Institut für Pathologie

Universität Ulm

Leiter: Prof. Dr. med. Peter Möller

BRAF V600 Mutationen in Spindelzelligen und Desmoplastischen Melanomen

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

von

Philipp Keil

geboren in Frankfurt am Main

Ulm 2017

Amtierender Dekan: **Prof. Dr. rer. nat. Thomas Wirth**

1. Berichterstatter: **Prof. Dr. med. Peter Möller**

2. Berichterstatter: **Prof. Dr. med. Patrick Schuler**

Tag der Promotion: **26.10.2017**

Meinem Großvater gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS i

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS iii

1 EINLEITUNG 1

2 MATERIAL UND METHODEN 3

2.1 Material 3

2.2 Auswahl des Patientenkollektivs 5

2.3 Morphologische Kriterien 6

2.4 Methoden 6

2.4.1 Herstellen von Gewebslysat 6

2.4.2 DNA Extraktion 7

2.4.3 PCR 8

2.4.4 Agarose-Gelelektrophorese 9

2.4.5 Pyrosequenzierung 10

2.4.6 Konventionelle Sequenzierung nach Sanger 11

2.5 Literatur- und Datenbankrecherche 13

2.6 Statistische Auswertung 13

3 ERGEBNISSE 14

3.1 Patientenkollektiv 14

3.2 Genotypisierung 14

3.3 Klinisch-pathologische Merkmale 14

3.4 Datenbankrecherche 15

3.5 Literaturrecherche 15

4 DISKUSSION 18

5 ZUSAMMENFASSUNG 21

6 LITERATURVERZEICHNIS 23

DANKSAGUNG 26

CURRICULUM VITAE 27

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Erläuterung
A	Adenosin
AJCC	American Joint Committee on Cancer
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BRAF	v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B
COSMIC	Catalogue of Somatic Mutations in Cancer
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleosid-Triphosphat
E	*BRAF* V600E Mutation
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al	und andere
FFPE	Formalin-fixiert, in Paraffin-eingebettet
G	Guanosin
H & E	Hämatoxylin und Eosin Färbungen
HMB45	human melanoma black 45 monoclonal Antikörper
K	*BRAF* V600K Mutation
mut	mutiert
N, n	Anzahl der Fälle
p	*p*-Wert (=Signifikanzwert)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase chain reaction
PPi	Pyrophosphat
Rpm	revolutions per minute
rTaq	rekombinante Thermus aquaticus (thermostabile) DNA Polymerase
SDM	Spindelzell- und desmoplastisches Melanom
SOP	Standard Operating Procedure
T	Thymidin
TAE	Pufferlösung aus Tris-Acetat-EDTA
TEN	Pufferlösung aus Tris, Ethylendiamintetraacetat und Natriumchlorid

Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
V600E	Aminosäuresubstitution an Stelle 600 des *BRAF* Gens von Valin (V) zu Glutaminsäure (E)
V600K	Aminosäuresubstitution an Stelle 600 des *BRAF* Gens von Valin (V) zu Lysin (K)
vs.	versus
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

1 EINLEITUNG

Spindelzellige und desmoplastische Melanome (SDM) sind Subtypen des Malignen Melanoms, die sich in klinischen, histologischen als auch prognostischen Aspekten von diesem unterscheiden.
SDM sind vorwiegend in der Hals- und Nacken-Region vorzufinden (Lens et al. 2005). Sie präsentieren sich im Allgemeinen pigmentfrei und / oder weisen bei Inspektion einen narbenähnlichen Charakter auf. Unter dem Mikroskop zeigen sich häufig spindelartige, maligne entartete Zellen. Dieses klinische Erscheinungsbild erschwert eine korrekte Diagnosestellung erheblich. Aus diesem Grund werden SDM zumeist erst in fortgeschrittenen Stadien, einhergehend mit der Infiltration von tiefer liegenden Hautschichten, erkannt (Lens et al. 2005; McCarthy et al. 2004; McCarthy et al. 2006). Differentialdiagnostisch werden gehäuft andere relevante nicht-melanozytischen Entitäten in Betracht gezogen. Hierzu zählen u.a. mesenchymale und neuronale Tumoren. Zur Validierung der Diagnose können spezifische Immunphänotypen, wie z.B. HBM45-negativ, herangezogen werden (Longacre et al. 1996; McCarthy et al. 2006). In den letzten Jahrzehnten wurden mehrere morphologische Klassifikationen entwickelt, um die Diagnosestellung von SDM zu erleichtern (Longacre et al. 1996; McCarthy et al. 2006). Hierbei konnten sich nachdrücklich die diagnostischen Begriffe ‚desomplastisches Melanom' und/oder ‚desmoplastisches neurotropes Melanom' etablieren (McCarthy et al. 2006). Als neurotrop bezeichnet man solche desmoplastischen Melanome, welche entlang präformierter Strukturen, wie z.B. Hautnerven, wachsen. Histologisch betrachtet werden beim desmoplastischen Melanom maligne spindelzellartige Melanozyten durch Kollagenfaserbündel voneinander separiert (McCarthy et al. 2006). Therapeutisch strebt man stets die vollständige chirurgische Resektion des Tumorgewebes an. Eine R0-Resektion erweist sich auf Grund des bereits beschriebenen spezifischen Wachstums als besonders schwierig. Entsprechend kommt es im Verlauf immer wieder zu lokalen Rezidiven, welche im Allgemeinen einer erneuten chirurgischen Intervention bedürfen (Lens et al. 2005; McCarthy et al. 2004; McCarthy et al. 2006).

In einer Studie wurde berichtet, dass Lymphknotenmetastasen im Verlauf der Erkrankung an SDM seltener auftreten als dies bei Patienten mit herkömmlichen Melanomen der Fall sei (Lens et al. 2005). Außerdem wird bei diesem Vergleich die Meinung vertreten, dass SDM mit einem lokal aggressiveren Wachstum einher gehen (Livestro et al. 2005). Für

den einzelnen Patienten konnte man allerdings im direkten Vergleich zu an konventionellen Melanomtypen Erkrankten trotz der beschriebenen Umstände kein besseres klinisches Outcome feststellen (Lens et al. 2005; Livestro et al. 2005).

Das B-raf Protein ist eine entscheidende Komponente der mitogen-aktivierten Proteinkinase-Kaskade. Diese stellt einen Signaltransduktionsweg dar, welchem u.a. die Aufgabe obliegt Zellwachstum, Zelldifferenzierung wie auch die Apoptose zu regulieren. Mutationen im *BRAF* Gen begünstigen die Zellproliferation sowie die Aktivierung weiterer Kinasen entlang der Kaskade in einer Vielzahl von malignen Tumoren. Das okogenetische Potential von *BRAF* wurde bereits umfangreicht untersucht. So zeigte sich mitunter, dass aktivierte Mutationen auf dem Codon 600 des *BRAF* Gens für ~95 % aller somatischen Varianten verantwortlich sind. Im Fall des malignen Melanoms wurden in ~40-60 % der Fälle *BRAF* Mutationen beobachtet (Pacheco et al. 2011). *BRAF*-Inhibitoren der zweiten Generation (Pacheco et al. 2011) zeigten eindrucksvolle Ergebnisse in der Therapie maligner Melanome mit nachgewiesenen *BRAF* Mutationen. (Pacheco et al. 2011). Zudem wurde das molekulare Profil der meisten Melanom-Subtypen bereits determiniert (z.B. lenitigo-maligna 40-80%, superfiziell-spreitend 59-78%, akral 12-23%, nodulär 43-68%, mukosal 3-11%, uveal <1%) (Pacheco et al. 2011). Über den Anteil an Mutationen im *BRAF* Gen (Mutationsfrequenz) in SDM ist bis heute jedoch noch wenig bekannt. Die meisten der bis dato veröffentlichen Daten stammen überwiegend aus kleineren Fallserien mit variablen Ergebnissen (Davison et al. 2005; Goel et al. 2006).

In der im Folgenden beschriebenen Studie wurde die Mutationsfrequenz von *BRAF* V600 Mutationen in einer großen Kohorte von SDM untersucht. Die präsentierten Ergebnisse argumentieren für die molekular-genetische Profilbildung für diese spezifischen Melanom Subtypen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

Die Tabellen 1 bis 5 führen die in dieser Studie verwendeten Chemikalien, Pufferlösungen, Laborkits, Primer, sowie Geräte und Arbeitsmaterialien auf.

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien

Agarose High Resolution	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure (100%)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Ethanol (100%)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Xylol	Apotheke Universitätsklinikum Ulm, Deutschland

Tabelle 2: Verwendete Pufferlösungen und Laborkits

GenomeLab DTCS Quick Start Kit
• Quick Start Mix 880 µL
  o dATP, dCTP, dTTP, dITP
  o ddUTP, ddGTP, ddCTP, ddATP (WellRED label)
• Tris-HCl, MgCl2, reaction buffer - pH 8.9
• Thermo Sequenase DNA Polymerase I
• Pyrophosphatase
• (-) 47 Sequencing Primer 240 µL
• pUC18 Control Template 20 µL
• Glycogen 110 µL
• Mineral oil 5 ml
• Sample Loading Solution (SLS) 6 ml
	Beckman Coulter, Brea, CA, USA

PCR-Reagenzien • rekombinante Thermus aquaticus (rTaq)	

DNA Polymerase	
• DNA Polymerisationsmix mit Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTP)	
PeqGOLD Gel Extraction Kit	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
• PerfectBind DNA Colums	
• Binding Buffer	
• CG Wash Buffer	
• Elution Buffer	
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
PyroMark Q24 System	Quaigen, Hilden, Deutschland
• PyroMark Binding Buffer	
• Pyromark Annealing Buffer	
• PyroMark Gold Q24 Reagents	
• PyroMark Q24 Cartridge	
• Denaturation Solution	
QIAamp DNA Mini Kit	Quaigen, Hilden, Deutschland
• Buffer AE, AW1, AW2, AL	
• QIAamp Mini Spin Columns	
• Proteinase K	
Streptavidin Sepharose Beads	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
TAE-Puffer	(96,8 g Tris, 22,8 ml Essigsäure, 7,44 g EDTA)
TEN-Puffer	(Aqua destillata, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0,1 M NaCl)

Tabelle 3: Verwendete *BRAF*-Primer

vorwärts Primer	5'-biotin-TGCTTGCTCTGATAGGAAAATG-3'
rückwärts Primer	5'-AGCATCTCAGGGCCAAAAAT-3'
Sequenzier-Primer	5'-GACCCACTCCATCGAG-3'

Die in dieser Studie verwendeten BRAF-Primer stammen aus dem Bestand der Firma Biomers, Ulm, Deutschland. Dabei wurden alle Primer mit einer Konzentration von 100 pmol/µl verwendet und vorab bei einer Temperatur von -20 °C aufbewahrt.

Tabelle 4: Verwendete Geräte

Elektrophoresekammer	AGS GmbH, Heidelberg, Deutschland
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr, Biberach, Deutschland
Gefrierschrank -80 °C	Heraeus, Hanau
Heizblock, Typ 2099	Liebisch, Bielefeld, Deutschland
Kapillar-Sequenzierer, GenomeLab GeXp	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Kühlkombination Liebherr Premium	Liebherr, Bulle, Schweiz
Mikropipetten 2, 5, 10, 100, 200, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikrowelle, M1719N	Samsung Electronics, Seoul, Süd-Korea
PCR-Thermocycler, Primus 96 Plus	MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland
Pyrosequenzierer, PyroMark Q24	Quiagen, Hilden, Deutschland
Spannungsgeber EPS 301	Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK
Spektometer, Ultrospec 2100 pro	Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK
Thermomixer, 5436	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermomixer, Comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
UV-Kammer, Alphaimager EP	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Vortexer, VTX 3000L Uzusio	LMS, Tokio, Japan
Waage, EMB 1200-1	Kern, Balingen, Deutschland
Zentrifuge, Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge, Centrifuge comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Tabelle 5: Verwendete Arbeitsmaterialien

Glaskolben	VWR, Radnor, PA, USA
Handschuhe, Sempercare	Sempermed, Wien, Österreich
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Skalpell-Klingen	Braun Aesculap, Tuttlingen, Deutschland

2.2 Auswahl des Patientenkollektivs

Insgesamt umfasste die Studienkohorte 50 Fälle mit der Diagnose SDM. 18 dieser Fälle wurden mittels der elektronischen Datenbank der Universität Ulm aus dem Archiv des

Instituts für Pathologie zusammengestellt. Als Zeitfenster wurde der Abschnitt von 1984 bis 2013 festgelegt.
20 weitere Fälle wurden vom Department of Pathology and Immunology der Washington University School of Medicine, St. Louis, USA, und 10 Fälle vom Department of Dermatopathology des Columbia University Medical Centers, New York City, USA, zur Verfügung gestellt.

Die Diagnose ‚SDM' wurde zunächst für jeden einzelnen Fall lichtmikroskopisch gesichert. Hierzu wurden Schnitte aus Formalin-fixiertem und in Paraffin-eingebettetem (FFPE) Tumorgewebe hergestellt. Zugleich wurden geeignete Tumorregionen für weitere Analyseschritte aus den H&E gefärbten Schnittpräparaten ausgewählt und markiert. Das Ethikkomitee der Universität Ulm bestätigte diese retroperspektive anonymisierte Studie.

2.3 Morphologische Kriterien

Die Diagnosestellung ‚SDM' erfolgte anhand von etablierten histopathologischen Kriterien (McCarthy et al. 2006). Diese Kriterien beinhalten u.a. das Vorhandensein von spindelförmigen/fusiformen Melanozyten, die invasiv proliferierend wachsen und zumeist durch Kollagenfaserbündel voneinander separiert werden (McCarthy et al. 2006). Die Pigmentierung und die Neurotropie der Tumore wurden für jeden Fall vermerkt. Der Grad an Desmoplasie wurde quantifiziert, um folgende SDM-Subtypen zu definieren: ‚rein' (≥90 % Desmoplasie-Anteil), ‚gemischt' (≥10 – 90 %), oder ‚spindelartig' (<10 %) (Coupelon et al. 2012; Longacre et al. 1996; McCarthy et al. 2006).

2.4 Methoden

2.4.1 Herstellen von Gewebslysat

Um Tumormaterial aus den ausgewählten Fällen zu gewinnen, wurde FFPE Gewebe entweder von Leerschnitten mikrodisseziert oder aus einem Paraffinblock ausgestanzt. Die Mikrodissektion erfolgte mittels eines Skalpells. Als Gewebsstanze diente eine dermale 2 mm Stanzbiopsienadel. Das so gewonnene Material wurde jeweils in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß verbracht. Im nächsten Schritt wurde das Tumorgewebe mittels Xylol und Ethanol entparaffiniert.

Die Entparaffinierung erfolgte in allen Fällen nach folgendem Protokoll:

- Dreimaliges Waschen in je 1000 µl Xylol für 1 Minute
- Das Reaktionsgefäß bei 13000 rpm für 1 Minute zentrifugieren

- Im Anschluss das überständige Xylol mit einer Pipette entfernen und für den nächsten Waschgang erneuert 1000 µl Xylol hinzugeben
- Anschließend dreimaliges Waschen in Ethanol nach selbigem Prinzip
- Das nun entparaffinierte Tumorgewebe in den Reaktionsgefäßen in einem mit 62 °C vortemperierten Heizblock für 5-10 min trocknen

Im Anschluss erfolgte die Herstellung von Lysat nach folgendem Protokoll:

- Zugeben von 180 µl TEN-Pufferlösung und 20 µl Proteinkinase K (20 µg/ml) zum entparaffinierten Tumorgewebe
- Dieses bei 62 °C über Nacht in einem vortemperiertem Heizblock bebrüten
- Die Proteinkinase K bei 94 °C am nächsten Tag für 1 h denaturieren

2.4.2 DNA Extraktion

Zur anschließenden DNA Extraktion wurde das QIAamp DNA mini Kit verwendet. Das im Folgenden beschriebene Protokoll entspricht den Angaben des Herstellers Quiagen, Hilden, Deutschland:

- Das Lysat auf Raumtemperatur bringen und kurz bei 8000 rpm zentrifugieren
- Zum Lysat 200 µl Buffer AL und 200 µl Ethanol hinzugeben, mit einem Vortexmischer durchmengen und erneut kurz bei 8000 rpm zentrifugieren
- Das Gemisch in QIAamp Mini spin columns + Tube überführen und bei 8000 rpm für 1 min zentrifugieren
- Die Membran des QIAamp Mini spin column bindet die DNA
- Den Rückstand des Waschpuffers im Tube stets verwerfen und das QIAamp Mini spin column je Waschschritt in einen neuen Tube überführen
- Zwei weitere Waschschritte mit je 500 µl AW1 und AW2 Waschpuffer und anschließendem Zentrifugieren bei 8000 rpm
- Trocknen der Membran durch dreiminütiges Zentrifugieren bei 13000 rpm
- Zur Elution der DNA von der Membran: QIAamp Mini spin column in 1,5 ml Reaktionsgefäß verbringen und 25 µl Buffer ATE mittig auf die Membran pipettieren
- Inkubation bei Raumtemperatur für 1 min und anschließend 1 min bei 14000 rpm zentrifugieren
- Der Durchfluss im Reaktionsgefäß ergibt im Durchschnitt ca. 15 - 20 µl extrahierte DNA

- Alle aufgeführten Schritte erfolgen bei Raumtemperatur
- Lagern der neu gewonnen DNA-Proben bei -20 °C

2.4.3 PCR

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) werden die DNA-Abschnitte von Interesse zwischen zwei Oligonukleotid-Primern, welche jeweils gegenläufig an komplementäre DNA-Abschnitte binden, exponentiell vervielfältigt. Eine solche Amplifikation erfolgt bei der PCR stets in drei sich wiederholenden Schritten:

1. Hitzedenaturierung der doppelsträngigen DNA
2. Abkühlen des Reaktionsansatzes auf eine Annealing-Temperatur zum Binden der Primer an ihre jeweils korrespondierenden DNA-Abschnitte
3. Elongation durch eine hitzebeständige DNA-Polymerase, die mit Hilfe der beigefügten dNTPs komplementäre DNA-Stränge synthetisiert

Durch erneutes Erhitzen des Reaktionsansatzes werden der Synthesevorgang abgebrochen und die neu-synthetisierten Doppelstränge denaturiert. So ergibt sich eine Kettenreaktion, die die exponentielle Vervielfältigung der benötigten DNA-Abschnitte nach sich zieht. Tabelle 6 beschreibt im Detail die verwendeten Mengenverhältnisse des für die PCR verwendeten Reaktionsansatzes. Der Reaktionsansatz wurde nach Herstellung kurz durchmischt und zentrifugiert. Zu den zu untersuchenden Proben kamen stets eine negativ Probe und eine positiv Probe im Sinne der Erfolgskontrolle hinzu. Die PCR Maschine wurde auf 95 °C vorgeheizt und mit 20 µl Reaktionsansatz je Probe bestückt. In Tabelle 7 wird der Ablauf des verwendeten PCR-Protokolls im Detail aufgeführt. Dieses Protokoll für die Amplifikation von *BRAF* entspricht den Standardarbeitsanweisungen (SOP) des Instituts für Pathologie der Universität Ulm.

Tabelle 6: PCR-Reagenzien mit Mengenverhältnissen

Reagenz	Menge (µl)
Mastermix	18
Aqua destillata	15,4
10-fach PCR-Puffer	2
dNTP	0,2
Primer vorwärts	0,1
Primer rückwärts	0,1

rTaq DNA Polymerase	0,2
DNA	2

Die einzelnen Schritte zur Herstellung des Reaktionsansatzes wurden alle auf Eis durchgeführt.

Tabelle 7: PCR-Programm Protokoll

Zyklus	**Zyklus Eigenschaft**
Start (vorgeheizt auf 95 °C)	[95 °C - 5 min]
2x	[95 °C - 30 sec; 62 °C - 30 sec; 72 °C - 30 sec]
2x	[95 °C - 30 sec; 60 °C - 30 sec; 72 °C - 30 sec]
2x	[95 °C - 30 sec; 58 °C - 30 sec; 72 °C - 30 sec]
35x	[95 °C - 30 sec; 58 °C - 30 sec; 72 °C - 30 sec]
1x	[72 °C - 10 min]
Ende	

2.4.4 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese können angefärbte DNA-Abschnitte des PCR-Produkts der Größe nach voneinander getrennt werden. Dabei wird ein elektrisches Feld angelegt, in dem die negativ geladenen DNA-Abschnitte, welche zuvor in eine Geltasche eingebracht wurden, in Richtung Anode wandern können. Größere Fragmente bleiben im Vergleich schon zu Beginn des Wanderns in den Gelzwischenräumen hängen - kleinere DNA-Abschnitte entsprechend später. Wie groß ein Fragment schlussendlich ist, kann anhand einer DNA-Leiter, die ebenfalls in einer der Geltaschen eingebracht wird, abgelesen werden. Die DNA-Leiter setzt sich aus unterschiedlichen DNA-Fragmenten definierter Größen zusammen (100-2000 bp). Nach 90 Minuten, bei einer angelegten Stromspannung von 120 V, können unter einer UV-Bank die zuvor angefärbten DNA-Fragmente sichtbar gemacht werden und mit der DNA-Leiter verglichen werden.

In diesem Setting wurde die Gelelektrophorese zur Erfolgskontrolle des PCR-Verfahrens verwendet. Die verwendeten Mengenverhältnisse zur Herstellung eines Gelkissens sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Gelkissenzusammensetzung

Reagenz	Menge (µl)
Agarose	2 g
TAE Puffer	100 ml
Aqua destillata	nach Bedarf
Ethidiumbromid (50 mg/ml)	ein Tropfen

2.4.5 Pyrosequenzierung

Zur Detektion von Mutationen innerhalb der "Hotspot"-Region rund um das Codon 600 des *BRAF* Gens wurde die Pyrosequenzierung verwendet. Diese wurde mit Hilfe des PyroMark Q24 Systems der Firma Quiagen (Hilden, Deutschland) durchgeführt. Bei PyroMark Q24 handelt es sich um ein vollautomatisiertes Sequenzierungssystem.

Allgemein misst man bei der Pyrosequenzierung die enzymatische Aktivität einer DNA-Polymerase über den Anbau von Desoxyribonukleosid-Triphosphaten (dNTPs) an die zu sequenzierende DNA. Dabei lassen sich über ein im Folgenden beschriebenes Enzymsystem Lichtreaktionen messen und graphisch darstellen. Somit kann die Sequenz eines DNA Abschnitts ermitteln werden.

Bevor jedoch eine Pyrosequenzierung durchgeführt werden kann, benötigt man ein aufgereinigtes PCR-Produkt. Dieses besteht aus Einzelstrang-DNA-Abschnitten. Zur Aufreinigung verwendet man im Rahmen der PCR-Methode einen am 5'-Ende biotinylierten Primer. Durch die Biotinylierung ist es möglich einen Anteil des PCR-Produkts zu markieren und diesen Anteil im Anschluss durch Zugabe von Streptavidin-beschichteten Sepharose-Partikeln an diese zu binden. Das PCR-Produkt wird daraufhin mehrfach mittels Ethanol sowie mit einer Lösung zur Denaturierung der Doppelstrang-DNA gewaschen. Hierdurch lassen sich die gebundenen Biotin-markierten DNA-Einzelstränge vom Rest des PCR-Produkts trennen. Den separierten biotinylierten DNA-Einzelsträngen werden nun Sequenzierungsprimer beigefügt. Es folgt ein kurzzeitiges Erhitzen auf 80 °C. Während des Abkühlens kommt es zur Hybridisierung der Primer. Vor

der eigentlichen Pyrosequenzierung werden dem Gemisch folgende Enzyme beigefügt: Adenosin-Trisphosphat-(ATP)-Sulfurylase, DNA-Polymerase, Luziferase, Apyrase. An Substraten benötigt man: Adenosin-5'-Phosphosulfat und Luziferin. Nun kann die Pyrosequenzierung gestartet werden. Dieser Vorgang läuft folgendermaßen ab:

- Zugabe der vier dNTPs in vorgegebener Reihenfolge. (Die in diesem Versuch verwendete Reihenfolge wurde an die Basensequenz des *BRAF* Mutations-Hotspots c.1798 - c.1802 angepasst.)
- Sobald ein dNTP zur komplementären Base passt, kommt es durch die DNA-Polymerase zum Einbau.
- Beim Einbau spaltet sich Pyrophosphat (PPi) in äquimolarer Menge ab.
- Die ATP-Sulfurylase stellt aus PPi und Adenosin-5'-Phophosulfat ATP her
- Die Luziferase verwendet ATP als Energielieferant und wandelt Luziferin in Oxyluziferin um.
- Dabei entsteht Licht in entsprechend proportionaler Menge zum zuvor abgespaltenen PPi.
- Das Licht kann mittels einer Kamera erfasst und in Form eines Pyrogramm-Schaubildes visualisiert werden.
- Das Schaubild zeigt in Reihe quantitativ den Einbau von dNTPs an den zu sequenzierenden DNA Abschnitt.
- Überschüssiges ATP und nicht eingebaute dNTPs werden durch die Apyrase enzymatisch für den jeweilig nächsten Sequenzierungsschritt entfernt.

Die Pyrosequenzierung in dieser Studie erfolgte mit Hilfe etablierter Protokolle (Lennerz et al. 2012).

Die Ergebnisse der Pyrosequenzierung wurden im Anschluss manuell anhand der einzelnen Pyrogramme auf Mutationen durchgesehen. Im Falle einer Mutation wurde stets mindestens eine weitere Person zur Bestätigung der Diagnose hinzugezogen. Betrug die relative Lichtintensität eines Signals ≤ 5%, wurde der Fall als Wildtyp definiert.

2.4.6 Konventionelle Sequenzierung nach Sanger

Zur Validierung der diagnostizierten Mutationen wurde die konventionelle Sequenzierung nach Sanger verwendet. Die Sanger Sequenzierung bedient sich eines ähnlichen Ansatzes, wie die Pyrosequenzierung. Als Ausgang dient das PCR Produkt des zu untersuchenden

DNA Abschnitts. Die Grundlage der Sequenzierung nach Sager stellt eine Kettenabbruchreaktion durch den Einbau von Didesoxynukleosid-Trisphosphaten (ddNTPs) dar. Im Gegensatz zur PCR wird nur ein Primer verwendet, sodass ein komplementärer DNA Abschnitt nur in eine Richtung synthetisiert werden kann. Im Reaktionsansatz konkurriert der Einbau von dNTPs durch eine DNA-Polymerase mit dem Einbau von Fluoreszenz-Farbstoff-markierten ddNTPs. Durch die Kettenabbruchreaktionen entstehen Fragmente unterschiedlicher Längen. Anhand der verschiedenen Farbmarkierungen lässt sich das zuletzt eingebaute Nukleotid eines Fragments detektieren. Sortiert man in Folge die synthetisierten Fragmente der Größe nach, so erhält man die komplementäre Sequenz des DNA-Abschnitts von Interesse. Abweichungen von der Sequenz, im Sinne von Mutationen, können somit frei gelegt werden.

Tabelle 9 und 10 zeigen die verwendeten Reagenzienmengen sowie das Sequenzierungsprogramm im vorgewärmten PCR-Apparat. Im Anschluss an den Sequenzierungsvorgang erfolgte die vollautomatisierte Auftrennung sowie die Analyse der Nukleotidabfolge durch einen GenomeLab GeXP Kapillar-Sequenzierer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA)

Die Sequenzierungsergebnisse der Sanger Methode wurden mit Hilfe der Software CodonCode Aligner (CodonCode Corporation, Centerville, MA, USA) eingelesen und ausgewertet. Als Referenz zum Basenabgleich diente die aktuelle humane Genom-Referenzsequenz.

Tabelle 9: Reagenzien Sequenzierung nach Sanger

Reagenz	**Menge (µl)**
GenomeLab DTCS Quick Start Kit	4
Aqua	4
Sequenzprimer (5 pmol/µl)	1
Amplifikat	1

Tabelle 10: Sequenzierung nach Sanger Protokoll

Zyklus	**Zyklus Eigenschaft**
Start	[95 °C, 5 min]
30x	[96 °C, 20 s; 50 °C, 20 s; 60 °C, 4 min]

Ende

2.5 Literatur- und Datenbankrecherche

Die beiden elektronische Datenbanken Medline und Scopus dienten der Recherche nach Studien zum Thema *BRAF* Mutationsanalyse. Dabei wurde der Zeitraum von Januar 1976 bis Juli 2016 festgelegt und im Folgenden nach entsprechenden Studien durchsucht. Die verwendeten Suchwörter waren *desmopl**, *neurotr** und *spindle* jeweils in Kombination mit *melanoma*. Um weitere Studien zum genannten Thema zu identifizieren erfolgte die Durchsicht der Referenzlisten ausgewählter wissenschaftlicher Artikel. Für jede Studie wurden der histologische Melanom Subtyp, der *BRAF* Mutationssubtyp (z.B. V600E, V600K) und die Anzahl der mutierten und insgesamt getesteten Fälle notiert. Mit Hilfe der COSMIC Datenbank (http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/, letzte Durchsicht Juli 2016) konnten die Mutationssubtypen in SDM und die Mutationssubtypen in konventionellen malignen Melanomen miteinander verglichen werden.

2.6 Statistische Auswertung

Zur Analyse statistisch signifikanter Unterschiede wurde der t-Test nach Student (Alter) und der exakte Test nach Fisher (Geschlecht, anatomische Lage, Pigmentierung und histologischer Subtyp) angewandt. Die ermittelten Mutationsfrequenzen wurden ebenfalls unter Verwendung des exakten Tests nach Fisher (two-tailed) und des Chi-Quadrat Tests (mit Yates Korrektur) verglichen. Hierzu wurde die online Rechensoftware von GraphPad QuickClacs verwendet (http://graphpad.com/quickcalcs/contingency1.cfm). Die Datenanalyse erfolgte unter Zuhilfenahme von Prism 5.0b (GraphPad Software, San Diego, CA).

3 ERGEBNISSE

3.1 Patientenkollektiv

Die demographischen und klinisch-pathologischen Merkmale der insgesamt 50 untersuchten Fälle wurden in Tabelle 11 zusammengefasst. Die meisten Tumore (80 %) zeigten sich nicht-pigmentiert (amelanotisch), traten hauptsächlich bei Männern auf (70 %) und befanden sich vor allem in der Kopf/Hals-Region (60 %). Es befanden sich 79 % (n = 37/47) der Patienten bei Diagnosestellung in Stadium I oder II. Bei 21 % der Patienten wurde ein fortgeschrittenes oder bereits Metastasen bildendes Stadium (III oder IV) festgestellt.

3.2 Genotypisierung

Die DNA Extraktion und *BRAF* Sequenzierung waren in allen 50 Fällen erfolgreich. Insgesamt zeigten sich fünf Missense-Mutationen (10 %). Zwei dieser Mutationen (c.1799 T>A) präsentierten sich als V600E Missense-Mutationen. Es konnten bei den restlichen drei Fällen (c.1798_1799 GT>AA) V600K Missense-Mutationen (Abbildung 1A) nachgewiesen werden.

3.3 Klinisch-pathologische Merkmale

Im Vergleich zwischen mutierten SDM und Wild-Typ SDM zeigten Alter (Mutierte: Median = 70 Jahre vs. Wild-Typ: Median = 76 Jahre; p = 0,47; t-Test), Geschlecht, anatomische Lage, Pigmentierung und histologischer Subtyp keine signifikanten Unterschiede (p-Spannweite: 0,14-0.63; exakter Test nach Fisher). Vier der mutierten Fälle konnten dem histologischer Subtyp ‚spindelzellig' zugeteilt werden. Nur eine Mutation traf auf die Definition des histologischen Subtyps ‚rein' zu (Tabelle 10). Es handelt sich bei dieser Mutation um eine V600K Missense-Mutation (Abbildung 1B). Die Stadien-Zuweisung ergab im Vergleich zwischen mutiert und Wild-Typ SDM keinen signifikanten Unterschied (p=0,24; Chi-Quadrat-Test); jedoch wurden bei allen drei Patienten mit einer V600K Missense-Mutation zum Zeitpunkt der Diagnose Metastasen festgestellt. Zudem wurde in der Kohorte ein insgesamt höherer Anteil an V600K gegenüber V600E Missense-Mutationen ermittelt (60%).

3.4 Datenbankrecherche

Nichtsdestotrotz lässt sich zusammenfassen, dass die Gesamtfrequenz von *BRAF* V600K Missense-Mutationen in SDM (n = 3/50; 6 %) nicht signifikant höher war als die innerhalb der COSMIC Datenbank aufgeführte *BRAF* V600K Frequenz für herkömmliche maligne Melanome (n = 451/18545; 2,4 %; p = 0,26, Chi-Quadrat-Test mit Yates Korrektur; COSMIC Datenbank, Stand Juli 2016). Darüber hinaus zeigte die durchgeführte Datenbankrecherche, dass die *BRAF* Mutationsfrequenz in SDM signifikant geringer ist als bisher in konventionellen Melanomen beobachtet wurde (n = 5084/11291; ~45 %; p < 0,001).

3.5 Literaturrecherche

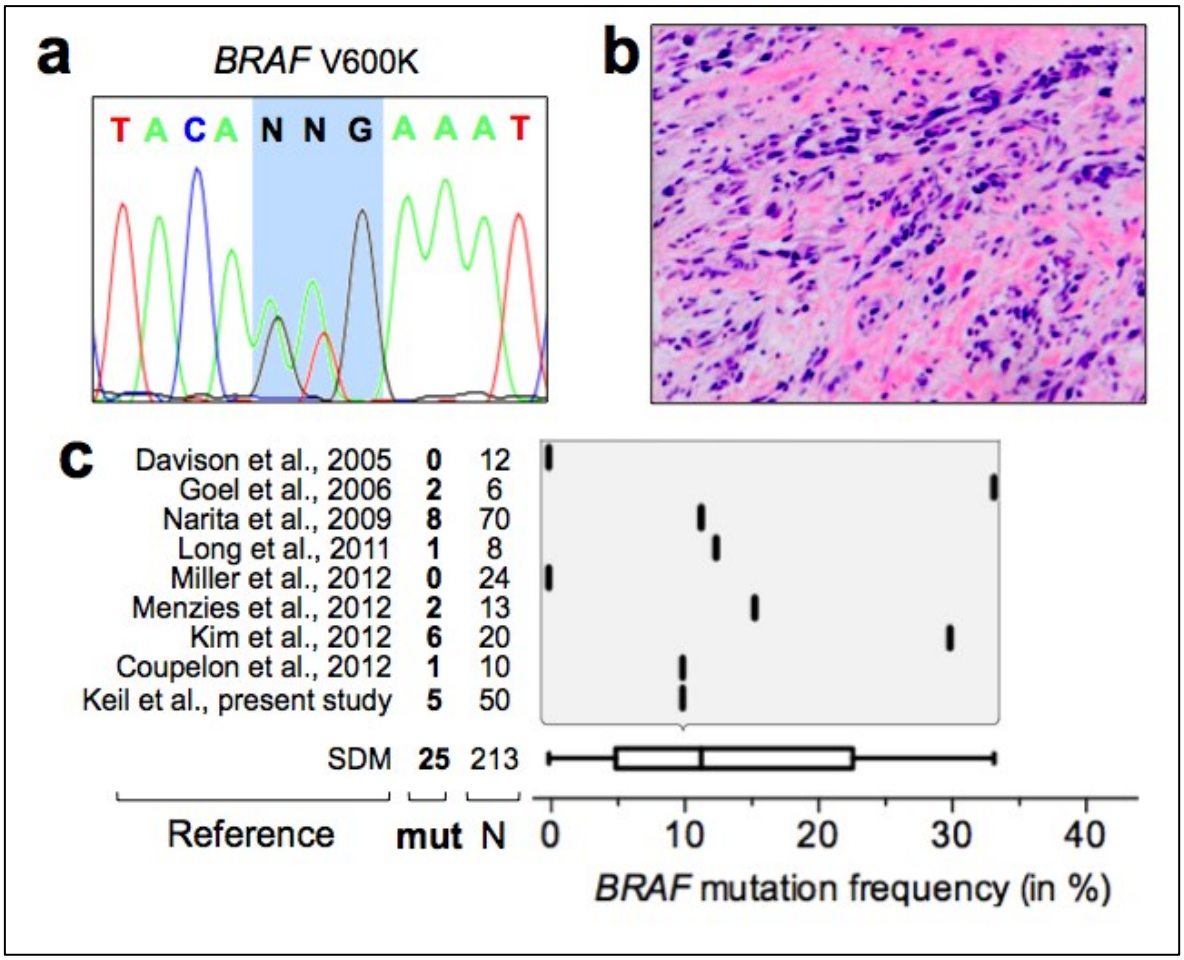
Die Details der Literaturdurchsicht werden in Abbildung 1C graphisch dargestellt. Es werden hierbei alle literarisch aufgeführten Fälle an SDM mit den Fällen dieser Studie zusammen aufgeführt. In Summe sind dies 213 Fälle, unter denen sich eine Gesamtmutationsfrequenz von 11,7 % feststellen ließ (25 mutiert von 213 getesteten Fällen an SDM).

Tabelle 11: Demographische und klinische Merkmale der Studienkohorte getestet auf *BRAF* Mutationen

Merkmale	**Patienten (N=50)**		***BRAF* V600 (N=5)**
	Anzahl	%	Aminosäurenwechsel
Alter, Jahre			
Median (Spannweite)	69 (28-96)		
Geschlecht			
Männlich	35	70	E, K, K
Weiblich	15	30	E, K
Anatomische Lage			
Kopf/Hals	30	60	K
Körperstamm	7	14	K
Obere Extremitäten	6	12	E, E
Untere Extremitäten	2	4	
Schleimhaut	4	8	K
Unklarer Primarius	1	2	
Pigmentierung			
Ja (Melanin)	9	18	K
Nein (Amelanotisch)	39	78	E, E, K, K
Unbekannt	2	4	
Histologischer - Subtyp			
Rein	24	48	K
Gemischt	4	8	
Spindelzellig	22	44	E, E, K, K
Stadium			
I	12	24	
II	25	50	E, E
III	2	4	
IV	8	16	K, K, K
Unbekannt	3	6	

Abkürzungen: *E, V600E Mutation; K, V600K Mutation; Stadien Einteilung (pathologisch) gemäß AJCC 7te Edition.*

Abbildung 1: *BRAF* Mutation und Histomorphologie



Abkürzungen: ***A*** *Elektropherogramm einer Didesoxynukleotid Sequenzierung nach Sanger in einem reinen desmoplastischen Melanom mit c.1798_99 GT>AA BRAF Codon 600 Missense-Mutation (AAG/GTG); codiert V600K/WT Protein.* ***B*** *Histomorphologie von atypischen Spindelzellen auf dem Hintergrund von kollagen-reichem Stroma (H&E; 200x).* ***C*** *Zusammenfassung der Literaturrecherche über BRAF Mutationen in SDM. Den Studien wird jeweils die Anzahl der mutierten (mut) und getesteten (N) Fälle zugeteilt. Alle Studien kombiniert (SDM) werden in einem Box-Whisker-Plot dargestellt.*

4 DISKUSSION

Die Studie zeigt, dass *BRAF* V600 Missense-Mutationen gehäuft in Spindelzell- und desmoplastischen Melanomen vorkommen. Die Frequenz hierbei beträgt 10%. Die beschriebenen Mutations-Subtypen V600E und V600K Missense-Mutationen deuten darauf hin, dass die allgemein verbreitete Meinung einer Abwesenheit von *BRAF* Mutationen in SDM revidiert werden muss.

Der Vergleich der Ergebnisse dieser Studie mit Resultaten aus Studien aktueller Literatur weist auf den ersten Blick Diskrepanzen auf. Zwei häufig zitierte Studien berichten von einer komplette Abwesenheit von *BRAF* Mutationen in SDM (Davison et al. 2005; Miller et al. 2012). Mutmaßlich basieren die deutlichen Unterschiede zu den Ergebnissen dieser Studie auf den relativ geringen Fallzahlen innerhalb der beiden Studien. Die Tatsache, dass die Melanom-Subtypen SDM mit einem Anteil von ca. 1% aller Melanom Fälle (Livestro et al. 2005) sehr selten vorkommen, könnte eine weitere Erklärung liefern. Darüber hinaus präsentieren sich SDM sowohl klinisch als auch pathologisch zum Teil sehr unterschiedlich (Lens et al. 2005; Longacre et al. 1996; McCarthy et al. 2004; McCarthy et al. 2006; Pacheco et al. 2011), was die Diagnosestellung, wie bereits in der Einleitung beschrieben, erschwert.

Bei weiterer Durchsicht aktueller Literatur zum Thema *BRAF* Mutationen in SDM lassen sich einige kleinere Fall-Studien und eine größere Fall-Studie finden (Coupelon et al. 2012; Goel et al. 2006; Kim et al. 2012; Long et al. 2011; Menzies et al. 2012; Narita et al. 2009). Interessanterweise kam diesen Studien bisher nicht die angemessene Aufmerksamkeit zu.

Die Kombination der Ergebnisse dieser Studie mit denen der aufgeführten Studien zeigt eine Gesamt-Mutationsfrequenz in SDM von 10-12% (Abbildung 1C).

Das onkogene Potential von *BRAF* wurde bereits intensiv untersucht (Belden & Flaherty 2012). Dennoch werden in Zukunft weitere funktionelle Studien vonnöten sein, um auch für SDM die Abhängigkeit von *BRAF* genauer abschätzen zu können. In Verbindung mit vorausgegangenen Studien über andere Melanom Subtypen deutet alles darauf hin, dass das aktivierte/mutierte *BRAF* Gen zur Pathogenese in SDM beisteuert.

Außerdem lässt sich sagen, dass die Mutationsfrequenz in SDM signifikant geringer ist als in konventionellen Melanomen (n = 8329/18545; ~45%; $p < 0{,}001$; COSMIC Datenbank, Stand Juli 2016). Darüber hinaus präsentieren sich SDM typischerweise als lokal-begrenzte Läsionen, die im Allgemeinen gut chirurgisch reseziert werden können. Im Vergleich zu Patienten mit konventionellen Melanomen zeigen sich bei SDM Patienten eher selten weit vorangeschrittene Krankheitsbilder mit Metastasierung und entsprechend folgenreichem Ausgang (Livestro et al. 2005). Folglich könnte mittels einer *BRAF* Genotypisierung in SDM ein Gewinn für erkrankte Patienten erlangt werden. Im Falle der Detektion einer *BRAF* Mutation könnten Patienten durch die Anwendung einer zielgerichteten Therapie deutlich profitieren.

Die Detektion von V600K Submutationen in SDM ist von besonderem Interesse. Im konventionellen Melanom wird das Auftreten einer solchen Submutation mit einem klinisch aggressiveren Krankheitsverlauf und einer verkürzten absoluten Überlebensrate in Verbindung gebracht (El-Osta et al. 2011). Da dieser Studie keine Daten zum Krankheitsverlauf der Patienten zur Verfügung standen, lässt sich über die Überlebensdaten der Kohorte keine Aussage treffen. Es fällt jedoch auf, dass alle drei Patienten mit einer V600K Submutation einen Metastasen-bildenden Krankheitsverlauf zeigten.

Ungeachtet des klinisch aggressiveren Verlaufs sprechen Patienten mit konventionellen Melanomen sehr gut auf eine zielgerichtete Therapie mittels *BRAF* Inhibition an (Rubinstein et al. 2010). Basierend auf aktuellen Studien kann diese Aussagen jedoch nicht für SDM getroffen werden.

Die in dieser Studie erhobenen Daten sprechen dafür, dass diagnostische Strategien zur *BRAF* Analyse in SDM molekulare Techniken beinhalten sollten, die in der Lage sind mehrere Mutationssubtypen, u.a. V600E und V600K, zu detektieren (Rubinstein et al. 2010). Spezifisch könnte sich das bisher verwendete alleinige Screening auf V600E Submutationen mittels mutations-spezifischer Immunohistochemie als unzureichend erweisen (Colomba et al. 2013).

Die in dieser Studie präsentierten Mutationsfrequenzen und Mutationssubtypen (u.a. die seltene V600K Mutation) innerhalb des *BRAF* Gens in Spindelzell- und desmoplastischen

Melanomen liefern entscheidende Argumente für die Erweiterung gegenwärtiger molekularer Diagnosestrategien um diese seltenen Subtypen des malignen Melanoms.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Spindelzell- und desmoplastische Melanome (SDM) sind seltene, aber klar definierte Subtypen des Malignen Melanoms. Sie unterscheiden sich von diesem in klinischen, histologischen wie auch prognostischen Merkmalen. Über die *BRAF* Mutationsfrequenz innerhalb dieser seltenen Melanom-Subtypen ist bis heute wenig bekannt.

Ziel dieser Studie waren zum einen die Bestimmung der Mutationsfrequenz von *BRAF* V600 Mutationen innerhalb einer großen Kohorte SDM und zum anderen der anschließende Vergleich mit Mutationsfrequenzen, die bis dato in Vorgängerstudien beschrieben wurden. Desweiteren sollten die Mutationsfrequenzen in SDM mit den Mutationsfrequenzen innerhalb herkömmlicher Melanome verglichen werden.

In Zusammenarbeit mit der Columbia University, New York City, und der Washington University, St. Louis, wurden geeignete Fälle ausgewählt und im Falle der Verfügbarkeit einer definierten Menge an Tumorgewebe in diese Studie integriert. Zur Analyse wurden das Tumormaterial mikrodisseziert oder ausgestanzt, die DNA extrahiert und mittels Pyrosequenzierung auf das Vorhandensein von *BRAF* V600 Mutationen überprüft. Zur Validierung wurde die Sanger-Sequenzierungsmethode verwendet. Die detektierte *BRAF* Mutationsfrequenz innerhalb SDM wurde im Anschluss mit den in der Literatur beschriebenen SDM Mutationsfrequenzen und den Frequenzen innerhalb herkömmlicher Melanome aus dem Datensatz der COSMIC Datenplattform verglichen.

Bei der *BRAF* Analyse von 50 SDM zeigten sich insgesamt fünf V600 Mutationen (10%). Demnach ist die *BRAF* Mutationsfrequenz in SDM signifikant niedriger als bisher in konventionellen Melanomen beobachtet (n=5084/11291; ~45%; $p < 0{,}001$). Hervorzuheben ist, dass drei der als mutiert detektierten Fälle *BRAF* V600K Missense-Mutationen aufwiesen. In der Literatur wurde Patienten mit konventionellen Melanomen und dem Mutationssubtyp V600K ein klinisch aggressiverer Krankheitsverlauf zugeschrieben. Vergleichsweise präsentierten sich in dieser Studie die drei Patienten mit *BRAF* V600K Mutationen in einem bereits Metastasen-bildenden Krankheitsstadium.

Die Mutationsfrequenz von 10% und die hier detektierten *BRAF* V600 Mutationssubtypen in Spindelzell- und desmoplastischen Melanomen argumentieren für die Erweiterung der

Diagnostik um molekularen Untersuchungsmethoden im Falle der Diagnosestellung eines dieser seltenen Melanom-Subtypen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Belden, S. and Flaherty, K.T., 2012. MEK and RAF inhibitors for BRAF-mutated cancers. Expert Reviews in Molecular Medicine, 14, p.e17.

2. Colomba, E., Hélias-Rodzewicz, Z., Von Deimling, A., Marin, C., Terrones, N., Pechaud, D., Surel, S., Côté, J.F., Peschaud, F., Capper, D., Blons, H., Zimmermann, U., Clerici, T., Saiag, P. and Emil, J.F., 2013. Detection of BRAF p.V600E mutations in melanomas: comparison of four methods argues for sequential use of immunohistochemistry and pyrosequencing. The Journal of molecular diagnostics: JMD, 15(1), pp.94–100.

3. Coupelon, S., Franck, F., Jarrousse, A.S., Déchelotte, P., Souteyrand, P. and D'Incan, M., 2012. Desmoplastic malignant melanoma: a study of ten cases and status of BRAF mutation. Dermatology (Basel, Switzerland), 225(2), pp.168–171.

4. Davison, J.M. Rosenbaum, E., Barrett, T.L., Goldenberg, D., Hoque, M.O., Sidransky, D. and Westra, W.H., 2005. Absence of V599E BRAF mutations in desmoplastic melanomas. Cancer, 103(4), pp.788–792.

5. El-Osta, H., Falchook, G., Tsimberidou, A., Hong, D., Naing, A., Kim, K., Wen, S., Janku, F. and Kurzrock, R., 2011. BRAF mutations in advanced cancers: clinical characteristics and outcomes. PloS One, 6(10), p.e25806.

6. Goel, V.K. Lazar, A.J., Warneke, C.L., Redston, M.S. and Haluska, F.G., 2006. Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. The Journal of Investigative Dermatology, 126(1), pp.154–160.

7. Kim, J., Lazar, A.J., Davies, M.A., Homsi, J., Papadopoulos, N.E., Hwu, W.,. Bedikian, A.Y., Woodman, S.E., Patel, S.P., Hwu, P. and Kim, K.B., 2012. BRAF, NRAS and KIT sequencing analysis of spindle cell melanoma. Journal of Cutaneous Pathology, 39(9), pp.821–825.

8. Lennerz, J.K., Klaus, B.M., Marienfeld, R.B. and Möller, P., 2012. Pyrosequencing of BRAF V600E in routine samples of hairy cell leukaemia identifies CD5+ variant

hairy cell leukaemia that lacks V600E. British Journal of Haematology, 157(2), pp.267–269.

9. Lens, M.B., Newton-Bishop, J.A. and Boon, A.P., 2005. Desmoplastic malignant melanoma: a systematic review. The British Journal of Dermatology, 152(4), pp.673–678.

10. Livestro, D.P., Muzikansky, A., Kaine, E.M., Flotte, T.J., Sober, A.J., Mihm, M.C. Jr, Michaelson, J.S., Cosimi, A.B. and Tanabe, K.K., 2005. Biology of desmoplastic melanoma: a case-control comparison with other melanomas. Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology, 23(27), pp.6739–6746.

11. Long, G.V., Menzies, A.M., Nagrial, A.M., Haydu, L.E., Hamilton, A.L., Mann, G.J., Hughes, T.M., Thompson, J.F., Scolyer, R.A. and Kefford, R.F., 2011. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology, 29(10), pp.1239–1246.

12. Longacre, T.A., Egbert, B.M. and Rouse, R.V., 1996. Desmoplastic and spindle-cell malignant melanoma. An immunohistochemical study. The American Journal of Surgical Pathology, 20(12), pp.1489–1500.

13. McCarthy, S.W., Crotty, K.A. and Scolyer, R.A., 2006. Desmoplastic melanoma and desmoplastic neurotropic melanoma. In: LeBout PE, editor. World Health Organization Classification of Tumors Pathology and Genetics of Skin Tumours. IARC Press, pp. 76–78.

14. McCarthy, S.W., Scolyer, R.A. and Palmer, A.A., 2004. Desmoplastic melanoma: a diagnostic trap for the unwary. Pathology, 36(5), pp.445–451.

15. Menzies, A.M., Haydu, L.E., Visintin, L., Carlino, M.S., Howle, J.R., Thompson, J.F., Kefford, R.F., Scolyer, R.A. and Long, G.V., 2012. Distinguishing clinicopathologic features of patients with V600E and V600K BRAF-mutant metastatic melanoma. Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research, 18(12), pp.3242–3249.

16. Miller, D.D., Emley, A., Yang, S., Richards, J.E., Lee, J.E., Deng, A., Hoang, M.P. and Mahalingam, M., 2012. Mixed versus pure variants of desmoplastic melanoma: a genetic and immunohistochemical appraisal. Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc, 25(4), pp.505–515.

17. Narita, N., Tanemura, A., Murali, R., Scolyer, R.A., Huang, S., Arigami, T., Yanagita, S., Chong, K.K., Thompson, J.F., Morton, D.L. and Hoon, D.S., 2009. Functional RET G691S polymorphism in cutaneous malignant melanoma. Oncogene, 28(34), pp.3058–3068.

18. Pacheco, I., Buzea, C. and Tron, V., 2011. Towards new therapeutic approaches for malignant melanoma. Expert Reviews in Molecular Medicine, 13.

19. Rubinstein, J.C., Sznol, M., Pavlick, A.C., Ariyan, S., Cheng, E., Bacchiocchi, A., Kluger, H.M., Narayan, D. and Halaban, R., 2010. Incidence of the V600K mutation among melanoma patients with BRAF mutations, and potential therapeutic response to the specific BRAF inhibitor PLX4032. Journal of Translational Medicine, 8, p.67.

DANKSAGUNG

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. P. Möller, der mir die einmalige Gelegenheit gab an seinem Institut meine Arbeit, meine Forschungen und schlussendlich die Fertigstellung dieser Promotionsschrift durchzuführen.

Ein besonderer Dank gilt meinem Betreuer und Doktorvater Herrn Prof. Dr. J. K. Lennerz für seine unermüdliche Motivation, Unterstützung und wertvollen Beiträge. Ich bin sehr dankbar für die Geduld, die mir Herr Prof. Lennerz stets entgegenbrachte, für seine Erreichbarkeit zu jedem Zeitpunkt und seine Expertise in allen Belangen.

Bedanken möchte ich mich außerdem auch bei Frau Dr. Ulrike Kostezka und Frau Elena Kelsch für exzellente technische Unterstützung während des experimentellen Teils meiner Arbeit.

Vielen Dank an meine Mitdoktoranden am Institut für die Hilfsbereitschaft und den Rat in verschiedensten Belangen.

Darüber gilt mein Dank Frau Dr. U. Gerstenmaier, die mir bei der Genotypisierung viel weiterhelfen konnte.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern, meiner Familie und bei meiner Freundin bedanken - danke für eure Unterstützung während der gesamten Zeit.

CURRICULUM VITAE

Name:	**Philipp Keil**
Geburtsort:	Frankfurt am Main, Hessen
Nationalität:	Deutsch

BASISAUSBILDUNG UND SOZIALES ENGAGEMENT

1999-2008	Kaiserin-Friedrich-Gymnasium, Bad Homburg vor der Höhe
2005-2006	Belmont Secondary High School, Victoria, Canada
Juni 2008	Abitur
2008	Rettungssanitätsausbildung, Bildungsinstitut des Deutschen Roten Kreuzes, Mainz
2008-2009	Freiwilliges Soziales Jahr im Rettungsdienst des DRK Kreisverband Hochtaunus, Bad Homburg v.d.H.

UNIVERSITÄRE AUSBILDUNG

2009 – 2016	Medizinische Fakultät der Universität Ulm
2011	Physikum (1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung)
04/2015	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (schriftlicher Teil)
05/2016	3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (mündlicher Teil)
Famulaturen	Innere Medizin, Urologie, Plastische Chirurgie, Radiologie

BERUFLICHER WERDEGANG

Seit 01/2017	Assistenzarzt, 1. Medizinische Klinik der Universitätsmedizin Mainz Leitung: Univ.-Prof. Dr. med. Peter R. Galle

PROMOTION

2012-2017	Molekulare Charakterisierung von Spindelzelligen und desmoplastischen Melanomen, Institut für Pathologie, Uni Ulm

PRÄSENTATIONEN

Heidelberg 2013: Keil P, Weissinger SE, Silvers DN, Möller P, Horst B, Lennerz JK. *BRAF* V600K Mutations in Spindle-cell Melanoma. 97. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, Heidelberg Germany, May 23rd-26th 2013. **(Präsentation)**

Heidelberg 2013: Keil P, Weissinger SE, Silvers DN, Möller P, Horst B, Lennerz JK. Recurrent *BRAF* V600K mutations in spindle cell melanoma. Der Pathologe 2013; (34)1: 74A

PUBLIKATIONEN

SE Weissinger, **P Keil**, DN Silvers, BM Klaus, P Möller, BA Horst, JK Lennerz. A diagnostic algorithm to distinguish desmoplastic from spindle cell melanoma. Modern Pathology; 2014 Apr; 27(4):524-34.