

Mutationsspektrum des malignen Melanoms durch Sequenzierung in der Routinediagnostik

Katharina Marston¹, Ilaria Alborelli¹, Hazem A. Juratli^{1,3}, Philip Jermann¹, Edouard Stauffer², Mathias Gugger², Sylvia Hoeller¹, Luigi M. Terracciano¹, Katharina Glatz¹, Michel Bihl¹, Simon Haefliger^{1#}, Matthias S. Matter^{1#}

1. Pathologie, Institut für Medizinische Genetik und Pathologie, Universitätsspital Basel, Universität Basel, Basel, Schweiz
 2. Institut für Pathologie, Promed laboratoire médical SA, Fribourg, Schweiz
 3. Abteilung für Dermatologie, Universitätsspital Basel, Basel, Schweiz
 (# gleichberechtigte letzte Autoren)



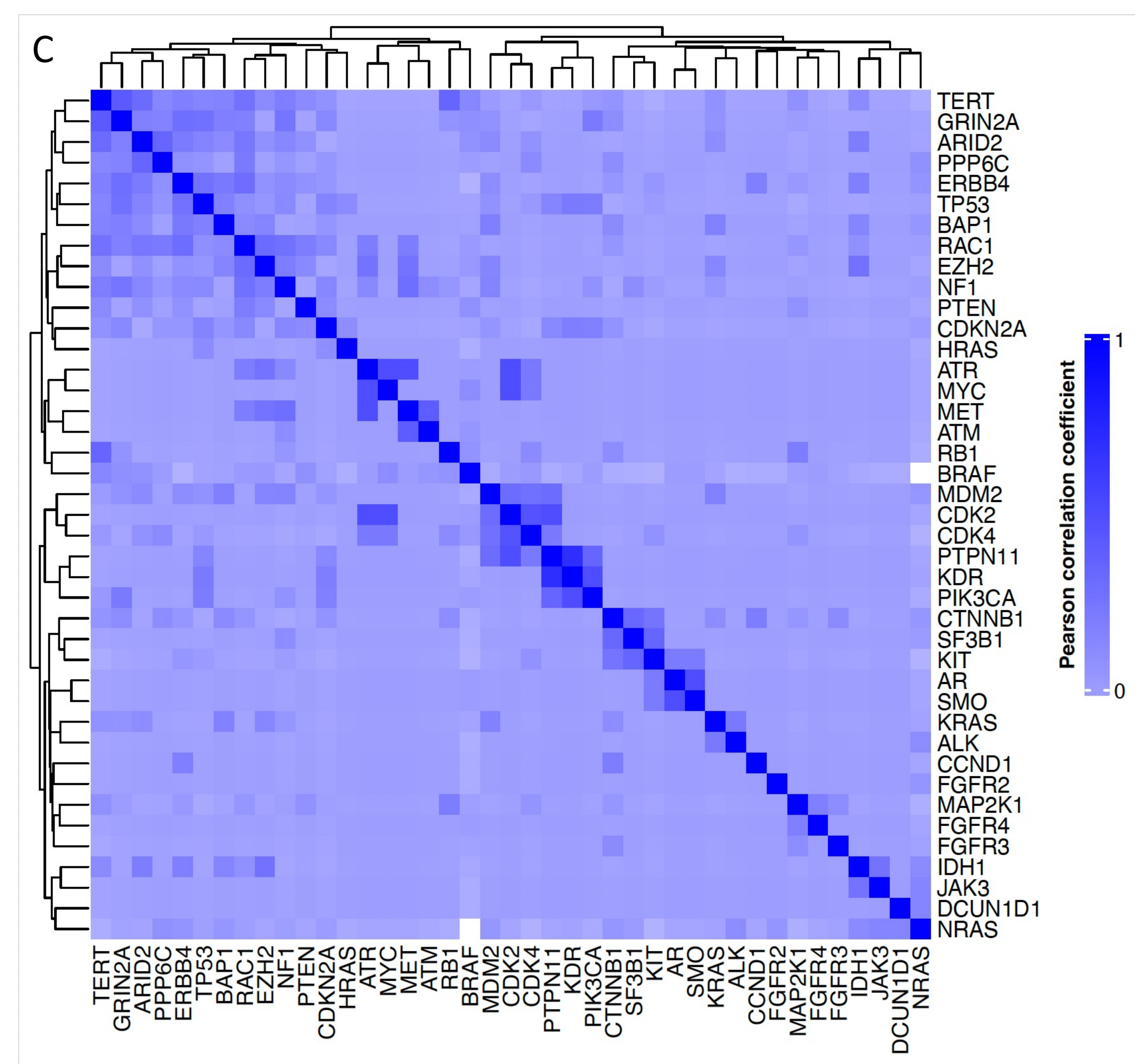
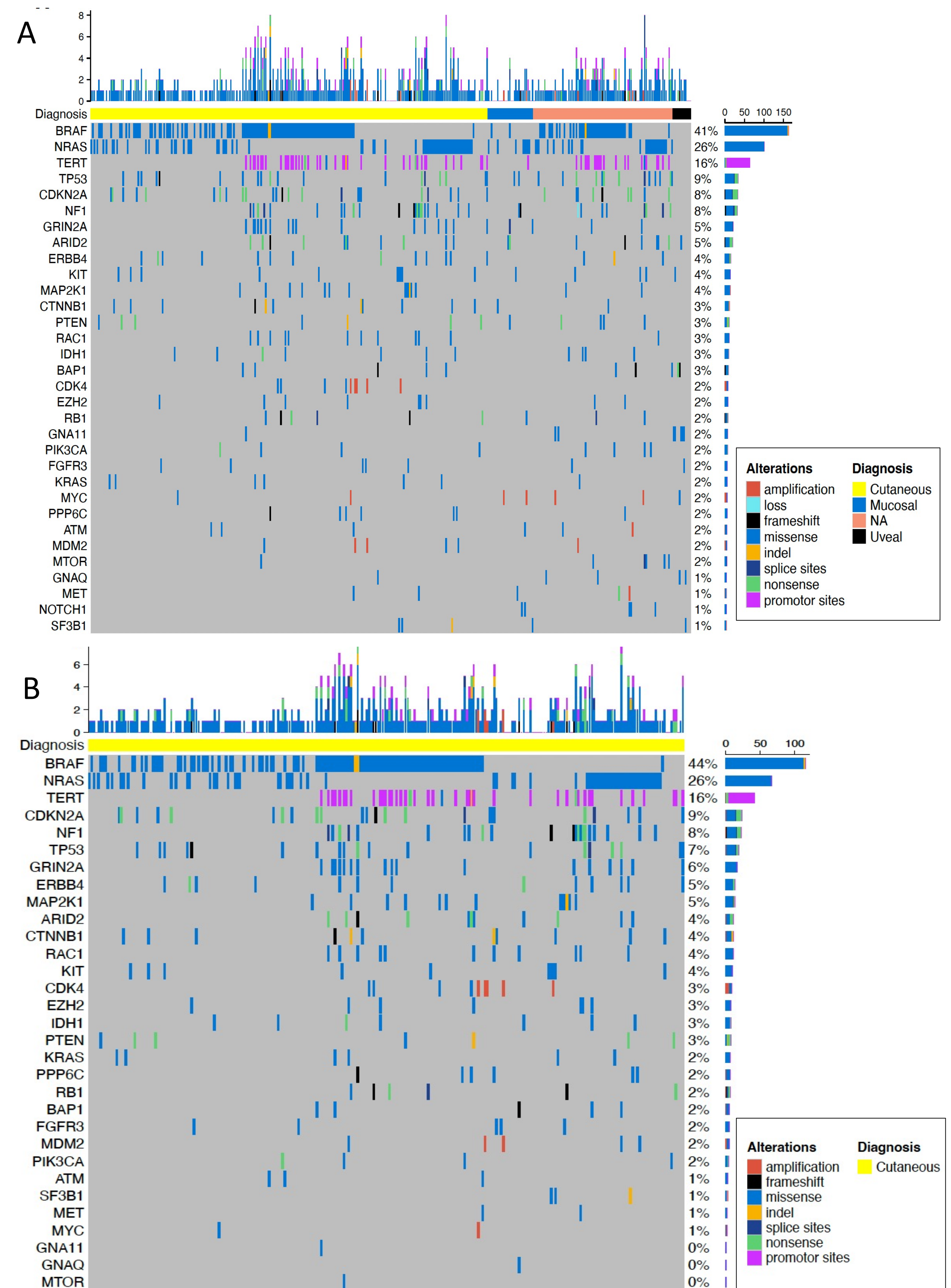
Einleitung: Die molekulare Analyse des malignen Melanoms (MM) ist bei Patient:innen in fortgeschrittenen Tumorstadien zum Standard geworden, da die anschließende Therapie direkt vom Ergebnis abhängt. Durch diese molekularen Analysen lernen wir immer mehr über die auftretenden Mutationen des MM. Dennoch gibt es widersprüchliche Daten über die Prävalenz der auftretenden Veränderungen, und die Anzahl der Studien, die Tumorproben aus der klinischen Routine beschreiben, ist begrenzt. Daher ist es sehr wichtig, das Spektrum an Mutationen im fortgeschrittenen MM in der Routinediagnostik zu kennen, um mögliche Mutationen in den Treibergenen, die als Biomarker für zugelassene zielgerichtete Therapien fungieren, schnell identifizieren zu können.

Patientenkollektiv: In einem Gesamtkollektiv von 364 MM-Patient:innen wurde das molekulare Profil im Rahmen der Routinediagnostik zwischen 2015 und 2022 an unserem Institut des Universitätsspitals Basel mittels «Next-Generation-Sequenzierung» (NGS) analysiert. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Nordwest- und Zentralschweiz genehmigt.

Methoden: Für die DNA-Isolierung wurden Gewebelöcher in 4 µm dicke Schnitte angefertigt und anhand eines H&E-gefärbten Gewebeschnitts ein Mindesttumorzellgehalt von 20 % mit Hilfe eines Pathologen markiert. Der ausgewählte Bereich wurde anschliessend makrodisseziert und die DNA mit dem Maxwell DNA-Reinigungsset (Promega) gemäß dem Protokoll des Herstellers isoliert. Abschliessend wurde die DNA-Konzentration mit dem Qubit dsDNA HS Assay Kit (ThermoFisher Scientific) quantifiziert. Die Next-Generation-Sequenzierung (NGS) wurde in 156 Fälle (39,7 %) mit dem Ion Torrent™ OncoPrint™ Focus Assay, in 126 Fälle (32,1 %) mit einem kundenspezifischen NGS Melanom Panel, in 77 Fälle (19,6 %) mit dem Cancer Hotspot Panel v2 Assay und in 34 Fälle (8,6 %) mit dem OncoPrint™ Comprehensive V3 Assay analysiert. Die Datenanalyse erfolgt mittels Ion Reporter Software (Thermo Fisher Scientific). Detektierte Sequenzvarianten wurden auf ihre Pathogenität anhand von früherer Literatur, Datenbanken (COSMIC, ClinVar, The Jackson Laboratory Clinical Knowledgebase (CKB), dbSNP, Cancer Core Europe online portal) bewertet. In der Studie wurden nur pathogene und wahrscheinlich pathogene Varianten aufgenommen. Für die Korrelationsanalyse berechneten wir den Pearson-Korrelationskoeffizienten rho (rPear). Statistische Analysen und Datenvisualisierung wurden mit R Version 4.2 (R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich) unter Verwendung der folgenden Pakete durchgeführt: ggplot2 und Complex Heatmap.

Resultate: Pathogene molekulare Veränderungen wurden bei 320 (87,9%) MM gefunden, während 44 (12,1%) keine Veränderungen in den untersuchten Genen aufwiesen. Bei den kutanen Melanomen (n= 245) wurden hauptsächlich Varianten im BRAF-Gen (46,9%), meistens p.V600E, gefolgt vom RAS-Gen (29,2%), meistens NRAS p.Q61R, gefunden. Bei den Schleimhautmelanomen (n=23) wurden überwiegend NRAS-Varianten gefunden (34,8%). Bei den Aderhautmelanomen (n=10) wurden erwartungsgemäss hauptsächlich Varianten in GNA11 (50%) und GNAQ (20%) nachgewiesen. Bei 87 MM, deren Primärlokalisation nicht spezifiziert war, wurde in 54% der Fälle eine BRAF-Mutation und in 29,9% eine NRAS-Mutation gefunden.

Diskussion und Schlussfolgerung: Unsere molekularen Daten umfassen eine grosse Schweizer Kohorte von 364 MM-Patienten, die im Rahmen der klinischen Routineuntersuchung analysiert wurden. Unsere Studie zeigt hauptsächlich aktivierende Varianten in den Treibergenen (BRAF und NRAS) und bestätigt mit kleineren Unterschieden epidemiologische Daten aus früheren Studien in Europa. Darüber hinaus bestätigt unsere Studie die Durchführbarkeit der molekularen Profilerstellung an formalinfixierten, paraffineingebetteten Proben als Teil eines routinemässigen diagnostischen Ablaufs bei fortgeschrittenen MM.



Bilderlegenden: (A): Oncoprint aller Mutationen aller Gruppen des malignen Melanoms. (B): Oncoprint aller Mutationen kutaner Melanome (C): Heatmap, Korrelationskoeffizienten zwischen dem gleichzeitigen Vorliegen bestimmter genetischer Veränderungen bei kutanen Melanomen.

References:
 1. Rikumar S, Watson IR. Molecular characterization of cutaneous melanoma: creating a framework for targeted and immune therapies. *Br J Cancer*. 2016 Jul 12;115(2):145-55.
 2. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2009 Dec 20;27(26):6199-206.
 3. Shin AH, Joseph NM, Yu R, Benharashid J, Liu S, Frow T, et al. Genomic and Transcriptomic Analysis Reveals Incremental Disruption of Key Signaling Pathways during Melanoma Evolution. *Cancer Cell*. 2018 Jul 9;34(1):145-55.e4.
 4. Dhonen N, Maras R. BRAF signaling and targeted therapies in melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2009 Jun 23(3):529-45. ix.
 5. Karlsson J, Nilsson LM, Mitra S, Alsten S, Shekta GV, Sah VR, et al. Molecular profiling of driver events in metastatic uveal melanoma. *Nat Commun*. 2020 Apr 11;11:1894.
 6. Hodi E, Watson IR, Kryukov GV, Arold ST, Imelinski M, Theurillat JP, et al. A Landscape of Driver Mutations in Melanoma. *Cell*. 2012 Jul 20;150(2):251-63.
 7. Cancer Genome Atlas Network. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell*. 2015 Jun 18;161(7):1681-96.
 8. Hayward NK, Willmott JS, Waddell N, Johansson PA, Field MA, Nones K, et al. Whole-genome landscapes of major melanoma subtypes. *Nature*. 2017 11;545(7653):175-80.
 9. Cirenayis H, Luasa M, Eberdahl H, Törnqvist T, Kvist A, Saal LH, et al. NF1-mutated melanoma tumors harbor distinct clinical and biological characteristics. *Mol Oncol*. 2017 Apr 11;11(4):438-51.
 10. Krauthammer M, Kong Y, Bacchicchi A, Evans P, Pomputpong N, Wu C, et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations in NF1 and RASopathy genes in sun-exposed melanomas. *Nat Genet*. 2015 Sep;47(9):996-1002.
 11. Hennessy BT, Smith CL, Ram PT, Lu Y, Mills GB. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2005 Dec;4(12):988-1004.
 12. Davies MA. The role of the PI3K/AKT pathway in melanoma. *Cancer J*. 2012 Apr;18(2):142-7.
 13. Liu L, D'heerth D, Gan L, Metzger J, Summers A, Lassam N, et al. Mutation of the CDKN2A 5' UTR creates an aberrant initiation codon and predisposes to melanoma. *Nat Genet*. 1999 Jun;21(1):28-32.
 14. Gonzalez ML, Bender CM, You EH, Glendon JM, Flores JF, Walker GJ, et al. Low Frequency of p16/CDKN2A Methylation in Sporadic Melanoma: Comparative Approaches for Methylation Analysis of Primary Tumors. *Cancer Res*. 1997 Dec 15;57(23):5336-47.
 15. Yoo Z, Yeager R, Rodrik-Outomskaya VS, Tao A, Torres MM, Chang MT, et al. Tumors with class 3 BRAF mutants are sensitive to the inhibition of activated RAS. *Nature*. 2017 Aug 10;548(7666):234-8.
 16. Maltoni-Coussio E, Adierlatto E, Orzi C, Garcia JS, Perez-Garcia J. NRAS-mutant melanoma: current challenges and future prospect. *Oncotargets Ther*. 2017 Aug 8;10:3941-7.
 17. Carbi-Baguel A, Rubio-Casadevall J, Pujuguet M, Santoni A, Olivera G, Coll M, et al. Epidemiology and Molecular Profile of Mucosal Melanoma: A Population-Based Study in Southern Europe. *Cancers*. 2022 Feb 3;14(3):780.
 18. Van Raamsdonk CD, Bezrookove V, Green G, Bauer J, Gaugler L, O'Brien JM, et al. Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue nevi. *Nature*. 2009 Jan 29;457(7229):599-602.
 19. Van Raamsdonk CD, Greenwood K, Crosby MB, Gerrits MC, Vemula S, Wiesner T, et al. Mutations in GNA11 in uveal melanoma. *N Engl J Med*. 2010 Dec 2;363(23):2191-9.