufzeit, die das Ergebnis in weniger als zwei Stunden verfügbar machen.

Damit bietet das System besonders für kleinere Labore eine Möglichkeit, molekulare Analysen für die Tumordiagnostik durchzuführen.

Einen Nachteil könnte unter Umständen der aufgrund der fehlenden Angaben zur Mutationshäufigkeit vergleichsweise geringere Informationsgehalt des Ergebnisses darstellen.

Die Einführung weiterer Assays könnte weitere diagnostische Möglichkeiten und auch polygenetische Analysen ermöglichen. Neben der genetischen Analyse von Tumorgewebe sind hier auch andere Fragestellungen denkbar, z. B. der Einsatz als Schnelltest in der Erregerdiagnostik oder generell in ressourcenärmeren Ländern oder Regionen.

## Abkürzungsverzeichnis

A. dem. *demineralisiertes Wasser*  
AJCC *American Joint Committee for Cancer*  
ARMS *Amplification-refractory mutation system*  
ATP *Adenosintriphosphat*  
BCR-ABL *Fusionsgen aus den Genen BCR (breakpoint cluster region) und ABL (Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene)*  
BRAF *v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*  
CI *Konfidenzintervall*  
C<sub>q</sub> *Cycle of Quantification*  
EGF *epidermal growth factor*  
EGFR *epidermal growth factor receptor*  
ERK *extracellular signal-regulated kinase*  
FDA *Food and Drug Administration*  
FFPE *Formalin-fixiert Paraffin-eingebettet*  
FRET *Förster-Resonanzenergietransfer*  
GDP *Guanosindiphosphat*  
GTP *Guanosintriphosphat*  
HGVS *Human Genome Variation Society*  
HIFU *Hoch-intensiver fokussierter Ultraschall*  
HMB-45 *human melanoma black 45*  
IFN- $\alpha$  *Interferon alpha*  
IGV *Integrative Genomics Viewer*  
ISFET *Ionensensitiver Feldeffekt-Transistor*  
IUPAC *International Union of Pure and Applied Chemistry*  
LOD *Limit Of Detection (Detektionsgrenze)*  
MAPK *mitogen activated protein kinase*  
MEK *mitogen activated protein kinase kinase*  
NGS *Next-Generation-Sequencing*  
PCR *Polymerasekettenreaktion*  
PGM *Personal Genome Machine*  
real time-qPCR *quantitative Echtzeit-PCR*  
SPC *sample processing control (endogenes Kontrollgen)*  
UDG *Uracil-DNA-Glykosylase*  
v *Mutationshäufigkeit (Anteil mutierter Gene in der Probe)*



## Literaturverzeichnis

- 1 Melero I, Hervas-Stubbs S, Glennie M, Pardoll D, Chen L. Immunostimulatory monoclonal antibodies for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 2007;7:95-106.
- 2 Stoffel A. Targeted therapies for solid tumors: current status and future perspectives. *BioDrugs* 2010;24:303-16.
- 3 O'Brien S, Guilhot F, Larson R, Gathmann I, Baccarani M, Cervantes F, Cornelissen J, Fischer T, Hochhaus A, Hughes T, Lechner K, Nielsen J, Rousset P, Reiffers J, Saglio G, Shepherd J, Simonsson B, Gratwohl A, Goldman J, Kantarjian H, Taylor K, Verhoef G, Bolton A, Capdeville R, Druker B. Imatinib Compared with Interferon and Low-Dose Cytarabine for Newly Diagnosed Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia. *The New England Journal of Medicine* 2003;348:994-1004.
- 4 Burotto M, Chiou V, Lee J-M, Kohn E. The MAPK pathway across different malignancies: a new perspective. *Cancer* 2014;120:3446-56.
- 5 Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 2003;3:11-22.
- 6 Yang S-H, Sharrocks A, Whitmarsh A. MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation. *Gene* 2013;513:1-13.
- 7 Davies H, Bignell G, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett M, 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, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins G, Bigner D, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho J, Leung S, Yuen S, Weber B, Seigler H, Darrow T, Paterson H, Marais R, Marshall C, Wooster R, Stratton M, Futreal A. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417:949-54.
- 8 Iqbal N, Iqbal N. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. *Molecular Biology International* 2014;2014:852748.
- 9 Rosell R, Moran T, Queralt C, Porta R, Cardenal F, Camps C, Majem M, Lopez-Vivanco G, Isla D, Provencio M, Insa A, Massuti B, Gonzalez-Larriba J, Paz-Ares L, Bover I, Garcia-Campelo R, Moreno M, Catot S, Rolfo C, Reguart N, Palmero R, Sánchez J, Bastus R, Mayo C, Bertran-Alamillo J, Molina M, Sanchez J, Taron M. Screening for Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Lung Cancer. *The New England Journal of Medicine* 2009;361:958-67.
- 10 Patrick R, Fenske N, Messina J. Primary mucosal melanoma. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2007;56:828-34.
- 11 Tolleson W. Human melanocyte biology, toxicology, and pathology. *Journal of Environmental Science and Health, Part C: Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews* 2005;23:105-61.

- 12 McLaughlin C, Wu X-C, Jemal A, Martin H, Roche L, Chen V. Incidence of noncutaneous melanomas in the U.S. *Cancer* 2005;103:1000-07.
- 13 Sinha R, Hader D-P. UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochemical & Photobiological Sciences* 2002;1:225-36.
- 14 Brenner M, Hearing VJ. The Protective Role of Melanin Against UV Damage in Human Skin. *Photochemistry and Photobiology* 2008;84:539-49.
- 15 Böcker W, Denk H, Heitz P, Moch H. *Pathologie*. 4. Auflage. München: Urban & Fischer Verlag (Elsevier GmbH); 2008:1045-48.
- 16 Erdmann F, Lortet-Tieulent J, Schüz J, Zeeb H, Greinert R, Breitbart E, Bray F. International trends in the incidence of malignant melanoma 1953-2008 - are recent generations at higher or lower risk? *International Journal of Cancer* 2013;132:385-400.
- 17 Erickson C, Driscoll M. Melanoma epidemic: Facts and controversies. *Clinics in Dermatology* 2010;28:281-86.
- 18 Whiteman DC, Whiteman CA, Green AC. Childhood sun exposure as a risk factor for melanoma: a systematic review of epidemiologic studies. *Cancer Causes & Control* 2001;12:69-82.
- 19 Gandini S, Sera F, Cattaruzza M, Pasquini P, Picconi O, Boyle P, Melchi C. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *European Journal of Cancer* 2005;41:45-60.
- 20 Pflugfelder A, Kochs C, Blum A, Capellaro M, Czeschik C, Dettenborn T, Dill D, Dippel E, Eigentler T, Feyer P, Follmann M, Frerich B, Ganten M-K, Gärtner J, Gutzmer R, Hassel J, Hauschild A, Hohenberger P, Hübner J, Kaatz M, Kleeberg U, Kölbl O, Kortmann R-D, Krause-Bergmann A, Kurschat P, Leiter U, Link H, Loquai C, Löser C, Mackensen A, Meier F, Mohr P, Möhrle M, Nashan D, Reske S, Rose C, Sander C, Satzger I, Schiller M, Schlemmer H-P, Strittmatter G, Sunderkötter C, Swoboda L, Trefzer U, Voltz R, Vordermark D, Weichenthal M, Werner A, Wesselmann S, Weyergraf A, Wick W, Garbe C, Schadendorf D. Malignant Melanoma S3-Guideline. Diagnosis, Therapy and Follow-up of Melanoma. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 2013;11:1-116.
- 21 Armstrong BK, Krickler A. How much melanoma is caused by sun exposure? *Melanoma Research* 1993;3:395-401.
- 22 Houghton A, Polsky D. Focus on melanoma. *Cancer Cell* 2002;2:275-78.
- 23 Keilholz U, Brossart P, Gerger A, Mackensen A, Peschel C, Schadendorf D, Schlaeppi M, Wörmann B. DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie: Melanom. Leitlinie. Stand: Oktober 2014. Verfügbar über: [www.dgho-onkopedia.de](http://www.dgho-onkopedia.de), abgerufen am 03/12/2014.

- 24 Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg): Krebs in Deutschland 2009/2010. 9. Ausgabe. Berlin, 2013:60-63.
- 25 Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. International Agency for Research on Cancer: GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. 2013. Verfügbar über: <http://globocan.iarc.fr>, abgerufen am 05/08/2014.
- 26 Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Atlas der Krebsinzidenz und -mortalität in Deutschland (GEKID-Atlas). Datenlieferung: Dezember 2013, Lübeck, 2014. Verfügbar über <http://www.gekid.de>, abgerufen am 01/08/2014.
- 27 Tronnier M, Semkova K, Wollina U, Tchernev G. Malignant melanoma: epidemiologic aspects, diagnostic and therapeutic approach. Wiener Medizinische Wochenschrift 2013;163:354-58.
- 28 Coory M, Baade P, Aitken J, Smithers M, McLeod R, Ring I. Trends for in situ and invasive melanoma in Queensland, Australia, 1982-2002. Cancer Causes & Control 2006;17:21-27.
- 29 Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. Annals of Surgery 1970;172:902-08.
- 30 Clark WH, From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. Cancer Research 1969;29:705-27.
- 31 Sebastian G, Stein A. Das maligne Melanom der Haut. 2. Auflage. Bremen: UNI-MED Verlag AG; 2006.
- 32 Weinstein D, Leininger J, Hamby C, Safai B. Diagnostic and prognostic biomarkers in melanoma. The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology 2014;7:13-24.
- 33 Balch C, Gershenwald J, Soong S-j, Thompson J, Atkins M, Byrd D, Buzaid A, Cochran A, Coit D, Ding S, Eggermont A, Flaherty K, Gimotty P, Kirkwood J, McMasters K, Mihm M, Morton D, Ross M, Sober A, Sondak V. Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging and Classification. Journal of Clinical Oncology 2009;27:6199-206.
- 34 Balch C, Soong S-J, Gershenwald J, Thompson J, Reintgen D, Cascinelli N, Urist M, McMasters K, Ross M, Kirkwood J, Atkins M, Thompson J, Coit D, Byrd D, Desmond R, Zhang Y, Liu P-Y, Lyman G, Morabito A. Prognostic Factors Analysis of 17,600 Melanoma Patients: Validation of the American Joint Committee on Cancer Melanoma Staging System. Journal of Clinical Oncology 2001;19:3622-34.
- 35 Crosby T, Fish R, Coles B, Mason M. Systemic treatments for metastatic cutaneous melanoma. Cochrane Database of Systematic Reviews 2000;2:CD001215.

- 36 Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, Schadendorf D, Dummer R, Smylie M, Rutkowski P, Ferrucci PF, Hill A, Wagstaff J, Carlino MS, Haanen JB, Maio M, Marquez-Rodas I, McArthur GA, Ascierto PA, Long GV, Callahan MK, Postow MA, Grossmann K, Sznol M, Dreno B, Bastholt L, Yang A, Rollin LM, Horak C, Hodi FS, Wolchok JD. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *The New England Journal of Medicine* 2015;373:23-34.
- 37 Robert C, Schachter J, Long GV, Arance A, Grob JJ, Mortier L, Daud A, Carlino MS, McNeil C, Lotem M, Larkin J, Lorigan P, Neyns B, Blank CU, Hamid O, Mateus C, Shapira-Frommer R, Kosh M, Zhou H, Ibrahim N, Ebbinghaus S, Ribas A. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *New England Journal of Medicine* 2015;372:2521-32.
- 38 Dummer R, Schadendorf D, Ascierto P, Larkin J, Lebbé C, Hauschild A. Integrating first-line treatment options into clinical practice: what's new in advanced melanoma? *Melanoma research* 2015;25:461-69.
- 39 Maldonado J, Fridlyand J, Patel H, Jain A, Busam K, Kageshita T, Ono T, Albertson D, Pinkel D, Bastian B. Determinants of BRAF Mutations in Primary Melanomas. *Journal of the National Cancer Institute* 2003;95:1878-90.
- 40 Curtin J, Fridlyand J, Kageshita T, Patel H, Busam K, Kutzner H, Cho K-H, Aiba S, Bröcker E-B, LeBoit P, Pinkel D, Bastian B. Distinct Sets of Genetic Alterations in Melanoma. *The New England Journal of Medicine* 2005;353:2135-47.
- 41 Greaves W, Verma S, Patel K, Davies M, Barkoh B, Galbincea J, Yao H, Lazar A, Aldape K, Medeiros J, Luthra R. Frequency and Spectrum of BRAF Mutations in a Retrospective, Single-Institution Study of 1112 Cases of Melanoma. *The Journal of Molecular Diagnostics* 2013;15:220-26.
- 42 Heinzerling L, Baiter M, Kühnapfel S, Schuler G, Keikavoussi P, Agaimy A, Kiesewetter F, Hartmann A, Schneider-Stock R. Mutation landscape in melanoma patients clinical implications of heterogeneity of BRAF mutations. *British Journal of Cancer* 2013;109:2833-41.
- 43 Forbes S, Beare D, Gunasekaran P, Leung K, Bindal N, Boutselakis H, Ding M, Bamford S, Cole C, Ward S, Kok C, Jia M, De T, Teague J, Stratton M, McDermott U, Campbell P. COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. *Nucleic Acids Research* 2015;43:D805-11.
- 44 Lovly C, Dahlman KB, Fohn L, Su Z, Dias-Santagata D, Hicks D, Hucks D, Berry E, Terry C, Duke M, Su Y, Sobolik-Delmaire T, Richmond A, Kelley M, Vnencak-Jones C, Iafrate J, Sosman J, Pao W. Routine multiplex mutational profiling of melanomas enables enrollment in genotype-driven therapeutic trials. *PloS one* 2012;7:e35309.
- 45 Heinzerling L, Kühnapfel S, Meckbach D, Baiter M, Kaempgen E, Keikavoussi P, Schuler G, Agaimy A, Bauer J, Hartmann A, Kiesewetter F, Schneider-Stock R. Rare BRAF mutations in melanoma patients: implications for molecular testing in clinical practice. *British Journal of Cancer* 2013;108:2164-71.

- 46 Mandalà M, Voit C. Targeting BRAF in melanoma: Biological and clinical challenges. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2013;87:239-55.
- 47 Wan P, Garnett M, Roe, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good V, Project CG, Jones, Marshall C, Springer C, Barford D, Marais R. Mechanism of Activation of the RAF-ERK Signaling Pathway by Oncogenic Mutations of B-RAF. *Cell* 2004;116:855-67.
- 48 Flaherty K, Puzanov I, Kim K, Ribas A, McArthur G, Sosman J, O'Dwyer P, Lee R, Grippo J, Nolop K, Chapman P. Inhibition of Mutated, Activated BRAF in Metastatic Melanoma. *The New England Journal of Medicine* 2010;363:809-19.
- 49 Tsai J, Lee J, Wang W, Zhang J, Cho H, Mamo S, Bremer R, Gillette S, Kong J, Haass N, Sproesser K, Li L, Smalley K, Fong D, Zhu Y-L, Marimuthu A, Nguyen H, Lam B, Liu J, Cheung I, Rice J, Suzuki Y, Luu C, Settachatgul C, Shellooe R, Cantwell J, Kim S-H, Schlessinger J, Zhang K, West B, Powell B, Habets G, Zhang C, Ibrahim P, Hirth P, Artis D, Herlyn M, Bollag G. Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008;105:3041-46.
- 50 Chapman P, Hauschild A, Robert C, Haanen J, Ascierto P, Larkin J, Dummer R, Garbe C, Testori A, Maio M, Hogg D, Lorigan P, Lebbe C, Jouary T, Schadendorf D, Ribas A, O'Day S, Sosman J, Kirkwood J, Eggermont A, Dreno B, Nolop K, Li J, Nelson B, Hou J, Lee R, Flaherty K, McArthur G. Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. *The New England Journal of Medicine* 2011;364:2507-16.
- 51 McArthur G, Chapman P, Robert C, Larkin J, Haanen J, Dummer R, Ribas A, Hogg D, Hamid O, Ascierto P, Garbe C, Testori A, Maio M, Lorigan P, Lebbé C, Jouary T, Schadendorf D, O'Day S, Kirkwood J, Eggermont A, Dréno B, Sosman J, Flaherty K, Yin M, Caro I, Cheng S, Trunzer K, Hauschild A. Safety and efficacy of vemurafenib in BRAF(V600E) and BRAF(V600K) mutation-positive melanoma (BRIM-3): extended follow-up of a phase 3, randomised, open-label study. *The Lancet Oncology* 2014;15:323-32.
- 52 Hauschild A, Grob J-J, Demidov L, Jouary T, Gutzmer R, Millward M, Rutkowski P, Blank C, Miller W, Kaempgen E, Martín-Algarra S, Karaszewska B, Mauch C, Chiarion-Sileni V, Martín A-M, Swann S, Haney P, Mirakhur B, Guckert M, Goodman V, Chapman P. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet* 2012;380:358-65.
- 53 Flaherty K, Infante J, Daud A, Gonzalez R, Kefford R, Sosman J, Hamid O, Schuchter L, Cebon J, Ibrahim N, Kudchadkar R, Burris H, Falchook G, Algazi A, Lewis K, Long G, Puzanov I, Lebowitz P, Singh A, Little S, Sun P, Allred A, Ouellet D, Kim K, Patel K, Weber J. Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. *The New England Journal of Medicine* 2012;367:1694-703.
- 54 Pettersson E, Lundeberg J, Ahmadian A. Generations of sequencing technologies. *Genomics* 2009;93:105-11.

- 55 Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1977;74:5463-67.
- 56 Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlén M, Nyrén P. Real-Time DNA Sequencing Using Detection of Pyrophosphate Release. *Analytical Biochemistry* 1996;242:84-89.
- 57 Ronaghi M, Uhlén M, Nyrén P. A Sequencing Method Based on Real-Time Pyrophosphate. *Science* 1998;281:363-65.
- 58 Tsiatis A, Norris-Kirby A, Rich R, Hafez M, Gocke C, Eshleman J, Murphy K. Comparison of Sanger sequencing, pyrosequencing, and melting curve analysis for the detection of KRAS mutations: diagnostic and clinical implications. *The Journal of Molecular Diagnostics* 2010;12:425-32.
- 59 Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 1986;51 Pt 1:263-73.
- 60 Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/technology (Nature Publishing Company)* 1992;10:413-17.
- 61 Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, Smith JC, Markham AF. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Research* 1989;17:2503-16.
- 62 Little S. Amplification-Refractory Mutation System (ARMS) Analysis of Point Mutations. *Current Protocols in Human Genetics* 2001;7:9.8.1–9.8.12.
- 63 Bahassi EM, Stambrook P. Next-generation sequencing technologies: breaking the sound barrier of human genetics. *Mutagenesis* 2014;29:303-10.
- 64 Rothberg J, Hinz W, Rearick T, Schultz J, Mileski W, Davey M, Leamon J, Johnson K, Milgrew M, Edwards M, Hoon J, Simons J, Marran D, Myers J, Davidson J, Branting A, Nobile J, Puc B, Light D, Clark T, Huber M, Branciforte J, Stoner I, Cawley S, Lyons M, Fu Y, Homer N, Sedova M, Miao X, Reed B, Sabina J, Feierstein E, Schorn M, Alanjary M, Dimalanta E, Dressman D, Kasinskas R, Sokolsky T, Fidanza J, Namsaraev E, McKernan K, Williams A, Roth T, Bustillo J. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature* 2011;475:348-52.
- 65 Robinson JT, Thorvaldsdottir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, Mesirov JP. Integrative genomics viewer. *Nature Biotechnology* 2011;29:24-26.
- 66 Newcombe RG. Two-sided confidence intervals for the single proportion: comparison of seven methods. *Statistics in Medicine* 1998;17:857-72.
- 67 Do H, Wong S, Li J, Dobrovic A. Reducing Sequence Artifacts in Amplicon-Based Massively Parallel Sequencing of Formalin-Fixed Paraffin-Embedded DNA by

Enzymatic Depletion of Uracil-Containing Templates. *Clinical Chemistry* 2013;59:1376-83.

68 Tan Y, Liu Y, Eu K, Ang P, Li W, Salto-Tellez M, Iacopetta B, Soong R. Detection of BRAF V600E mutation by pyrosequencing. *Pathology* 2008;40:295-98.

69 Spittle C, Ward R, Nathanson K, Gimotty P, Rappaport E, Brose M, Medina A, Letrero R, Herlyn M, Edwards R. Application of a BRAF pyrosequencing assay for mutation detection and copy number analysis in malignant melanoma. *The Journal of Molecular Diagnostics* 2007;9:464-71.

70 Jancik S, Drabek J, Berkovcova J, Xu Y, Stankova M, Klein J, Kolek V, Skarda J, Tichy T, Grygarkova I, Radzioch D, Hajdich M. A comparison of Direct sequencing, Pyrosequencing, High resolution melting analysis, TheraScreen DxS, and the K-ras StripAssay for detecting KRAS mutations in non small cell lung carcinomas. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2012;31:79.

71 Ogino S, Kawasaki T, Brahmandam M, Yan L, Cantor M, Namgyal C, Mino-Kenudson M, Lauwers G, Loda M, Fuchs C. Sensitive sequencing method for KRAS mutation detection by Pyrosequencing. *The Journal of Molecular Diagnostics* 2005;7:413-21.

72 Marchant J, Mange A, Larrieux M, Costes V, Solassol J. Comparative evaluation of the new FDA approved THxID™-BRAF test with high resolution melting and sanger sequencing. *BMC Cancer* 2014;14:519.

73 Jewell S, Srinivasan M, McCart L, Williams N, Grizzle W, LiVolsi V, MacLennan G, Sedmak D. Analysis of the molecular quality of human tissues: an experience from the Cooperative Human Tissue Network. *American Journal of Clinical Pathology* 2002;118:733-41.

74 Kokkat T, Patel M, McGarvey D, LiVolsi V, Baloch Z. Archived formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) blocks: A valuable underexploited resource for extraction of DNA, RNA, and protein. *Biopreservation and Biobanking* 2013;11:101-06.

75 Viros A, Fridlyand J, Bauer J, Lasithiotakis K, Garbe C, Pinkel D, Bastian B. Improving Melanoma Classification by Integrating Genetic and Morphologic Features. *PLoS Medicine* 2008;5(6):e120.

76 Massad C, Loya A, Taraif S, Saroufim M, Kibbi AG, Habib R, Novy M, Rauscher B, Oberkanins C, Khalifeh I. BRAF mutation status in primary and metastatic melanomas in two regions with differing potential ultraviolet radiation exposure. *Clinical and Experimental Dermatology* 2014;39:932-43.

77 Long G, Menzies A, Nagrial A, Haydu L, Hamilton A, Mann G, Hughes M, Thompson J, Scolyer R, Kefford R. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. *Journal of Clinical Oncology* 2011;29:1239-46.

- 78 Menzies A, Haydu L, Visintin L, Carlino M, Howle J, Thompson J, Kefford R, Scolyer R, Long G. Distinguishing Clinicopathologic Features of Patients with V600E and V600K BRAF-Mutant Metastatic Melanoma. *Clinical Cancer Research* 2012;18:3242-49.
- 79 Anderson W, Pfeiffer R, Tucker M, Rosenberg P. Divergent cancer pathways for early-onset and late-onset cutaneous malignant melanoma. *Cancer* 2009;115:4176-85.
- 80 Lachiewicz A, Berwick M, Wiggins C, Thomas N. Epidemiologic Support for Melanoma Heterogeneity Using the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. *Journal of Investigative Dermatology* 2007;128:243-45.
- 81 Mishima Y. Melanocytic and nevocytic malignant melanomas. Cellular and subcellular differentiation. *Cancer* 1967;20:632-49.
- 82 Weinstock M, Colditz G, Willett W, Stampfer M, Bronstein B, Martin, Speizer F. Moles and Site-Specific Risk of Nonfamilial Cutaneous Malignant Melanoma in Women. *Journal of the National Cancer Institute* 1989;81:948-52.
- 83 Whiteman D, Watt P, Purdie D, Hughes M, Hayward N, Green A. Melanocytic Nevi, Solar Keratoses, and Divergent Pathways to Cutaneous Melanoma. *Journal of the National Cancer Institute* 2003;95:806-12.
- 84 Van Raamsdonk C, Griewank K, Crosby M, Garrido M, Vemula S, Wiesner T, Obenaus A, Wackernagel W, Green G, Bouvier N, Sozen M, Baimukanova G, Roy R, Heguy A, Dolgalev I, Khanin R, Busam K, Speicher M, O'Brien J, Bastian B. Mutations in GNA11 in Uveal Melanoma. *The New England Journal of Medicine* 2010;363:2191-99.
- 85 Gear H, Williams H, Kemp E, Roberts F. BRAF Mutations in Conjunctival Melanoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2004;45:2484-88.
- 86 Griewank KG, Murali R, Schilling B, Scholz S, Sucker A, Song M, Susskind D, Grabellus F, Zimmer L, Hillen U, Steuhl KP, Schadendorf D, Westekemper H, Zeschnigk M. TERT promoter mutations in ocular melanoma distinguish between conjunctival and uveal tumours. *British Journal of Cancer* 2013;109:497-501.
- 87 Sigalotti L, Fratta E, Parisi G, Coral S, Maio M. Stability of BRAF V600E mutation in metastatic melanoma: new insights for therapeutic success? *British Journal of Cancer* 2011;105:327-28.
- 88 Edlundh-Rose E, Egyházi S, Omholt K, Månsson-Brahme E, Platz A, Hansson J, Lundeberg J. NRAS and BRAF mutations in melanoma tumours in relation to clinical characteristics: a study based on mutation screening by pyrosequencing. *Melanoma Research* 2006;16:471-78.
- 89 Pollock P, Harper U, Hansen K, Yudt L, Stark M, Robbins C, Moses T, Hostetter G, Wagner U, Kakareka J, Salem G, Pohida T, Heenan P, Duray P, Kallioniemi O, Hayward N, Trent J, Meltzer P. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nature Genetics* 2002;33:19-20.



- 90 Poynter J, Elder J, Fullen D, Nair R, Soengas M, Johnson T, Redman B, Thomas N, Gruber S. BRAF and NRAS mutations in melanoma and melanocytic nevi. *Melanoma Research* 2006;16:267-73.
- 91 Tsao H, Bevona C, Goggins W, Quinn T. The transformation rate of moles (melanocytic nevi) into cutaneous melanoma: a population-based estimate. *Archives of Dermatology* 2003;139:282-88.
- 92 Erdei E, Torres S. A new understanding in the epidemiology of melanoma. *Expert Review of Anticancer Therapy* 2010;10:1811-23.
- 93 Lipsker D, Engel F, Cribier B, Velten M, Hedelin G. Trends in melanoma epidemiology suggest three different types of melanoma. *The British Journal of Dermatology* 2007;157:338-43.
- 94 Kreitman RJ. Hairy cell leukemia-new genes, new targets. *Current Hematologic Malignancy Reports* 2013;8:184-95.
- 95 Kim KB, Cabanillas ME, Lazar AJ, Williams MD, Sanders DL, Ilagan JL, Nolop K, Lee RJ, Sherman SI. Clinical responses to vemurafenib in patients with metastatic papillary thyroid cancer harboring BRAF(V600E) mutation. *Thyroid* 2013;23:1277-83.
- 96 Prahallad A, Sun C, Huang S, Di Nicolantonio F, Salazar R, Zecchin D, Beijersbergen RL, Bardelli A, Bernards R. Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR. *Nature* 2012;483:100-3.
- 97 Lade-Keller J, Romer KM, Guldberg P, Riber-Hansen R, Hansen LL, Steiniche T, Hager H, Kristensen LS. Evaluation of BRAF mutation testing methodologies in formalin-fixed, paraffin-embedded cutaneous melanomas. *The Journal of Molecular Diagnostics* 2013;15:70-80.
- 98 Anderson S, Bloom KJ, Vallera DU, Rueschoff J, Meldrum C, Schilling R, Kovach B, Lee JR, Ochoa P, Langland R, Halait H, Lawrence HJ, Dugan MC. Multisite analytic performance studies of a real-time polymerase chain reaction assay for the detection of BRAF V600E mutations in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens of malignant melanoma. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 2012;136:1385-91.
- 99 Capper D, Preusser M, Habel A, Sahm F, Ackermann U, Schindler G, Pusch S, Mechtersheimer G, Zentgraf H, von Deimling A. Assessment of BRAF V600E mutation status by immunohistochemistry with a mutation-specific monoclonal antibody. *Acta Neuropathologica* 2011;122:11-19.
- 100 Wang XJ, Kim A, Li S. Immunohistochemical analysis using a BRAF V600E mutation specific antibody is highly sensitive and specific for the diagnosis of hairy cell leukemia. *International journal of clinical and experimental pathology* 2014;7:4323-8.
- 101 Adackapara CA, Sholl LM, Barletta JA, Hornick JL. Immunohistochemistry using the BRAF V600E mutation-specific monoclonal antibody VE1 is not a useful surrogate for genotyping in colorectal adenocarcinoma. *Histopathology* 2013;63:187-93.

102 Janku F, Claes B, Huang HJ, Falchook GS, Devogelaere B, Kockx M, Bempt IV, Reijans M, Naing A, Fu S, Piha-Paul SA, Hong DS, Holley VR, Tsimberidou AM, Stepanek VM, Patel SP, Kopetz ES, Subbiah V, Wheler JJ, Zinner RG, Karp DD, Luthra R, Roy-Chowdhuri S, Sablon E, Meric-Bernstam F, Maertens G, Kurzrock R. BRAF mutation testing with a rapid, fully integrated molecular diagnostics system. *Oncotarget* 2015;6(29):26886-94.

103 Melchior L, Grauslund M, Bellosillo B, Montagut C, Torres E, Moragón E, Micalessi I, Frans J, Noten V, Bourgain C, Vriesema R, van der Geize R, Cokelaere K, Vercooren N, Crul K, Rüdiger T, Buchmüller D, Reijans M, Jans C. Multi-center evaluation of the novel fully-automated PCR-based Idylla™ BRAF Mutation Test on formalin-fixed paraffin-embedded tissue of malignant melanoma. *Experimental and Molecular Pathology* 2015;99:485-91.

104 Colling R, Wang LM, Soilleux E. Automated PCR detection of BRAF mutations in colorectal adenocarcinoma: a diagnostic test accuracy study. *Journal of Clinical Pathology* 2015;[Epub ahead of print].

105 Marchetti A, Milella M, Felicioni L, Cappuzzo F, Irtelli L, Del Grammastro M, Sciarrotta M, Malatesta S, Nuzzo C, Finocchiaro G, Perrucci B, Carlone D, Gelibter AJ, Ceribelli A, Mezzetti A, Iacobelli S, Cognetti F, Buttitta F. Clinical implications of KRAS mutations in lung cancer patients treated with tyrosine kinase inhibitors: an important role for mutations in minor clones. *Neoplasia* 2009;11:1084-92.

106 Poulidakos PI, Zhang C, Bollag G, Shokat KM, Rosen N. RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature* 2010;464:427-30.

107 Hatzivassiliou G, Song K, Yen I, Brandhuber BJ, Anderson DJ, Alvarado R, Ludlam MJC, Stokoe D, Gloor SL, Vigers G, Morales T, Aliagas I, Liu B, Sideris S, Hoeflich KP, Jaiswal BS, Seshagiri S, Koeppen H, Belvin M, Friedman LS, Malek S. RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature* 2010;464:431-35.

108 Jang S, Atkins MB. Treatment of BRAF-Mutant Melanoma: The Role of Vemurafenib and Other Therapies. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 2013;95:24-31.

109 Long GV, Stroyakovskiy D, Gogas H, Levchenko E, de Braud F, Larkin J, Garbe C, Jouary T, Hauschild A, Grob JJ, Chiarion-Sileni V, Lebbe C, Mandala M, Millward M, Arance A, Bondarenko I, Haanen JB, Hansson J, Utikal J, Ferraresi V, Kovalenko N, Mohr P, Probachai V, Schadendorf D, Nathan P, Robert C, Ribas A, DeMarini DJ, Irani JG, Swann S, Legos JJ, Jin F, Mookerjee B, Flaherty K. Dabrafenib and trametinib versus dabrafenib and placebo for Val600 BRAF-mutant melanoma: a multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *The Lancet* 2015;386(9992):444-51.

110 John L, Cowey L. The Rapid Emergence of Novel Therapeutics in Advanced Malignant Melanoma. *Dermatology and Therapy* 2015;5:151-69.

- 111 van 't Veer LJ, Burgering BM, Versteeg R, Boot AJ, Ruiters DJ, Osanto S, Schrier PI, Bos JL. N-ras mutations in human cutaneous melanoma from sun-exposed body sites. *Molecular and Cellular Biology* 1989;9:3114-6.
- 112 Albino AP, Nanus DM, Mentle IR, Cordon-Cardo C, McNutt NS, Bressler J, Andreeff M. Analysis of ras oncogenes in malignant melanoma and precursor lesions: correlation of point mutations with differentiation phenotype. *Oncogene* 1989;4:1363-74.
- 113 Ji Z, Flaherty KT, Tsao H. Targeting the RAS pathway in melanoma. *Trends in Molecular Medicine* 2012;18:27-35.
- 114 Curtin J, Busam K, Pinkel D, Bastian B. Somatic Activation of KIT in Distinct Subtypes of Melanoma. *Journal of Clinical Oncology* 2006;24:4340-46.
- 115 Hodi S, Corless C, Giobbie-Hurder A, Fletcher J, Zhu M, Marino-Enriquez A, Friedlander P, Gonzalez R, Weber J, Gajewski T, O'Day S, Kim K, Lawrence D, Flaherty K, Luke J, Collichio F, Ernstoff M, Heinrich M, Beadling C, Zukotynski K, Yap J, Van den Abbeele A, Demetri G, Fisher D. Imatinib for Melanomas Harboring Mutationally Activated or Amplified KIT Arising on Mucosal, Acral, and Chronically Sun-Damaged Skin. *Journal of Clinical Oncology* 2013;31:3182-90.
- 116 Guo J, Si L, Kong Y, Flaherty K, Xu X, Zhu Y, Corless C, Li L, Li H, Sheng X, Cui C, Chi Z, Li S, Han M, Mao L, Lin X, Du N, Zhang X, Li J, Wang B, Qin S. Phase II, Open-Label, Single-Arm Trial of Imatinib Mesylate in Patients With Metastatic Melanoma Harboring c-Kit Mutation or Amplification. *Journal of Clinical Oncology* 2011;29:2904-09.
- 117 Carvajal R, Antonescu C, Wolchok J, Chapman P, Roman R-A, Teitcher J, Panageas K, Busam K, Chmielowski B, Lutzky J, Pavlick A, Fusco A, Cane L, Takebe N, Vemula S, Bouvier N, Bastian B, Schwartz G. KIT as a therapeutic target in metastatic melanoma. *JAMA* 2011;305:2327-34.
- 118 Mandalà M, Massi D. Tissue prognostic biomarkers in primary cutaneous melanoma. *Virchows Archiv* 2014;464:265-81.
- 119 Garraway L, Widlund H, Rubin M, Getz G, Berger A, Ramaswamy S, Beroukhi R, Milner D, Granter S, Du J, Lee C, Wagner S, Li C, Golub T, Rimm D, Meyerson M, Fisher D, Sellers W. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature* 2005;436:117-22.
- 120 Majewski J, Schwartzenuber J, Lalonde E, Montpetit A, Jabado N. What can exome sequencing do for you? *Journal of Medical Genetics* 2011;48:580-89.
- 121 Wang Z, Liu X, Yang B-Z, Gelernter J. The role and challenges of exome sequencing in studies of human diseases. *Frontiers in Genetics* 2013;4.
- 122 Check Hayden E. Technology: The \$1,000 genome. *Nature* 2014;507:294-95.

123 Check Hayden E. Is the \$1,000 genome for real? Nature 2014;Verfügbar über: <http://www.nature.com/news/is-the-1-000-genome-for-real-1.14530>, abgerufen am 02/02/2015.

124 Metzker M. Sequencing technologies - the next generation. Nature Reviews Genetics 2010;11:31-46.

125 Xuan J, Yu Y, Qing T, Guo L, Shi L. Next-generation sequencing in the clinic: Promises and challenges. Cancer Letters 2013;340:284-95.

126 van den Kieboom CH, Ferwerda G, de Baere I, Vermeiren H, de Groot R, Rossau R, de Jonge MI. Assessment of a molecular diagnostic platform for integrated isolation and quantification of mRNA in whole blood. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases 2015;34:2209-12.

## **Lebenslauf**

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

## Publikationsliste

1. Ana-Iris Schiefer\*, Laura Parlow\*, Lisa Gabler, Ildiko Mesteri, Oskar Koperek, Andreas von Deimling, Berthold Streubel, Matthias Preusser, Annika Lehmann, Udo Kellner, Patrick Pauwels, Suzan Lambin, Manfred Dietel, Michael Hummel, Frederick Klauschen, Peter Birner, Markus Möbs. Multicenter evaluation of a novel, automated rapid detection system of BRAF status in formalin-fixed paraffin embedded tissues. The Journal of Molecular Diagnostics, akzeptiertes Manuskript

\*A-I. Schiefer und L. Parlow trugen in gleichem Maße zu dieser Publikation bei (Co-Erstautoren).

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Laura Kristin Parlow, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Vergleich von zwei Methoden zur Detektion aktivierender BRAF V600-Mutationen im malignen Melanom“ 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 beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

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

Datum

Unterschrift

## **Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen**

Laura Kristin Parlow hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Ana-Iris Schiefer\*, Laura Parlow\*, Lisa Gabler, Ildiko Mesteri, Oskar Koperek, Andreas von Deimling, Berthold Streubel, Matthias Preusser, Annika Lehmann, Udo Kellner, Patrick Pauwels, Suzan Lambin, Manfred Dietel, Michael Hummel, Frederick Klauschen, Peter Birner, Markus Möbs. Multicenter evaluation of a novel, automated rapid detection system of BRAF status in formalin-fixed paraffin embedded tissues. The Journal of Molecular Diagnostics, akzeptiertes Manuskript

\*A-I. Schiefer und L. Parlow trugen in gleichem Maße zu dieser Publikation bei (Co-Erstautoren).

Beitrag im Einzelnen:

Selektion der Fälle mit malignem Melanom aus Datenbank, mikroskopische Durchsicht sowie Annotation der Tumorareale, experimentelle Durchführung von DNA-Isolierung, Pyrosequenzierung, Idylla-Methode und Next Generation Sequencing (Ion Torrent PGM), Datenauswertung, Mitarbeit bei der Manuskripterstellung

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin



## **Danksagung**

Ich danke PD Dr. Frederick Klauschen und Dr. Markus Möbs herzlich dafür, dass sie mich bei dieser Arbeit begleiteten, immer für Probleme erreichbar waren, auf alle Fragen eine Antwort wussten und mir nicht nur wissenschaftliche Orientierung und Motivation gaben und geben.

Dr. Annika Lehmann, Dr. Denise Treue und dem gesamten Labor-Team der Charité Campi Mitte und Benjamin Franklin danke ich für ihre große Unterstützung und Hilfe.

Dr. Kemal Yildiz danke ich für seine Korrekturen und Anregungen.

Außerdem danke ich meiner Familie, vor allem meinen Eltern, für unzählige Korrekturen und für ihre Unterstützung, Inspiration und die Ermöglichung meines Studiums.