

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie
der Universität zu Köln
Direktorin: Universitätsprofessorin Dr. med. E. R. von Stebut-Borschitz

**Bedeutung von NRAS-Mutationen für Prognose
und Krankheitsverlauf von Patienten mit
malignem Melanom
– eine monozentrisch-retrospektive Analyse**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Bodo Magnus Bühler
aus Tübingen

promoviert am 20. Oktober 2023

Dekan: Universitätsprofessor Dr.med. G. R. Fink

1. Gutachterin: Universitätsprofessorin Dr. med. Dr. rer. nat. C. M. J. Mauch
2. Gutachterin: Privatdozentin Dr. med. A. M. Schultheis

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.¹

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Frau Universitätsprofessorin Dr. med. Dr. rer. nat. C. M. J. Mauch

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Der dieser Arbeit zugrunde liegenden Datensatz basiert auf einer Tumordatenbank des Hauttumorzentrum der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Uniklinik Köln, die seit 1990 geführt und unter meiner Mitarbeit kontinuierlich fortgeführt wurde. Die Erlaubnis relevante Datensätze retrospektiv zu extrahieren und für diese Arbeit zu verwenden wurde mir von Frau Universitätsprofessorin Dr. med. Dr. rer. nat. C. M. J. Mauch erteilt. Zusätzlich zu den vorliegenden Daten wurden keine weiteren Analysen, Patientenkontakte, laborchemischen Untersuchungen oder radiologische Befunde erhoben.

Die Daten wurden von mir selbst ausgewertet. Eine statistische Beratung ist nicht erfolgt. Zur statistischen Analyse wurden die Programme *Prism 8* (Version 8.1.2 for MacOS, Graph-Pad Software Inc., San Diego, California) und *SPSS for MacOS* (Version 27, IBM Corporation, Armonk, NY) verwendet.

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine monozentrisch-retrospektive Studie, die bei der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln am 24.11.2021 zur Beratung eingereicht und am 02.05.2022 positiv beschieden wurde (Aktenzeichen 21-1572-retro).

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 02.Juli 2023

Unterschrift:

Danksagung

Mein größter Dank gilt meiner Doktormutter, Universitätsprofessorin Dr.med. Dr. rer. nat. Cornelia Mauch, die mir bei der Erstellung der Dissertation stets zur Seite gestanden und mich unterstützt hat.

Durch sie habe ich im Studium im Rahmen des Blockpraktikums einen Einblick in die Dermatologie erhalten dürfen, der mich nachhaltig geprägt und meinen Wunsch, Dermatologe zu werden, erst geweckt hat.

Auch Herrn Prof. Dr.med. Max Schlaak (mittlerweile ltd. Oberarzt an der Charité in Berlin) möchte ich an dieser Stelle danken, der mich zu Beginn der Dissertation betreut hat.

Dank ihres Vertrauens, ihrem Mentoring und ihrer Förderung ist die Dermatoonkologie zu meinem persönlichen Schwerpunkt in meiner Profession als Arzt geworden. Danke!

Von ganzem Herzen danken möchte ich meinen Kolleginnen und Kollegen aus dem Hauttumorzentrum der Uniklinik Köln, allen voran Esther Göppert und Claudia Kirchhoff, die mir immer eine Hilfe waren und mich – nicht nur bei der Aktensuche für diese Dissertation – unermüdlich unterstützt haben.

Herrn PD Dr. med. Michael Caspers und Frau PD Dr. med. Oana Persa gebührt mein Dank für die Einführung in *Graphpad Prism* und *SPSS*!

Auch bei Frau Dr. med. Nicole Kreuzberg möchte ich mich an dieser Stelle für ihre beharrliche Motivation, die Doktorarbeit fertig zu stellen, bedanken.

Frau Dr. med. Viola Schweinsberg darf an dieser Stelle nicht unerwähnt bleiben – tapfer hat sie unzählige Versionen Korrektur gelesen und für mich immer ein offenes Ohr gehabt. Danke!

Zu guter Letzt -aber nicht minder wichtig- möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mich auf der Reise zum „Doktor med.“ begleitet und bedingungslos unterstützt haben – in all ihren Höhen und Tiefen. Mein besonderer Dank gilt hierbei meinen Eltern, die immer an mich geglaubt, mich unterstützt und mir das Medizinstudium ermöglicht haben.

Inga, Thorsten, Tine, Michael, Volker, Nikki, Komaj, Sebastian, Ilya und Tanja:

Danke, dass ihr immer für mich da seid!

Gewidmet meinen Eltern

„As to the remote and exciting causes of melanosis, we are quite in the dark, nor can more be said of the methodus medendi. We are hence forced to confess the incompetency of our knowledge of the disease under consideration, and to leave to future investigators the merit of revealing the laws which govern its origin and progress ... and pointing out the means by which its ravages may be prevented or repressed.“

– Thomas Fawdington, The Manchester Royal Infirmary, 1826 ¹

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	10
1. ZUSAMMENFASSUNG	16
2. EINLEITUNG	19
2.1 Das maligne Melanom	19
2.1.1. Epidemiologie	20
2.1.2. Risikofaktoren	23
2.1.3. Klinik	24
2.1.4. Klassifizierung	25
2.1.4.1. Superfiziell spreitendes Melanom	26
2.1.4.2. Noduläres malignes Melanom	26
2.1.4.3. Lentigo-maligna Melanom	27
2.1.4.4. Akral-lentiginöses Melanom	28
2.1.5. Einteilung nach der AJCC-Klassifikation (2017)	28
2.1.6. Prognose	31
2.1.7. Mutationsanalysen	32
2.2 Diagnostik und Therapie	33
2.2.1. Adjuvante Therapie	35
2.2.2. Palliative Therapie	36
2.2.3. Systemtherapie	37
2.3 Die RAS/RAF/MEK/ERK – und PI3K/AKT/mTOR – Signalkaskadewege	41
2.3.1. Zelluläre Signaltransduktion	41
2.3.2. Der RAS/RAF/MEK/ERK – Signalkaskadeweg	42
2.3.3. Der PI3K/AKT/mTOR – Signalkaskadeweg	43
2.4 NRAS und die RAS – Superfamilie	43
2.5 Fragestellung	46
3. MATERIAL UND METHODEN	47
3.1 Patientenkohorte und Datenerhebung	47
3.2 Tumorproben und Mutationsanalysen	48
3.3 Statistische Analyse	48

4.	ERGEBNISSE	50
4.1	Epidemiologische Ergebnisse	50
4.1.1.	Erstdiagnose NRAS-Mutation	50
4.1.2.	Geschlechterverteilung der Patienten	51
4.1.3.	Altersverteilung bei Erstdiagnose	52
4.1.4.	Lokalisation des Primärtumors	53
4.1.5.	Histologische Subtypen am Gesamtkollektiv	55
4.1.6.	Primary tumor unknown („PTU“)	57
4.2	Histopathologische Charakteristika	58
4.2.1.	Vertikale Tumordicke nach Breslow	58
4.2.2.	Clark Level	61
4.2.3.	Ulzeration	62
4.2.4.	Wächterlymphknoten (<i>sentinel lymph node</i> , SLN)	63
4.3	Charakterisierung der Studienpopulation	65
4.4	Mutationsanalysen	69
4.4.1.	Koexistente, therapierelevante Mutationen	71
4.4.2.	Begleitmutationen	72
4.4.3.	Geschlechterspezifische Analyse der 4 häufigsten NRAS-Genotypen	75
4.5	Metastasierungsverhalten	76
4.5.1.	Metastasierung von Patienten mit NRAS-mutiertem malignen Melanom	76
4.5.2.	Metastasierung von Patienten mit positivem SLN	78
4.5.3.	Korrelation des Metastasierungsortes mit dem NRAS-Genotyp	80
4.6	Analyse des Gesamtüberlebens nach 5 bzw. 10 Jahren	84
4.7	Systemtherapie	87
4.7.1.	Progression Free Survival (PFS), allgemein	87
4.7.2.	Progression Free Survival (PFS), Immuntherapien	91
4.8	Zweitmalignome	94
5.	DISKUSSION	96
5.1	Epidemiologie NRAS-mutierter Melanome	96
5.2	Histopathologie NRAS-mutierter Melanome	98
5.3	Klassifikation von NRAS-Mutationen. Besteht die als dogmatisch beschriebene BRAF- bzw. NRAS- Exklusivität wirklich?	102

5.4	Metastasierung des NRAS-mutierten malignen Melanoms	104
5.5	Therapieansprechen NRAS-mutierter Melanompatienten auf Systemtherapien	107
5.6	Einfluss von NRAS-Mutationen auf das rezidivfreie und Gesamtüberleben von Patienten mit malignem Melanom	111
5.7	Assoziation von NRAS-Genotypen beim Melanom zu Zweitmalignomen	113
6.	LITERATURVERZEICHNIS	115
7.	ANHANG	132
7.1	Abbildungsverzeichnis	132
7.2	Tabellenverzeichnis	135
7.3	Erhebungsbogen	137
7.4	Metastasierungslinien 1 bis 9	138

Abkürzungsverzeichnis

AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
AK	Antikörper
AKT	Proteinkinase B
ALM	Akral-lentiginöses Melanom
alt.	alternativ
amelanot.	amelanotisch
AMM	Amelanotisches malignes Melanom
APC	Antigenpräsentierende Zelle
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.
BRAF	Proto-Onkogen B-RAF, V-RAF Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B1
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
CA	Karzinom
CD4+	Cluster of Differentiation 4 positive T-Helferzellen
CD8+	Cluster of Differentiation 8 positive T-Helferzellen
CDKN2A	Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 2A
CIO	Centrum für Integrierte Onkologie
c-KIT	Proto-Onkogen c-KIT, v-kit Hardy-Zuckerman 4 Feline Sarcoma Viral Oncogene Homolog
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
cm	Zentimeter
CT	Computertomographie
CTLA4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
CTX	Chemotherapie
DCR	<i>Disease control rate</i> , Krankheitskontrollrate
DFS	<i>Disease free survival</i> , Krankheitsfreies Überleben

DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DRR	<i>Durable response rate</i> , Heilungsrate
DTIC	Dacarbazin
ED	Erstdiagnose
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EMA	<i>European Medicines Agency</i> , Europäische Arzneimittel-Agentur
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
et al.	<i>Et alii/ et aliae/ et alia</i> , lat.: unter anderem. Hier für: „und andere“
Extr.	Extremitäten
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> , US-Behörde für Lebens- und Arzneimittel
FGFR	Fibroblast growth factor receptor
GAP	GTPase-activating protein
Grb2	Growth-factor-receptor-bound protein 2
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanosintriphosphat exchange factor
GLUT4	Glukosetransporter Typ 4
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GTP	Guanosintriphosphat
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HMB45	Human Melanoma Black 45, monoklonaler Antikörper
HRAS	Harvey Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
HTZ	Hauttumorzentrum Uniklinik Köln
hvr	hypervariable Region
ICD	<i>International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems</i> , Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme
i.d.R.	in der Regel

IE.	Internationale Einheiten
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
inkl.	inklusive
inoper.	inoperabel
i.v.	intravenös
Jh.	Jahrhundert
JÜR	Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit
kDA	Kilodalton
KI	Konfidenzintervall
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
LAD	Lymphadenektomie
LDH	Laktatdehydrogenase
LK	Lymphknoten
LMM	Lentigo-maligna Melanom
log ²	logarithmiert
lokoreg.	lokoregional
m	männlich
m ²	Quadratmeter
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAPKK	Mitogen-activated protein kinase-kinase
MAPKKK	Mitogen-activated protein Kinase-kinase-kinase
Max.	Maximum
MEK	Mitogen activated protein/Extracelullar signal regulated kinase Kinase
Melan-A	Melanomantigen
Min.	Minimum
Mio	Million
MM	Malignes Melanom
mm	Millimeter

MRT	Magnetresonanztomographie
mtl.	monatlich
mTOR	mechanistic Target of Rapamycin, Serin/Threonin-Kinase
mut	<i>mutant</i> , mutiert
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NEX	Nachexzision
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i> , Massive Parallelesequenzierung
NMM	Noduläres malignes Melanom
NRAS	Neuroblastoma Rat Sarcoma, alt.: Neuroblastoma Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
o.g.	oben genannt
OS	<i>Overall survival</i> , Gesamtüberleben
p53	Tumorprotein p53
PD1	Programmed cell death protein 1
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PDL1	Programmed cell death ligand protein 1
PFS	<i>Progression free survival</i> , Progressionsfreies Überleben
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-Biphosphonat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat
PTEN	Phosphatase and tensin-homolog
PTU	<i>Primary tumor unknown</i> , unbekannter Primarius
Q	Quartil
RAC1	Ras-verwandtes C3-Botulinumtoxinsubstrat 1
RAF	Rapidly accelerated fibrosarcoma, Rat fibrosarcoma
RANKL	Receptor Activator of NF-kB Ligand
RAS	Rat Sarcoma, G-Protein
RR	Relatives Risiko

RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
S-100(b)	Tumormarker S-100(b)
sc.	subkutan
SD	<i>Standard deviation</i> , Standardabweichung
SEER	Surveillance, Epidemiology, and End Results Programm
SF	Standardfehler
SIR	Standardisierte Inzidenzrate
SLN	<i>Sentinel lymph node</i> , Wächterlymphknoten
SLNB	<i>Sentinel lymph node biopsy</i> , Wächterlymphknotenbiopsie
SLND	<i>Sentinel lymph node dissection</i> , Wächterlymphknotenentfernung
sog.	sogenannt
SOS	Son-of-sevenless
SSM	Superfiziell spreitendes Melanom
SW I	Switch I
SW II	Switch II
TD	Tumordicke (nach Breslow)
TNM	Tumor Nodus Metastase
TP53	Tumorsuppressor-Gen TP53
T-VEC	Talimogene laherparepvec, onkolytisches Herpes-Virus
u.a.	unter anderem
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i> , Internationale Vereinigung gegen Krebs
ulz.	ulzeriert
UV	Ultraviolette Strahlung
v.a.	vor allem
v.Chr.	vor Christi
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor

Vgl.	Vergleich
vs.	versus
w	weiblich
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

Aus Gründen der besseren Lesbarkeit werden Personenbezeichnungen lediglich in der männlichen Form verwendet. Diese schließt damit die weibliche Form ein.

1. Zusammenfassung

Das maligne Melanom ist eine von den Melanozyten ausgehende bösartige Neoplasie, die in Deutschland, aber auch europa- und weltweit, eine stetig ansteigende Inzidenz erfährt und eine hohe Tendenz zur Metastasierung aufweist. Für die Gruppe der NRAS-mutierten Melanompatienten besteht derzeit keine zugelassene zielgerichtete Therapie wie es hingegen für BRAF- und cKIT-mutierte Melanompatienten der Fall ist.

Vor diesem Hintergrund wurden in der vorliegenden, retrospektiven Monozenterstudie Prognosefaktoren für NRAS-mutierte Melanompatienten und deren Krankheitsverlauf identifiziert sowie das Therapieansprechen auf verschiedene Systemtherapien untersucht. In Kenntnis der gegenwärtigen Literatur handelt es sich hierbei mit einem Studienkollektiv von 324 Patienten um die derzeit größte monozentrische Studie für NRAS-mutierte Melanompatienten.

Unter epidemiologischen Gesichtspunkten konnten wir in unserem Studienkollektiv eine statistisch signifikante Androtropie von 63% feststellen ($p < 0,0001$). Das Alter bei Erstdiagnose lag geschlechtsunspezifisch im Median bei 70 Jahren (MW: 66,40). Die höchste Prävalenz zeigte sich am Rumpf, gefolgt von den unteren und oberen Extremitäten. In der altersspezifischen Analyse konnten wir eine Prädominanz des nodulären malignen Melanoms über alle Altersgruppen hinweg verzeichnen (p -Wert $< 0,0001$). Die mediane Tumordicke lag bei 3,0mm.

In 45% der Fälle konnte nach erfolgter Wächterlymphknotenbiopsie (SLNB) ein metastatischer Befall des SLN nachgewiesen werden. Dieser Wert liegt deutlich höher als in vielen anderen veröffentlichten Studien.

Molekularpathologisch betreffen NRAS-Mutationen beim Melanom am häufigsten das Codon 61, was wir übereinstimmend bestätigen können. Die häufigste NRAS-Mutation in unserer Patientenkohorte war NRAS Q61R, gefolgt von Q61K, Q61L und Q61H. In 3,7% der Fälle fanden sich koexistente, aktivierende Treibermutationen von NRAS/BRAF und NRAS/c-KIT. Dies ist erstaunlich, da allgemein angenommen wird, dass sich zwei aktivierende Treibermutationen gegenseitig ausschließen.

Die mediane Dauer bis zur Entwicklung einer Primärmetastasierung ab Erstdiagnose betrug in unserer Studienpopulation 12,00 Monate. Wir konnten aufzeigen, dass NRAS-Mutationen beim Melanom zu einer ausgeprägten lokoregionalen und frühen cerebralen Metastasierung führen ($p < 0,0001$). Um ein Genotyp-spezifisches Metastasierungsmuster identifizieren zu können, erfolgte eine Stratifizierung der Primärmetastasierung unserer Studienpopulation konkordant zu den vier NRAS-Hauptgenotypen Q61H, Q61K, Q61L und Q61R. Unseren Ergebnissen zufolge scheint für Patienten mit einer NRAS Q61H Mutation eine Tendenz zu bestehen, keine oder lokoregionäre Metastasen zu entwickeln. Für Patienten mit einer NRAS Q61K Mutation hingegen kann ein lokoregionales bzw. viszerales Metastasierungsmuster als wahrscheinlich

angenommen werden. Für Patienten mit einer NRAS Q61L Mutation lässt sich eine Korrelation zu lokoregionalen und cerebralen Metastasen ableiten. Allein für NRAS Q61R Patienten besteht ein diffuses Metastasierungsmuster, das zu keinen oder zu jeder Art von Metastasen führt. Eine solche Stratifizierung spiegelt sich in der aktuellen Literatur nicht wider. Wir konnten somit erstmals ein Genotyp-spezifisches Metastasierungsmuster für NRAS-mutierte Melanompatienten in Abhängigkeit spezifischer NRAS-Mutationen identifizieren.

Das Melanom-spezifische Gesamtüberleben nach 5 Jahren betrug im Schätzverfahren nach Kaplan-Meier 62,9% (Q61L: 80,7%, Q61H: 71,4%, Q61R: 62,0%, Q61K: 57,6%). In den 10-Jahres-Daten sank das OS für die Gesamtkohorte auf 46,7%. Das Gesamtüberleben nach NRAS-Genotypen folgte dabei der 5-Jahres-Analyse.

Anhand einer multivariaten Cox-Regression überprüften wir Einflussfaktoren auf das Gesamtüberleben. Als signifikante Faktoren für ein verkürztes OS konnten wir den NRAS Genotyp Q61K (Hazard Ratio 1,467), die Lokalisation des Primärtumors im Kopf-/Halsbereich (Hazard Ratio 1,706) sowie ein Lebensalter von 71-80 Jahren (Hazard Ratio 1,274) ermitteln. Als reziproken und damit positiv prognostischen Prädiktor identifizierten wir den Genotyp Q61L (Hazard Ratio 0,357). Dies ist überraschend, da wir im Rahmen dieser Studie auch feststellen konnten, dass dieser Genotyp ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Hirnmetastasen aufweist und das Erreichen eines Stadium IV M1D als limitierender Faktor im Gesamtüberleben gilt.

Insgesamt 34,87% der Studienpopulation erhielten eine systemische Therapie. Hinsichtlich der Systemtherapeutika wurde in 3 Gruppen unterschieden: 1. Chemotherapeutika, 2. Immuntherapien und 3. zielgerichtete Therapien. In der *First-Line*-Therapie konnte ein medianes progressionsfreies Überleben (PFS) von 4,00 Monaten für die Gesamtkohorte ermittelt werden. In der Substanzklassenanalyse wiesen immuntherapeutisch behandelte Patienten mit 7,50 Monaten das längste PFS auf. Für chemotherapeutisch bzw. zielgerichtet therapierte Patienten ließ sich ein PFS von 2,00 bzw. 3,50 Monaten feststellen ($p < 0,0001$). In der *Second-Line*-Therapie betrug das PFS für die Gesamtkohorte 5,00 Monate. Patienten unter Chemotherapie bzw. zielgerichteter Therapie wiesen ein PFS von 3,00 Monaten bzw. 4,00 auf. Die Gruppe der Immuntherapierten erreichte ein PFS von 5,50 Monaten ($p = 0,901$).

Auffällig war, dass das PFS bei unseren Patienten in fortgeschrittenen Therapielinien unter Therapie mit einem MEK-Inhibitor zunahm (max. 8 Monate in 3. Therapielinie bzw. 7 Monate in 4. Therapielinie) – auch wenn diese Ergebnisse keine statistische Signifikanz erreichten.

Um zu evaluieren, ob Patienten mit einer NRAS-Mutation von einer bestimmten Immuntherapie in der *First-* bzw. *Second-Line*-Therapie profitieren, haben wir das PFS konkordant zu den Therapieschemata CTLA-4-Antikörper, PD1-Antikörper oder Immunkombinationstherapie (CTLA-4-AK + PD1-AK) untersucht. Hier zeigte sich, dass NRAS-Mutierte in der

Erstlinientherapie von einer Checkpoint-Inhibition mit einem PD1-Antikörper (Mono oder in Kombination mit CTLA-4) profitieren ($p=0,0025$), in der Zweitlinie hingegen von einer Monotherapie mit Ipilimumab im Vergleich zur Immunkombinationstherapie ($p=0,4552$).

Insgesamt 11,73% der der Studienpatienten erkrankten an einem Zweitmalignom. Der Wert ist im Vergleich zu publizierten Daten um knapp das 10-fache erhöht und sollte Anlass für weitere Untersuchungen sein. Eine Assoziation bestimmter Zweitneoplasien zu einem spezifischen NRAS-Genotyp konnten wir nicht feststellen.

2. Einleitung

2.1 Das maligne Melanom

Etymologisch leitet sich der Begriff „Melanom“ vom altgriechischen Terminus „mélas“ ab und bedeutet sinngemäß „schwarz“². Die ersten datierten Aufzeichnungen hierzu finden sich in den Papyri von Hippokrates von Kos aus dem 5. Jh. v.Chr.³.

Das maligne Melanom ist eine bösartige Neoplasie, die von den pigmentbildenden Zellen der basalen Epidermis, den Melanozyten, ausgeht und eine hohe Tendenz zur Metastasierung aufweist⁴. Die Manifestation erfolgt vornehmlich an der Haut, seltener kann es aber auch an Schleimhäuten, den Meningen oder am Auge auftreten. Eine Sonderform stellt das nicht pigmentierte, amelanotische Melanom dar⁵.

Das im Volksmund als „schwarzer Hautkrebs“ bezeichnete maligne Melanom gilt als aggressivster Hauttumor, der bereits bei Tumoreindringtiefen von wenigen Millimetern zu einer lymphogenen und/oder hämatogenen Metastasierung führen oder letal verlaufen kann. Auch Spätmetastasierungen Jahre oder Jahrzehnte nach Erstdiagnose sind möglich^{5,6}.

Anders als Thomas Fawdington vor knapp 200 Jahren stehen wir heutzutage in Bezug auf das maligne Melanom nicht mehr ganz im Dunkeln, da in den vergangenen 30 Jahren zahlreiche Erkenntnisse über die Tumorbilogie dieser Neoplasie gewonnen werden konnten, welche den Verlauf der Erkrankung der betroffenen Patienten günstig beeinflussen können.

Die wohl rasanteste Entwicklung erfolgte in den letzten fünf Jahren durch die Implementierung zielgerichteter, mutationsabhängiger Therapien, sog. *targeted drugs*, sowie immunmodulierender Substanzen, sog. Checkpointinhibitoren, in den klinischen Alltag. Zu den zielgerichteten Therapien zählen unter anderem BRAF- und MEK-Inhibitoren, zu den Checkpointinhibitoren hingegen PD1-, PDL1- und CTLA4-Antikörper.

Diese Substanzen sind als Meilensteine in der onkologischen Therapie anzusehen, da sie das Langzeitüberleben von fernmetastasierten Melanompatienten deutlich verlängern. Sukzessive werden diese Therapien nun auch für andere Tumorentitäten eingesetzt und auf ihre Wirksamkeit in klinischen Studien überprüft.

Gekrönt wurde diese Evolution mit Verleihung des Nobelpreises für Medizin im Jahre 2018 an James P. Allison und Tasuku Honjo für ihre Forschungen und die Entwicklung der CTLA4- und PD1-Antikörper.

Trotz dieser Innovationen stellt das Melanom bis heute eine Bedrohung für die betroffenen Patienten und eine Herausforderung für die onkologisch tätigen Ärzten dar, da das Melanom weiterhin für 90% aller durch Hautkrebs verursachten Todesfälle verantwortlich ist⁷⁻⁹.

2.1.1. Epidemiologie

Die Inzidenz des malignen Melanoms hat in den vergangenen Jahren stark zugenommen ¹⁰. Galt das Melanom noch vor drei Jahrzehnten als seltener Tumor, rangiert es heutzutage unter den zehn häufigsten soliden Tumorentitäten in Deutschland ^{11,12} und betrifft vornehmlich die kaukasische Bevölkerung ^{11,13,14}.

Wie den aktuellen Daten des Zentrums für Krebsregisterdaten und des Robert-Koch-Instituts aus dem Jahre 2017 zu entnehmen ist, hat das maligne Melanom der Haut bei Männern und Frauen in Deutschland mittlerweile Platz 5 der häufigsten Tumorentitäten in Bezug auf alle Krebsneuerkrankungen eingenommen. Der prozentuale Anteil liegt bei 4,4% bei Männern und 4,5% bei Frauen ¹⁵.

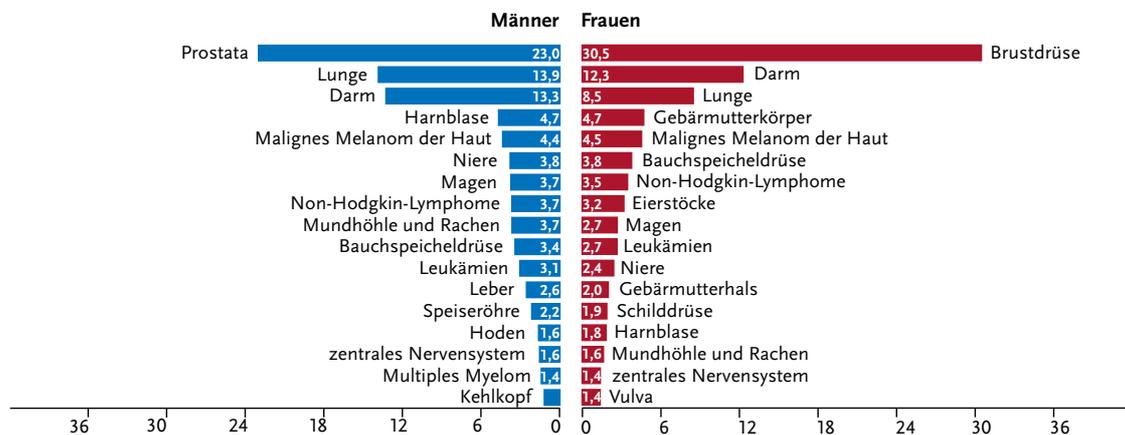


Abbildung 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorentitäten an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2014 (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs) (Abbildung und Legende aus ¹⁵).

In Europa liegt die Inzidenz bei 6 bis 24 Fällen/ 100.000 Einwohner pro Jahr ¹⁶, wobei bislang ein Nord-Süd-Gefälle zu beobachten war: In skandinavischen Ländern fanden sich die höchsten, im Mittelmeerraum hingegen die niedrigsten Inzidenzraten ^{17,18}.

Sacchetto et al. konnten in ihrer Studie aus dem Jahre 2018 diesen geographischen Trend widerlegen, da innerhalb der 18 beitragenden nationalen Krebsregister in den Jahren 1995-2012 die höchste Inzidenz mit 24 Fällen/ 100.000 Einwohnern in der Schweiz zu verzeichnen war ¹⁶. In der Spitzengruppe fanden sich darüber hinaus Norwegen und Nordirland. England, Irland und Deutschland lagen hingegen im Mittelfeld. Island und Irland rangierten neben Italien und Spanien in der Schlussgruppe mit den niedrigsten Inzidenzzahlen.

Deutschland liegt der Studiengruppe zufolge mit 14,6 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr bei Männern respektive 13,9 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr bei Frauen im Mittelfeld (gruppierte Inzidenzzahlen aus den Jahren 1995 bis 2012) ¹⁶.

Die weltweit höchsten Inzidenzraten mit 50-60 Fällen pro 100.000 Einwohnern und Jahr werden in Australien verzeichnet ^{11,19}. Gefolgt von Neuseeland, Südafrika, Europa und den Vereinigten Staaten von Amerika ²⁰.

In Australien konnten MacLennan et al. 1992 43 Fälle für Frauen und 56 Fälle für Männer pro 100.000 Einwohner zählen. In der Altersgruppe der 14-45 Jährigen gilt das Melanom hier als die häufigste Tumorerkrankung und ist unabhängig der altersbezogenen Subgruppenanalysen die dritthäufigste Neoplasie bei Frauen und die vierthäufigste bei Männern ²¹.

Für den Zeitraum 1999-2014 findet sich in Deutschland ein Anstieg der Erkrankungsraten von 13,7 auf 19,5 Fälle bei Männern pro 100.000 Einwohner pro Jahr und von 16,5 auf 18,6 Fälle bei Frauen pro 100.000 Einwohner pro Jahr ^{7,15}. Vergleicht man diese Zahlen mit dem Beginn der zentralen Registrierung im Saarländischen Krebsregister aus dem Jahr 1970 mit drei Fällen/ 100.000 Einwohner pro Jahr ergibt sich eine Versiebenfachung der Inzidenz in den vergangenen vier Jahrzehnten ⁷. Prognostisch wird eine Verdopplung der Inzidenzzahlen bei Männern in den kommenden 20 Jahren und eine Verdreifachung bei Frauen in den nächsten 20 bzw. 30 Jahren erwartet ^{7,17}.

Aktuell und prognostisch sind in Deutschland mehr Männer als Frauen von einem malignen Melanom betroffen. Etwa 10.910 Männer und 10.310 Frauen erkrankten 2014 an einem Melanom. Das Erkrankungsalter liegt mit 67 Jahren bei Männern im Median um sieben Jahre höher als bei Frauen mit 60 Jahren ¹⁵.

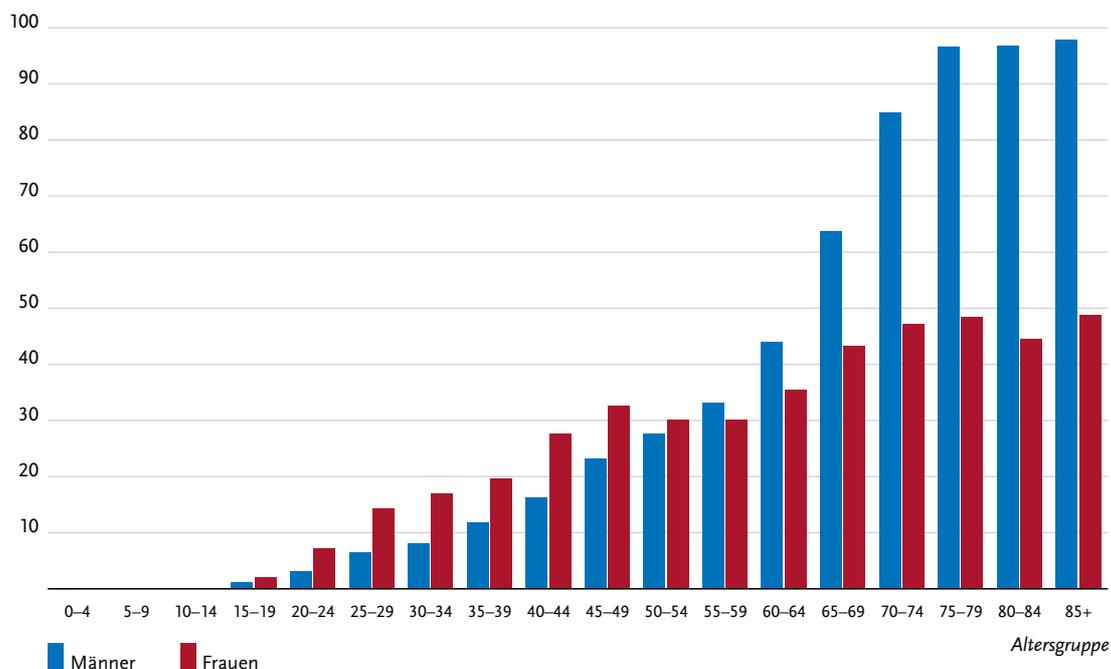


Abbildung 2: Altersspezifische Erkrankungsraten nach Geschlecht, ICD-10 C43, Deutschland 2013-2014, je 100.000 (Abbildung und Legende aus ¹⁵).

Die altersspezifischen Erkrankungsrate nach Geschlecht zeigen gleichermaßen einen Erkrankungsgipfel von Männern und Frauen in der 8. Lebensdekade. Bei Frauen bestehen jedoch zwischen dem 65. und 85. Lebensjahr ähnliche Erkrankungsrate im Vergleich zu Männern, bei denen eine sprunghafte Inzidenz ab dem 65. Lebensjahr zu verzeichnen ist (Vgl. Abbildung 2).

Kinder und Jugendliche sind selten von einem malignen Melanom betroffen ^{15,22}. Bei jungen Erwachsenen hingegen ist das Melanom eine der häufigsten Formen von bösartigen Neubildungen ¹⁵. Besorgniserregend ist die deutlich stärkere Zunahme des malignen Melanoms bei jüngeren Frauen.

In Bezug auf die Mortalität sind die Sterberaten seit den 1990er Jahren annähernd konstant geblieben (Vgl. Abbildung 3 und 4). So betrug die standardisierte Sterberate für Männer im Jahr 2009 2,6%, im Jahr 2014 hingegen 2,9%. Für Frauen gelten analog Sterberaten von 1,7% im Jahr 2009 vs. 1,7% im Jahr 2014 ^{15,23}.

Abbildung 3

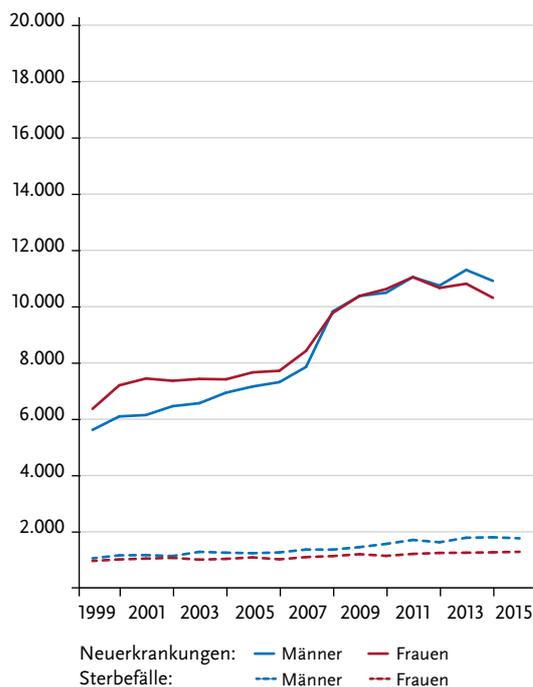


Abbildung 4

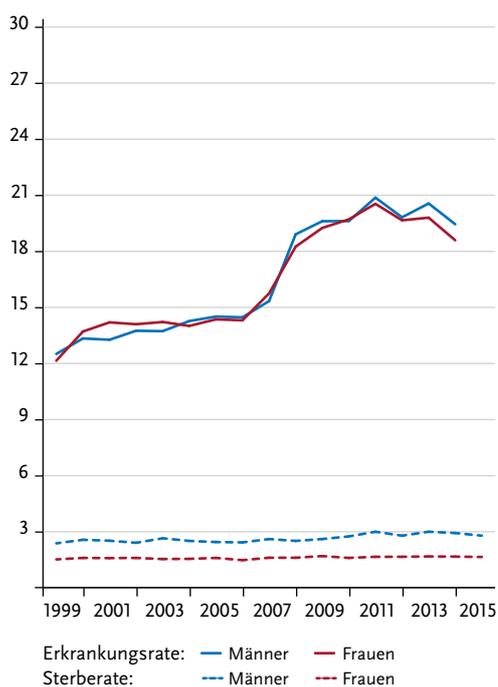


Abbildung 3: Absolute Zahl der Neuerkrankungs- und Sterbefälle, nach Geschlecht, ICD-10 C43, Deutschland 1999 – 2014/2015 (Abbildung und Legende aus ¹⁵).

Abbildung 4: Altersstandardisierte Erkrankungs- und Sterberaten, nach Geschlecht, ICD-10 C43, Deutschland 1999 – 2014/2015, je 100.000 (Europastandard) (Abbildung und Legende aus ¹⁵).

2.1.2. Risikofaktoren

Die Genese eines malignen Melanoms ist multifaktoriell und wird durch verschiedene exogene und endogene Risikofaktoren bedingt.

Als wichtigster exogener Faktor für die Entstehung maligner Melanome wird ultraviolette Strahlung (v.a. UV-B) diskutiert^{24,25}. Hierbei wird vor allem der intermittierenden UV-Belastung durch häufige Sonnenbrände in der Kindheit und Jugend eine tragende Rolle beigemessen, mehr noch als einer chronisch-kumulativen UV-Exposition²⁶⁻²⁸. Dennoch besteht Uneinigkeit in puncto Expositionsdauer, -frequenz und -intensität.

Harrison²⁹ und Garbe³⁰ betonen in ihren Studien, dass vor allem die kumulative Dauer der UV-Exposition einen assoziativen Parameter darstellt. Wiecker³¹ hingegen konnte in einer Studie mit 1812 Kindergartenkindern nachweisen, dass bereits eine geringe UV-Exposition zur Induktion von melanozytären Nävi ausreicht. Eine Kausalität zwischen multiplen melanozytären Nävi und der Entwicklung von Melanomen konnte bereits 1986 von Swerdlow postuliert werden³².

Es gilt als gesichert, dass nicht nur natürliches, sondern auch künstliches UV-Licht (z.B. durch den Besuch von Solarien) das Risiko, an einem malignen Melanom zu erkranken, beträchtlich erhöht^{33,34}. Auch unser verändertes Freizeitverhalten mit vermehrten Urlauben in sonnenreichen Ländern führt zu einer erhöhten Inzidenz an Melanomerkrankungen³⁵.

Die Mehrheit der Melanome entsteht *de novo* auf gesunder Haut und scheint durch epigenetische Faktoren induziert zu sein. 30% entwickeln sich jedoch auf Basis eines vorbestehenden Pigmentmals³⁶.

Als wichtigster endogener Faktor gilt die Anzahl an melanozytären Nävi. Gandini et al. konnten in einer Metaanalyse ein siebenfach erhöhtes Melanomrisiko für Menschen mit >100 melanozytären Nävi feststellen^{37,38}.

Eine hohe Anzahl an (atypischen) melanozytären Nävi kann mit einer familiären Disposition assoziiert sein (FAMMM-Syndrom, familiäres atypisches multiples Muttermal- und Melanomsyndrom). Ein FAMMM-Syndrom besteht, wenn zwei oder mehr direkte Verwandte an einem Melanom erkrankt sind³⁹. Eine genetische Prädisposition kann bei 5-10% aller Melanomerkrankten nachgewiesen werden^{40,41}.

Ferner gilt der Hauttyp I nach Fitzpatrick (helle Hautfarbe, blaue Augen, geringes Pigmentierungsverhalten, häufige Sonnenbrände) als Risikofaktor für die Entwicklung eines Melanoms⁴².

Auch die Erkrankung „Xeroderma pigmentosum“ gilt als hereditärer Risikofaktor: Es handelt sich um eine autosomal dominant vererbte Erkrankung, die bei den Betroffenen aufgrund einer

defekten DNA-Reparatur nach UV-Exposition zu einer solaren Elastose führt. Konsekutiv entwickeln diese Patienten melanozytäre und epitheliale Hauttumore (Melanome, Basalzellkarzinome und/oder kutane Plattenepithelkarzinome) ⁴³.

2.1.3. Klinik

Die Diagnose eines malignen Melanoms wird klinisch unter Beachtung der Anamnese und Zuhilfenahme der Dermatoskopie gestellt. In Tabelle 1 sind die Kriterien zur Diagnose eines malignen Melanoms dargestellt.

In der Anamnese berichten die Patienten meist von einem neu aufgetretenen Pigmentmal oder Veränderungen eines vorbestehenden Muttermals.

Unterstützend kann der Untersucher die ABCDE – Regel (Vgl. Tabelle 2) zur Diagnosestellung einbeziehen, die erstmals 1985 von Friedman et al. publiziert ⁴⁴ und 2004 von Abbasi et al. um das Kriterium *Evolution* (E) ergänzt wurde ⁴⁵. Treffen zwei der fünf Kriterien zu, ist eine weitere Diagnostik und die Exzisionsbiopsie der suspekten Hautläsion angezeigt.

Weitere klinische Anzeichen für das Vorliegen eines malignen Melanoms können darüberhinaus verstärkter Juckreiz oder spontane Blutungen der Hautveränderung sein. Auch Erosionen oder eine Ulzeration können einen Anhalt für eine maligne Entartung eines Nävuszellnävus bieten.

Tabelle 1: Klinische Kriterien zur Diagnose des Melanoms, modifiziert nach Kerl, H. ⁴⁶.

Frühstadien	Fortgeschrittene Melanome
<ul style="list-style-type: none"> • Asymmetrischer, unscharf und unregelmäßig begrenzter Fleck • Variables Pigmentmuster mit verschiedenen Farbnuancen • Durchmesser > 5mm 	<ul style="list-style-type: none"> • Exophytischer Knoten (dunkelbraun bis schwarz, blaurot) • Flacher, bräunlich-schwarzer, unscharfer Rand • Entzündung, Ulzeration, Blutung • Weiße Areale (Regression) • Schon länger vorher bestehendes Muttermal

Tabelle 2: ABCDE – Regel bei malignem Melanom, modifiziert nach Czeschik, JC. ⁴⁷.

ABCDE – Regel		Klinisch
A	<i>Asymmetry</i> (Asymmetrie)	Asymmetrischer Umriss der Läsion
B	<i>Border</i> (Begrenzung)	Unscharfe Begrenzung, Ausläufer
C	<i>Colour</i> (Farbe)	Mehrere Farbtöne innerhalb der Läsion bzw. dunklere Färbung im Vergleich zu anderen Nävi des Patienten
D	<i>Diameter</i> (Durchmesser)	Größter Durchmesser > 5mm
E	<i>Evolution</i> (Erhabenheit/Entwicklung)	Erhabenheit der Hautveränderung über das umgebende Hautniveau bzw. Veränderung einer bestehenden Läsion

2.1.4. Klassifizierung

In der Einteilung nach Clark aus dem Jahre 1969 wird das maligne Melanom hinsichtlich seiner klinisch-pathologischen Charakteristika in drei Gruppen unterschieden. Das superfiziell spreitende Melanom (SSM), das noduläre maligne Melanom (NMM) sowie das Lentigo-maligna Melanom (LMM) ⁴⁸. Ergänzt wurde diese Typisierung 1980 von Coleman et al. um das akral-lentiginöse Melanom, das sog. ALM ⁴⁹. Diese Einteilung stellt bis heute die Grundlage der dermatopathologischen Begutachtung dar und umfasst mehr als 90% der diagnostizierten Melanome ¹⁷ (Vgl. Tabelle 3).

In den folgenden Jahren konnten Sonderformen wie das amelanotische Melanom, das okuläre Melanom, das Schleimhautmelanom und das desmoplastische Melanom detektiert und als eigenständige Tumorentitäten beschrieben werden. Die Gruppe der Sonderformen macht etwa 6% aller Melanome aus ¹⁷.

Bezüglich Lokalisation, Wachstumsverhalten und Entwicklung weisen die histologischen Subtypen Unterschiede auf, die im Folgenden näher charakterisiert werden sollen.

Tabelle 3: Histologische Subtypen kutaner Melanome, modifiziert nach Garbe, C. ¹⁷.

Histologischer Subtyp kutaner Melanome		Anzahl	Prozent	Alter (Median)
Superfiziell spreitendes Melanom	SSM	41.013	58,6 %	54
Noduläres malignes Melanom	NMM	14.398	20,6 %	59
Lentigo-maligna Melanom	LMM	7511	10,7 %	69
Akral-lentiginöses Melanom	ALM	2897	4,2 %	65
andere		4143	5,9 %	54
Total		69.962	100,0%	

2.1.4.1. Superfiziell spreitendes Melanom

Das superfiziell spreitende Melanom (SSM) ist mit knapp 59% der häufigste Subtyp des Melanoms und wird bei jüngeren Patienten gefunden. Im Median liegt das Erkrankungsalter bei 54 Jahren ¹⁷.

Es manifestiert sich bevorzugt am Rumpf und stellt sich als unscharf begrenzte, asymmetrische, teils polyzyklische Makula mit inhomogenem Pigmentnetz dar. Die Colorierung changiert von rötlich-braun bis schwarz, weist aber auch blau-graue und/oder weißliche Areale auf. Letztgenannte weisen auf Regressionszonen hin und kommen beim SSM häufig vor ⁵⁰.

Eine verruköse Oberfläche bzw. exzentrisch gelegene, papulöse Anteile können laut Czarnecki et al. auf ein invasives Wachstum hindeuten ⁵¹.

Histopathologisch weist das SSM zunächst ein primär horizontales Wachstum auf, das initial als Melanoma in situ bezeichnet wird. Diese radiale Wachstumsphase ist gekennzeichnet von einer ausgeprägten transepidermalen Migration von Tumorzellen und einer unscharfen, seitlichen Begrenzung ^{50,52}.

Im Verlauf wird das Wachstum vertikal, atypische Melanozyten mit pleomorphen Kernen liegen einzeln oder als Nester mit pagetoider Durchwanderung der Epidermis vor ⁵². Kommt es zur Ablösung einzelner Zellen oder Nester und Evasion in die tieferen dermalen Strukturen unter Überwindung der Basalmembran, liegt ein invasives Melanom mit Potenz zur Metastasierung vor ^{50,52,53}. Ein lymphozytäres Entzündungsinfiltrat mit Beimengung von Plasmazellen ist charakteristischerweise im oberen Korium zu finden ^{50,52}.

2.1.4.2. Noduläres malignes Melanom

Bei dem nodulären malignen Melanom (NMM) handelt es sich um den zweithäufigsten Melanomtyp mit einem Anteil von ca. 21%. Im Median liegt das Erkrankungsalter bei diesem Subtyp bei 59 Jahren ¹⁷.

Im Gegensatz zum SSM erfolgt das Tumorwachstum beim nodulären malignen Melanom i.d.R. ohne horizontale Wachstumsphase, sondern primär vertikal ⁵⁰. Aufgrund seiner frühzeitigen Tiefenausdehnung konnte das noduläre maligne Melanom als aggressivster histologischer Subtyp mit rascher Tendenz zur Metastasierung identifiziert werden ⁵⁴. Golger et al. leiteten hieraus eine deutlich schlechtere Prognose für betroffene Patienten im Vergleich zu den anderen histologischen Subtypen ab (Hazard-Ratio 1,61) ⁵⁵.

Die Entwicklung eines nodulären malignen Melanoms kann ebenso wie das SSM *de novo* auf gesunder Haut, aber auch sekundär auf bestehenden Nävuszellnävi oder vorbestehenden Melanomen (SSM, LMM) erfolgen ^{5,52}.

Klinisch zeigt sich zumeist eine rasch größer werdende Papel, die sich im Verlauf zu einem dunkelbraun bis blau-schwarz pigmentierten Knötchen mit oder ohne zentraler Ulzeration entwickelt ⁵⁶.

Histopathologisch finden sich polymorphe Melanozyten, die sich in einer nodulären Formation in die Dermis ausbreiten ⁵⁰. Die Melanozyten erscheinen in „rasenartige[n] Verbände[n] und in Nestern unterschiedlicher Größe“ ⁵² organisiert.

Neben der Kernpleomorphie und vermehrtem Zytoplasma der Melanozyten zählt die Atrophie bzw. Ulzeration der Epidermis zu den Kennzeichen dieses Subtyps ⁵². Ein periläsionäres, lymphozytäres Infiltrat ist oft nicht nachweisbar ⁵⁰.

2.1.4.3. Lentigo-maligna Melanom

Lentigo-maligna Melanome (LMM) sind gekennzeichnet durch ihre Lokalisation an sonnenexponierter Haut und treten vorzugsweise im Kopf-Hals-Bereich bei älteren Patienten auf. Mit knapp 11% ist es der dritthäufigste Melanomtyp ¹⁷.

Zumeist entwickelt sich das LMM aus einer pigmentierten Präkanzerose, der Lentigo-maligna ^{57,58}. Mit einem medianen Erkrankungsalter von 69 Jahren, tritt das Lentigo-maligna Melanom durchschnittlich 15 Jahre später auf als das SSM.

Klinisch zeigt sich meist eine über Jahre horizontal wachsende hell- bis dunkelbraun pigmentierte, unscharf begrenzte Makula ^{50,58}. Bilden sich im Verlauf dunkelbraun bis schwarze Knötchen aus oder kommt es zur Ulzeration, spricht dies für die Umwandlung in ein Lentigo-maligna Melanom und ein infiltratives Wachstum ^{50,58}.

Das histopathologische Bild ist von einer markanten solaren Elastose geprägt, die Epidermis erscheint atroph ^{52,58}. Die pleomorphen Melanozyten stehen in der Basalzellschicht in unregelmäßigen Abständen meist einzellig, können aber auch kettenartig gereiht oder in Nestern vorkommen ⁵². Sie weisen chromatindichte Nuclei, eine Kernpleomorphie und ein optisch leeres Zytoplasma auf ⁵². Die für Melanome typische transdermale Migration melanozytärer Zellen ist nur schwach ausgeprägt, hingegen kann eine Ausbreitung der Tumorzellen entlang des Follikel-epithels beobachtet werden ⁵². Wie beim SSM findet sich hier ein periläsionäres lymphozytäres Infiltrat ⁵⁰.

2.1.4.4. Akral-lentiginöses Melanom

Das akral-lentiginöse Melanom (ALM) zählt mit 4,2% aller Melanome zu den eher seltenen Formen. Das mediane Erkrankungsalter liegt bei 65 Jahren ¹⁷.

Es ist definiert durch seine Manifestation an Handflächen und Fußsohlen, sowie durch sein peri- und subunguales Wachstum ⁵⁹.

Das klinische Erscheinungsbild eines ALM ist mannigfaltig, wodurch diese Tumorentität häufig erst spät diagnostiziert und bisweilen mit Hämatomen, Onychomykosen oder bakteriellen Infektionen am Nagelorgan verwechselt wird.

Initial kann sich ein akral-lentiginöses Melanom in Form unscheinbarer braun bis braunschwarzer Makulae äußern, ähnlich harmloser Lentiginos ¹². Mit Größenzunahme finden sich Charakteristika ähnlich einem SSM. Häufig wird die Diagnose jedoch erst bei Ausbildung von Knoten oder Ulzeration gestellt ⁵⁰.

Subunguale Melanome zeigen häufig eine striäre, bräunlich-schwarze Pigmentierung des Nagels von proximal nach distal im Sinne einer Melanonychia striata longitudinalis ⁴⁶. Eine Hyperpigmentierung der Cuticula und des proximalen Nagelfalzes wird als positives Hutchinson-Zeichen definiert ⁶⁰ und dient als klinisches Charakteristikum zur Differenzierung benigner und maligner Veränderungen am Nagelorgan.

Histopathologisch zeigt sich eine Akanthose und Hyperkeratose der Epidermis neben einer Proliferation atypischer Melanozyten im Bereich der dermoepidermalen Junctionszone ⁴⁶. Die Läsionen sind seitlich unscharf begrenzt und weisen einzelzellige, im Verlauf in Nestern gruppierte, atypische Melanozyten in allen Schichten der Epidermis auf. In der Dermis ist ein lymphozytäres Entzündungsinfiltrat zu finden ^{46,52}.

2.1.5. Einteilung nach der AJCC-Klassifikation (2017)

Die klinische Klassifikation eines malignen Melanoms erfolgt nach der aktuellen TNM-Klassifikation der Internationalen Vereinigung gegen Krebs (UICC), die Stadieneinteilung nach den Guidelines des *American Joint Committee on Cancer* (AJCC).

Die AJCC-Klassifikation wurde zuletzt 2017 (8th edition) aktualisiert ⁶¹ und beruht auf den Parametern Tumordicke nach Breslow, Ulzeration, regionäre Lymphknoten- und Fernmetastasierung. Das Charakteristikum „Mitoserate“ erhielt keinen weiteren Einzug in die aktuell geltende Klassifikation.

Mehrheitlich wurden die für diese Dissertation zugrundeliegenden Daten nach der „7th edition 2009“ erhoben, jedoch zur Homogenisierung und einheitlichen Auswertbarkeit in die aktuell geltende 8th edition überführt. In den Tabellen 4-7 ist die Stadieneinteilung nach der AJCC-Klassifikation 2017 (8th edition) dargestellt.

Tabelle 4: T-Stadium der TNM-Klassifikation maligner Melanome nach AJCC 8th ed., modifiziert nach Bristol-Myers Squibb ⁶², basierend auf Amin et al. 2017 ⁶³.

T	Tumordicke	Ulzerationsstatus
TX (Dicke des Primärtumors kann nicht bewertet werden)	Kann nicht bewertet werden	Kann nicht bewertet werden
T0 (Primärtumor kann nicht nachgewiesen werden)	Kann nicht bewertet werden	Kann nicht bewertet werden
Tis (Melanom in situ)	Kann nicht bewertet werden	Kann nicht bewertet werden
T1	≤ 1,0 mm	Unbekannt oder unspezifiziert
T1a	< 0,8 mm	Ohne Ulzeration
T1b	< 0,8 mm 0,8 – 1,0 mm	Mit Ulzeration Mit oder ohne Ulzeration
T2	> 1,0 – 2,0mm	Unbekannt oder unspezifiziert
T2a	> 1,0 – 2,0 mm	Ohne Ulzeration
T2b	> 1,0 – 2,0 mm	Mit Ulzeration
T3	> 2,0 – 4,0 mm	Unbekannt oder unspezifiziert
T3a	> 2,0 – 4,0 mm	Ohne Ulzeration
T3b	> 2,0 – 4,0 mm	Mit Ulzeration
T4	> 4,0 mm	Unbekannt oder unspezifiziert
T4a	> 4,0 mm	Ohne Ulzeration
T4b	> 4,0 mm	Mit Ulzeration

Tabelle 5: N-Stadium der TNM-Klassifikation maligner Melanome nach AJCC 8th ed., modifiziert nach Bristol-Myers Squibb ⁶², basierend auf Amin et al. 2017 ⁶³.

N	Anzahl metastasierter Lymphknoten	In-Transit-, Satelliten- und/oder Mikrosatelliten-Metastasen
NX	Lokale Lymphknoten nicht bewertet	Nein
N0	Keine lokalen Metastasen festgestellt	Nein
N1	1	
N1a	1 klinisch okkult	Nein
N1b	1 klinisch detektiert	Nein
N1c	Erkrankung ohne lokale Metastasen	Ja
T2	2 oder 3	
N2a	2 oder 3 klinisch okkult	Nein
N2b	2 oder 3, mind. einer klinisch detektiert	Nein
N2c	Einer klinisch okkult oder detektiert	Ja
T3	4 oder mehr	
N3a	4 oder mehr klinisch okkult	Nein
N3b	4 oder mehr und einer davon klinisch nachgewiesen oder Konglomerat	Nein
N3c	2 oder mehrere klinisch okkult oder klinisch nachgewiesene und/oder das Auftreten beliebig vieler Konglomerate	Ja

Tabelle 6: M-Stadium der TNM-Klassifikation maligner Melanome nach AJCC 8th ed., modifiziert nach Bristol-Myers Squibb⁶², basierend auf Amin et al. 2017⁶³.

M	Lokalisation	Serum-Laktatdehydrogenase
M0	Keine nachgewiesenen Fernmetastasen	Kann nicht bewertet werden
M1a	Fernmetastasen der Haut, der Weichgewebe inkl. Muskeln und/oder nicht regionäre Lymphknoten	Nicht bestimmt oder unspezifiziert
M1a(0)		Nicht erhöht
M1a(1)		Erhöht
M1b	Lungenmetastase(n) mit oder ohne Erkrankung aus M1a	Nicht bestimmt oder unspezifiziert
M1b(0)		Nicht erhöht
M2b(1)		Erhöht
M1c	Fernmetastasen der viszeralen Lokalisationen außerhalb des ZNS mit und ohne Erkrankungen aus M1a und M1b	Nicht bestimmt oder unspezifiziert
M1c(0)		Nicht erhöht
M1c(1)		Erhöht
M1d	Fernmetastasen innerhalb des ZNS mit oder ohne Erkrankungen aus M1a, M1b oder M1c	Nicht bestimmt oder unspezifiziert
M1d(0)		Nicht erhöht
M1d(1)		Erhöht

Tabelle 7: Stadiengruppierung der TNM-Klassifikation maligner Melanome nach AJCC 8th ed., modifiziert nach Bristol-Myers Squibb⁶², basierend auf Amin et al. 2017⁶³.

Stadium	Klinische Stadieneinteilung			Pathologische Stadieneinteilung		
	T	N	M	T	N	M
0	Tis	N0	M0	Tis	N0	M0
I A	T1a	N0	M0	T1a	N0	M0
I B	T1b	N0	M0	T1b	N0	M0
	T2a	N0	M0	T2a	N0	M0
II A	T2b	N0	M0	T2b	N0	M0
	T3a	N0	M0	T3a	N0	M0
II B	T3b	N0	M0	T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0	T4a	N0	M0
II C	T4b	N0	M0	T4b	N0	M0
III	Jedes T	≥ N1	M0			
III A				T1a/b – T2a	N1a oder N2a	M0
III B				T0	N1b, N1c	M0
				T1a/b – T2a	N1b/c oder N2c	M0
III C				T2b / T3a	N1a – N2b	M0
				T0	N2b, N2c, N3b/c	M0
				T1a – T3a	N2c oder N3a/b/c	M0
				T3b/T4a	Jedes N ≥ N1	M0
				T4b	N1a – N2c	M0
III D				T4b	N3a/b/c	M0
IV	Jedes T, Tis	Jedes N	M1	Jedes T	Jedes N	M1

2.1.6. Prognose

Für die Prognose und Nachsorge eines Melanompatienten ist das diagnostizierte Stadium von Relevanz. Je früher ein Melanom erkannt und exzidiert wird, umso besser ist die Prognose des Betroffenen. Von immanenter Bedeutung ist hierbei die vertikale Tumordicke nach Breslow als wichtigster prognostischer Faktor. Im Folgenden sind die 5- und 10-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeiten (JÜR) nach der aktuell geltenden AJCC-Klassifikation aus dem Jahre 2017 (8th edition) dargestellt:

Tabelle 8: 5- und 10-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit nach Tumorstadium ⁶¹.

Tumorstadium	5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit	10-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit
IA	99%	98%
IB	97%	94%
IIA	94%	88%
IIB	87%	82%
IIC	82%	75%
IIIA	93%	88%
IIIB	83%	77%
IIIC	69%	60%
IIID	32%	24%
IV	n.a. *	n.a. *

* “Given the rapidly evolving landscape of treatment for stage IV melanoma in recent years, which already has resulted in significantly improved progression-free and overall survival for patients, the Melanoma Expert Panel strategically paused and did not establish a stage IV database or perform analyses of patients with stage IV disease. Instead new, clinically relevant M-category criteria were introduced into the eighth edition that will facilitate the refined collection of stage IV data, including more precise data collection for patients with CNS metastases” ⁶⁴.

Näherungsweise können derzeit für das Stadium IV nur die von Balch et al. aus der AJCC Klassifikation (7th edition) publizierte Daten aus 2009 herangezogen werden ⁶⁵. Die 1-Jahres-Überlebensrate beträgt hiernach 62% (M1a) bis 33% (M1c). Evidenzbasierte Daten zu der neu implementierten Kategorie M1d sowie Langzeitergebnisse zu den neuen Therapieregimen im Stadium IV liegen noch nicht vor. Mit positiveren Prognosen für diese Patientenkohorte ist jedoch zu rechnen.

Die Prognose im Stadium I gilt als exzellent (5-JÜR 97-99% respektive 10-JÜR 94-98%). Die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit sinkt jedoch mit höherer Tumordicke im Stadium II von 94% (IIA) auf 82% (IIC), respektive von 88% auf 75% nach 10 Jahren.

Munsch et coll. konnten ab einer Tumordicke >1,0mm eine deutlich größere Wahrscheinlichkeit für einen positiven Wächterlymphknoten (SLN) nachweisen⁶⁶. Bei Vorliegen von Lymphknotenmetastasen sinkt die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 93% (IIIA) auf 32% (IIID)⁶¹. Analog zeigt sich bei lokoregional metastasierten Melanompatienten nach 10 Jahren Prognoseverschlechterung von 88% (IIIA) auf 24% (IIID)⁶¹.

2.1.7. Mutationsanalysen

Aufgrund der schlechteren Prognose von Patienten im Stadium IIC, verglichen mit Patienten im Stadium IIIA und IIIB, werden im Hauttumorzentrum der Uniklinik Köln Mutationsanalysen bereits ab Stadium IIC und somit in früheren Tumorstadien veranlasst, als in der aktuellen S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms empfohlen (ab Stadium IIIB)⁷.

Hierbei wird mittels *new generation sequencing* (NGS) eine Sequenzierung der Tumor-DNA durchgeführt. Die für das maligne Melanom relevanten Treibermutationen sind BRAF, NRAS und c-KIT.

Mutationen im BRAF-Gen werden in 50% der Fälle gefunden^{67,68} und wurden 2002 erstmals von Davies et al. beschrieben⁶⁹. Bei BRAF handelt sich um eine Serin-Threonin-Proteinkinase, die im RAS/RAF/MEK/ERK-Signalkaskadeweg eine Schlüsselrolle für die Wachstumsregulation spielt. Die häufigsten Mutationen entstehen an Position V600 durch den Austausch der Aminosäure Valin gegen Glutamin (BRAF^{V600E}) bzw. Lysin (BRAF^{V600K}). Hierdurch kommt es zu einer konstitutiven Aktivierung der Proteinkinase und einer dauerhaften Hochregulation des Signalkaskadewegs, woraus ein unkontrolliertes Zellwachstum resultiert⁶⁹.

Das Protoonkogen NRAS zählt zu der Gruppe der G-Proteine und ist beim Melanom in 15-30% der Fälle mutiert^{68,70}. Das GTP-bindende Protein ist an der Signaltransduktion extrazellulärer Stimuli beteiligt und führt durch Mutation ebenfalls zu einer Überaktivierung des RAS/RAF/MEK/ERK-Signalkaskadewegs. Eine autonome Tumorzellproliferation ist die Folge^{71,72}. Neben somatischen Mutationen im Codon 12 und 13 (Exon 2) kommt eine Erbgutveränderung vor allem im Codon 61 (Exon3) vor (NRAS Q61)^{73,74}.

Die Tyrosinkinase c-KIT zählt zu den Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK's) und reguliert gleichfalls Zellproliferation und -wachstum. Mutationen an den Exonen 9, 11, 13 und 17 führen bei etwa 10 % der akralen und mukosalen Melanomen zu undifferenziertem Zellwachstum^{75,76}.

2.2 Diagnostik und Therapie

Besteht der Verdacht auf ein malignes Melanom, sollte eine unmittelbare Exzisionsbiopsie mit einem seitlichen Sicherheitsabstand von 1-3mm und Absetzung im subkutanen Fettgewebe mit dem Ziel einer R0-Resektion erfolgen ⁷⁷. Das Exzidat wird infolge einer histopathologischen Untersuchung zugeführt und mittels HMB45-, Melan-A- und S100b-Färbungen immunhistochemisch untersucht. Anhand der Immunhistochemie und den histologischen Kriterien (typische Musterbildungen, atypische melanozytäre Mitosen, Kernpolymorphismen und Regressionsphänomenen u.a.) kann die Diagnose „Melanom“ bestätigt und der histologische Subtyp bestimmt werden ⁵².

Je nach Tumordicke erfolgt anschließend eine Nachexzision (NEX) zur Erweiterung des Sicherheitsabstands. Laut der aktuellen *S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms des Leitlinienprogramms der Deutschen Krebsgesellschaft (AWMF)* ⁷ soll ein Melanoma in situ R0-reseziert sein. Eine weitere Nachexzision ist nicht erforderlich. Für Tumoren mit einer Tumordicke bis 2mm gilt ein Sicherheitsabstand von 1cm, bei >2mm Invasionsstiefe gilt eine NEX mit 2cm als Standardtherapie. Hierdurch sollen Rezidive vermieden und die Mortalität gesenkt werden ⁷⁸. Bei Tumoren deren Exzision operativ nicht möglich ist, bspw. bei Lentigo-maligna Melanomen im Kopf-Hals-Bereich, kann alternativ eine lokale Radiatio erfolgen ⁷. „Bei inoperablen R1-oder [sic!] R2-resezierten Primärtumoren kann [ebenfalls] eine Radiotherapie mit dem Ziel der lokalen Kontrolle eingesetzt werden“ ⁷.

Zusätzlich zur Nachexzision wird Patienten mit einer Tumoreindringtiefe ab 1,0mm eine Wächterlymphknotenbiopsie (*sentinel lymph node dissection*, SLND) empfohlen ⁷. Die AJCC-Klassifikation von 2018 empfiehlt diese bereits ab einer Tumordicke von 0,8mm ⁶³, so dass derzeit eine Diskrepanz zwischen den deutschen und den internationalen Leitlinien besteht. Die SLND sollte bei Patienten mit einer Tumordicke von 0,8-1,0mm nach individueller Risikoabschätzung und Aufklärung erfolgen. Für eine SLND wird präoperativ im Bereich der Primariusnarbe ein Nano-Kolloid mit ^{99m}Tc-Technetium injiziert, um die drainierenden Lymphbahnen sowie den Wächterlymphknoten (*sentinel lymph node*, SLN) mittels Gammasonde intraoperativ darstellen zu können.

Die SLND ist nicht nur für das pathologischen Staging und die Prognoseabschätzung von Relevanz ⁷⁹, sondern hat auch Implikationen auf eine mögliche adjuvante Therapie im Stadium III.

Bei negativem SLN erfolgt eine reguläre Nachsorge, eine elektive Lymphadenektomie (LAD) wird nicht empfohlen ⁷. Bei positivem SLN (mind. Stadium IIIA) wird bei einem Metastasendurchmesser >1mm eine radikale LAD empfohlen ⁷, sofern keine Fernmetastasen im Staging (mittels CT Thorax/Abdomen und MRT Schädel) nachgewiesen worden sind ⁸⁰. Bei isolierten

Tumorzellen oder Metastasen <1mm Durchmesser im SLN kann auf eine komplettierende LAD verzichtet werden, da eine Verbesserung des Gesamtüberlebens (*overall survival*, OS) in großen Kohortenstudien nicht festgestellt werden konnte (DeCOG-SLT Studie⁸¹, MSLT-II Studie⁸²). Eine postoperative Radiatio sollte erfolgen, wenn >3 Lymphknotenmetastasen oder ein Kapseldurchbruch vorliegen bzw. eine LK-Metastase einen Durchmesser >3cm aufweist⁷.

Die initiale Diagnostik beinhaltet eine Ganzkörperinspektion inkl. der einsehbaren Schleimhäute sowie die Palpation der Lymphknotenstationen cervikal, axillär und inguinal. Ab Stadium pT1b wird zusätzlich eine Sonographie der drainierenden Lymphknotenstationen sowie die Bestimmung der LDH und des Tumormarkers S-100b empfohlen⁷. Die Sonographie gilt als sensitivste Methode zur Detektion von Lymphknotenmetastasen und ist anderen radiologischen Verfahren, wie bspw. der Computertomographie, als überlegen einzuordnen⁸³. Eine Schnittbilduntersuchung mittels CT und/oder MRT als initiale Ausbreitungsdiagnostik wird erst bei einem Primärtumor mit Stadium pT4b (TD >4mm, mit Ulzeration) empfohlen⁷.

Nach Abschluss des pathologischen Stagings erfolgt die Eingruppierung der Patienten gemäß geltender TNM-Klassifikation in das jeweilige AJCC-Stadium und die stadienadaptierte Nachsorge (Vgl. Tabellen 7 und 9).

Ziel der Nachsorge ist die frühzeitige Detektion von weiteren, unabhängigen Primärmelanomen bzw. einer Metastasierung der Patienten. Hierzu gehören Lokalrezidive, Satelliten-Metastasen (in unmittelbarer Umgebung zum Primärtumor, bis 2cm Radius), In-transit-Metastasen (>2cm Entfernung zum Primärtumor, jedoch vor drainierender Lymphknotenstation), regionäre Lymphknotenmetastasen und/oder Fernmetastasen.

Da Melanome sowohl lymphogen als auch hämatogen metastasieren können sind Filiae an allen inneren Organen, aber auch in Knochen, dem Gehirn und an Haut und/oder Subkutis möglich^{5,6,53}. Eine Metastasierung wird in zwei Drittel der Fälle als lymphogene oder lokoregionale Tumorausbreitung evident, in etwa 30% als primäre Fernmetastasierung⁸⁴.

Bei Vorliegen von Fernmetastasen sollte in kurativer Intention die Schaffung einer operativen R0-Situation angestrebt werden⁷. Sollte dies nicht möglich sein, ist eine Systemtherapie indiziert⁷.

Tabelle 9: Nachsorgeschema am Hauttumorzentrum der Uniklinik Köln, Stand Dezember 2020.

Stadium	Körperliche Untersuchung			LK-Sonographie			Tumormarker S-100b			Bildgebung ^o			
	Jahr	1-3	4-5	6-10	1-3	4-5	6-10	1-3	4-5	6-10	1-3	4-5	6-10
IA	6- mtl	12- mtl	12- mtl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IB-IIB	3- mtl	6- mtl	6-12- mtl	6- mtl	-	-	3- mtl	-	-	-	-	-	-
IIC-IV*	3- mtl	3- mtl	6- mtl	3- mtl	6- mtl	-	3- mtl	6- mtl	-	6- mtl	-	-	-

Legende:

^oBildgebung mittels CT Thorax/Abdomen und cMRT, * für R0-resezierte Stadien, mtl = monatlich.

2.2.1. Adjuvante Therapie

Für Patienten mit R0-reseziertem malignen Melanom im Stadium IIB-IIC sowie Stadium IIIA-IIIIC besteht die Möglichkeit einer adjuvanten Therapie mit Interferon $\alpha 2a$. Das „*low-dose*“ Schema nach Kirkwood (3x 3Mio IE. Interferon $\alpha 2a$ sc./Woche über 18 Monate) galt lange Zeit als Goldstandard in der Adjuvans, da Studien ein längeres progressionsfreies Überleben (PFS) im Stadium II nachgewiesen haben ^{85,86}. Die Therapie mit pegyliertem Interferon im adjuvanten Setting zeigte zwar bei Patienten im Stadium III ein verlängertes PFS als die Beobachtungskohorte, hatte jedoch keinen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben ⁸⁷. Alternativ besteht für Patienten im Stadium III die Möglichkeit eines „*high-dose* Interferon“ Regimes mit Interferon $\alpha 2a$ (20 Mio. I.E./m² i.v. an Tag 1-5 über vier Wochen, anschließend 10 Mio. I.E./m² s.c. 3x/Woche über 11 Monate), jedoch verbunden mit einem deutlich erhöhtem Nebenwirkungsprofil ⁸⁸. Eine *high-dose* Interferontherapie gilt im Kontext der neuen Therapieoptionen mit Immuncheckpointinhibitoren und zielgerichteten Therapien („*targeted therapies*“) jedoch als archaisch ⁸⁹: Eggermont et al. konnten 2016 durch eine adjuvante Therapie mit dem CTLA-4 Antikörper Ipilimumab ein PFS von 40,8% nach fünf Jahren im Stadium III konstatieren (vs. 30,3% in der Placebogruppe) ⁹⁰. Eine kürzlich veröffentlichte Studie unterstreicht diese Ergebnisse mit Ipilimumab durch deutliche Verbesserung des PFS im Vgl. zur konventionellen Interferontherapie ⁹¹.

Neuere Studien belegen, dass adjuvante Therapien mit PD1-Inhibitoren zu einer signifikanten Verlängerung des progressionsfreien Intervalls im Vergleich zu Ipilimumab bzw. Placebo führen ^{92,93}. Konkret wies Pembrolizumab in einer Phase III Studie nach einem Jahr ein PFS von

75,4% gegenüber 61,0% in der Placebogruppe auf ⁹³. Nivolumab zeigte im Vergleich zu Ipilimumab nach einem Jahr ein progressionsfreies Überleben von 70,5% vs. 60,8% ⁹². Bei Vorliegen einer BRAF^{V600}-Mutation konnte durch die Studiengruppe um Georgina Long gezeigt werden, dass unter einer zielgerichteten Therapie mit Dabrafenib und Trametinib einerseits das Rezidivrisiko signifikant gesenkt und andererseits das PFS signifikant verlängert werden kann (PFS nach drei Jahren: Dabrafenib+Trametinib 58%, Placebo: 38%) ⁹⁴. Diese Erkenntnisse führten zur Zulassung von Nivolumab (Stadium IIIB, IIIC und IV) und Pembrolizumab (Stadium IIIA-C) im August bzw. Oktober 2018 in der adjuvanten Therapie des malignen Melanoms. Für BRAF-mutierte Melanompatienten erhielt die Kombinationstherapie aus Dabrafenib und Trametinib im August 2018 den positiven Bescheid zur adjuvanten Therapie im Stadium IIIA-IIIC. Interferon alpha (im *low-dose* Regime) hat jedoch weiterhin einen Stellenwert für Patienten im Stadium II, da weder Checkpointinhibitoren noch BRAF-/MEK-Inhibitor-Kombinationen hierfür derzeit eine Zulassung besitzen. Eine spezifische adjuvante Therapieoption für NRAS-mutierte Melanompatienten besteht nicht.

2.2.2. Palliative Therapie

Bei Vorliegen von isolierten Fernmetastasen sollte, wie bereits erwähnt, in kurativer Intention ein chirurgisches Vorgehen zur Schaffung einer R0-Situation gewählt werden ⁷. Für Patienten im Stadium III mit vereinzelt lokoregionalen, In-transit- oder Satellitenmetastasen gilt ein operativer Ansatz gleichfalls als Erstlinientherapie. Sollte sich ein inoperabler Befund zeigen, besteht die Möglichkeit einer lokalen Radiatio oder einer Therapie mit *talimogene laherparepvec* (T-VEC) ⁷. T-VEC ist ein onkolytisches Herpes-Virus, das 2015 in den USA und Europa zugelassen wurde ^{95,96}. Es handelt sich dabei um ein modifiziertes Herpes-simplex-Virus Typ 1, welches das Gen des Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierenden Faktors (GM-CSF) enthält und intraläsional injiziert wird. In loco führt die Produktion von GM-CSF zur Aktivierung und Rekrutierung von APC's (Antigenpräsentierende Zellen = Makrophagen, dendritische Zellen, Monozyten und B-Lymphozyten) wodurch eine antitumorale Immunantwort ausgelöst wird ⁹⁷. In der Phase III-Studie „OPTIM“ wurden Patienten in zwei Kohorten mit T-VEC intraläsional und GM-CSF subkutan behandelt. Die Heilungsrate (*durable response rate*, DRR) war bei T-VEC (13,0%) signifikant höher als in der Vergleichsgruppe mit GM-CSF (3,0%) ⁹⁸. Eine Studie von Andtbacka et al. aus dem Jahre 2015 konnte diese Ergebnisse bestätigen (16,3% vs. 2,1%) ⁹⁵. Das Gesamtüberleben (*overall survival*, OS) war hier bei T-VEC um 4,4 Monate länger als in der Vergleichsgruppe, jedoch ohne statistische Signifikanz ⁹⁵.

Wenngleich T-VEC in verschiedenen Studien zu einer Tumormassenreduktion in distanten (Organ-) Filiae führte^{98,99}, hat die europäische Zulassungsbehörde EMA (*European Medicines Agency*) im Gegensatz zur FDA (*Food and Drug Administration*) in den USA derzeit nur die Zulassung für die Stadien IIIB/C und IV M1a erteilt. In den USA besteht die uneingeschränkte Zulassung für die Stadien III und IV.

In diesem Kontext verlieren die weiterhin zugelassenen Therapieoptionen einer isolierten, hyperthermen Extremitätenperfusion oder einer Elektrochemotherapie mit Bleomycin bzw. Cisplatin an Bedeutung.

Wenn ein lokales Therapieverfahren im palliativen Setting nicht möglich ist, gilt eine Systemtherapie als indiziert. Vorrangig sollte hierbei der Einschluß in klinische Studien geprüft werden⁷.

2.2.3. Systemtherapie

Immuntherapien und zielgerichtete Therapien bilden gegenwärtig die Säulen der dermatologischen Therapie im fernmetastasierten Stadium und gelten als Meilensteine in der Onkologie. Galt noch vor wenigen Jahren die Chemotherapie mit Dacarbazin (DTIC) als etablierteste Behandlungsmethode im Stadium IV mit einem medianen Überleben von 8-12 Monaten, konnte durch den Paradigmenwechsel ein medianes Gesamtüberleben von 24 Monaten und mehr erzielt werden¹⁰⁰.

Das menschliche Immunsystem wird über sog. *immune checkpoints* reguliert¹⁰¹. Zwei für die Therapie des Melanoms wichtige Checkpoints sind CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) und PD-1 (*programmed cell death protein-1*). Sie fungieren als regulatorische Bremse des Immunsystems und führen zur seiner Herabregulation zum Schutz vor Autoimmunitätsreaktionen^{101,102}. Tumorzellen instrumentalisieren diesen Mechanismus, bspw. durch erhöhte Expression von PD-L1 (*programmed cell death protein-1 Ligand*), und schwächen die Effektorfunktion von T-Zellen und NK-Zellen durch Bindung an deren Rezeptoren¹⁰³. Gleiches gilt für das CTLA-4 Protein, das auf der Oberfläche von aktivierten CD4+ und CD8+ T-Zellen exprimiert wird¹⁰¹. Durch Blockade der Proteine kommt es zur Herabregulation der negativen *feedback*-Schleife und einer Induktion von Tumor-spezifischen T-Zellantworten durch Aktivierung und Proliferation von T-Zellen sowie einer gesteigerten Autoimmunität und letztlich zu einer reduzierten Toleranz gegenüber Tumorzellen^{102,104,105}.

2010 konnten Hodi et al. ein medianes Gesamtüberleben von 10,1 Monaten für Patienten unter Therapie mit dem CTLA-4 – Antikörper Ipilimumab feststellen¹⁰⁶. Noch ermutigendere Daten

lieferte die Studiengruppe um Caroline Robert und Georgina Long, die für die Therapie mit dem PD-1 – Antikörper Nivolumab ein 1-Jahres-Gesamtüberleben von 72,9% im Stadium IV nachweisen konnte (vs. 42,1% DTIC). Das PFS betrug 5,1 Monate für Nivolumab und 2,2 Monate in der Kontrollgruppe mit Dacarbazin. Die Ansprechrate für Nivolumab lag mit 40% signifikant höher als in der Kontrollgruppe mit 13,9% (DTIC) ¹⁰⁷.

Im selben Jahr konnte die gleiche Studiengruppe für den PD-1 – Antikörper Pembrolizumab ein 6-Monats-PFS von 47,3% demonstrieren (vs. 26,5% unter Ipilimumab). Die extrapolierten Daten zur 1-JÜR betragen 74,1% (Pembrolizumab) bzw. 58,2% (Ipilimumab) bei deutlich geringerer Toxizität als unter einer CTLA-4 – Monotherapie ¹⁰⁸. Die bisher besten Ergebnisse in Bezug auf das Gesamtüberleben konnten Hodi et al. 2016 durch die kombinierte Checkpoint-Inhibition mit Nivolumab und Ipilimumab feststellen: Das OS nach 24 Monaten betrug für therapienaive Patienten 63,8%. Die Vergleichsgruppe mit Ipilimumab in der Monotherapie erzielte ein OS von 53,6% ¹⁰⁹. Diese Daten wurden von Callahan et al. im Jahre 2018 bestätigt. In ihrem 3-Jahres *Follow-Up* wiesen sie ein OS unter Nivolumab + Ipilimumab von 63% und eine mediane Ansprechdauer von 22,3 Monaten nach ¹¹⁰.

Zudem mehren sich die Berichte über Komplettremissionen unter Immuncheckpoint-Blockade mit monoklonalen PD-1 – und CTLA-4 – Antikörpern ^{111,112}.

Aufgrund dieser Ergebnisse erfolgten die Zulassungen zur Behandlung von Melanompatienten im Stadium IV mit einem PD1-Antikörper (Nivolumab, Pembrolizumab) als Monotherapie oder in Kombination mit dem CTLA4-Antikörper Ipilimumab (Ipilimumab + Nivolumab) – unabhängig des Mutationsstatus ¹⁰⁷⁻¹⁰⁹.

Für Patienten mit einer BRAF^{V600}-Mutation besteht die Möglichkeit mittels *small molecules* alterierte Signalmoleküle des MAPK-Signalkaskadewegs zu adressieren und zu inhibieren ¹¹³⁻¹¹⁷.

In der BRIM-3 Studie aus 2011 konnte eine signifikante Verlängerung des OS nach sechs Monaten unter der Therapie mit Vemurafenib (BRAF-Inhibitor) im Vergleich zur Kontrollgruppe mit DTIC festgestellt werden (84% vs. 64%) ¹¹⁴. Die Ergebnisse wurden 2017 durch die Langzeitdaten der BRIM-3 Studie bestätigt (1-JÜR: 56% vs. 21%; 4-JÜR: 24% vs. 16%) ¹¹⁸.

In der Monotherapie mit dem BRAF-Inhibitor Dabrafenib zeigten sich ähnliche Ergebnisse wie Hauschild et al. 2012 in der Phase III-Studie „BREAK-III“ zeigen konnten ¹¹³. Das mediane PFS betrug 5,1 Monate unter BRAF-Inhibition vs. 2,7 Monate unter Chemotherapie mit DTIC. In der BREAK-II-Studie (Phase II) von 2013 erreichten Patienten mit einer BRAF^{V600E}-Mutation unter zielgerichteter Therapie mit Dabrafenib ein PFS von 6,3 Monaten und ein OS von 13,1 Monaten. Die Kohorte mit einer BRAF^{V600K}-Mutation erzielte ein PFS von 4,5 Monaten und ein OS von 12,9 Monaten ¹¹⁹.

Die Kombination von BRAF- und MEK-Inhibitoren konnte einerseits die Toxizität der BRAF-Inhibitoren senken und andererseits das PFS und OS signifikant verlängern ^{115,117,120}.

Die Kombination von Vemurafenib mit dem MEK-Inhibitor Cobimetinib wies ein signifikant höheres PFS als die Kontrollgruppe auf. Komplett- oder Teilremissionen konnten unter dieser zielgerichteten Therapie in 68% der Fälle erzielt werden ¹¹⁷.

Das mediane PFS für Dabrafenib plus Trametinib (MEK-Inhibitor) war mit 11,4 Monaten signifikant höher als in der Monotherapie mit Vemurafenib (7,3 Monate) ¹¹⁵. Dies galt auch für das 1-Jahres-Gesamtüberleben (72% vs. 65%).

Das beste Ergebnis konnte in der 2018 veröffentlichten COLUMBUS-Studie erzielt werden: Die Kombination Encorafenib (BRAF-Inhibitor) plus Binimetinib (MEK-Inhibitor) erreichte ein PFS von 14,9 Monaten verglichen mit einer Vemurafenib-Monotherapie (7,3 Monate) bei moderater Toxizität ¹²¹.

Alle drei Kombinationen sind mittlerweile zur Therapie von Melanompatienten mit nachgewiesener BRAF^{V600E}- oder BRAF^{V600K}-Mutation zugelassen.

Zielgerichtete Therapien mit *small molecules* für Patienten mit einer NRAS – Mutation wurden verschiedenen Studien untersucht (u.a. Selumetinib ¹²², Pimasertib ¹²³, Trametinib ¹²⁴, Binimetinib ¹²⁵). Signifikante Verbesserungen des OS im Vergleich zu den Gesamtüberlebensraten unter Immuntherapien konnten jedoch für diese Patientenkohorte nicht festgestellt werden. Eine spezifische Therapieoption für NRAS-Mutationen bleibt somit vakant ¹²⁶.

Bei vorhandener c-KIT – Mutation ist eine spezifische Therapie mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib möglich ^{127,128}.

Eine radioonkologische Intervention ist geboten bei frakturinstabilen Knochenmetastasen und/oder Knochenschmerzen und kann wesentlich zu einer Lebensqualitätssteigerung der betroffenen Patienten beitragen. Bei Vorhandensein asymptomatischer Knochenmetastasen ist die Therapie mit Bisphosphonaten oder RANKL-Inhibitoren (z.B. Denosumab) eine weitere Behandlungsoption. Auch bei Hirnmetastasen ist eine strahlentherapeutische Intervention angezeigt, entweder mittels isolierter stereotaktischer Bestrahlung (Gamma- oder Cyberknife) einzelner Filiae oder als Ganzhirnradiatio bei multiplen supra- und infratentoriellen Metastasen ^{7,129}. Die Möglichkeit eines operativen, neurochirurgischen Eingriffs sollte jedoch vorab geprüft werden.

Der synergistische Effekt („*abscopal effect*“) einer kombinierten Immuntherapie mit einer lokalen Radiatio wurde vielfach beschrieben. Dieser zeigt durch die Radiatio-vermittelte Tumoran-tigenfreisetzung – sowie die konsekutive Erkennung durch das modulierte Immunsystem – eine Verbesserung des Gesamtüberlebens ¹³⁰.

Ein weiterer Ansatz, um Tumore für eine Immuncheckpoint-Inhibition zu sensibilisieren, besteht in der Anwendung von onkolytischen Viren als Immunaktivatoren. Erste präklinische Daten konnten bereits vielversprechende Ergebnisse und ein besseres Therapieansprechen aufzeigen¹³¹⁻¹³³. Die synergistische Wirkung beruht auf einer viral getriggerten Tumorantigen-spezifischen T-Zellantwort und konsekutiven Checkpointinhibition¹³². Eine Phase Ib/II Studie von Puzanov et al. konnte unlängst eine bessere Wirkung von T-VEC in Kombination mit Ipilimumab nachweisen¹³⁴. Ähnliche Ergebnisse lieferte die PIVOT-02-Studie und demonstrierte eine Modifikation der Tumorimmunogenität, wodurch eine erhöhte intratumorale CD8+ Antwort durch eine vermehrte T-Zellinfiltration hervorgerufen wurde¹³⁵. Dieses Prinzip der Modifikation des *tumor microenvironments* könnte künftig ein weiterer vielversprechender Therapieansatz sein und wird derzeit in verschiedenen klinischen Studien überprüft^{136,137}.

Chemotherapien haben weiterhin ihren Stellenwert in der Dermatoonkologie, gelten jedoch nicht mehr als Erstlinientherapeutika. Sie werden meist als *salvage*-Therapie nach Progress unter Immun- bzw. zielgerichteter Therapie, bei hoher Tumorlast zu ihrer unmittelbaren Reduktion oder zur Stabilisierung bei rascher Metastasierungsdynamik eingesetzt⁷. Empfohlen werden derzeit, in Abhängigkeit des Allgemeinzustandes des Patienten, Monochemotherapien mit Dacarbazin (DTIC), Paclitaxel oder Cisplatin bzw. Polychemotherapien nach dem **BHD**- (Carmustin/BNCU, Hydroxyurea, Dacarbazin), **BOLD**- (Bleomycin, Vincristin/Oncovin, Lomustin, Dacarbazin), **CarboTax**- (Carboplatin, Paclitaxel), **GemTreo**- (Gemcitabin, Treosulfan) oder **DVP**-Schema (Dacarbazin, Vindesin, Cisplatin)⁷.

2.3 Die RAS/RAF/MEK/ERK – und PI3K/AKT/mTOR – Signalkaskadewege

2.3.1. Zelluläre Signaltransduktion

In Anbetracht der Aggressivität und der steigenden Inzidenz des Melanoms ist sein Verständnis auf molekularbiologischer Ebene von besonderer Bedeutung. Hervorzuheben sind hierbei der intrazelluläre RAS/RAF/MEK/ERK – Signalkaskadeweg (MAPK-pathway) sowie der PI3K/AKT/mTOR – Signalkaskadeweg (PI3K-pathway), die eine Schlüsselrolle bei der Tumorphprogression sowie Therapieresistenz von Melanomen einnehmen^{69,138-140} und Ansatzpunkte für eine zielgerichtete Melanomtherapie bieten können.

Durch zelluläre Feedback-Mechanismen kommt es zu einer gegenseitigen Hoch- bzw. Herunterregulation und damit zu *escape*-Mechanismen des Tumors, die vor allem im Kontext der Therapieresistenz von Belang sind¹⁴¹.

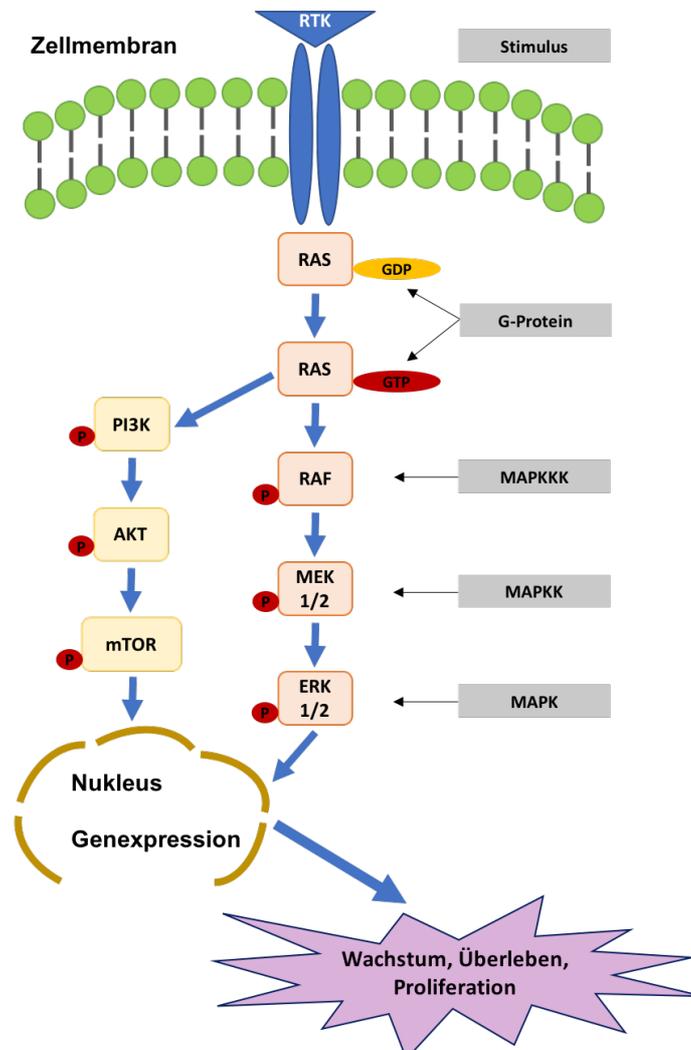


Abbildung 5: Die RAS/RAF/MEK/ERK– und PI3K/AKT/mTOR– Signalkaskadewege, Abbildung modifiziert nach Cheng, Y.⁷³ und Dumaz, N.¹⁴².

2.3.2. Der RAS/RAF/MEK/ERK – Signalkaskadeweg

Der RAS/RAF/MEK/ERK – Signalweg (Vgl. Abbildung 5) zählt zum MAPK-Signalweg (*mitogen-activated protein kinase pathway*), welcher der Vermittlung extrazellulärer Signale an zytoplasmatische und nukleäre Effektoren dient und den wichtigsten zellulären Signalweg beim Melanom darstellt^{73,138,143,144}. Die häufigsten Mutationen beim Melanom sind in seinen Genprodukten zu finden^{141,145}.

Der RAS/RAF/MEK/ERK – Signalweg ist an der Regulation von Zellproliferation, -differenzierung, Überleben und Apoptose der Zelle beteiligt^{73,138} und wird vornehmlich von Wachstumsfaktoren stimuliert^{142,144}.

Der MAPK-Signalweg ist durch eine sequentielle Drei-Kinasen-Kaskade gekennzeichnet, welche durch die Bindung eines extrazellulären Faktors an die membranständige Rezeptor-Tyrosinkinase aktiviert wird^{138,144,146}. Zu den RTKs zählen u.a. EGFR (*epidermal growth factor receptor*), PDGFR (*platelet-derived growth factor receptor*), c-KIT, VEGFR (*vascular endothelial growth factor receptor*) und FGFR (*fibroblast growth factor receptor*)¹⁴⁴.

Durch Bindung des Liganden wird eine Dimerisierung des Rezeptors und konsekutiv eine Autophosphorylierungskaskade induziert. Die RAS/RAF/MEK/ERK-Kaskade wird durch die RAS-GTPase mediiert, die über drei Zwischenstufen (RAF, MEK, ERK) sukzessive phosphoryliert wird. Das nachgeschaltete Enzym dient jeweils als Substrat für die vorgeschaltete Phosphorylierung:

An den phosphorylierten, zytoplasmatischen Teil der dimerisierten Rezeptor-Tyrosinkinase bindet das Adapterprotein Grb2 (growth-factor-receptor-bound protein 2) und transloziert den GDP/GTP-exchange-factor (GEF) son-of-sevenless (SOS) an die Zellmembran^{138,146}. SOS induziert den *switch* der GTPase vom inaktiven RAS/GDP-Status in den aktiven RAS/GTP-Status^{138,143} durch Interaktion mit der *switch2*-Region des RAS-Moleküls^{147,148}. Zudem bewirkt SOS die Verdrängung der *switch1*-Region aus dem Zentrum, so dass die Effektor-Region (Nukleotid-Bindestelle) frei liegt und GTP an RAS binden kann¹⁴⁷ (Vgl. Abbildung 7). Erst nach dieser Konformationsänderung der allosterischen Region kann die Serin-/Threoninkinase RAF gebunden und an die Zellmembran transloziert werden^{138,149,150}. Die Aktivierung einer der drei Isoformen von RAF (A-RAF, B-RAF, C-RAF) erfolgt durch erneute Phosphorylierung. Die Signalkaskade wird nun durch Phosphorylierung der beiden Serin-/Threoninkinasen MEK1 und MEK2 fortgesetzt^{138,146}. Diese wiederum aktivieren ERK1 und ERK2 durch Phosphorylierung. ERK1/2 haben über 50 Substrate, die sowohl zytosolisch, als auch nukleär gelegen sind^{138,151}. Die nukleären Substrate regulieren die Genexpression durch Aktivierung einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren¹³⁸, die zytosolischen Substrate lösen u.a. eine negative Feedbackschleife zur Inhibition des Adapterproteins Grb2 aus¹⁵².

2.3.3. Der PI3K/AKT/mTOR – Signalkaskadeweg

Der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) – Signalkaskadeweg (Vgl. Abbildung 5) ist maßgeblich an Apoptose, Zellzyklusprogression und Zelldifferenzierung beteiligt ¹⁵³.

Bei PI3K α handelt es sich um eine Lipid-Kinase, die regulatorische und katalytische Untereinheiten besitzt ¹⁵³. Physiologisch wird die PI3K-Kaskade durch Rezeptor-Tyrosinkinasen aktiviert ¹⁵³. Sie kann aber auch durch Bindung von NRAS an die katalytische Untereinheit p110 α von PI3K α aktiviert werden ^{71,145,153}.

Wachstumsfaktoren wie EGRF (*epidermal growth factor receptor*) oder IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*) binden an die RTK's und führen zu einer Dimerisierung von PI3K α ¹⁵⁴. Eine Autophosphorylierungskaskade wird ausgelöst, wodurch das Membranlipid PIP2 (Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat) zu PIP3 (Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat) konvertiert wird ^{145,153}. PIP3 bindet konsekutiv die Serin/Threonin-Kinase AKT und aktiviert diese ^{138,145}. Einerseits führt dies zur Hemmung der Apoptose durch Inhibition pro-apoptotischer Proteine wie Bcl sowie Aktivierung der Proteintranslation durch mTOR ^{138,145,153}. Gleichzeitig bewirkt AKT eine Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors FOXO1, wodurch dieses Protein vermehrt abgebaut wird. Seiner Aufgabe, die Inhibition einer unkontrollierten Zellteilung, kann FOXO1 somit nicht nachkommen ^{145,154}.

Als Antagonist inhibiert der Tumorsuppressor PTEN (*Phosphatase and Tensin-homologue*) AKT durch Dephosphorylierung von PIP3 zu PIP2 ^{153,154}.

Beim Melanom kommt es zu inaktivierenden Mutationen oder Deletion von PTEN durch aktivierende Mutationen von NRAS ¹⁵⁵. Der Verlust von PTEN führt zu einer verstärkten mTOR Aktivität, die in gesteigertem Zellwachstum und -proliferation mündet ^{138,145,153,154}.

2.4 NRAS und die RAS – Superfamilie

RAS-Gene zählen zu den ersten detektierten Protoonkogenen. Sie wurden in den 1980er Jahren in retroviralen Sarkomen von Ratten identifiziert und nach ihren Stämmen benannt (**rat sarcoma**): Harvey- (H-RAS), Kirsten- (K-RAS) und Neuroblastoma-RAS (N-RAS) ^{156,157}.

Diese RAS-Proteine sind für die Nomenklatur der Superfamilie verantwortlich, zu der mehr als 100 monomere GTPasen zählen, die ein Molekulargewicht von 20 bis 40 kDa aufweisen und für Signaltransduktion extrazellulärer Stimuli an den Nucleus von elementarer Bedeutung sind ¹⁵⁸.

Die vier Isoformen des RAS-Gens (KRAS4A, KRAS4B, NRAS and HRAS) unterscheiden sich vornehmlich am C-terminalen Ende, der hypervariablen Region (hvr), und bedingen ca. 30%

der für Krebserkrankungen verantwortlichen Mutationen beim Menschen ^{126,159,160}. Neben der RAS-Subgruppe werden auch die Rho-, Rab-, Ran- und Sar1/Arf-Proteine zur RAS-Superfamilie gezählt ⁷³. Allen Subgruppen, die in ihrer biologischen Funktion differieren, ist eine hochaffine GTP/GDP-bindende Domäne gemein, die einen molekularen Schalter (*switch*) zwischen aktivem und inaktivem Zustand der entsprechenden GTPase darstellt ^{158,159}.

Die Transition von inaktivem zu aktivem Zustand erfolgt durch Dissoziation von GDP, die langsam autark, oder durch GEFs bzw. GAPs katalysiert, erfolgen kann ^{146,153,159}.

Bei aktivierenden RAS-Mutationen handelt es sich in ca. 97-99% der Fälle um Missense-Mutationen, die zu einer Konformationsänderung in der *switch*-Region des RAS-Proteins führen und dadurch einen Verlust seiner GTPase-Aktivität hervorrufen ^{71,159}.

Beim malignen Melanom sind aus dieser Familie vor allem die NRAS-Mutationen von Relevanz und können - je nach Studie - in 15-39% ¹⁶¹⁻¹⁶⁴ der Fälle nachgewiesen werden. Im Mittel wird eine Frequenz von 20% angegeben ¹⁵⁰.

Bei NRAS (*neuroblastoma rat sarcoma* oder auch *Neuroblastoma Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog*) handelt es sich um ein G-Protein, das erstmals 1982 von der Studiengruppe um Robin A. Weiss beschrieben wurde ¹⁵⁶ und ein Molekulargewicht von 20-23kDa aufweist ¹⁶⁵. Mutationen am NRAS-Gen treten im Codon 12, 13 und 61 auf ¹⁵³. Beim Melanom ist Codon 61 mit 84% der Fälle am häufigsten betroffen ^{159,166}.

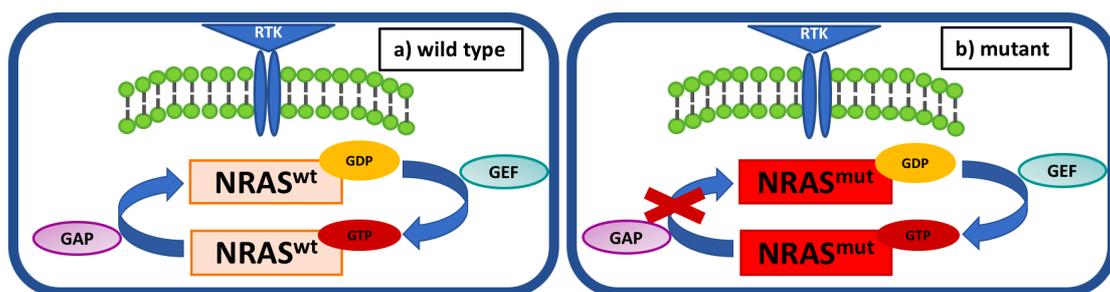


Abbildung 6: Schematische Darstellung des inaktivem NRAS/GDP- und aktivem NRAS/GTP-Status bei NRAS-Wildtyp (a) und mutiertem NRAS-Molekül (b). Abbildung modifiziert nach Posch, C. ¹⁴³.

Es besteht beim nichtmutierten NRAS-Molekül (Wildtyp) ein Equilibrium zwischen inaktivem GDP- und aktivem GTP-Status, das durch GEFs oder GAPs katalysiert wird ^{146,153,166} (Vgl. Abbildung 6). Mutationen führen zu einer Dysbalance zugunsten des aktivierten GTP-Status und somit zu einer Daueraktivierung des G-Proteins, was letztlich zu einem unkontrollierten

Tumorstadium führt ¹⁶⁶. Betroffen sind dabei einzelne Nukleotidveränderungen in der *switch* II Region von Codon 61, welche seine intrinsische, katalytische Aktivität beeinträchtigen ^{148,166} und NRAS in seinem aktiven GTP-Status arretieren ¹⁶⁶. Bei Mutationen in Codon 12 und 13 ist die Phosphat-Bindestelle betroffen und macht das Protein unempfindlich für die physiologische Deaktivierung durch GTPase aktivierende Proteine ^{143,166}. Die Mutationen in Codon 61 und Codon 12 bzw. 13 gelten als aktivierend, wirken jedoch antagonistisch ¹⁶⁶.

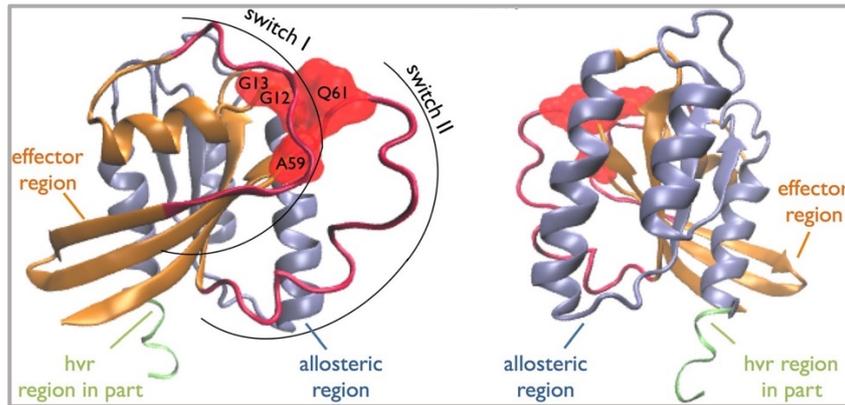


Abbildung 7: Darstellung des RAS-Moleküls mit Lokalisation der häufigen, onkogenen Mutationsloci an G12, G13, A59 und Q61. Darstellung der Effektorregion in orange, der allosterischen Region in blau, der switch-Regionen in rot und der c-terminalen, hypervariablen in grün (Abbildung aus ¹⁶⁷).

2.5 Fragestellung

Das metastasierte maligne Melanom ist eine biodiverse Tumorentität. Die Erforschung zugrunde liegender Mutationen und der Eingriff in davon abhängige biologische Signalwege hat in den letzten Jahren zu einer revolutionierenden Therapieform durch BRAF- und MEK-Inhibitoren für BRAF-mutierte Melanompatienten geführt. Für die Gruppe der NRAS-positiv mutierten Melanompatienten fehlen leider entsprechende detaillierte Untersuchungen und Erkenntnisse.

Vor diesem Hintergrund erfolgte im Rahmen der vorliegenden Dissertation eine umfassende Analyse der epidemiologischen-, histopathologischen und therapiespezifischen Faktoren von NRAS-mutierten Melanompatienten am Hauttumorzentrum der Uniklinik Köln. Überdies wurden die Mutationsgenotypen von NRAS hinsichtlich des Metastasierungsverhaltens und Gesamtüberlebens im malignen Melanom analysiert.

Im Einzelnen sollen dabei folgende Fragestellungen beantwortet werden:

1. Wie verhält sich die Epidemiologie des NRAS mutierten malignen Melanoms?
2. Was sind histopathologische Kriterien des NRAS mutierten malignen Melanoms?
3. Wie lassen sich die Mutationen in verschiedenen Lokalisationen des NRAS-Gens im malignen Melanom klassifizieren? Welche begleitenden Mutationen können bei NRAS mutierten Patienten gefunden werden? Besteht die als dogmatisch beschriebene BRAF- bzw. NRAS-Exklusivität wirklich?
4. Wie verhält sich die Metastasierung im NRAS mutierten malignen Melanom? Welchen prädiktiven Wert spielen hierbei Mutationsgenotypen von NRAS?
5. Wie ist das Ansprechen NRAS mutierter Patienten auf Systemtherapien beim malignen Melanom? Welche Auswirkungen haben sie auf das rezidivfreie Überleben?
6. Welchen Einfluss haben NRAS-Mutationen auf das Gesamtüberleben von Patienten mit malignem Melanom? Bestehen hierbei Unterschiede für die einzelnen Mutationsgenotypen von NRAS?
7. Besteht eine Assoziation zwischen Mutationsgenotypen beim NRAS mutierten malignen Melanom zu Zweitmalignomen?

3. Material und Methoden

3.1 Patientenkohorte und Datenerhebung

Anhand einer Tumordatenbank, die seit den 1990er Jahren in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Uniklinik Köln geführt wird, konnten wir Patienten nach ihrem Mutationsstatus identifizieren. Diese Daten wurden mit einer separat geführten Mutationsdatenbank abgeglichen. Eine Gesamtzahl von 324 Melanompatienten (m/w) mit verfügbaren Daten bezüglich ihres NRAS-Mutationsstatus wurden in die vorliegende retrospektive, monozentrische Analyse eingeschlossen.

Alle Patienten wurden während der Tumornachsorge oder bei Vorliegen von Metastasen im Rahmen der Therapie in unserer Klinik betreut.

Die klinischen und histologischen Daten wurden retrospektiv aus den jeweiligen Patientenakten der Tumorambulanz des Hauttumorzentrums der Universitätsklinik Köln sowie dem CIO Köln/Dermatologie (Centrum für Integrierte Onkologie Aachen Bonn Köln Düsseldorf) entnommen. Die früheste Erstdokumentation einer NRAS-Mutation aus unserer Studienpopulation wurde im November 2002 dokumentiert. Zusätzlich zu den vorliegenden Daten wurden keine weiteren Analysen, Patientenkontakte, laborchemischen Untersuchungen oder radiologische Befunde erhoben.

Eingeschlossen wurden Patienten mit kutanen Melanomen (n=288), unbekanntem Primarius (n=28), Bindehautmelanomen (n=1) und Schleimhautmelanomen (n=7).

Ausgeschlossen wurden Patienten mit einem fragmentarischen Datenset (<60% der zu erhebenden Daten) oder Patienten, die sich einmalig zur Einholung einer Zweitmeinung im Hauttumorzentrum der Uniklinik Köln vorstellten.

Alle Patienten wurden gemäß der Staging Guidelines des *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) klassifiziert, entsprechend der unterschiedlichen Charakteristika nach der 7th edition (2009) bzw. 8th edition (2017). Eine entsprechende Stratifizierung entfiel u.a. auf die Stadien-Eingruppierung bei Erstdiagnose (bis 2017) bzw. status quo bei Datacut am 31.03.2019.

Die Daten wurden vor der statistischen Analyse in einer zentralen Datenbank zusammengeführt (Microsoft® Excel für Mac, Version 16.16.9) und umfassen u.a. demographisch-epidemiologische Daten, Resultate der Wächterlymphknotenbiopsie (SLNB), AJCC Stadium bei Erstdiagnose respektive Datacut, Therapielinien, BRAF- und NRAS-Mutationsstatus, ggfs. koexistente Mutationen und/oder Zweitmalignome.

Die Informationen bezüglich des Primärtumors beinhalten Lokalisation, histologischen Subtyp, Tumordicke nach Breslow, Clark-Level sowie Ulzeration.

Bei Patienten, die nachweislich mehrere unabhängige Primärmelanome aufwiesen, wurde der für die Erkrankung ursächliche Tumor anhand der Tumordicke nach Breslow und dem lokoregionalem Metastasierungsmuster identifiziert. Meta- oder synchrone Primärtumoren wurden in dieser Arbeit nicht weiter analysiert.

Als *lost-to-follow-up* wurden Patienten definiert, die sich vor Abschluss einer Behandlung nicht wieder in unserem Hauttumorzentrum vorgestellt haben oder deren Sterbedatum nicht ermittelt werden konnte.

Die Aktenführung des Hauttumorzentrums erfolgte größtenteils in Papierform und wurde in den letzten Jahren um ein elektronisches Dokumentationssystem (Orbis®) ergänzt. Sämtliche für diese Studie relevanten Patientendaten spiegeln sich in den jeweiligen Patientenakten wider. Für die Studie wurden die Patientendaten pseudonymisiert und fortlaufend nummeriert. Das Geburtsdatum wurde auf das Jahr reduziert. Ein exemplarischer Erhebungsbogen ist im Anhang zu finden.

3.2 Tumorproben und Mutationsanalysen

Die Mutationsanalysen wurden an den Primärtumoren oder an Lymphknotenmetastasen durchgeführt (n=246). In 78 Fällen erhoben wir diese jedoch auch an Organmetastasen, da weder Primarius noch Lymphknotenmetastasen für eine molekularpathologische Untersuchung zur Verfügung standen.

Die Durchführung der Mutationsanalysen mittels Sanger-Sequenzierung (2011-2014) bzw. *New Generation Sequencing* (ab 2015) erfolgte im Rahmen der Regelvorsorge durch das Institut für Pathologie der Universität zu Köln/ Prof. R. Büttner. Das schriftliche Einverständnis der Patienten für die Durchführung der Analyse wurde vorab eingeholt ¹⁶⁸.

Vereinzelte Mutationsanalysen wurden auch im Rahmen von klinischen Studien oder durch externe pathologische Institute durchgeführt, wo die Untersuchung des Primärtumors erfolgt und die Erstdiagnose Melanom gestellt worden ist. Die Behandlung dieser Patienten erfolgte im weiteren Verlauf durch das Hauttumorzentrum der Uniklinik Köln.

3.3 Statistische Analyse

Es wurden unterschiedliche statistische Verfahren für die Auswertung der Daten angewendet:

Kontinuierliche Variablen wurden bei Normalverteilung als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Normalverteilte Daten wurden mittels T-Test geprüft. Kategorisierte Variablen wurden als absolute Zahlen und relative Häufigkeiten angegeben. Ferner wurde in Bezug auf

alle quantitativen Merkmale mittels T-Test geprüft, ob ein signifikanter Unterschied zwischen den getesteten Gruppen besteht. Als nichtparametrischer Test wurde der Wilcoxon Signed Rank Test verwendet.

Um die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung von Hirnmetastasen nach Genotyp zu untersuchen, wurde das Relative Risiko (RR) bestimmt.

Bezüglich des Langzeitverlaufs, Berechnungen des Gesamtüberlebens nach 5 bzw. 10 Jahren sowie des progressionsfreien Überlebens wurde eine Überlebenszeitanalyse mittels des Schätzverfahrens von Kaplan und Meier durchgeführt und anhand des Log Rank Test nach Mantel-Cox geprüft.

Zur Bestimmung prädiktiver Faktoren für die Entwicklung von Hirnmetastasen bzw. Tod führten wir multivariate Analysen mittels COX-Regression durch.

Ein Ergebnis galt als signifikant, sobald $p < 0,05$ ergab und die Nullhypothese somit verworfen werden konnte.

Die graphische Aufarbeitung erfolgte anhand von Balken-, Torten- und Streudiagrammen, Boxplots, Kaplan-Meier-Kurven sowie in tabellarischer Form.

Für die statistischen Berechnungen wurde das Programm Prism 8 (Version 8.1.2 for MacOS, GraphPad Software Inc., San Diego, California) verwendet. Die multivariaten Analysen erfolgten mit SPSS for MacOS (Version 27, IBM Corporation, Armonk, NY).

4. Ergebnisse

4.1 Epidemiologische Ergebnisse

4.1.1. Erstdiagnose NRAS-Mutation

Die 324 erfassten Melanompatienten mit nachgewiesener NRAS-Mutation hatten ihre Erstdiagnose in den Jahren 1991-2019.

Die Verteilung der Erstdiagnosen pro Jahr zeigt folgende Abbildung.

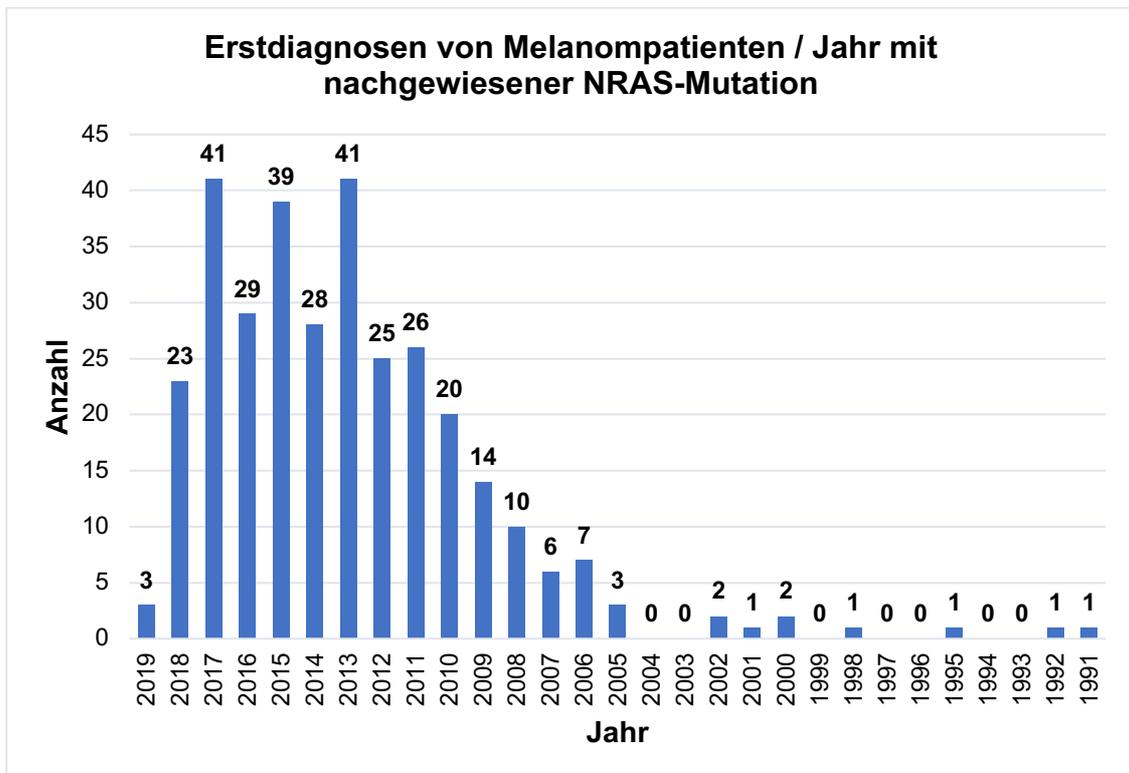


Abbildung 8: Anzahl der Erstdiagnosen NRAS-positiver Melanompatienten bezogen auf die Jahre 1991 bis 2019.

Die geringe Anzahl von 3 Patienten im Jahr 2019 ist dem Zeitraum der Datenerhebung geschuldet, dessen Endpunkt der 31.03.2019 war.

Anmerkung:

Die Patienten, deren Erstdiagnose vor 2011 lag, wurden im Verlauf bei Vorliegen einer Metastasierung auf eine NRAS-Mutation getestet, z.B. im Rahmen klinischer Studien. Routinemäßig werden in Hauttumorzentrum der Universitätsklinik zu Köln Patienten ab einem AJCC-Stadium IIC bzw. bei Nachweis einer lokoregionalen und/oder Fernmetastasierung hinsichtlich ihres Mutationsstatus getestet und erfasst.

4.1.2. Geschlechterverteilung der Patienten

Die Geschlechterverteilung in unserer Patientenkohorte zeigte eine Prädominanz des männlichen Geschlechts: von 324 Patienten waren 119 weiblich und 205 männlich.

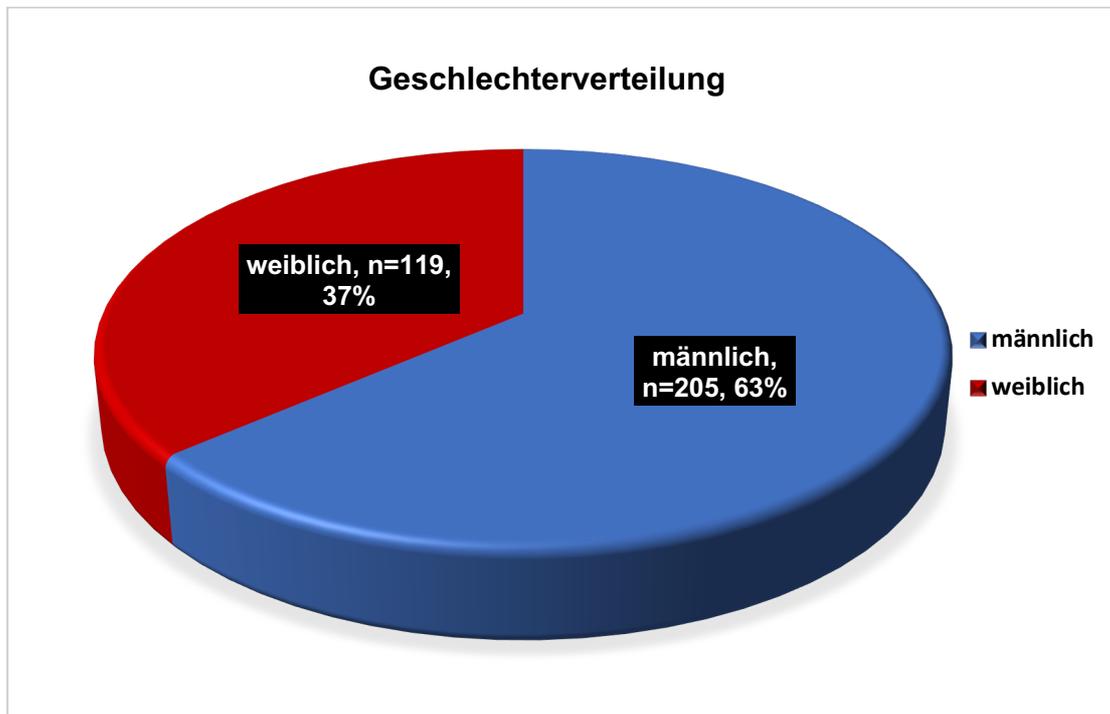


Abbildung 9: Geschlechterverteilung der Gesamtkohorte. Von 324 Patienten sind 119 Frauen und 205 Männer, dies entspricht einer signifikanten Häufung des männlichen Geschlechts mit 63%.

Im Wilcoxon Signed Rank Test zeigte sich das Ergebnis höchst signifikant mit einem p-Wert von $<0,0001$.

4.1.3. Altersverteilung bei Erstdiagnose

Die Patienten mit nachgewiesener NRAS-Mutation waren zum Zeitpunkt der Erstdiagnose im Median 70 Jahre (MW 66,40) alt. Es zeigte sich, dass Frauen bei Diagnosestellung etwas jünger waren, der Median lag bei 66 Jahren (MW: 63,16; SD: 15,10; Range: 28-90). Der Erkrankungsgipfel lag bei 61-80 Jahren.

Bei Männern lag der Median mit 72 Jahren (MW: 68,28; SD 12,21; Range 21-95) geringfügig höher als der geschlechtsunspezifische Median, der Erkrankungsgipfel hingegen bei 71-80 Jahren.

Nachfolgende Graphik stellt die geschlechtsspezifische Altersverteilung sortiert nach 10-Jahresabständen dar.

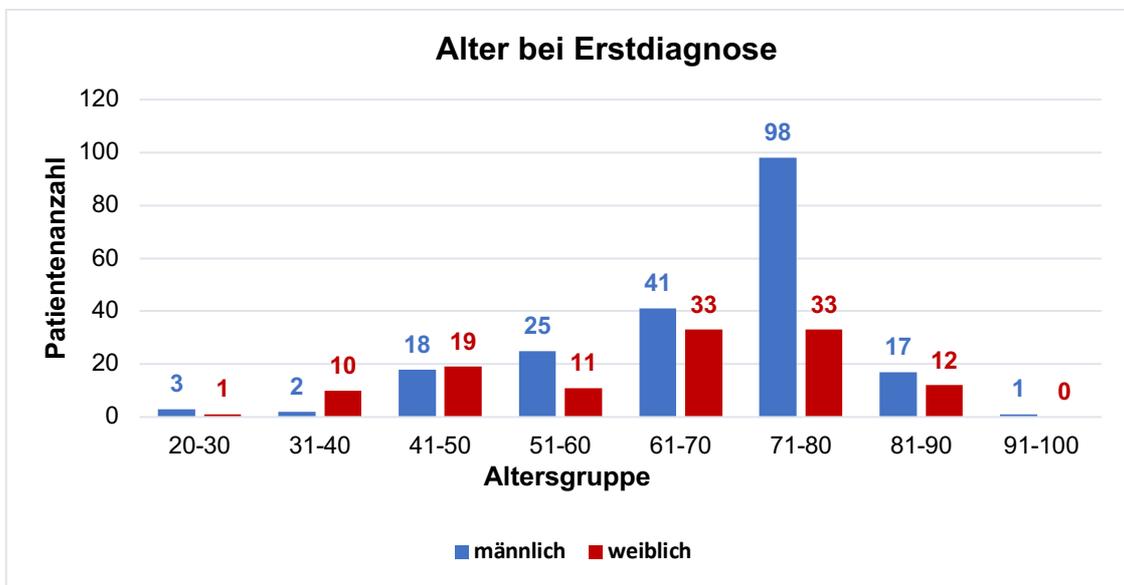


Abbildung 10: Alter bei Erstdiagnose. Verteilung nach Altersklassen (in 10-Jahresabständen) zum Zeitpunkt der Erstdiagnose in Abhängigkeit des Geschlechts. Die insgesamt 324 Patienten verteilen sich auf 119 Frauen und 205 Männer.

4.1.4. Lokalisation des Primärtumors

In unserer Patientenkohorte war in 296 Fällen die Lokalisation des Primärtumors dokumentiert. Bei 28 Patienten war der Primärtumor nicht bekannt. Bei denen als *primary tumor unknown* (PTU) geführten Patienten manifestierte sich die Tumorerkrankung als LK- oder Organmetastase.

In der statistischen Analyse der Daten wurden die Primärlokalisationen in 6 Gruppen zusammengefasst (Vgl. Tabelle 10). In der Datenbank wurden ursprünglich 15 Areale unterschieden: Gesicht, sonstiger Kopf, Auge, Hals, Brust und Bauch, Rücken, Gesäß, äußeres Genitale, Oberarm, Unterarm, Hand, Oberschenkel, Unterschenkel, Fuß, Schleimhäute.

Anschließend erfolgte eine Stratifizierung nach histologischem Subtyp und Lokalisation (Vgl. Abbildung 11).

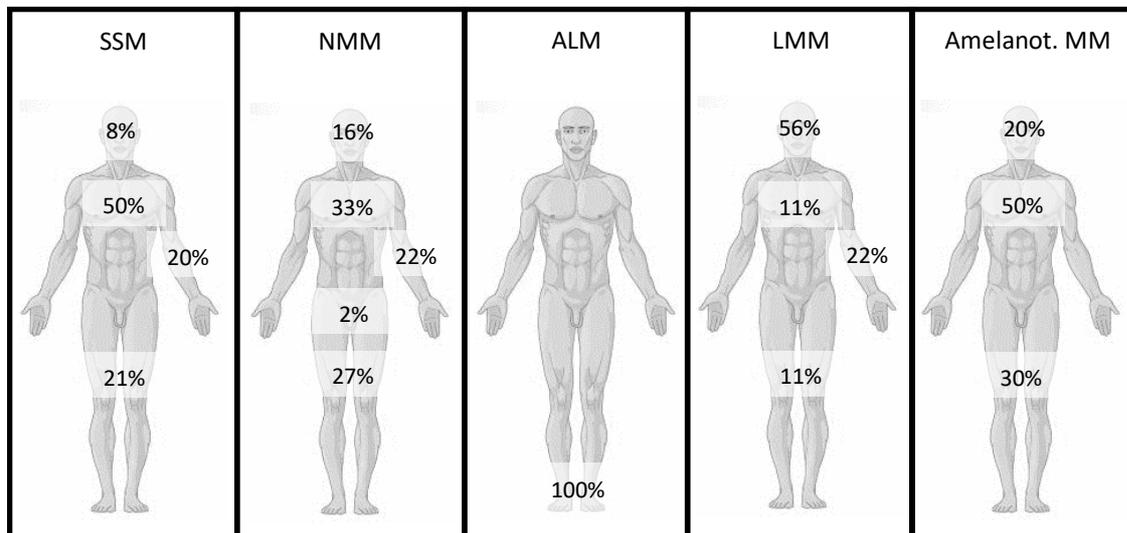


Abbildung 11: Lokalisation der Primärtumoren nach histologischem Subtyp in Prozent. Aufgrund von Rundungen entsprechen die Gesamtsummen nicht bei allen Subtypen 100%.

Insgesamt zeigte sich mit 108 Fällen (33,33%) die höchste Prävalenz am Rumpf (Brust, Bauch, Rücken), gefolgt von den unteren Extremitäten (Oberschenkel, Unterschenkel, Fuß) mit 80 Fällen (24,69%). An den oberen Extremitäten (Oberarm, Unterarm, Hand) wurden 59 Fälle (18,21%) detektiert.

Im Kopf-Hals-Bereich (Gesicht, Kopfhaut, Auge, Schleimhäute, Hals) wurden 44 Melanome (13,58%) gefunden, genital (inkl. Schleimhäute) hingegen 5 (0,02%). In 28 Fällen war der Primarius unbekannt (8,64%).

(Aufgrund von Rundungen beträgt die Gesamtsumme nicht 100%, sondern 98,47%.)

Eine Übersicht zur Lokalisation des Primärtumors nach histologischem Subtyp in absoluten Zahlen findet sich in der nachstehenden Tabelle.

Tabelle 10: Übersicht der Lokalisation des Primärtumors nach histologischem Subtyp, in absoluten Zahlen.

	SSM	NMM	ALM	LMM	AMM	Schleim- haut	Binde- haut	PTU	Nicht klassifi- zierbar
Kopf/Hals	7	20	0	5	2	5	1	0	4
Rumpf	42	41	0	1	5	0	0	0	19
Obere Extr.	17	27	0	2	0	0	0	0	13
Genital	0	3	0	0	0	2	0	0	0
Untere Extr.	18	33	10	1	3	0	0	0	15
PTU	0	0	0	0	0	0	0	28	0
Gesamt	84	124	10	9	10	7	1	28	51

4.1.5. Histologische Subtypen am Gesamtkollektiv

In der Erfassung der histologischen Subtypen ergab sich folgende Häufigkeitsverteilung:

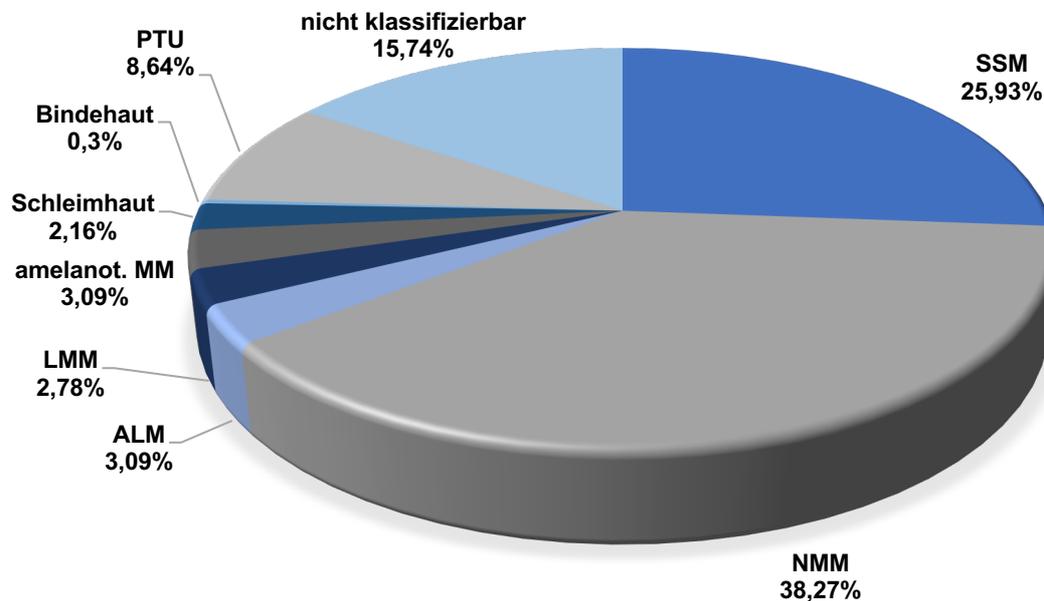


Abbildung 12: Verteilung der histologischen Subtypen am Gesamtkollektiv (n=324): SSM=superfiziell spreitendes Melanom, NMM=noduläres malignes Melanom, ALM=Akral-lentiginöses Melanom, LMM=Lentigo-maligna Melanom, amelanot.MM=amelanotisches Melanom, Schleimhaut=Schleimhautmelanom, Bindehaut=Bindehautmelanom, PTU=unbekannter Primarius, nicht klassifizierbar=nicht klassifizierbares malignes Melanom.

Am häufigsten wurde mit 124 Fällen (38,27%) das noduläre Melanom (NMM) diagnostiziert, gefolgt vom superfiziell spreitenden Melanom (SSM) mit 84 Fällen (25,93%). Das akral-lentiginöse Melanom und das amelanotische Melanom wurde jeweils in 10 Fällen (3,09%) nachgewiesen, das Lentigo-maligna Melanom (LMM) hingegen in 9 Fällen (2,78%). In 7 Fällen (2,16%) konnte ein Schleimhautmelanom detektiert werden. In einem Einzelfall (0,3%) fand sich ein Bindehautmelanom. Bei insgesamt 28 Patienten (8,64%) konnte kein Primärtumor gefunden werden. Insgesamt 51 Fälle (15,74%) wurden als nicht klassifizierbar eingestuft, hierunter summieren sich Sonderformen wie das desmoplastische oder sarkomatoide Melanom, die in der Statistik nicht separat aufgeführt werden. Auch Melanome, welche histopathologisch nicht eindeutig zugeordnet werden konnten, entfallen in diese Subgruppe (Vgl. nachstehende Tabelle 11).

Tabelle 11: Einteilung der nicht-klassifizierbaren Melanome nach primären und sekundären histologischen Merkmalen.

Nicht klassifizierbare Melanome (n=51)	
Histologische Subtypen	n (%)
Malignes Melanom	26 (50,9)
Ulz. malignes Melanom	07 (13,7)
Ulz. malignes Melanom mit Satellitose	02 (03,9)
Regressives Melanom	04 (07,8)
Desmoplastisches Melanom	01 (01,9)
Ulz. nävoides Melanom	01 (01,9)
Nävoides Melanom mit Satellitose	02 (03,9)
Ulz. polypoides Melanom	05 (09,8)
Sarkomatoides Melanom	01 (01,9)
Ulz. spindelzell. Melanom	01 (01,9)
Spitzoides Melanom	01 (01,9)

Anmerkung: Aufgrund von Rundungen ergibt sich eine prozentuale Gesamtsumme von 99,5%

Betrachtet man das histopathologische Merkmal „nodulär“ als Sekundärcharakteristikum ergaben sich weitere „knotige“ Melanome in unserer Gesamtkohorte (n=324):

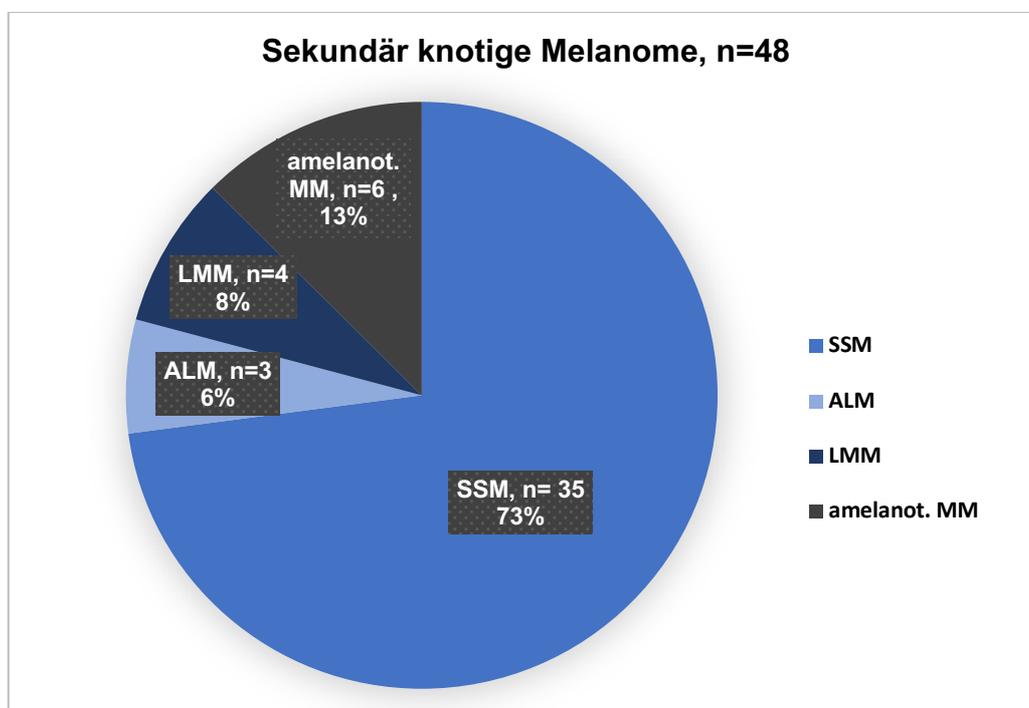


Abbildung 13: Häufigkeitsverteilung des histopathologischen Sekundärmerkmals „nodulär“ nach histologischem Subtyp: SSM=superfiziell spreitendes Melanom, ALM=Akral-lentiginöses Melanom, LMM= Lentigo-maligna Melanom, amelanot. MM=amelanotisches Melanom.

Insgesamt 48 Patienten (14,8%) wiesen ein sekundär knotiges Melanom auf. In 35 Fällen war das Sekundärmerkmal mit einem superfiziell spreitenden Melanom (SSM) assoziiert, in 6 Fällen mit einem amelanotischen Melanom. Bei 4 Patienten mit einem Lentigo-maligna Melanom (LMM) bzw. 3 Patienten mit einem akral-lentiginösen Melanom (ALM) konnte dieses histopathologische Kriterium gleichfalls nachgewiesen werden.

In summa konnte bei 172 Tumoren (53,1% der Gesamtkohorte) ein primär oder sekundär nouläres Charakteristikum nachgewiesen werden. Die Korrelation des histopathologischen Merkmals „nodulär“ mit einer nachgewiesenen NRAS-Mutation zeigt sich statistisch hoch signifikant ($p < 0,0001$).

4.1.6. Primary tumor unknown („PTU“)

Die 28 Patienten mit einem PTU (*primary tumor unknown*) waren bei Diagnosestellung im Mittel 65,2 Jahre alt (Median 72,00; SD 14,731; SF 2,784; Range 29-82 Jahre). Die Primärmanifestation konnte in 78% der Fälle anhand einer lymphogenen Metastasierung festgestellt werden (Vgl. nachstehende Tabelle 12).

Tabelle 12: Tabellarische Übersicht der Lokalisation der Primärmanifestation bei PTU.

Primärmanifestation bei PTU, n=28	n (%)
LK-Filia bei PTU	13 (46)
Kutane Filia bei PTU	09 (32)
Lungenmetastase bei PTU	02 (07)
Hirnmetastase bei PTU	03 (11)
Viszerale Filia bei PTU	01 (04)

Anteilig waren 18 Patienten (64,3%) männlichen und 10 (35,7%) weiblichen Geschlechts.

Das Gesamtüberleben dieser Patientenkohorte betrug im Median 23,00 Monate (MW 30,54; SF 5,840; Range 2-140 Monate).

4.2 Histopathologische Charakteristika

4.2.1. Vertikale Tumordicke nach Breslow

Bei insgesamt 269 Patienten aus der Gesamtkohorte konnte die vertikale Tumordicke nach Breslow ermittelt werden. In 28 Fällen war diese bei unbekanntem Primärtumor nicht festzustellen, weshalb diese Patienten nicht in die Auswertung aufgenommen wurden.

In weiteren 27 Kasus fehlte eine entsprechende Dokumentation. Zur letztgenannten Gruppe zählen auch Patienten mit einem Schleimhaut- oder Bindehautmelanom, bei denen per definitionem keine Tumordicke angegeben bzw. ausgemessen wird (n=7+1). In 19 Fällen wurde die Tumordicke nicht dokumentiert.

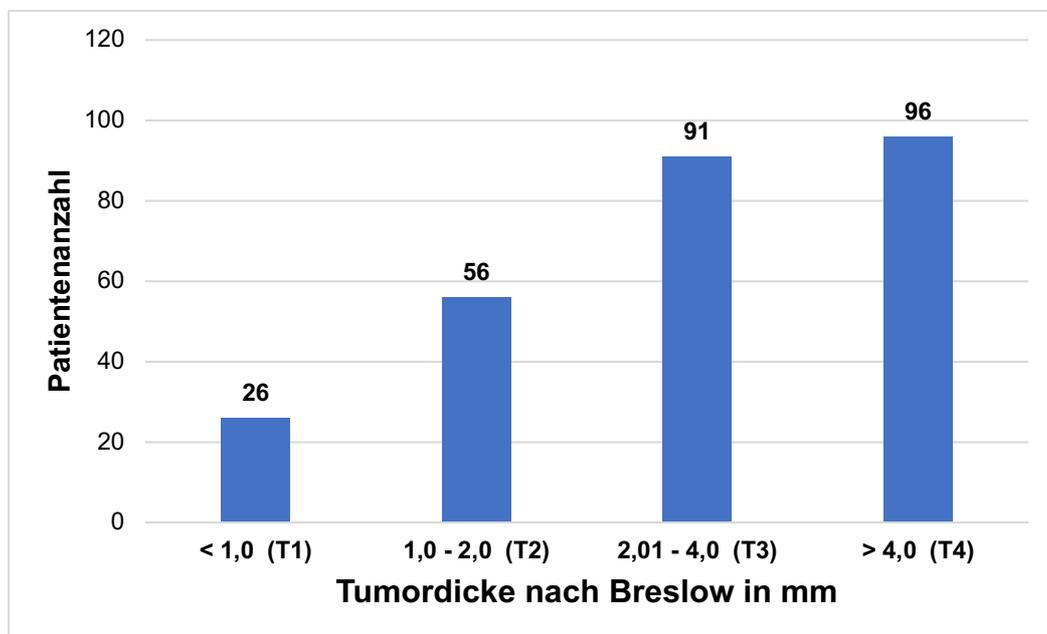


Abbildung 14: Balkendiagramm zur Verteilung der Tumore entsprechend der Tumordicke nach Breslow (n=269) in Stadien T1 – T4.

In dem untersuchten Patientenkollektiv hatten 56 Tumore (20,8%) eine Eindringtiefe von 1,0-2,0mm (T2). Auf die Gruppe 2,01-4,0mm (T3) entfielen 91 Tumore (33,8%). Nur 26 Patienten (9,7%) wiesen ein Melanom mit einer Tumordicke <1,0mm und einem geringen Metastasierungsrisiko (T1) auf. Der größte Anteil des Patientenkollektivs (35,7%) umfasste Tumore mit einer Tumordicke >4,0 mm (n=96) und zählt zur Gruppe der Hochrisikomelanome mit einem erhöhten Metastasierungsrisiko (T4).

In der statistischen Auswertung mit dem Wilcoxon Signed Rank Test zeigte sich eine mediane Tumordicke von 3,00mm (Mittelwert 4,25mm, Minimum 0,30mm, Maximum 80,00mm) bei einem zweiseitigen p-Wert von <0,0001.

Die Subtyp-spezifischen Analysen sind nachstehender Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 13: Tabellarische Darstellung der Tumordicke nach histologischem Subtyp mit Minimum, Maximum, Mittelwert, Median, 1. bzw. 3.Quartil und p-Wert (Wilcoxon Signed Rank Test).

Tumordicke nach histologischem Subtyp							
	Gesamt	SSM	NMM	LMM	ALM	AMM	Nicht klassifizierbar
Min	0,30	0,30	0,30	0,48	1,10	0,95	0,50
Q1	1,70	1,26	2,45	2,45	3,05	1,84	1,70
Mittelwert	4,25	2,71	4,82	5,90	3,82	3,82	5,26
Median	3,00	2,15	3,50	3,50	3,64	2,15	3,40
Q3	4,8375	4,125	5,00	4,20	5,65	4,375	6,00
Max	80,00	9,00	80,00	30,00	7,80	15,00	30,00
p-Wert	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0039	0,0078	0,0010	<0,0001

Zur graphischen Darstellung und Vergleichbarkeit des Parameters Tumordicke nach Breslow soll nachstehender Boxplot dienen.

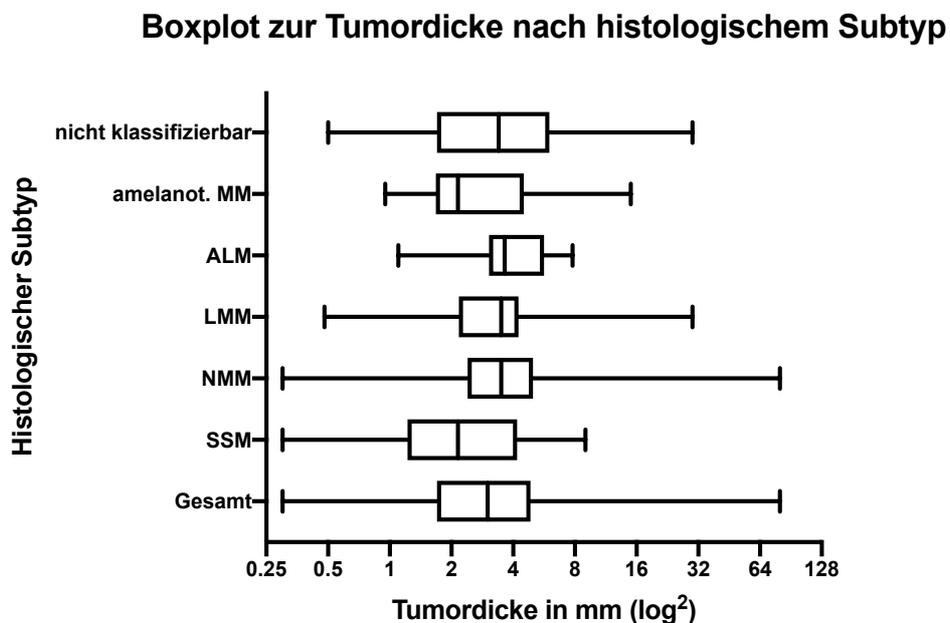


Abbildung 15: Boxplot-Darstellung der Tumordicke nach histologischem Subtyp. Zur übersichtlicheren Darstellung wurde die Abszisse logarithmiert. SSM=superfiziell spreitendes Melanom, NMM=noduläres malignes Melanom, ALM=Akral-lentiginöses Melanom, LMM=Lentigo-maligna Melanom, amelanot. MM=amelanotisches Melanom, nicht klassifizierbar=nicht klassifizierbares malignes Melanom.

In der geschlechterspezifischen Analyse betrug die mediane Tumordicke bei Männern 3,50mm und 3,34mm bei Frauen. Als mittlere Tumordicke konnte bei Männern ein Wert von 3,83mm (Minimum 0,30mm, Maximum 30,00mm) respektive 5,06mm (Minimum 0,30mm, Maximum 80,00mm) bei Frauen berechnet werden.

Die ermittelten Werte zeigen höchst signifikante Unterschiede zwischen männlichem und weiblichem Geschlecht (p-Wert <0,0001).

Die Korrelation der Tumordicke mit dem Erkrankungsalter der Patienten ergab folgende Verteilung:

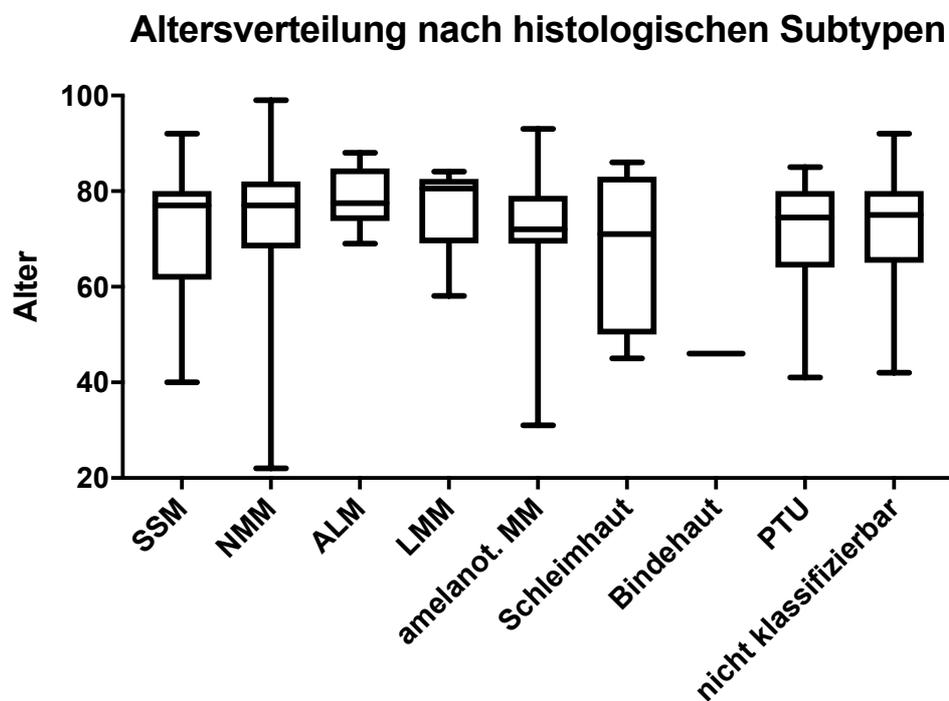


Abbildung 16: Boxplot-Darstellung der Altersverteilung (in Jahren) nach histologischem Subtyp. SSM=superfiziell spreitendes Melanom, NMM=noduläres malignes Melanom, ALM=Akral-lentiginöses Melanom, LMM=Lentigo-maligna Melanom, amelanot.MM=amelanotisches Melanom, Schleimhaut=Schleimhautmelanom, Bindehaut=Bindehautmelanom, PTU=unbekannter Primarius, nicht klassifizierbar=nicht klassifizierbares malignes Melanom.

Hierbei zeigt sich, dass in unserer Patientenkohorte das noduläre Melanom dominant über alle Altersgruppen hinweg verteilt ist (Median 77,0 Jahre, Minimum 22 Jahre, Maximum 93 Jahre). Das amelanotische Melanom zeigt eine ähnliche Verteilung (Median 72,0 Jahre, Minimum 31 Jahre, Maximum 93 Jahre). Dem superfiziell spreitenden Melanom (Median 77,0 Jahre, Minimum 40 Jahre, Maximum 92 Jahre), dem Schleimhautmelanom (Median 71 Jahre, Minimum 45 Jahre, Maximum 86 Jahre) und den Patienten mit einem unbekanntem Primarius (Median 74,5 Jahre, Minimum 41 Jahre, Maximum 85 Jahre) bzw. nicht klassifizierbaren Melanom

(Median 75 Jahre, Minimum 42 Jahre, Maximum 92 Jahre) ist annähernd gleiches Erkrankungsalter gemein. Das ALM (Median 77,5 Jahre, Minimum 69 Jahre, Maximum 88 Jahre) und das LMM (Median 80,5 Jahre, Minimum 58 Jahre, Maximum 84 Jahre) traten in unserer Patientenkohorte vornehmlich im höheren Lebensalter auf. Eine Sonderstellung nimmt hier das Bindehautmelanom (Median 46 Jahre) ein, da es nur in einem Fall nachgewiesen werden konnte und somit keine statistisch relevante Analyse durchgeführt werden kann.

Die p-Werte in absteigender Rangfolge der Signifikanz: SSM, NMM, PTU und nicht klassifizierbares malignes Melanom jeweils mit einem p-Wert <0,0001. AMM p=0,0010. ALM p=0,0020. LMM p=0,0078. Schleimhautmelanom p= 0,0156.

4.2.2. Clark Level

Die Invasionstiefe der Tumorzellen des malignen Melanoms, das Clark Level, konnte in 203 von 324 Fällen ermittelt werden.

In 121 Fällen war dies nicht möglich. Dies ist u.a. dem Umstand geschuldet, dass der Primärtumor vor 1998 entfernt und das Clark Level nicht routinemäßig erfasst wurde, ein unbekannter Primarius bzw. ein Schleimhaut- oder Bindehautmelanom vorlag, eine Shave-Biopsie erfolgt ist oder die Dokumentation in den Patientenakten fehlte.

Tabelle 14: Tabellarische Darstellung der Verteilung der Tumore nach Clark Level.

Verteilung der Tumore nach Clark Level (n=228)

Clark Level	Anzahl Tumore	in %	Mittelwert in mm
I	0	0,00	0
II	1	0,00	0,48
II-III	1	0,00	0,35
III	25	12,31	2,23
III-IV	11	5,42	1,99
IV	147	72,41	3,51
IV-V	10	4,93	5,16
V	9	4,43	7,33

Anmerkung: Aufgrund von Rundungen entspricht die prozentuale Gesamtsumme nicht 100%, sondern 99,5%.

Die geringste Invasionstiefe war Clark Level II (0,004%), was gleichbedeutend mit der Überwindung der Basalmembran und Invasion bis ins Stratum papillare ist. Ein Level III konnte bei 25 Patienten diagnostiziert werden und entspricht 12,31% am Gesamtkollektiv. Die weitaus größte Häufigkeit fand sich mit 147 Fällen in Level IV mit Vordringen der Tumorzellen in die tiefe Dermis, was einem prozentualen Anteil von 72,41% entspricht. Bei 9 Patienten konnte das höchste Invasionslevel, Clark Level V, mit Eindringen der Tumorzellen bis in die Subkutis verzeichnet werden (4,43%). Das Invasionslevel konnte bei 22 Patienten (10,35%) nicht exakt bestimmt werden, bei diesen wurde ein Intermediärstadium II-III, III-IV bzw. IV-V angegeben.

4.2.3. Ulzeration

Aus dem Gesamtkollektiv von 324 Patienten konnten - abzüglich der 28 Patienten mit unbekanntem Primarius - in 296 Fällen Daten zur Ulzeration ermittelt werden. In 125 Fällen wurde in den Therapiebefunden eine Ulzeration vermerkt, in 171 Fällen wurde diese nicht dokumentiert. Die fehlende Dokumentation in den histologischen Befunden wurde als fehlende Ulzeration gewertet. In der geschlechterspezifischen Analyse zeigten sich signifikant mehr Ulzerationen bei Männern (65,6%) als bei Frauen (34,4%).

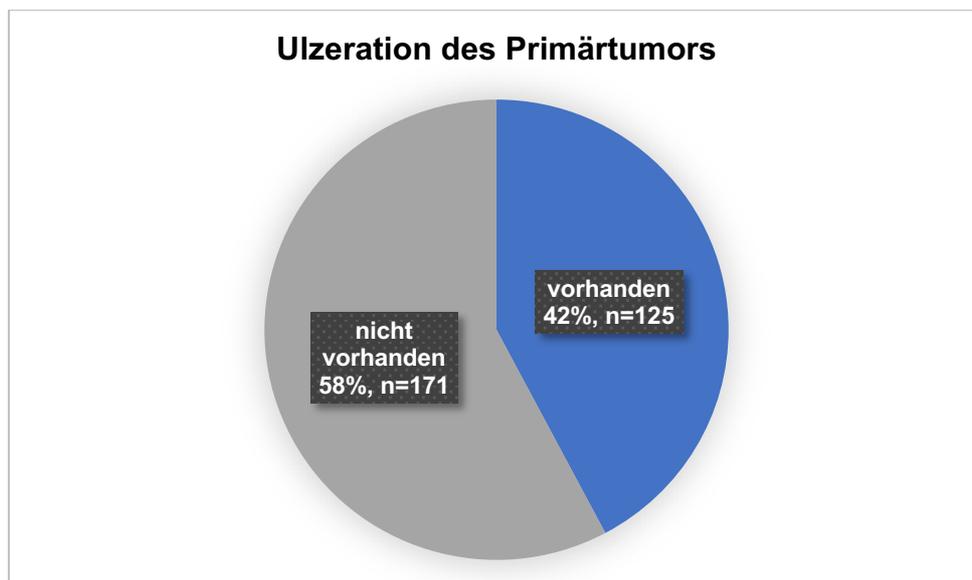


Abbildung 17: Ulzerationsstatus des Primärtumors, dargestellt als Tortendiagramm.

Im Wilcoxon Signed Rank Test war der p-Wert für beide Parameter signifikant (<0,0001).

4.2.4. Wächterlymphknoten (*sentinel lymph node*, SLN)

Zu insgesamt 298 Fällen lagen Daten bezüglich einer Wächterlymphknotenbiopsie (SLNB) vor. Bei 181 Patienten (60,7%) wurde im Rahmen der Nachexzision eine SLNB durchgeführt. In 117 Fällen ist eine SLNB aus verschiedenen Gründen nicht durchgeführt worden. Zu den Gründen zählen u.a. eine Tumordicke <1,0mm, Ablehnung der SLNB seitens der Patienten, Nichtauffindbarkeit des SLN intraoperativ, Alter und Multimorbidität der Patienten.

Tabelle 15: Tabellarische Übersicht der Wächterlymphknotenbiopsien.

SLNB (n=298)	
SLNB	n (%)
durchgeführt	181 (61%)
nicht durchgeführt	117 (39%)

Von den insgesamt 181 Patienten, bei denen eine Wächterlymphknotenbiopsie (SLNB) durchgeführt wurde, konnte in 45% der Fälle ein metastatischer Befall des SLN nachgewiesen werden. In der pathologischen Untersuchung der Wächterlymphknoten zeigten sich hingegen 55% nicht betroffen.

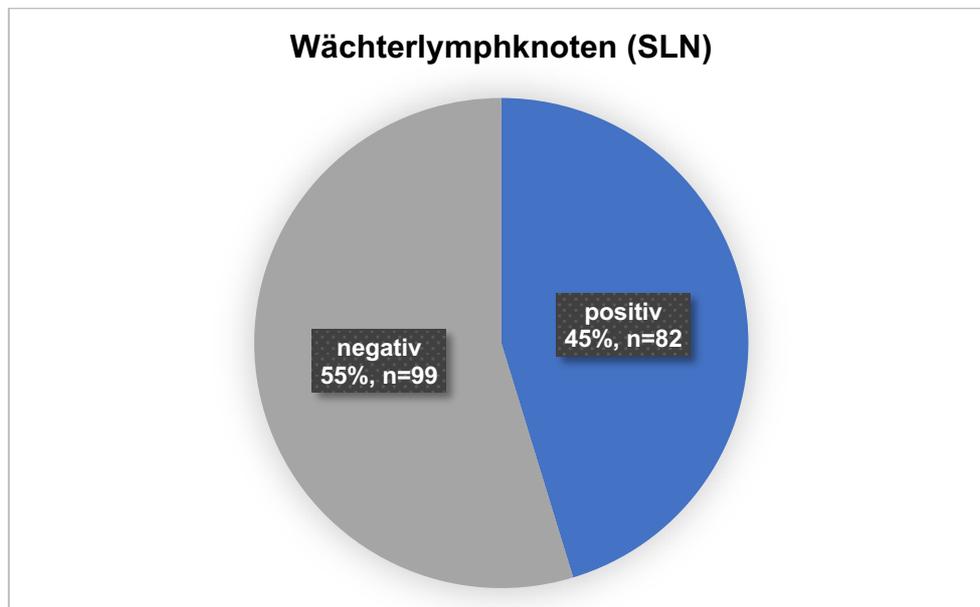


Abbildung 18: Dichotome Darstellung des Wächterlymphknoten-Status, dargestellt als Tortendiagramm.

In summa fanden sich bei 82 Patienten lymphogene Metastasen. In 81 Fällen mit positivem SLN lag eine Angabe zur Tumordicke des Primarius vor. Eine Einstufung nach T-Stadium (Tumordicke nach Breslow) findet sich in nachstehender Tabelle.

Tabelle 16: SLN-Positivität nach SLNB, kategorisiert nach T-Stadium 1-4 (Tumordicke nach Breslow).

SLN-Positivität nach Tumordicke, n=81	n (%)
T1: < 1,0mm	02 (02,4)
T2: 1,00-2,00mm	14 (17,1)
T3: 2,01-4,00mm	38 (46,3)
T4: > 4,00mm	27 (32,9)

In 38 Fällen (46,3%) lag eine Tumordicke von 2,01-4,00mm vor (T3). 27 Patienten (32,9%) mit positivem SLN konnten dem Stadium T4 mit einer Tumordicke von >4,00mm zugeordnet werden. Lediglich 2 Patienten (2,4%) wiesen ein *low-risk* Melanom mit einer Tumordicke von <1,00mm im Stadium T1 auf. In 14 Fällen (17,1%) wurde eine Tumordicke von 1,00-2,00mm angegeben.

Es zeigte sich eine starke Korrelation der SLN-Positivität mit *high-risk* Melanomen und einer Tumordicke >2,00mm.

Entsprechend dem pathologischen Staging ließ sich ferner eine Stratifizierung in Mikro- und Makrometastasen durchführen:

In toto fanden sich bei 60 der 82 Patienten mit positivem SLN Mikrometastasen. In 48 Fällen (80%) waren ein Lymphknoten, in 11 Fällen (18,3%) zwei Lymphknoten und in einem Fall (1,7%) drei Lymphknoten betroffen (MW 1,22; SD 0,45; SF 0,06). In der Gruppe der Patienten mit nachgewiesenen Makrometastasen (n=22) waren in 18 Fällen (81,8%) ein Lymphknoten, in 3 Fällen (13,6%) zwei Lymphknoten und in einem Fall (4,5%) drei Lymphknoten betroffen (MW 1,23; SD 0,53; SF 0,11).

Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Mikro- und Makrometastasen ergibt sich nicht.

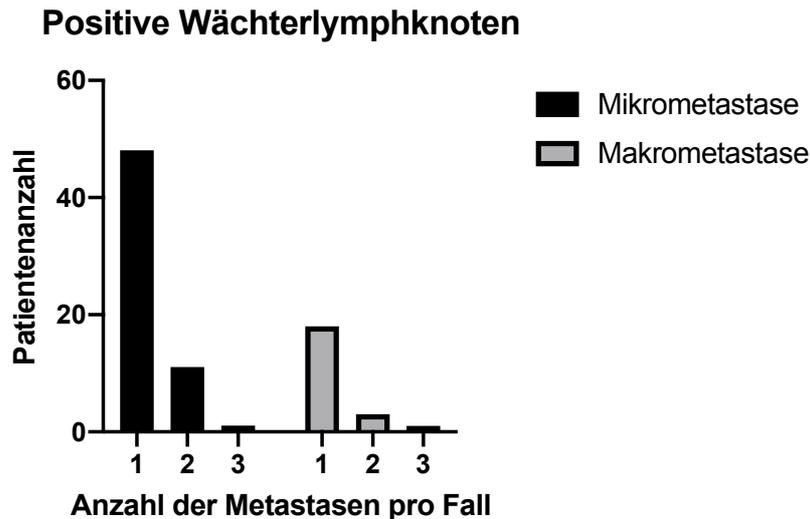


Abbildung 19: Balkendiagramm zur Darstellung der Stratifizierung von Lymphknotenmetastasen in Mikro- und Makrometastasen, gruppiert nach Anzahl der Metastasen pro Fall.

4.3 Charakterisierung der Studienpopulation

Im Median stellten sich die Patienten 2,00 Monate nach Erstdiagnose eines malignen Melanoms in unserem Hauttumorzentrum (HTZ) zur Nachsorge vor. Die Streubreite betrug 0,00 bis 240,00 Monate. Das 25%-Perzentil lag bei 1,00 Monaten, das 75%-Perzentil bei 3,00 Monaten und der Mittelwert bei 10,62 Monaten.

Im Wilcoxon Signed Rank Test zeigte sich der p-Wert höchst signifikant ($<0,0001$).

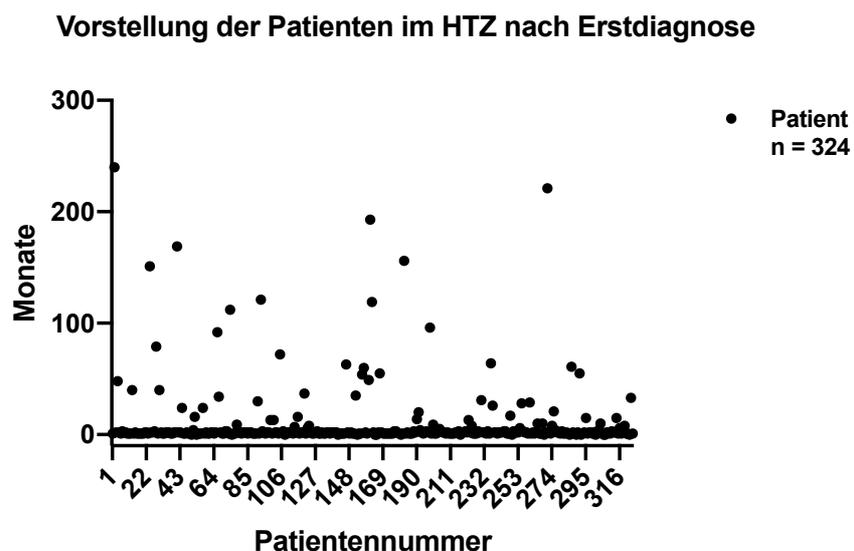


Abbildung 20: Streudiagramm zur Darstellung der Erstvorstellung im Hauttumorzentrum nach Patientenummer und Monat.

Hierbei konnte nach abgeschlossenem histopathologischen und pathologischem Staging (SLNB) folgende Verteilung der Tumorstadien festgestellt werden:

Tabelle 17: Tabellarische Darstellung der Verteilung der AJCC Stadien bei Erstvorstellung im Hauttumorzentrum (HTZ) nach Anpassung an die AJCC Klassifikation von 2017 (8th edition).

**AJCC Stadium 2017 (8th edition)
bei Erstvorstellung im HTZ**

Stadium	n (%)
IA	4 (01,23%)
IB	27 (08,33%)
IIA	28 (08,64%)
IIB	34 (10,49%)
IIC	38 (11,73%)
IIIA	30 (09,26%)
IIIB	53 (16,36%)
IIIC	70 (21,60%)
IIID	0 (00,00%)
IV M1a	1 (00,31%)
IV M1b	10 (03,09%)
IV M1c	19 (05,86%)
IV M1d	10 (03,09%)

Anmerkung: Aufgrund von Rundungen entspricht die prozentuale Gesamtsumme nicht 100%, sondern 99,99%.

Hieraus ist ersichtlich, dass sich der überwiegende Anteil der Patienten bei Vorstellung im Hauttumorzentrum im Stadium III befand (n=153; 47,22%). Die zweite große Kohorte war im Stadium II (n=100; 30,86%). Die Patienten im Stadium I (n=31; 09,57%) sowie im Stadium IV (n=40; 12,35%) waren in etwa gleich verteilt.

Betrachtet man die Gesamtkohorte (n=324) unter dem Aspekt der AJCC-Stadien bei jeweiliger Erstdiagnose sowie am Ende der Datenerhebung („cut-off“) nach individueller Nachbeobachtungszeit, kann eine drastische Verschiebung hin zu höheren Tumorstadien beobachtet werden (Abbildung 21):

Im Stadium I befanden sich bei „cut-off“ von den initial 31 Patienten (9,57%) nur noch 9 Patienten (2,78%). Dies entspricht in etwa einem Drittel der Anfangserhebung.

In Stadium II konnten 38 Patienten (11,73%) gezählt werden, was gleichfalls einer Reduktion auf etwa ein Drittel der Anfangskohorte entspricht.

In Stadium III waren 132 Patienten (40,74%) zu verzeichnen. Der Wert zeigt sich vergleichbar mit der initialen Kohorte.

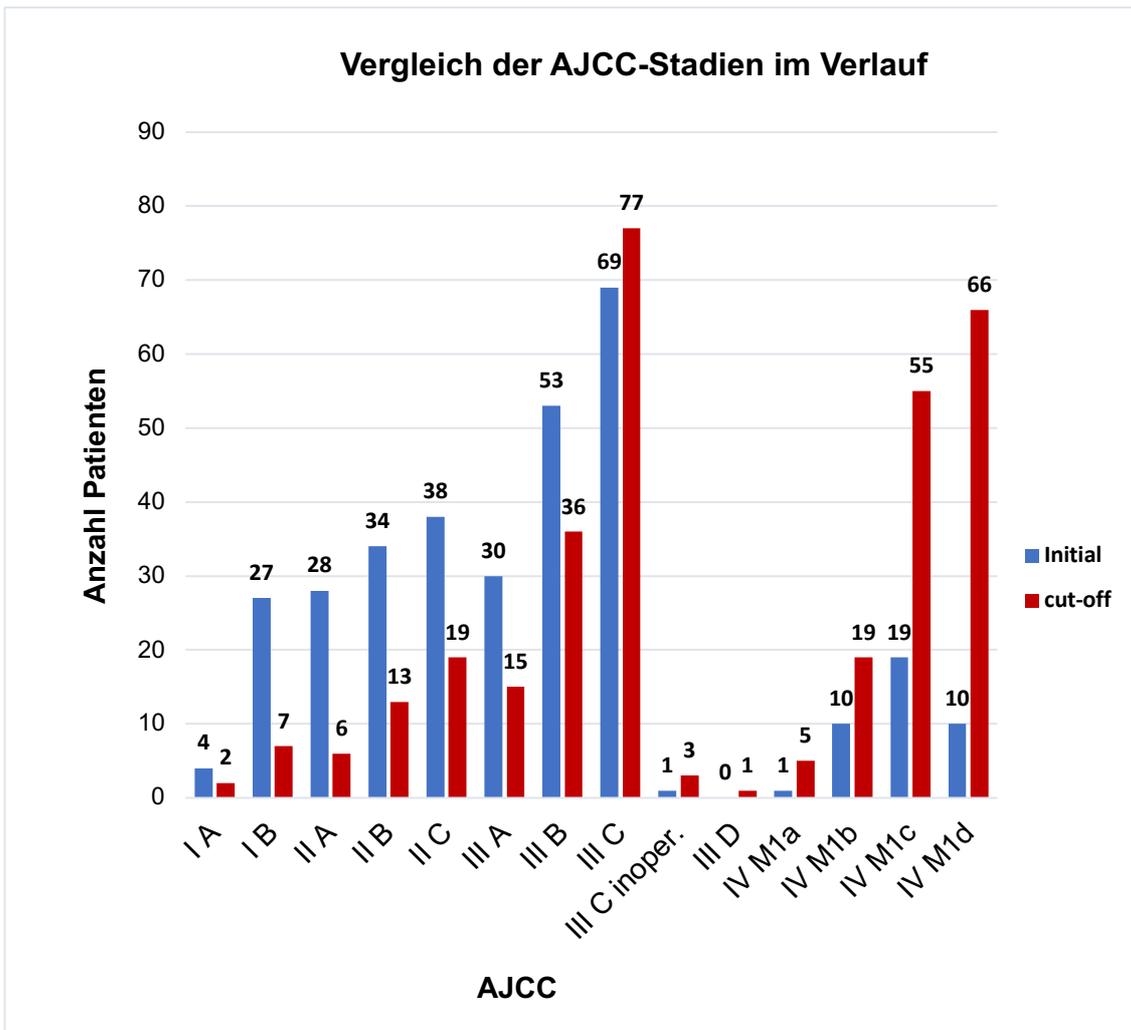


Abbildung 21: Graphische Gegenüberstellung der AJCC-Stadien bei Erstdiagnose („initial“) und am Ende der Datenerhebung („cut-off“). Inoper.=inoperabel.

Knapp die Hälfte der Patienten (n=145; 44,75%) wurde im Verlauf progredient (Median 22,00 Monate; MW 33,62 Monate nach Erstdiagnose; SD 42,61; SF 3,539, $p < 0,0001$) und wechselte in das Stadium IV.

Die 40 Patienten, welche sich bei Erstvorstellung im Stadium IV befanden, waren im Mittel 65,26 Jahre alt (Minimum 29 Jahre, Maximum 85 Jahre). Im Vergleich waren Patienten, die eine Fernmetastasierung erlitten und dadurch ins Stadium IV wechselten, im Durchschnitt 68,33 Jahre alt (Minimum 33 Jahre, Maximum 87 Jahre). Hier zeigte sich somit kein signifikanter Altersunterschied.

Am Ende der Datenerhebung befanden sich 179 Patienten (55,25%) in der Tumornachsorge bzw. in Therapie, 103 Patienten (31,79%) waren verstorben, 4 Patienten (1,23%) waren nach Komplettierung einer 10-jährigen Nachbeobachtung aus der Nachsorge entlassen. Zu insgesamt 38 Patienten (11,73%) fehlten weitere Dokumentationen, sie waren *lost-to-follow-up*,

wodurch keine weiteren Aussagen zu Überleben, Tod oder weiterer Therapie getroffen werden können.

Von den 103 Todesfällen waren 12 (11,65%) nicht Melanom-assoziiert: 4 Patienten sind infolge kardiovaskulärer Ereignisse und 6 Patienten an ihrem Zweitmalignom (Kolon-Karzinom n=3, Gallengang-Karzinom n=1, CLL n=1, Angiosarkom n=1) verstorben. 2 Patienten verstarben an einer Sepsis.

Von den 145 Patienten, die sich am Ende der Datenerhebung im Stadium IV befanden (im Median 22,00 Monate nach Erstdiagnose; MW 33,62, SF: 42,61; Range 0-306 Monate), haben 113 eine systemische Therapie erhalten. 11 Patienten erhielten eine rein chirurgische und 2 Patienten eine alleinige strahlentherapeutische Behandlung. Ein Patient erhielt im Rahmen einer Studie eine *triple*-Therapie mit drei verschiedenen Antikörpern. 18 Patienten haben eine Therapie abgelehnt.

Die 18 Patienten im Stadium IV, welche eine systemische Therapie abgelehnt haben, erreichten das Stadium IV im Mittel nach 33,89 Monaten (Range 0-172 Monate; SD 38,78; SF 9,141; $p < 0,0001$).

Hiervon wiesen ein Patient eine lokoregionale und distante Lymphknotenmetastasierung, 11 Patienten eine viszerale Metastasierung und 6 Patienten eine cerebrale Metastasierung auf.

Tabelle 18: Tabellarische Übersicht der Therapieablehnung im Stadium IV.

Therapieablehnung im Stadium IV	
Status bei Ende der Datenerhebung	n (%)
Best Supportive Care	02 (11,11)
Lost-to-follow-up	04 (22,22)
verstorben	12 (66,67)

Zum Ende der Datenerhebung befanden sich zwei der 18 Patienten (11,11%) im *Best Supportive Care* (MW 11,5 Monate nach Erreichen des Stadium IV), vier Patienten (22,22%) waren *lost-to-follow-up* (MW 9,75 Monate). 12 Patienten (66,67%) waren verstorben (MW 13,17 Monate).

4.4 Mutationsanalysen

Mit Implementierung neuer Therapieoptionen in den klinischen Alltag hat die Kenntnis des Mutationsstatus von Melanompatienten an Bedeutung gewonnen.

Bei allen 324 Patienten wurde in eine molekularpathologische Mutationsanalyse durchgeführt, die zur Detektion einer NRAS-Mutation geführt hat.

Tabelle 19: Übersicht der asservierten Tumorgewebe für die 1. Mutationsanalyse.

Tumorgewebe für die 1. Mutationsanalyse

Primarius	n = 192
Sentinel-Lymphknoten	n = 09
Lymphknotenmetastase	n = 45
Fernmetastase	n = 78

Die Mehrheit der Testungen erfolgte am Primarius (59,3%). In etwa einem Viertel der Fälle wurde die Analyse an einer Fernmetastase (24,1%) durchgeführt, da der Primarius nicht zur Verfügung stand oder sich die Tumorerkrankung durch eine Fernmetastasierung manifestierte. In 13,89% der Fälle konnte die Mutationstestung an einer Lymphknotenmetastase durchgeführt werden, bei neun Patienten (2,8%) diente hierzu der Wächterlymphknoten (SLN).

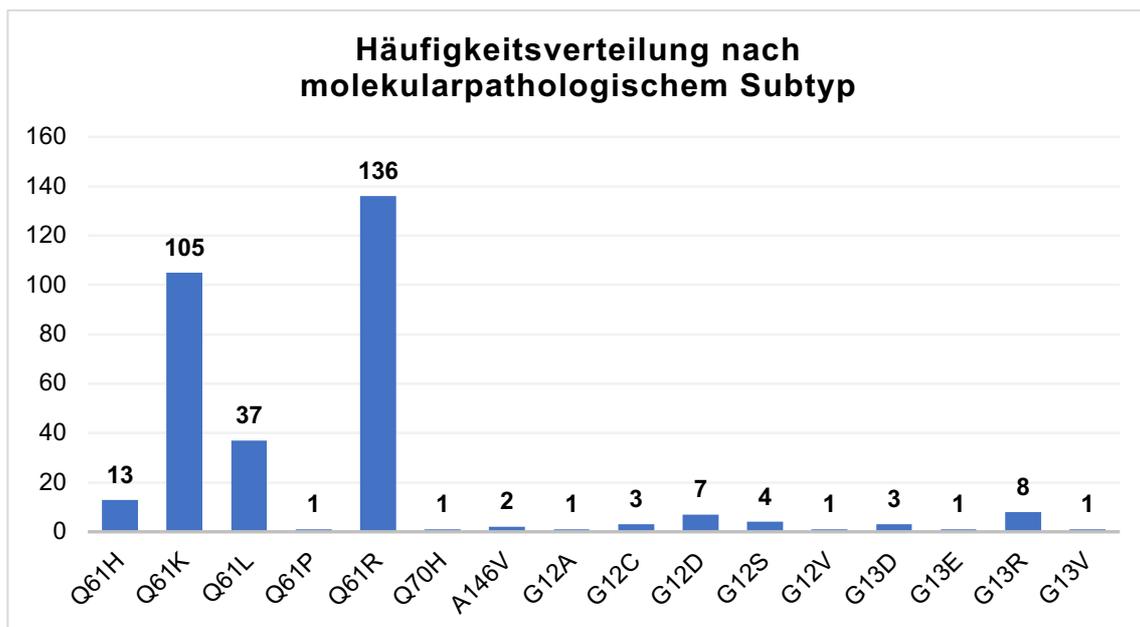


Abbildung 22: Häufigkeitsverteilung nachgewiesener NRAS – Mutationen nach molekularpathologischem Subtyp.

Die weitaus häufigste NRAS-Mutation in unserer Patientenkohorte ist NRAS Q61R (41,98%). Gefolgt von Q61K (32,41%), Q61L (11,42%), und Q61H (04,01%) in absteigender Rangfolge.

Desweiteren finden sich folgende, seltene NRAS – Mutationen: Q61P, Q70H, A146V, G12A, G12C, G12D, G12S, G12V, G13D, G13E, G13E, G13R und G13V.

Bei insgesamt 28 Patienten erfolgte im Verlauf eine erneute Mutationstestung (MW 12,67 Monate nach Ersttestung; SD 0,44 Monate). Diese erfolgte an In-transit- oder Satelliten- (n=9), Lymphknoten- (n=8) oder Fernmetastasen (n=11).

In 21 Fällen konnte die Subgruppe der NRAS – Mutation bestätigt werden. In 7 Kasus ergab sich eine Änderung des Mutationsstatus:

Tabelle 20: Tabelle korrespondierender Mutationsstatus bei Erst- und Zweittestung.

Ersttestung		Zweittestung
NRAS	Anzahl	NRAS
Wildtyp	6	
Wildtyp	2	Q61K
Wildtyp	1	Q61L
Wildtyp	3	Q61R
G13D	1	
G13D	1	Wildtyp

Alle Ersttestungen dieser Gruppe erfolgten am jeweiligen Primarius. Die Zweittestungen hingegen wurden in fünf Fällen an In-transit- bzw. Satellitenmetastasen, in einem Fall an einer Lymphknotenmetastase sowie einmal an einer Fernmetastase durchgeführt.

Ein signifikanter Unterschied in den Ergebnissen der zweiten Mutationstestung besteht nicht. Die Verteilung der molekularpathologischen Subgruppen entspricht derer unserer Gesamtkohorte. In einem Einzelfall kam es zum Verlust der zuvor nachgewiesenen Mutation.

In drei Fällen erfolgte eine dritte Mutationsanalyse (MW 34,33 Monate nach Ersttestung). Die Mutationsanalysen wurden an Fernmetastasen durchgeführt und bestätigten die zuvor in der Zweittestung nachgewiesenen Mutationen.

4.4.1. Koexistente, therapierelevante Mutationen

In der nachstehenden Tabelle finden sich die Mutationspaare koexistenter NRAS/BRAF– bzw. NRAS/c-KIT – Mutationen.

Tabelle 21: Tabellarische Gegenüberstellung nachgewiesener NRAS-/BRAF- bzw. NRAS-/c-KIT – Mutationspaare entsprechend der NRAS-Subgruppenmutation. Als therapierelevant ist die Aktivität bzw. Inaktivität der Zweitmutation angegeben, der jeweilige Quellennachweis findet sich nachstehend.

Primärmutation		Zweitmutation		Zweitmutation
NRAS	Anzahl	BRAF	c-KIT	aktivierend/inaktivierend
Q61H	13			
Q61H	1	N581S		aktivierend ¹⁶⁹
Q61H	1	V600E		aktivierend ¹⁷⁰
Q61K	105			
Q61K	1	V600E		aktivierend ¹⁷⁰
Q61K	1	G466R		inaktivierend ¹⁷¹
Q61L	37			
Q61L	1	E586K		aktivierend ¹⁷²
Q61L	1	S467L		inaktivierend ¹⁷³
Q61R	136			
Q61R	1	V600E		aktivierend ¹⁷⁰
Q61R	1		Exon 8	aktivierend ¹⁷⁴
A146A	2			
A146A	1	G469R		aktivierend ¹⁷⁵
G12D	7			
G12D	1	N591I		unbekannt
G12D	1	V600K		aktivierend ¹⁷⁰
G13D	3			
G13D	1	D594N		inaktivierend ¹⁶⁹
G13E	1			
G13E	1	S467L		inaktivierend ¹⁷³

Insgesamt konnten 12 Patienten identifiziert werden, bei denen in einer Tumorprobe sowohl eine NRAS– als auch eine BRAF– Mutation nachgewiesen wurde. Dies entspricht 3,7% der Gesamtkohorte.

Von diesen Mutationspaarungen zeigten sich 7 Patienten mit aktivierender NRAS – Mutation und koexistenter, aktivierender BRAF – Mutation. Eine prädominante Korrelation einer NRAS-Subgruppenmutation mit einer distinkten BRAF-Mutation ließ sich nicht nachweisen. Therapielevant waren von diesen 7 Paarungen >50% (4 Patienten, davon 3 mit einer BRAF^{V600E}

und ein Patient mit einer BRAF^{V600K} Mutation). Für die nachgewiesenen, aktivierenden BRAF – Mutationen N581S, E586K und G469R stehen derzeit (noch) keine zielgerichteten Therapien zur Verfügung. Die Funktion der BRAF – N591I ist bislang unbekannt. Die Funktion der BRAF G466R Mutation gilt als inaktivierend und bietet somit keine spezifische Therapieoption. Anteilig an der Gesamtkohorte wiesen somit 1,2% der Patienten eine therapierelevante, koexistente BRAF – Mutation auf.

Bei einem Patienten fand sich ein koexistentes, therapierelevantes NRAS/c-KIT – Mutationspaar (0,3% der Gesamtkohorte).

4.4.2. Begleitmutationen

Mittels *New Generation Sequencing* konnten im Rahmen der molekularpathologischen Untersuchungen weitere Begleitmutationen ermittelt werden. Diese sind in der nachstehenden Tabelle aufgeführt, bieten jedoch nach derzeitigem Kenntnisstand keine weiteren Therapieoptionen.

Es zeigte sich, dass bei NRAS-mutierten Tumoren begleitend v.a. Mutationen an RAC1, PTEN und TP53 auftraten, die im MAPK– und PI3K– Signalkaskadeweg regulatorische Funktionen einnehmen ¹⁴¹ und einer UV-induzierten Mutationslast entsprechen ⁶⁷.

Tabelle 22: Tabellarische Auflistung koexistenter Begleitmutationen, die mittels New Generation Sequencing detektiert werden konnten. Die Onkogenität ist unter „Aktivität“ angegeben, der jeweilige Quellennachweis findet sich nachstehend.

Koexistente Begleitmutation	Anzahl	Aktivität
RAC 1 EX2: c86C>A p.29H	1	aktivierend ⁶⁷
RAC 1 Ex2: c85C>T p.P29S	10	aktivierend ⁶⁷
RAC 1 Ex2: c85_86delins GT p.P29V	1	aktivierend ⁶⁷
CDKN2A Ex1: c.442G>A p.A148T	5	unbekannt
CDKN2A Ex1: c.148C>T p.Q50	1	aktivierend ¹⁷⁶
PIK3CA_S541F	1	unbekannt
IDH1-R132C	3	aktivierend ¹⁷⁷
PDGFRA-D576N	1	unbekannt
KNSTRN Ex1: c.119C>A p.A40E	1	aktivierend ¹⁷⁸
MAP2K1: c.148C>T p.L50F	1	unbekannt
OXA1L Ex1: c159_160insA p.A54Sfs*100	1	unbekannt
OXA1L Ex1: c169C>T p.L57F	1	unbekannt
C15orf23 Ex1: c71C>T p.S24F	1	aktivierend ¹⁷⁸
C15orf23 p.E5	1	unbekannt
PTEN A121E	1	aktivierend ¹⁷⁹
PTEN c.752G>T p.G251V	1	unbekannt
PTEN Ex7: c.635-2A>G	1	unbekannt
PTEN Ex8: c.1003C>T p.335*	1	unbekannt
TP53: c380C>T p.S127F	2	aktivierend ¹⁸⁰
TP53: c.993+3A>C	1	unbekannt
TP53 Ex4: c.215C>G p.P72R	3	inaktivierend ¹⁸¹
TP53-c559+2T>G	1	unbekannt
TP53-R213	2	aktivierend ¹⁸²
TP53-L145R	1	aktivierend ¹⁸³
TP53-G279E	2	inaktivierend ¹⁸⁴
TP53-I195T	1	unbekannt
TP53-K139M	1	unbekannt
TP53-Q136	1	aktivierend ^{185,186}
TP53-P151R	1	unbekannt
TP53-M237K	1	unbekannt
TP53-S241F	4	aktivierend ¹⁸⁷
TP53 Ex9: c.993+1G>A	1	Unbekannt
TP53-G245S	1	aktivierend ¹⁸⁸
HRAS Ex3: A59D	1	unbekannt
KRAS Ex2: c.34G>C p. G12R	1	aktivierend ¹⁸⁹
KRAS Ex2: c34G>T p.G12C	1	aktivierend ¹⁹⁰

Die Diversität des NRAS-Mutationsstatus bei Patienten mit malignem Melanom konnte anhand voranstehender Darstellungen veranschaulicht werden (Vgl. Abbildung 22, Häufigkeitsverteilung nach molekularpathologischem Subtyp).

Deutlich wird, dass es sich bei den Mutationen Q61P, Q70H, A146V, G12A, G12C, G12D, G12S, G12V, G13D, G13E, G13E, G13R und G13V um seltene Mutationen handelt, deren Ätiologie teilweise nicht abschließend geklärt ist. Sie werden in den folgenden Analysen aufgrund fehlender statistischer Signifikanz nicht weiter berücksichtigt.

Die Auswertungen im Folgenden beziehen sich auf die vier häufigsten Mutationen Q61H, Q61K, Q61L und Q61R.

4.4.3. Geschlechterspezifische Analyse der 4 häufigsten NRAS-Genotypen

In der Analyse der Geschlechterverteilung nach den vier häufigsten Genotypen NRAS Q61H, NRAS Q61K, NRAS Q61L und NRAS Q61R ergab sich folgende Verteilung:

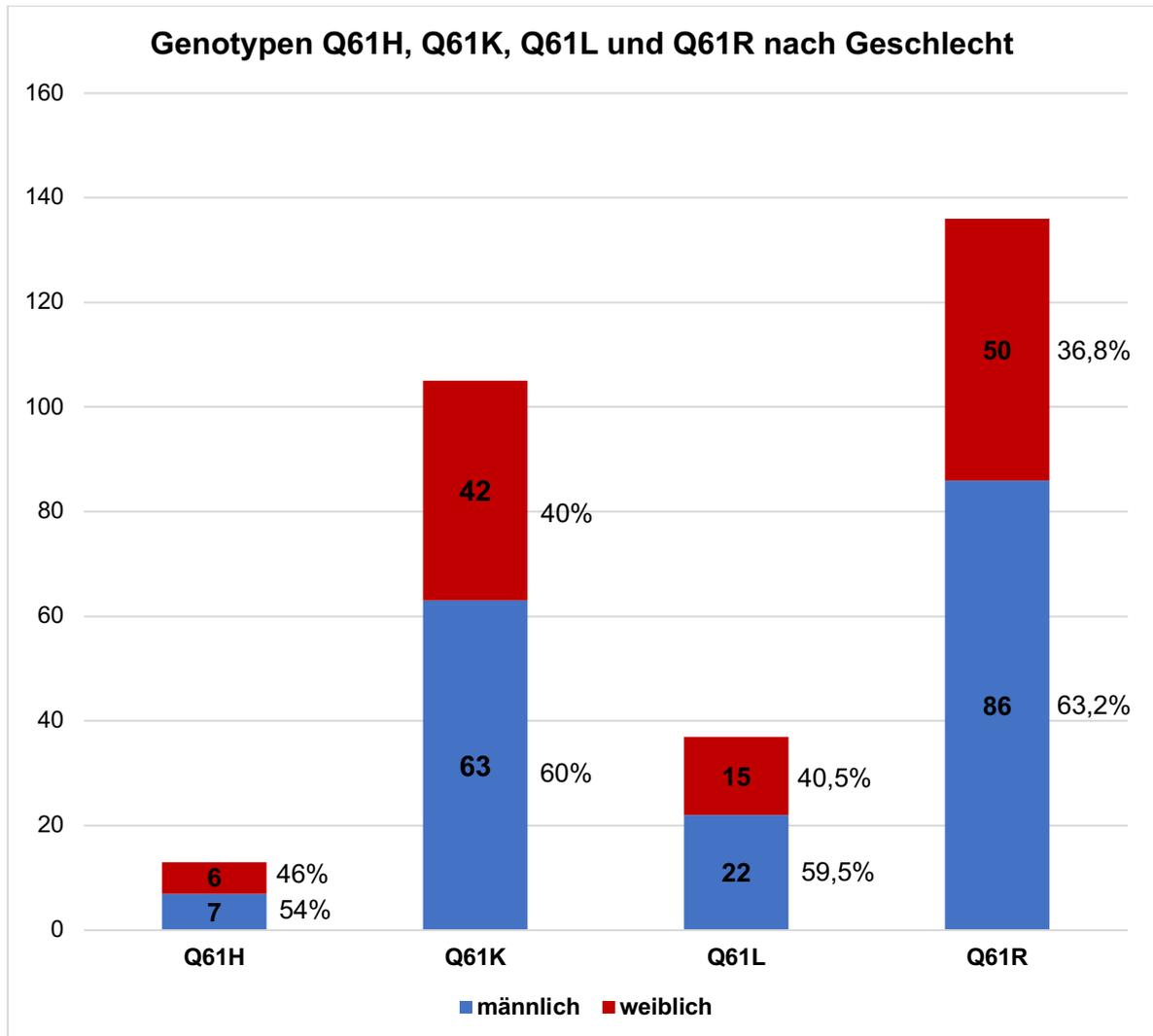


Abbildung 23: Verteilung der vier häufigsten NRAS – Genotypen Q61H, Q61K, Q61L und Q61R nach Geschlecht.

Bei allen vier Genotypen waren anteilig etwa 60% männlichen und 40% weiblichen Geschlechts. Es zeigte sich somit kein signifikanter Unterschied in der geschlechtsspezifischen Verteilung nach NRAS – Genotyp.

4.5 Metastasierungsverhalten

4.5.1. Metastasierung von Patienten mit NRAS-mutiertem malignen Melanom

In unserer Kohorte von 324 Patienten entwickelten 230 Patienten (71%) eine lokoregionale und/oder Fernmetastasierung. 94 Patienten (29%) wiesen im Beobachtungszeitraum keine Metastasen auf.

Betrachtet man die Chronologie der Metastasierung, so ist – wie bei einer Tumorerkrankung zu erwarten – nicht eine einmalige Metastasierung erfolgt. Individuell für den Patienten sind bis zu neun Metastasierungszeitpunkte mit teils multilokulären Metastasen dokumentiert.

Da es sich um eine interindividuelle Chronologie handelt, erfolgte zur Analyse eines Metastasierungsmusters nach Zeit eine gepoolte Analyse, in der alle dokumentierten Metastasen stratifiziert nach Lokalisation (lokoregional, AJCC IV M1A – M1D) in Abhängigkeit des zeitlichen Auftretens erfasst wurden (1.-9. Metastasierungslinie, Vgl. Anhang 7.4).

Zu den lokoregionalen Metastasen (AJCC III A – C) werden Satelliten- und Intransit-Metastasen sowie LK-Metastasen der primären Lymphknotenstationen gezählt. Insgesamt sind 307 lokoregionale Metastasierungen dokumentiert. Diese manifestierten sich mit einer Streubreite von 0-261 Monaten nach Erstdiagnose eines Melanoms (Median 19,00 Monate; SD 39,75; SF 2,269). Das 1.Perzentil (25%) lag bei 8,00 Monaten, das 3.Perzentil (75%) bei 41,00 Monaten.

Unter M1A subsummieren sich Fernmetastasen der Haut, Weichteilmetastasen und/oder distante, nicht regionäre Lymphknotenmetastasen. Insgesamt sind 118 subkutan/ kutane Metastasen, Weichteilmetastasen oder nicht regionäre Lymphknotenmetastasen dokumentiert. Diese traten mit einer Streubreite von 0-263 Monaten nach Erstdiagnose eines Melanoms (Median 28,50 Monate; SD 50,59; SF 4,657) auf. Das 1.Perzentil (25%) lag bei 12,75 Monaten, das 3.Perzentil (75%) bei 51,25 Monaten.

Pulmonale Metastasen mit oder ohne Metastasen aus IV M1A werden zur Gruppe M1B gezählt. In dieser Gruppe sind 154 Fälle dokumentiert. Pulmonale Metastasen manifestierten sich mit einer Streubreite von 0-309 Monaten nach Erstdiagnose eines Melanoms (Median 27,00 Monate; SD 41,01; SF 3,305). Das 1.Perzentil (25%) lag bei 13,00 Monaten, das 3.Perzentil (75%) bei 47,25 Monaten.

Viszerale Fernmetastasen außerhalb des ZNS mit oder ohne Beteiligung aus M1A und M1B kennzeichnen die Gruppe M1C. 156 viszerale Metastasierungen sind dokumentiert. Diese traten mit einer Streubreite von 0-148 Monaten nach Erstdiagnose eines Melanoms (Median 28,00 Monate; SD 28,00; SF 2,242) auf. Das 1.Perzentil (25%) lag bei 14,25 Monaten, das 3.Perzentil (75%) bei 50,00 Monaten.

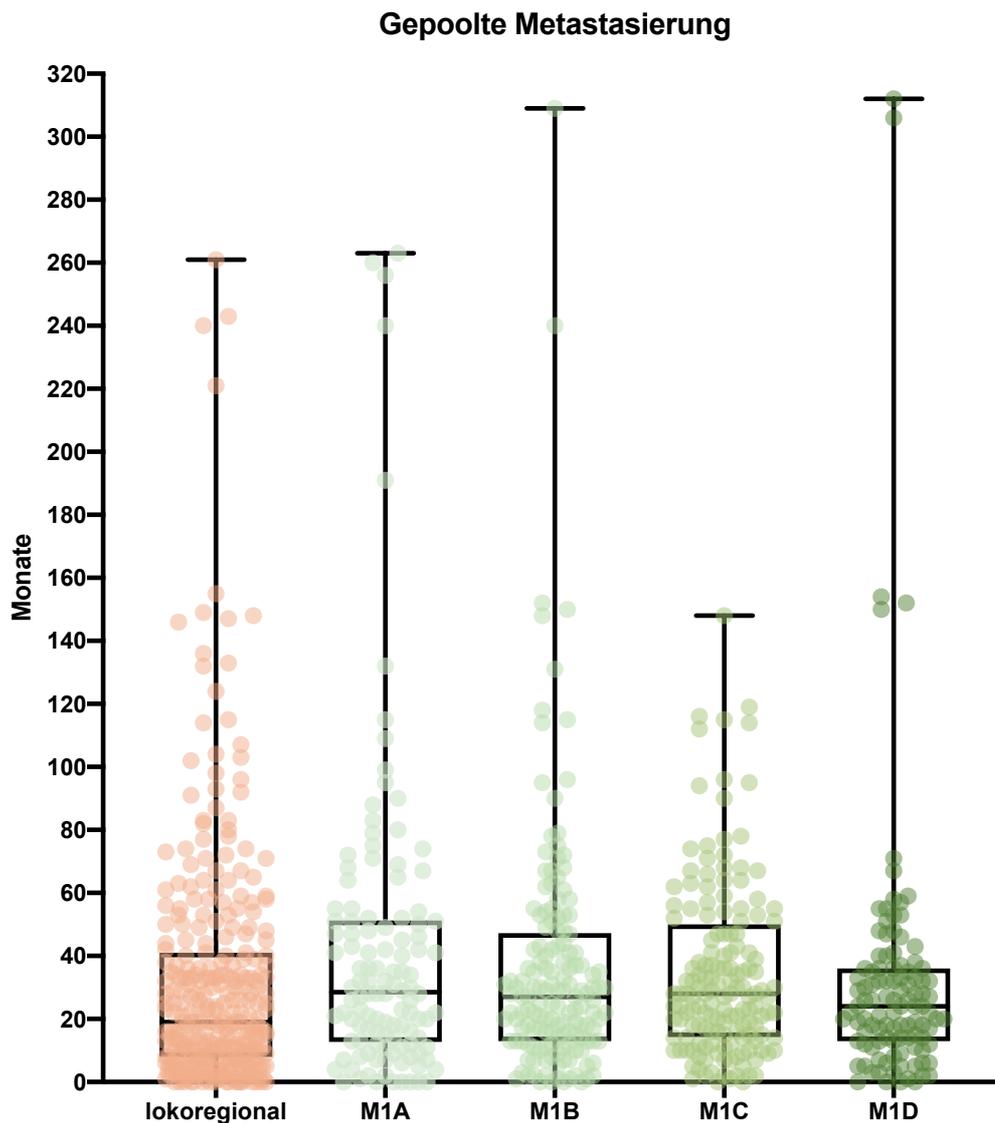


Abbildung 24: Gepoolte Metastasierung in Abhängigkeit von Zeit (Monaten) und Lokalisation (lokoregional, M1A-M1D), dargestellt in Boxplots.

Patienten mit cerebralen oder leptomeningealen Metastasen mit oder ohne Beteiligung aus M1A-M1C werden der Gruppe M1D zugerechnet. 108 Fälle cerebraler oder leptomeningealer Metastasen sind dokumentiert. Sie manifestierten sich mit einer Streubreite von 0-312 Monaten nach Erstdiagnose eines Melanoms (Median 24,00 Monate; SD 46,32; SF 4,457). Das 1. Perzentil (25%) lag bei 13,00 Monaten, das 3. Perzentil (75%) bei 36,00 Monaten.

Die Primärmetastasierung ergab folgende Verteilung: lokoregional 67% (n=156), M1A 6,5% (n=15), M1B 11,7% (n=27), M1C 5,2% (n=12), M1D 8,7% (n=20).

Betrachtet man die ermittelten Mediane sowie das 1. und 3. Perzentil, kann festgestellt werden, dass NRAS mutierte Patienten neben einer ausgeprägten lokoregionalen Metastasierung zu einer frühen cerebralen Metastasierung neigen.

Im Wilcoxon Signed Rank Test zeigten sich alle Ergebnisse höchst signifikant mit einem p-Wert von $<0,0001$.

4.5.2. Metastasierung von Patienten mit positivem SLN

Insgesamt 45 Patienten von den 82 Patienten mit positivem Wächterlymphknoten (SLN) entwickelten im Verlauf lokoregionale und/oder Fernmetastasen.

Der Mittelwert bis zum Auftreten der ersten Metastasierung betrug 14,82 Monate (Median 12,00 Monate; SD 16,21; SF 2,417; Range 1- 95 Monate). Das 1. Perzentil (25%) lag bei 4,50 Monaten, das 3. Perzentil (75%) bei 19,00 Monaten.

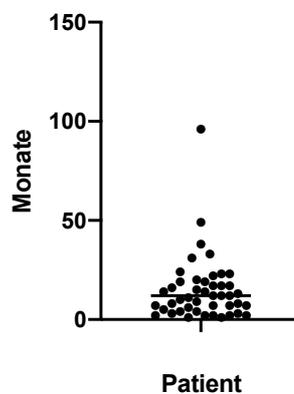


Abbildung 25: Streudiagramm zur Darstellung des Auftretens der Erstmetastasierung nach Zeit (Monate) von Patienten mit positivem Wächterlymphknoten.

Im Wilcoxon Signed Rank Test zeigte sich das Ergebnis höchst signifikant mit einem p-Wert von $<0,0001$.

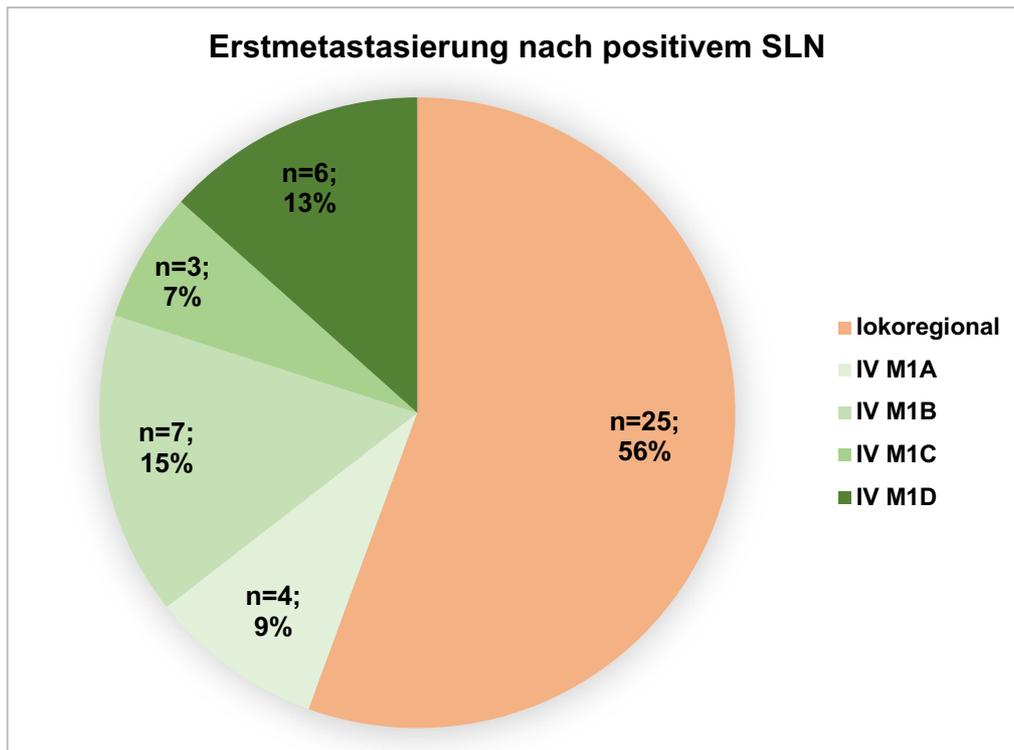


Abbildung 26: Häufigkeitsverteilung der Erstmetastasierung nach Lokalisation (lokoregional, M1A-M1D) von Patienten mit positivem Wächterlymphknoten (SLN).

Von den 45 Patienten mit positivem Wächterlymphknoten, die eine Metastasierung erlitten, entwickelten 56% lokoregionale Filiae. 15% wiesen als Erstmanifestation einer Metastasierung pulmonale Metastasen auf, 13% hingegen cerebrale Filiae. Weichteilmetastasen und/oder distante Lymphknotenmetastasen konnten bei 9% erfasst werden, 7% entwickelten viszerale Metastasen.

Im Wilcoxon Signed Rank Test zeigte sich das Ergebnis signifikant mit einem p-Wert von $p=0,0312$.

4.5.3. Korrelation des Metastasierungsortes mit dem NRAS-Genotyp

Für die Prognose und das Überleben von Patienten mit einem malignen Melanom ist das Erreichen des Stadium IV M1D mit Entwicklung von leptomeningealen und/oder Hirnmetastasen von besonderer Bedeutung.

In unserem Kollektiv haben wir hierzu die individuellen Metastasierungswege unter Betrachtung der vier Hauptgenotypen NRAS Q61H, NRAS Q61K, NRAS Q61L und NRAS Q61R analysiert. Die weiteren Genotypen wurden aufgrund zu geringer Fallzahlen in dieser Analyse ausgeschlossen.

Von den 291 Patienten, welche die Einschlusskriterien erfüllten, wurde zunächst die Primärmetastasierung entsprechend des Genotyps bestimmt:

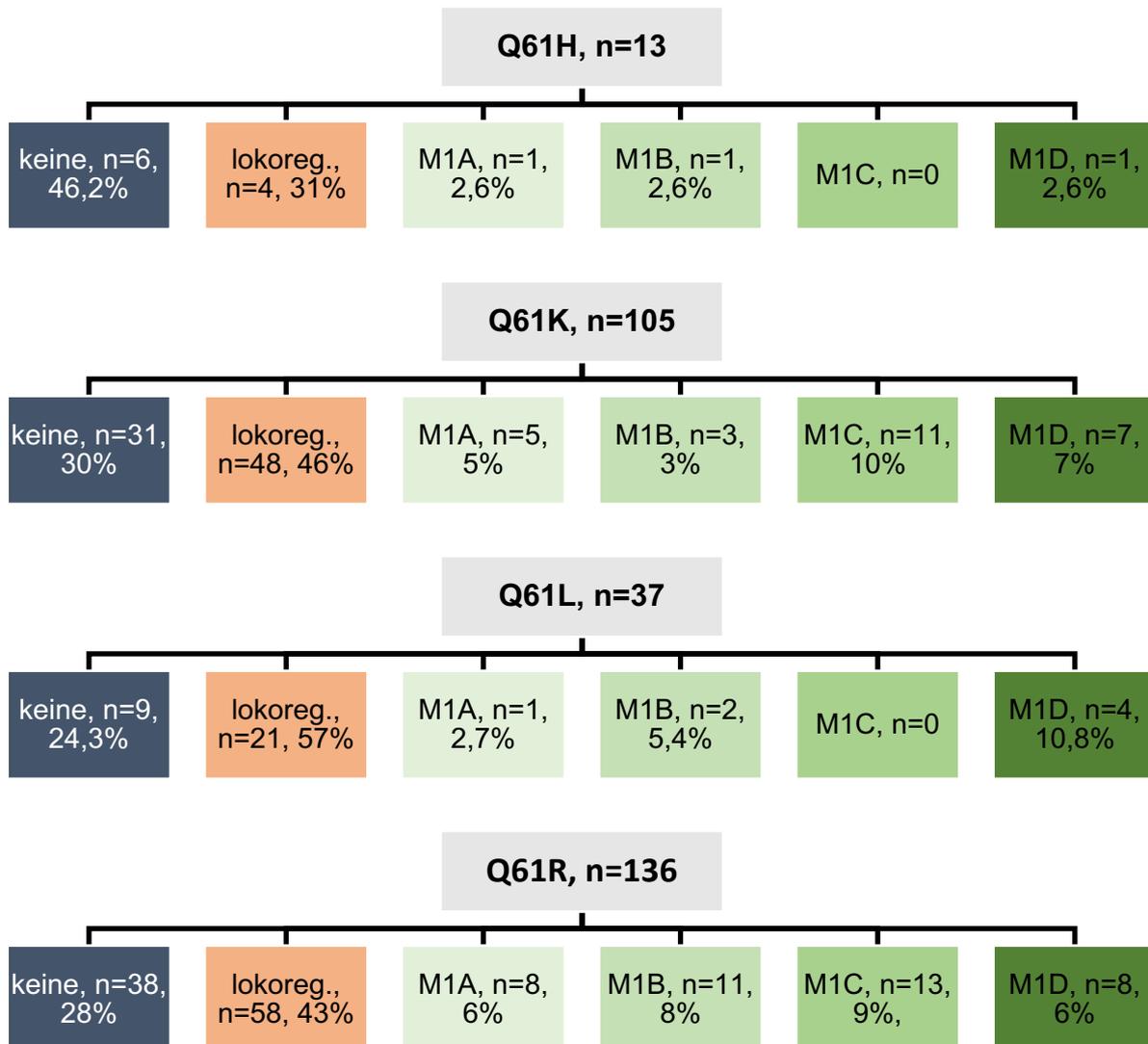


Abbildung 27: Hierarchiedigramme der Primärmetastasierung nach den Mutationsgenotypen NRAS Q61H, NRAS Q61K, NRAS Q61L und NRAS Q61R. lokoreg. = lokoregional.

Von den 13 Patienten mit einer NRAS Q61H Mutation entwickelten knapp die Hälfte der Patienten keine Metastasen (46,2%). Etwa ein Drittel entwickelte in der Primärmetastasierung lokoregionale Metastasen (31%), jeweils ein Patient entwickelte eine Weichteil-, Lungen- oder Hirnmetastase.

In der Gruppe NRAS Q61K (n=105) entwickelten 30% keine Metastasen. In der Primärmetastasierung zeigte sich bei 46% der Patienten eine lokoregionale Metastasierung. 5% entwickelten Weichteilmetastasen, 3% pulmonale Metastasen, 10% viszerale Metastasen und 7% Hirnmetastasen.

Patienten mit einer NRAS Q61L Mutation (n=37) entwickelten in 24,3% der Fälle keine Metastasen. Über die Hälfte (57%) wies initial ein lokoregionales Metastasierungsmuster auf. 2,7% der Patienten entwickelten eine Weichteilmetastase, 5,4% eine Lungenmetastase. Bei 10,8% konnte eine cerebrale Metastasierung festgestellt werden.

In der Gruppe NRAS Q61R (n=136) war in knapp einem Drittel der Fälle (28%) keine Metastasierung zu verzeichnen. 43% der Patienten wiesen lokoregionale Metastasen auf. Fernmetastasen im Stadium IV waren über die Kategorien M1A-M1D in etwa gleich verteilt (M1A 6%, M1B 8%, M1C 9%, M1D 6%).

Somit scheint eine Tendenz zu bestehen, dass Patienten mit einer NRAS Q61H Mutation keine oder lokoregionäre Metastasen entwickeln. Für Patienten mit einer NRAS Q61K Mutation hingegen kann ein lokoregionales bzw. viszerales Metastasierungsmuster als wahrscheinlich angenommen werden. Für Patienten mit einer NRAS Q61L Mutation scheint eine Korrelation zu lokoregionalen und cerebralen Metastasen zu bestehen. Allein für NRAS Q61R Patienten besteht ein diffuses Metastasierungsmuster, das von keinen über lokoregionale Metastasen bis hin zu jeder Art von Fernmetastasierung reicht.

Betrachtet man die Metastasierungsverläufe nach Genotyp bis zum Erreichen einer cerebralen Metastasierung, ergeben sich folgende Abbildungen:



Abbildung 28: Tortendiagramme zur Darstellung der Entwicklung von Hirnmetastasen nach Genotyp. Zentral dargestellt sind diejenigen Patienten, welche primär eine Hirnmetastasierung erlitten haben sowie die unmittelbare Metastasierungsstufe vor Entwicklung cerebraler Metastasen. Sofern mehr als eine Metastasierungsstufe zur Entwicklung von Hirnmetastasen geführt hat, wurde dies durch eine primäre bis quartäre Entwicklungsstufe kenntlich gemacht. Lokoreg.=lokoregional.

Insgesamt 58 der 291 Patienten entwickelten im Verlauf ihrer Erkrankung Hirnmetastasen (19,93%). Bei 20 Patienten manifestierte sich die Hirnmetastasierung als Primärlokalisierung. Eine Aufstellung nach molekularpathologischem Subtyp findet sich in o.g. Tortendiagrammen. Bei 29 Patienten traten Hirnmetastasen in der 2. Metastasierungsfolge auf. Bei weiteren 9 Patienten traten nach individuellen Metastasierungsfolgen cerebrale Metastasen auf.

Tabelle 23: Tabellarische Übersicht des relativen Risikos der Entwicklung cerebraler Metastasen nach Genotyp (NRAS Q61H, NRAS Q61K, NRAS Q61L und NRAS Q61R).

Relatives Risiko der Entwicklung cerebraler Metastasen	Relatives Risiko RR
Q61H	0.77
Q61K	0.96
Q61L	1.22
Q61R	0.99

Trotz der geringen Fallzahlen, scheint für die Patienten mit einer NRAS Q61L Mutation das größte Risiko zu bestehen, Hirnmetastasen zu entwickeln (RR=1,22).

In der Gesamtkohorte von 324 Patienten entwickelten insgesamt 68 Patienten (21%) Hirnmetastasen ungeachtet des korrelierenden Genotyps.

In der multivariaten Analyse zur Ermittlung prädiktiver Faktoren für die Entwicklung von Hirnmetastasen zeigte sich eine Tendenz, dass Patienten mit einem Primarius an den oberen Extremitäten hierzu neigen (Hazard Ratio 1,250). Auch die NRAS Q61L Mutation scheint hierauf einen Einfluss zu haben (Hazard Ratio 1,173).

Für die Parameter Geschlecht, Alter und das histopathologische Merkmal „nodulär“ ergab sich kein Hinweis auf eine Assoziation.

4.6 Analyse des Gesamtüberlebens nach 5 bzw. 10 Jahren

Für die Analyse des Gesamtüberlebens (*overall survival*) nach 5 und 10 Jahren lagen 273 vollständige Datensätze vor. Ausgeschlossen wurden unter diesem Gesichtspunkt Patienten, die nicht am Melanom verstorben sind und Patienten, deren Nachverfolgung aufgrund ihres Status als *lost-to-follow-up* nicht abschließend möglich war. Definiert wurde das *overall survival* als Zeitraum zwischen Erstdiagnose und Tod.

Angesichts der heterogenen Verteilung der NRAS-Mutationen, erfolgte die Analyse nur bei den Genotypen Q61H, Q61K, Q61L und Q61R der nicht zensierten Patienten (n=245) im Vergleich zur Gesamtkohorte (n=273). Die weiteren NRAS-Genotypen wurden aufgrund der geringen Datensätze nicht untersucht.

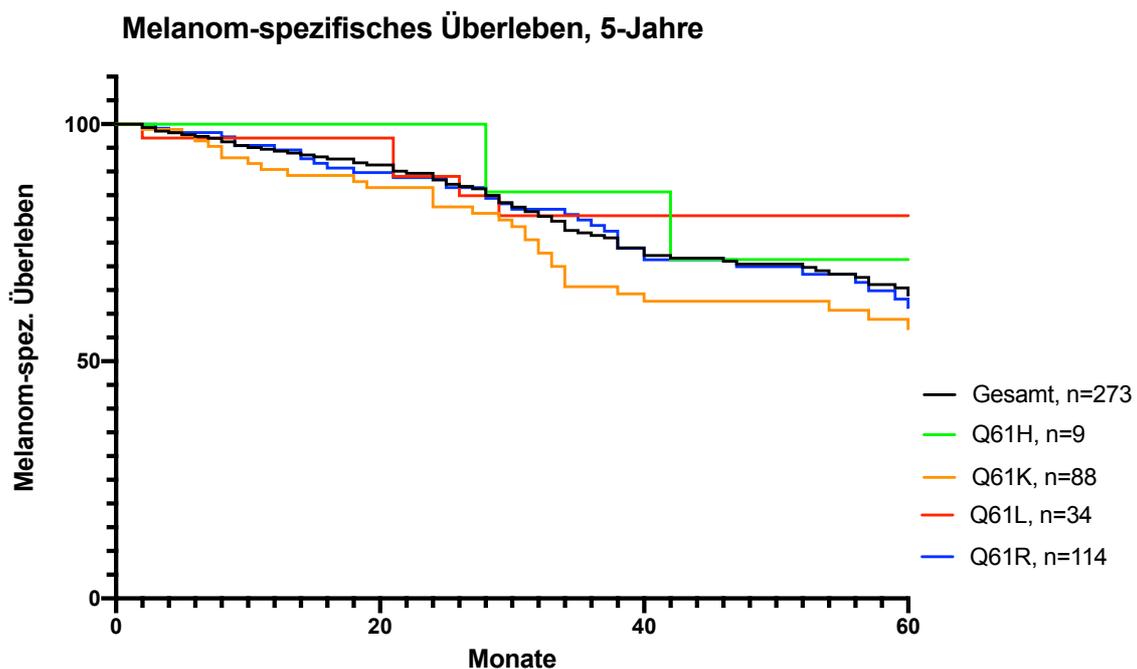


Abbildung 29: Melanom-spezifisches Überleben nach 5 Jahren, sortiert nach NRAS – Genotyp, dargestellt in Kaplan-Meier-Kurven.

Melanom-spezifisches Überleben, 10 Jahre

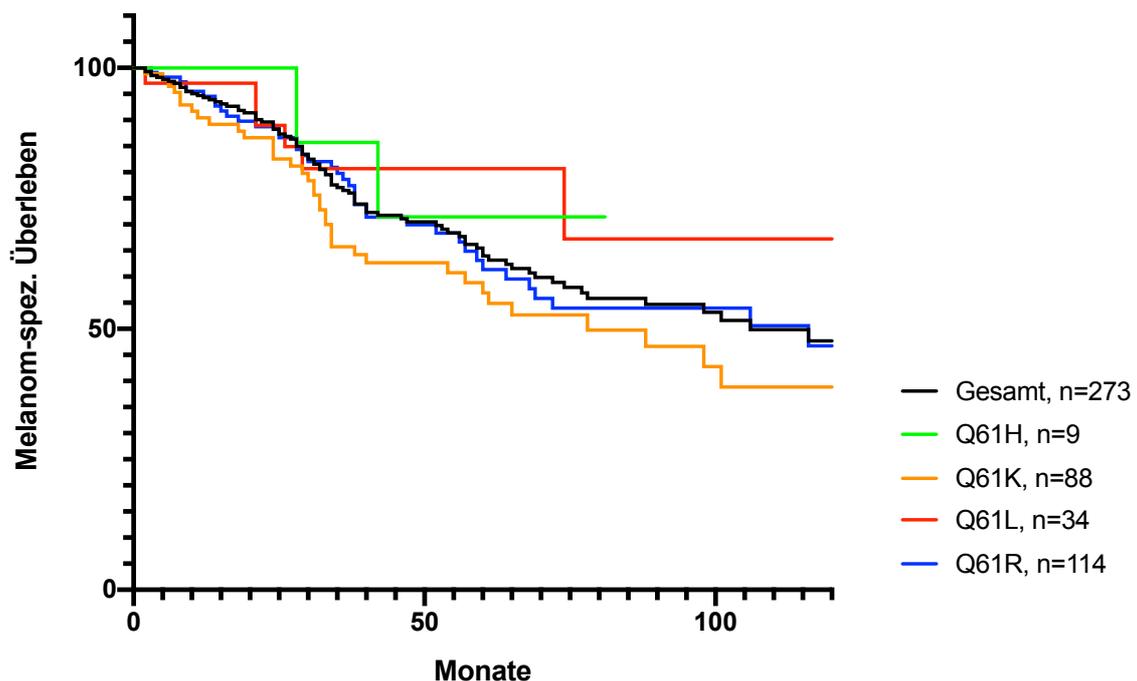


Abbildung 30: Melanom-spezifisches Überleben nach 10 Jahren, sortiert nach NRAS – Genotyp, dargestellt in Kaplan-Meier-Kurven.

Das Melanom-spezifische Gesamtüberleben für die Gesamtkohorte betrug im Schätzverfahren nach Kaplan-Meier nach 5 Jahren 62,9% (95%-KI: 59,2-66,6%). Das beste Ergebnis erzielte die Gruppe Q61L mit 80,7% (95%-KI: 72,8-88,6%). Ein ebenfalls besseres Ergebnis als die Gesamtkohorte erreichte die Gruppe Q61H mit 71,4% (95%-KI: 54,3-88,5%). Verglichen mit der Gesamtkohorte wiesen Patienten mit einer Q61R Mutation und einer 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 62,0% (95%-KI: 56,4-67,6%) ein ähnliches Melanom-spezifisches Überleben auf. Ein deutlich schlechteres Resultat als die Gesamtkohorte verzeichnete die Patientenkohorte mit einer Q61K Mutation und einem 5-Jahres-Gesamtüberleben von 57,6% (95%-KI: 51,5-63,7%).

In der 10-Jahres Analyse erreichte die Gesamtkohorte ein Melanom-spezifische Gesamtüberleben von 46,7% (95%-KI: 41,7-51,7%). Das beste Ergebnis in der Langzeitanalyse erzielte hier die Gruppe Q61H mit 71,4% (95%-KI: 54,3-88,5%). Allerdings lag das erreichte Überlebens-Maximum bei dieser Gruppe bei 81,1 Monaten, so dass ein 10-Jahres-Vergleich nicht durchführbar ist.

Ein besseres Resultat als die Gesamtkohorte wies alleinig die Gruppe Q61L mit 67,2% (95%-KI: 53,3-81,1%) auf. Patienten mit einer Q61R Mutation erreichten mit 47,2% (95%-KI: 40,1-

54,3%) ein ähnliches Ergebnis wie Gesamtkohorte. Die geringste 10-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit zeigten Patienten mit einer Q61K-Mutation (39,4%; 95%-KI: 31,7-47,1%).

In der statistischen Analyse zeigten sich die Ergebnisse jedoch nicht signifikant (Log Rank Test nach Mantel-Cox, p-Wert = 0,327).

In einer multivariaten Analyse mittels Cox-Regression untersuchten wir mögliche Einflussfaktoren auf das Gesamtüberleben. Für diese Analyse wurden von den vorgenannten 245 Patienten 13 Datensätze zensiert, da bei diesen Patienten ein PTU (mit NRAS Q61H, Q61K, Q61L oder Q61R Mutation) vorlag und keine Aussage bezüglich des Kriteriums „nodulär“ des Primärtumors möglich war.

Tabelle 24: Multivariate Analyse möglicher Einflussfaktoren auf das Gesamtüberleben.

Multivariate Analyse, Gesamtüberleben					
		Anzahl	95%-KI	p-Wert	Hazard Ratio
Altersgruppe	<40	n=13	0,104-1,629	0,206	0,412
	41-50	n=23	0,202-2,080	0,466	0,648
	51-60	n=30	0,298-2,690	0,844	0,896
	61-70	n=56	0,301-2,234	0,698	0,820
	71-80	n=91	0,478-3,394	0,629	1,274
	>80	n=19	Referenz	Referenz	Referenz
Geschlecht	weiblich	n=83	0,473-1,243	0,281	0,766
	männlich	n=149	Referenz	Referenz	Referenz
NRAS	Q61H	n=08	0,079-1,651	0,189	0,362
	Q61K	n=80	0,929-2,317	0,100	1,467
	Q61L	n=30	0,124-1,024	0,055	0,357
	Q61R	n=114	Referenz	Referenz	Referenz
Lokalisation	Kopf/Hals	n=30	0,825-3,528	0,149	1,706
	Rumpf	n=78	0,508-1,537	0,661	0,884
	Obere Extr.	n=58	0,358-1,300	0,245	0,682
	Genital	n=1	0,000-2,407 ²⁷⁵	0,980	0,000
	Untere Extr.	n=65	Referenz	Referenz	Referenz
Histologie	nicht nodulär	n=94	0,627-1,554	0,921	0,977
	nodulär	n=138	Referenz	Referenz	Referenz

Legende: Extr. = Extremitäten.

Hiernach weisen Patienten mit einer NRAS Q61K Mutation eine Tendenz auf, früher zu versterben (Hazard Ratio 1,467). Auch die Lokalisation des Primärtumors im Kopf-/Halsbereich lässt einen Einfluss auf das Gesamtüberleben vermuten (Hazard Ratio 1,706). Einen geringen Einfluss auf das Gesamtüberleben scheint die Altersgruppe der 71-80-Jährigen zu haben (Hazard Ratio 1,274), kann jedoch nach unseren Ergebnissen nicht als eigenständiger Prädiktor für das Gesamtüberleben herangezogen werden.

Das Geschlecht und das histopathologische Merkmal „nodulär“ (als Primär- und Sekundärcharakteristikum) sind in unserer Kohorte statistisch nicht mit einer verkürzten Überlebensdauer assoziiert.

4.7 Systemtherapie

Von den vorgenannt 145 Patienten, die im Verlauf das Stadium IV erreicht haben, erhielten insgesamt 113 Patienten entsprechend ihrer nachgewiesenen NRAS-Mutation eine systemische Therapie (34,87% der Gesamtkohorte) und konnten für die folgenden Analysen ausgewertet werden. Eine systemische Therapie wurde im Median 18,00 Monate nach Erstdiagnose initiiert (MW 33,21; Range 0- 311 Monate; SF: 47,02; 25%-Perzentil 10,00; 75%-Perzentil 37,00).

12 der 145 Patienten im Stadium IV (M1A-M1D) wurden von dieser Auswertung exkludiert, da sie entweder im Rahmen eines *Best-Supportive-Care* – Programms begleitet, rein chirurgisch bzw. strahlentherapeutisch behandelt oder hinsichtlich einer koinzidenten, aktivierenden BRAF-Mutation mit einer kombinierten BRAF-/MEK-Inhibition therapiert wurden. Auch Patienten, die *lost-to-follow-up* waren, wurden von dieser Subanalyse ausgeschlossen.

4.7.1. Progression Free Survival (PFS), allgemein

Unter dem Aspekt des rezidivfreien Überlebens (*progression free survival*, PFS) konnten 113 vollständige Datensätze analysiert werden.

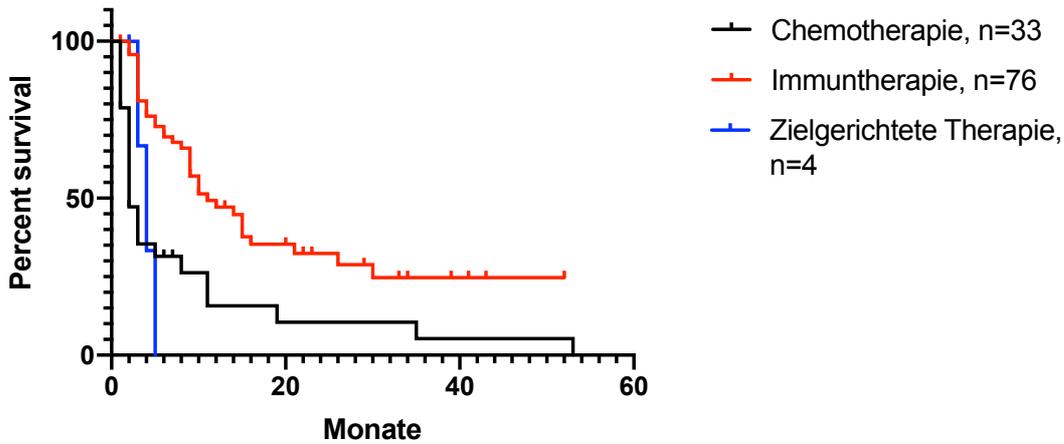
33 Patienten erhielten *First-Line* eine Chemotherapie, 76 eine Immuntherapie und 4 Patienten eine zielgerichtete Therapie mit einem MEK-Inhibitor.

Tabelle 25: Tabellarische Übersicht der angewandten Systemtherapeutika.

Chemotherapie	First-line	Second-line
gesamt	n=33	n=10
Dacarbazin	n=18	n=5
Paclitaxel	n=1	n=1
Carboplatin/ Taxol	n=2	n=0
Gemcitabine/ Treosulfan	n=0	n=2
Tomolozomid	n=1	n=0
BHD-Schema (Carmustin/ Hydroxyurea/ Dacarbazin)	n=10	n=2
Immuntherapie	First-line	Second-line
gesamt	n=76	n=40
Ipilimumab	n=22	n=17
Ipilimumab/ Nivolumab	n=12	n=4
Nivolumab	n=11	n=8
Pembrolizumab	n=31	n=11
Zielgerichtete Therapie	First-line	Second-line
gesamt	n=4	n=2
Trametinib	n=3	n=2
Binimetinib	n=1	n=0

Im interindividuellen Verlauf der Tumorerkrankung kam es bei Progress zu einem Wechsel der Therapie. Insgesamt sind pro Patient bis zu fünf verschiedene Therapielinien dokumentiert. Aufgrund der Diversität der verschiedenen Therapeutika innerhalb jeder Gruppe, wurden diese zu Chemotherapien, Immuntherapien und zielgerichteten Therapien zusammengefasst. Allein für die Immuntherapien erfolgte eine gesonderte Analyse (Vgl. 4.7.2). Die Ergebnisse der *First-Line*- und *Second-Line*-Therapien wurden im Folgenden als Kaplan-Meier-Kurven dargestellt.

A Progression Free Survival, 1. Therapielinie



B Progression Free Survival, 2. Therapielinie

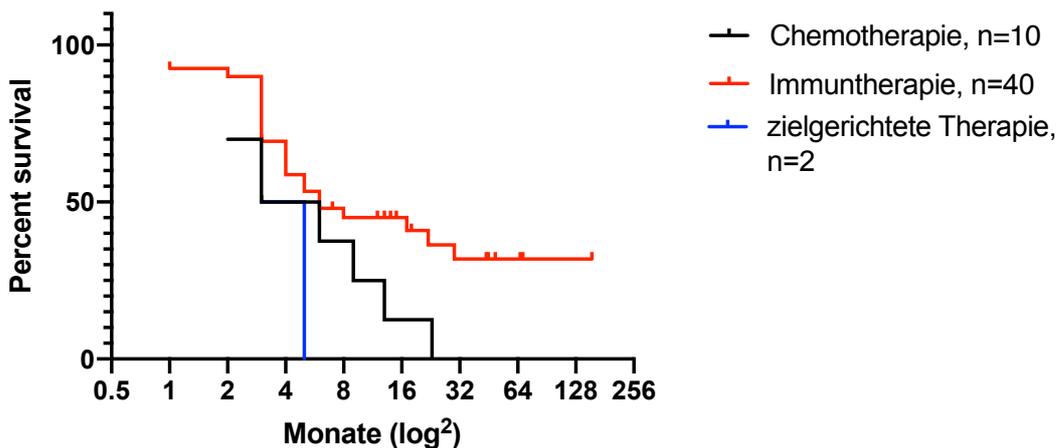


Abbildung 31: Die Kaplan-Meier-Kurven A und B stellen das progressionsfreie Überleben nach Chemotherapie, Immuntherapie und zielgerichteter Therapie entsprechend den Therapielinien 1 und 2 dar. Zur besseren Visualisierung wurde die Abszisse in Abbildung B logarithmiert.

Das PFS betrug in der *First-Line*-Therapie für die Gesamtgruppe im Median 4,00 Monate (MW 9,212; 95%-KI: 7,146-11,28; SF 1,043; Range 1-53 Monate). Für Patienten mit einer Chemotherapie ließ sich ein medianes PFS von 2,00 Monaten (MW 6,00; 95%-KI: 2,182-9,818; SF 1,874; Range 1-53 Monate) ermitteln.

Das mediane PFS für Patienten unter Immuntherapie betrug 7,50 Monate (MW 10,91; 95%-KI: 8,355-13,46; SF 1,281; Range 1-52 Monate). Für Patienten, die im Einzelfall MEK-Inhibitoren erhielten, ergab sich ein medianes PFS von 3,50 Monaten (MW 3,50; 95%-KI: 1,446-5,554; SF 0,6455; Range 2-5 Monate).

In der *Second-Line*-Therapie betrug das PFS für die Gesamtgruppe im Median 5,00 Monate (MW 15,00; 95%-KI: 7,838-22,10; SF 3,567; Range 1-155 Monate). Patienten unter Chemotherapie erreichten ein medianes PFS von 3,00 Monaten (MW 6,60; 95%-KI: 1,722-11,48; SF 2,156; Range 2-23 Monate). Das mediane PFS für Patienten unter Immuntherapie betrug 5,50 Monate (MW 17,65; 95%-KI: 8,475-26,83; SF 4,536; Range 1-155 Monate). Das PFS für Patienten mit zielgerichteter Therapie belief sich im Median auf 4,00 Monate (MW 4,00; 95%-KI: 2,040-5,960; SF 1,00; Range 3-5 Monate).

Im Log Rank Test nach Mantel-Cox zeigte sich der Vergleich des PFS nach *First-Line*-Therapie statistisch signifikant ($p < 0,0001$), nach *Second-Line*-Therapie hingegen nicht ($p = 0,0901$).

Auch die Therapielinien 3-5 wurden auf statistische Signifikanz überprüft:

Hier zeigte sich in der 3. Therapielinie eine Signifikanz im Log Rank Test nach Mantel-Cox ($p = 0,0353$), in den Therapielinien 4 und 5 jedoch nicht ($p = 0,6965$ bzw. $p = 0,1573$).

Kompletierend seien die Ergebnisse der 3.-5. Therapielinie deskriptiv in tabellarischer Form ergänzt:

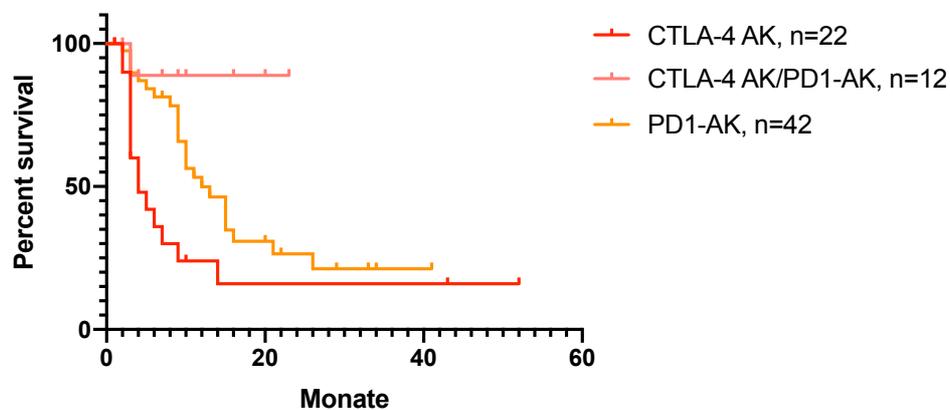
Tabelle 26: Deskriptive Statistik der Therapielinien 3-5 nach Substanzklasse.

	Chemo- therapie	Immun- therapie	Zielgerichtete Therapie
3. Therapielinie			
Anzahl	n=12	n=16	n=3
Mittelwert	4,58	11,69	4,33
Median	3,50	7,00	4,00
Min.-Max. (Monate)	1-20	1-42	1-8
Standardfehler	5,071	13,169	3,512
4. Therapielinie			
Anzahl	n=3	n=5	n=2
Mittelwert	2,67	6,80	6,50
Median	1,00	3,00	6,50
Min.-Max. (Monate)	1-6	2-22	6-7
Standardfehler	2,887	8,526	0,707
5. Therapielinie			
Anzahl	n=2	n=0	n=2
Mittelwert	2,50		3,50
Median	2,50		3,50
Min.-Max. (Monate)	2-3		2-5
Standardfehler	0,707		2,121

4.7.2. Progression Free Survival (PFS), Immuntherapien

Für NRAS-mutierte Melanompatienten gilt eine Immuntherapie derzeit als Goldstandard. Um mögliche Unterschiede im Ansprechen auf die verschiedenen Checkpointinhibitoren zu identifizieren, führten wir eine gesonderte Analyse durch. Es wurden jedoch nur die Therapielinien 1 und 2 betrachtet, da sich die Studienpopulation für die weiteren Therapielinien als zu gering erwies. Überdies erfolgte keine Stratifizierung nach NRAS-Genotyp. Das PFS ermittelten wir anhand des Schätzverfahrens nach Kaplan-Meier, die Behandlungsdauer entgegen mit einer deskriptiven Analyse (Wilcoxon Signed Rank Test).

A Progression Free Survival Immuntherapien, 1. Therapielinie



B Progression Free Survival Immuntherapien, 2. Therapielinie

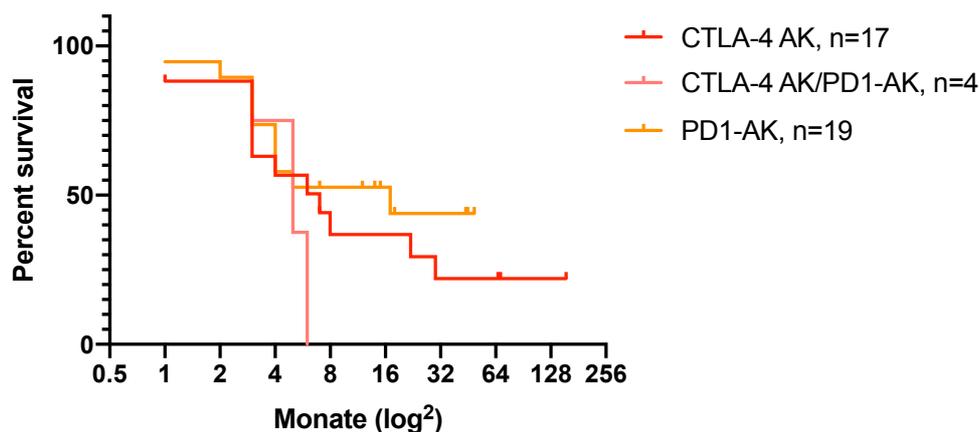


Abbildung 32: Die Kaplan-Meier-Kurven A und B stellen das progressionsfreie Überleben entsprechend den Immuntherapien (CTLA-4 AK, CTLA-4 AK/PD-1AK, PD1-AK) in den Therapielinien 1 und 2 dar. Zur besseren Visualisierung wurde die Abszisse in Abbildung B logarithmiert.

Das Therapieansprechen (PFS) betrug in der *First-Line*-Therapie für die Patienten mit dem CTLA-4 Antikörper Ipilimumab im Median 3,50 Monate (MW 10,86; 95%-KI: 3,978-17,75; SF 3,311) bei einer medianen Behandlungsdauer von 3,00 Monaten (MW 2,545; 95%-KI: 2,097-2,994; SF 0,2155; $p < 0,0001$). Für Patienten mit einer kombinierten Checkpointinhibition (Ipilimumab plus Nivolumab) lag das PFS im Median bei 8,50 Monaten (MW 10,00; 95%-KI: 5,803-14,20; SF 1,907), die mediane Behandlungsdauer bei 7,50 Monaten (MW 8,583; 95%-KI: 5,205-11,96; SF 1,535; $p = 0,0005$). Das mediane PFS für Patienten, die *First-Line* mit einem PD1-Antikörper (Nivolumab oder Pembrolizumab) behandelt wurden, lag bei 7,00 Monaten (MW 10,02; 95%-KI: 6,952-13,10; SF 1,521). Die mediane Behandlungsdauer betrug für diese Patientengruppe 4,50 Monaten (MW 6,810; 95%-KI: 5,042-8,577; SF 0,8750; $p < 0,0001$).

In der Zweitlinientherapie betrug das PFS für die Ipilimumab-Gruppe im Median 6,00 Monate (MW 22,82; 95%-KI: 2,183-43,46; SF 9,737) bei einer medianen Behandlungsdauer von 3,00 Monaten (MW 2,353; 95%-KI: 1,874-2,832; SF 0,2259; $p < 0,0001$). Für Patienten, die eine Immunkombinationstherapie erhielten, ließ sich ein medianes PFS von 4,00 Monaten (MW 4,250; 95%-KI: 1,863-6,637; SF 0,7500) bei einer medianen Behandlungsdauer von 3,00 Monaten (MW 3,250; 95%-KI: 1,248-5,252; SF 0,7500; $p = 0,1250$) ermitteln. Das PFS für Patienten unter PD1-Antikörpertherapie betrug im Median 7,00 Monate (MW 15,53; 95%-KI: 7,383-23,67; SF 3,876). Die mediane Behandlungsdauer lag hier bei 5,00 Monaten (MW 8,579; 95%-KI: 4,989-12,17; SF 1,709; $p < 0,0001$).

Im Log Rank Test nach Mantel-Cox zeigte sich der Vergleich des PFS nach Substanzklasse in der Erstlinientherapie statistisch signifikant ($p = 0,0025$), in der Zweitlinientherapie jedoch nicht ($p = 0,4552$).

Alle Ergebnisse bezüglich der Behandlungsdauer zeigten sich in der statistischen Analyse mittels Wilcoxon Signed Rank Test höchst signifikant ($p < 0,0001$ bzw. $p = 0,0005$), mit einer Ausnahme: Zweitlinientherapie/Immunkombinationstherapie, $p = 0,1250$.

Aus der Korrelation von PFS und Therapiedauer auf die verschiedenen Checkpointinhibitoren ergibt sich folgende Darstellung:

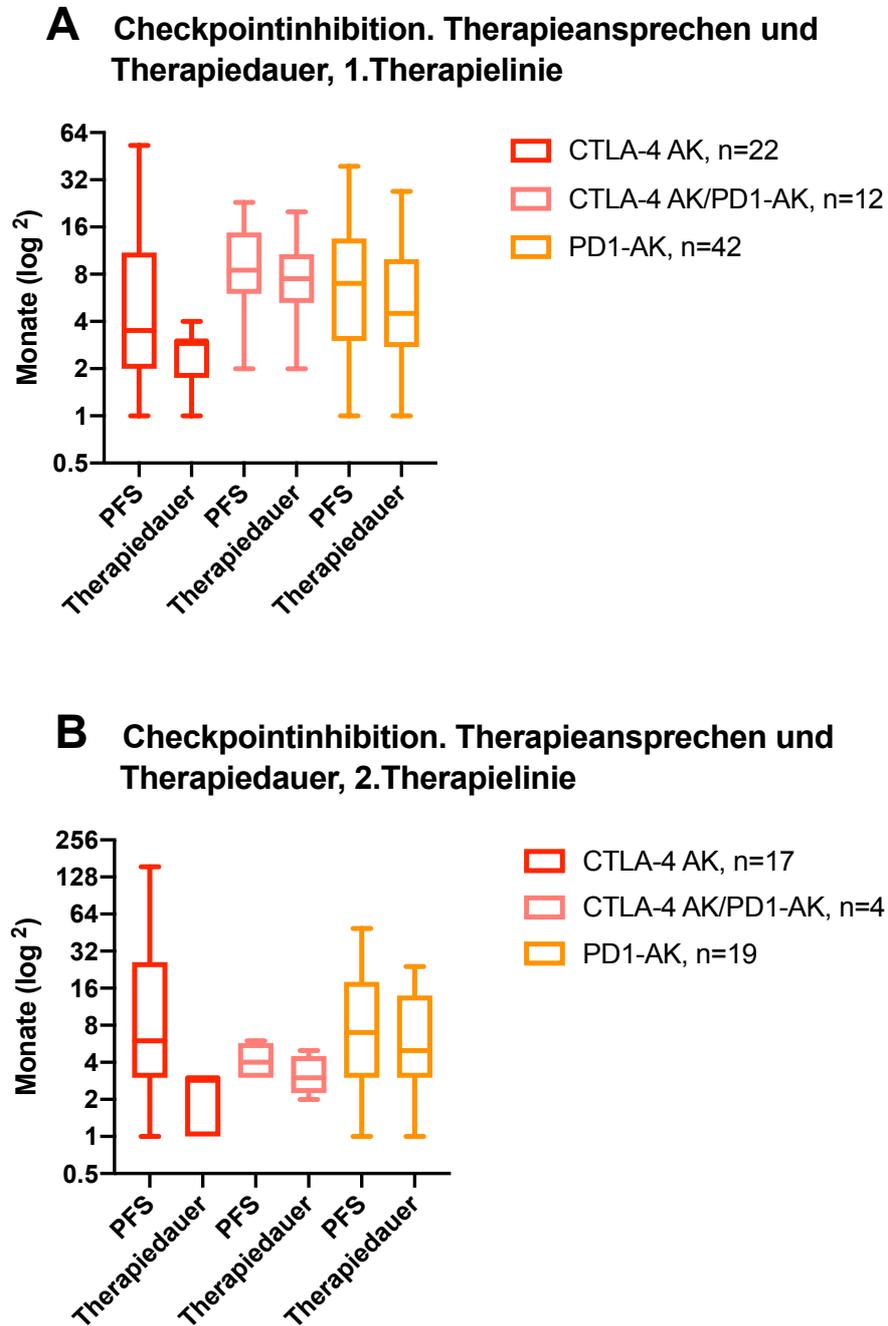


Abbildung 33: Boxplot-Darstellung von Therapieansprechen und Therapiedauer unter Checkpointinhibition (CTLA-4 AK, CTLA-4 AK/PD-1AK, PD1-AK). **(A)** Therapielinie 1, **(B)** Therapielinie 2. Zur besseren Visualisierung wurden die Ordinaten in A und B logarithmiert.

4.8 Zweitmalignome

In unserer Patientenkohorte konnten wir das Auftreten weiterer Malignome beobachten. Eine Auflistung aller verzeichneten Zweitmalignome in Paarung zum jeweiligen Mutationssubtyp ist in der nachstehenden Tabelle aufgeführt.

Insgesamt entwickelten 38 Patienten ein Zweitmalignom, vier Patienten darüberhinaus ein Drittmalignom. Am häufigsten konnte ein Prostatakarzinom als Zweitmalignom beobachtet (n=8, 21,05%) werden. Fünf Patienten (13,16%) erkrankten an einem Mammakarzinom. Kolonkarzinome wurden bei vier Patienten (10,52%) registriert. Bei einem Patienten mit einer NRAS Q 61K Mutation trat eine CLL als Drittmalignom auf. Ein Prostatakarzinom als Drittmalignom wurde bei zwei Patienten registriert, beide Patienten waren NRAS Q61R mutiert. In einem Einzelfall konnte ein Angiosarkom bei einem NRAS Q61R-positiven Patienten als Drittmalignom beobachtet werden. Zudem wurden eine AIDS-Erkrankung und eine HIV-Infektion erfasst.

Insgesamt zeigt sich eine starke Diversität an Zweitmalignomen, welche nicht in Assoziation zu einem distinkten NRAS-Genotyp zu stehen scheinen.

Tabelle 27: Tabellarische Übersicht aufgetretener Zweitmalignome in Assoziation zum jeweiligen NRAS – Genotyp.

Zweitmalignome in Abhängigkeit des NRAS-Genotyps

	Anzahl (n)	% (n/324)
Non-Hodgkin Lymphom	3	0,93
Q61H	1	0,31
Q61R	2	0,62
B-Zell-Lymphom	3	0,93
Q61K	2	0,62
Q61L	1	0,31
CLL	1	0,31
Q61R	1	0,31
Haarzell-Leukämie	1	0,31
Q61R	1	0,31
Neuroendokrines-CA	1	0,31
Q61K	1	0,31
Schilddrüsenkarzinom	1	0,31
Q61R	1	0,31
Ösophaguskarzinom	2	0,62
Q61K	1	0,31
Q61R	1	0,31
Bronchialkarzinom	2	0,62
Q61K	1	0,31
Q61R	1	0,31
Mammakarzinom	5	1,54
Q61K	1	0,31
Q61R	3	0,93
G12R	1	0,31
Kolonkarzinom	4	1,23
Q61K	2	0,62
Q61R	1	0,31
G13R	1	0,31
Gallengangskarzinom	1	0,31
Q61R	1	0,31
Harnblasenkarzinom	1	0,31
Q61H	1	0,31
Nierenzellkarzinom	2	0,62
Q61K	1	0,31
Q61R	1	0,31
Urothelkarzinom	2	0,62
Q61R	2	0,62
Prostatakarzinom	8	2,46
Q61K	1	0,31
Q61L	1	0,31
Q61R	3	0,93
G12A	1	0,31
G12C	1	0,31
G12S	1	0,31
Vulvakarzinom	1	0,31
Q61K	1	0,31

5. Diskussion

Das maligne Melanom ist eine bösartige Neoplasie, die in Deutschland, aber auch europa- und weltweit, eine kontinuierlich steigende Inzidenz erfährt¹⁵⁻¹⁷ und als Tumorentität des höheren Alters gilt^{12,15,163,191-194}.

Durch Implementierung immunmodulatorischer und zielgerichteter Therapien konnte das Gesamtüberleben betroffener Patienten verlängert und die Lebensqualität erheblich gesteigert werden.

Trotz der Errungenschaften in Tumorbiologie und molekularpathologischer Diagnostik, steht für die Gruppe der NRAS-mutierten Melanompatienten derzeit keine zugelassene, zielgerichtete Therapie zur Verfügung.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation erfolgte eine umfassende Analyse der epidemiologischen, histopathologischen und therapiespezifischen Faktoren aller erfassten NRAS-mutierten Melanompatienten am Hauttumorzentrum der Uniklinik Köln von 01/1991 bis 03/2019. Überdies wurden die Mutationsgenotypen von NRAS der Studienpopulation hinsichtlich des Metastasierungsverhaltens und Gesamtüberlebens im malignen Melanom analysiert. Nicht für alle Fragestellungen lagen vollständige Datensätze vor, so dass Zensierungen durchgeführt werden mussten und die Größe des jeweiligen Patientenkollektivs eingeschränkt wurde.

Unserer Kenntnis nach handelt es sich bei der vorliegenden Arbeit um die derzeit größte monozentrische Studie für NRAS-mutierte Melanompatienten. Lediglich die multizentrische Studie von Dummer et al. aus 2017¹²⁵ zur Evaluation des MEK-Inhibitors Binimetinib bei NRAS-mutierten Melanompatienten weist mit 402 rekrutierten Patienten aus 118 Zentren eine größere NRAS-Studienpopulation auf.

5.1 Epidemiologie NRAS-mutierter Melanome

Unser Kollektiv umfasst 324 Melanompatienten mit nachgewiesener NRAS-Mutation, die ihre Erstdiagnose in den Jahren 1991-2019 erhielten. Unsere Daten weisen einen starken Anstieg an Erstdiagnosen mit positivem NRAS-Mutationsstatus in den Jahren 2005-2018 auf. Die Inzidenz im Jahr 2019 fiel etwas geringer aus, da bei der vorliegenden Auswertung nur das 1. Quartal des Jahres 2019 miteinbezogen wurde.

Die allgemein ansteigende Inzidenz an Melanomerkrankungen konnte in vielen Studien nachgewiesen werden ^{15-17,19,55}. Diesen Trend können wir, wenn auch nur indirekt, bestätigen: Antizipiert man eine Prävalenz von 20% NRAS-positiv mutierter Melanompatienten an der Gesamtheit dieser soliden Tumorentität ¹⁹⁵⁻¹⁹⁷, so zeigen unsere Ergebnisse eine deutliche Inzidenzzunahme in den letzten zehn Jahren und sind kongruent zu vorpublizierten, epidemiologischen Daten ¹⁵⁻¹⁷.

Die Geschlechterverteilung in unserer Patientenkohorte zeigt eine Prädominanz des männlichen Geschlechts (205 Männer und 119 Frauen). Im Wilcoxon Signed Rank Test zeigte sich das Ergebnis höchst signifikant mit einem p-Wert von <0,0001 und stimmt mit den mutationsunabhängigen Daten des Robert-Koch-Instituts und des Zentrums für Krebsregisterdaten überein. Vergleichsdaten aus Italien (Guida et al. ¹⁹⁸), Frankreich (Ilie et al. ¹⁹⁹) und den USA (Thomas et al. ¹⁶¹) ähneln unseren Ergebnissen mit minimalen Abweichungen.

Die Patienten mit nachgewiesener NRAS-Mutation waren zum Zeitpunkt der Erstdiagnose im Median 70 Jahre (MW: 66,40) alt. Es zeigte sich, dass Frauen bei Diagnosestellung etwas jünger waren, der Median lag bei 66 Jahren (MW: 63,16; SD: 15,10; Range: 28-90). Der Erkrankungsgipfel lag bei 61-80 Jahren. Bei Männern lag der Median mit 72 Jahren (MW: 68,28; SD 12,21; Range 21-95) geringfügig über dem geschlechtsunspezifischen Median, der Erkrankungsgipfel hingegen bei 71-80 Jahren. Der geschlechtsunspezifische Median liegt in unserer Studienpopulation marginal höher als in den Untersuchungen von Heptt et al. ²⁰⁰ und Wu et al. ²⁰¹ die einen Median von 66 Jahren ermitteln konnten.

Aktuell und prognostisch sind in Deutschland übereinstimmend zu unseren Studienergebnissen mehr Männer als Frauen von einem malignen Melanom betroffen ¹⁵. Das Erkrankungsalter liegt mit 67 Jahren bei Männern im Median um sieben Jahre höher als bei Frauen mit 60 Jahren ¹⁵. Somit decken sich die Ergebnisse im Bezug zur Epidemiologie in unserer Studie der NRAS mutierten Melanome mit den allgemeinen epidemiologischen Gesichtspunkten zur Geschlechter- und Altersverteilung des malignen Melanoms, mit einer Abweichung in unserer Gruppe der 31-40-Jährigen. Hier ist anhand unserer Daten das Verhältnis von Männern zu Frauen 1:5. Auch die Gruppe der 41-50-Jährigen widerspricht der allgemeinen Geschlechterverteilung, das Verhältnis Männer zu Frauen liegt hier bei 1:1.

Begründet sein kann diese Entwicklung darin, dass 2008 in Deutschland ein gesetzliches Hautkrebsfrüherkennungsprogramm für Frauen und Männer ab 35 Jahren initiiert wurde. Hiernach haben alle >35-Jährigen einen Anspruch alle 2 Jahre durch einen akkreditierten Arzt eine Ganzkörperinspektion zu erhalten ²⁰². Da die Adhärenz und Inanspruchnahme dieser Vorsorgeleistung bei Frauen höher als bei Männern (Verhältnis 3:1) ist, lässt sich die ansteigende Inzidenz bei jungen Frauen möglicherweise hierauf zurückführen ²⁰². Auch das veränderte Freizeit- und Bräunungsverhalten kann hierauf einen Einfluss haben. Gilt ein bronzener Teint

vor allem bei jungen Frauen als zu erreichendes Schönheitsideal, so steht eine intermittierende UV-Exposition einer japanischen Arbeitsgruppe zufolge im Fokus, NRAS-vermittelte Melanome zu induzieren²⁰³ und kann als weiteres Erklärungsmodell herangezogen werden.

5.2 Histopathologie NRAS-mutierter Melanome

Den NRAS-mutierten Melanomen in unserer Studie lag mit 38,3% der Fälle am häufigsten der histopathologische Subtyp des nodulären malignen Melanoms (NMM) zugrunde - weit vor dem superfiziell spreitenden Melanom (SSM) mit 25,9%. Das akral-lentiginöse Melanom (ALM) und das amelanotische Melanom wurden jeweils in 3,1% der Tumore nachgewiesen, das Lentigo-maligna Melanom (LMM) hingegen in 2,8%. In 7 Fällen (2,2%) konnte ein Schleimhautmelanom detektiert werden. In einem Einzelfall (0,3%) fand sich ein Bindehautmelanom. Bei 8,6% der Patienten konnte kein Primärtumor gefunden werden. Insgesamt 15,7% der Tumore waren vorgenannten histopathologischen Subtypen nicht zuzuordnen.

Diese Verteilung steht jedoch im Widerspruch zu der allgemeinen histopathologischen Verteilung, wie sie in epidemiologisch-histopathologischen Untersuchungen ohne Bezug auf Untergruppen mit Mutationsstatus angegeben wird. Die Tübinger Arbeitsgruppe um Claus Garbe weist für das SSM einen prozentualen Anteil von 59% aus, 21% für das NMM, etwa 11% für das LMM und ca. 4% für das ALM. Anderen histologischen Subtypen werden ca. 6% zugeordnet¹⁷. Diese allgemeine Häufigkeitsverteilung wurde jüngst in einer Studie von Gassenmaier et al. mit Daten aus dem „Deutschen Zentralregister Malignes Melanom“ sowie von einer norwegischen Studiengruppe bestätigt^{204,205}.

Insgesamt konnte in unserer Kohorte bei 172 Tumoren (53,1% der Gesamtkohorte) ein primär oder sekundär noduläres Charakteristikum nachgewiesen werden. Die Korrelation des histopathologischen Merkmals „nodulär“ mit einem positiven NRAS-Mutationsstatus zeigte sich in unseren Ergebnissen statistisch hoch signifikant ($p < 0,0001$). In der altersspezifischen Analyse war in unserem Kollektiv zudem eine Prädominanz des NMMs über alle Altersgruppen hinweg zu verzeichnen (Median 77,0 Jahre, Minimum 22 Jahre, Maximum 93 Jahre, p -Wert $< 0,0001$).

Hieraus lässt sich ableiten, dass NRAS mutierte Melanome häufiger dem histologischen Subtyp eines NMMs anstelle eines SSMs folgen. Unsere Ergebnisse stützen somit vorpublizierte Studien, die – wenn auch in deutlich kleineren Studienpopulationen – eine Assoziation zwischen NRAS-Mutationen und NMMs feststellen konnten^{76,164,194,195,200,206-208}. Die norwegische Arbeitsgruppe um Trude Robsahm konnte darüber hinaus ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben und damit verbunden eine schlechtere Prognose sowie eine erhöhte geschlechtsunspezifische Mortalität für Patienten mit nodulären Melanomen feststellen²⁰⁵.

Interessanterweise wurden in unserer Studienpopulation 8,6% der Tumorerkrankungen durch Lymphknoten- oder Fernmetastasen ohne Hinweis auf einen Primärtumor (PTU) evident. Von den betroffenen Patienten wiesen 78% lymphogene und 22% Organfiliae auf. In 11% wurde eine cerebrale Metastasierung festgestellt. Auch hier zeigte sich eine Androtropie von 65%. In der Literatur wird die Inzidenz von Melanomerkrankungen ohne bekannten Primärtumor studienabhängig mit 1,4-5,6% angegeben ²⁰⁹. Unsere Daten liegen jedoch weit höher. Dies scheint eine Besonderheit bei NRAS-mutierten Patienten zu sein, bei denen Regressionsphänomene eine Rolle spielen könnten. Bae et al. untersuchten 2084 Patienten mit einem PTU ungeachtet ihres Mutationsstatus und stellten die Hypothese auf, dass nach Absiedlung von Metastasen eine Komplet regression des Primärtumors eingetreten oder der Ursprung in ektopen Melanozyten von Kapselnävi an Lymphknoten zu finden sei ²⁰⁹. Eine Stratifizierung nach BRAF- und NRAS-Mutationsstatus ist in der aktuellen Literatur nicht zu finden, könnte aber ein interessanter Aspekt für weitere, prospektive Untersuchungen sein.

Die topographische Verteilung NRAS-mutierter Melanome und deren Assoziation zu UV-exponierten Lokalisationen wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Einige Studien weisen eine Assoziation zu chronisch UV-exponierten Arealen aus ^{164,208,210,211}, andere Publikationen ziehen das Resümee, dass NRAS-mutierte Melanome eher an Körperstellen entstehen, die einer intermittierenden UV-Exposition ausgesetzt sind ^{203,212}. In unserer Studie zeigte sich mit 33,3% die höchste Prävalenz am Rumpf (Brust, Bauch, Rücken). In 24,7% waren die unteren Extremitäten (Oberschenkel, Unterschenkel, Fuß) betroffen, in 18,2% die oberen Extremitäten (Oberarm, Unterarm, Hand). Im Kopf-Hals-Bereich (Gesicht, Kopfhaut, Auge, Schleimhäute, Hals) wurden 44 Melanome (13,58%) nachgewiesen, genital (inkl. Schleimhäute) hingegen 5 (2%). Das in unserer Analyse dargestellte Verteilungsmuster für NRAS-Melanome ist kongruent mit Vergleichsdaten von Hept et al. und Thomas et al. aus Deutschland und den USA ^{161,200}. Eine Reihe anderer Publikationen, welche eine Korrelation von Primärlokalisierung und NRAS-Mutationsstatus untersucht haben, kommen hingegen zu dem Schluss, dass eine signifikante Assoziation zwischen NRAS-mutierten Melanomen zu oberen und unteren Extremitäten besteht ^{72,76,164,195,203,213,214}. Die in unserer Kohorte detektierten prädominanten Lokalisationen NRAS-mutierter Tumore widersprechen dabei einer chronisch UV-induzierten Tumorphathogenese bei NRAS-mutierten Melanomen und favorisieren die Hypothese einer kausalen Rolle der intermittierenden UV-Exposition.

Der größte Anteil des Patientenkollektivs (35,7%) umfasste Tumore mit einer Tumordicke >4,0 mm (n=96) und zählt zur Gruppe der Hochrisikomelanome mit einem erhöhten Metastasierungsrisiko (T4). In der statistischen Auswertung zeigte sich eine mediane Tumordicke von 3,00mm (Mittelwert 4,25mm, Minimum 0,30mm, Maximum 80,00mm) mit einem hoch signifikanten p-Wert von <0,0001. In der geschlechterspezifischen Analyse betrug die mediane Tumordicke bei Männern 3,50mm (Mittelwert 3,83mm, Minimum 0,30mm, Maximum 30,00mm)

und 3,34mm bei Frauen (Mittelwert 5,06mm, Minimum 0,30mm, Maximum 80,00mm). Unsere Ergebnisse weisen höchst signifikante geschlechtsspezifische Unterschiede auf ($p < 0,0001$) und bestätigen damit einerseits die Daten von Robsahm et al., die eine höhere mediane Tumordicke für Männer feststellen konnten²⁰⁵, und andererseits die Erkenntnis von Devitt et al., dass NRAS-mutierte Tumore mit höheren Tumordicken vergesellschaftet sind¹⁹³.

Bezüglich der Eindringtiefe nach Clark fand sich in unserer Kohorte am weitaus häufigsten mit 147 Fällen ein Level IV mit Vordringen der Tumorzellen in die tiefe Dermis, was einem prozentualen Anteil von 72,41% entspricht. Bei 9 Patienten konnte das höchste Invasionslevel, Clark Level V, mit Eindringen der Tumorzellen bis in die Subkutis verzeichnet werden (4,43%). Diese Beobachtung ist kongruent zu Untersuchungen von Omholt et al. aus 2002 und Edlund-Rose aus 2006^{164,215}, die eine signifikante Assoziation von NRAS-Mutationen und höheren Clark Levels aufweisen konnten. Das histopathologische Merkmal des Clark Levels verliert jedoch zunehmend an Bedeutung und wird in aktuelleren Studien nur noch rein deskriptiv erfasst.

Die Bedeutung der Ulzeration als prognostischer Parameter wurde in einer Vielzahl von Studien betont und gilt als wichtiges Kriterium in der AJCC-Klassifikation^{63,66,192,216}. In unserer Kohorte wiesen 125 Tumore (42%) eine Ulzeration auf. In der geschlechterspezifischen Analyse zeigte sich das Merkmal Ulzeration signifikant häufiger bei Männern (65,6%) als bei Frauen (34,4%). In der statistischen Analyse war der p-Wert für beide Ergebnisse hoch signifikant ($p < 0,0001$).

Die Ulzeration wurde von Kashani et al. als Kofaktor von dickeren Tumoren beschrieben, dem eine zentrale Bedeutung für die Vaskularisierung und Angiogenese von Melanomen beigegeben wird²¹⁷. Dies impliziert bei Vorliegen einer Ulzeration eine schlechtere Prognose durch lymphogene Metastasen, wie von Munsch et al. beschrieben⁶⁶. In einer Metaanalyse konnten Gutierrez-Castaneda et al. 2020 eine signifikante Assoziation von NRAS-Mutationen und dem histopathologischen Charakteristikum einer Ulzeration identifizieren⁷⁶. Studienabhängig wird der prozentuale Anteil bei NRAS-mutierten Melanomen mit 9,7-36% angegeben^{162,164,195,196,204,205}. Mit 64% konnten Si et al. in einer chinesischen Studienpopulation demgegenüber eine deutlich höhere Rate an ulzerierten NRAS-positiven Tumoren beobachten. Mit 42% nehmen die in unserer Kohorte dargestellten Daten diesbezüglich eine mittlere Position ein und können die Hypothese von Gutierrez-Castaneda et al. festigen.

Dass der Lymphknoten-Status neben der Tumordicke nach Breslow und der Ulzeration einen der wichtigsten Einflussfaktoren für die Prognose beim malignen Melanom darstellt, ist in der Literatur hinreichend belegt^{61,63,66,216}.

Von den insgesamt 181 Patienten, bei denen eine Wächterlymphknotenbiopsie (SLNB) durchgeführt wurde, konnte in 45% der Fälle ein metastatischer Befall des SLN nachgewiesen werden. In der pathologischen Untersuchung der Wächterlymphknoten zeigten sich hingegen 55%

nicht betroffen. Von den 82 Patienten mit positivem SLN fanden sich in 60 Fällen Mikrometastasen. Hiervon waren in 80% ein Lymphknoten, in 18,3% zwei Lymphknoten und in einem Fall (1,7%) drei Lymphknoten betroffen. In der Gruppe der Patienten mit nachgewiesenen Makrometastasen (n=22) waren in 81,8% ein Lymphknoten, in 13,6% zwei Lymphknoten und in 4,5% drei Lymphknoten betroffen.

Es zeigte sich eine starke Korrelation der SLN-Positivität für NRAS-mutierte *high-risk* Melanome und einer Tumordicke >2,00mm. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Mikro- und Makrometastasen ergab sich nicht. Unsere Daten sind als kongruent zu den Ergebnissen von Leiter et al. aus der DeCOG-SLT-Studie anzusehen. Diese ermittelten einerseits zwar eine Assoziation von Tumorlast im SLN, Tumordicke und Ulzeration mit einem erhöhten Risiko für Fernmetastasen, Rezidiven und Melanom-spezifischem Versterben, konnten andererseits aber anhand der Anzahl betroffener SLN keinen Einfluss auf die Prognose der Tumorerkrankung feststellen⁸¹.

In der Literatur weisen nur wenige Studien eine SLN-Positivität in Bezug auf den NRAS-Mutationsstatus aus. Ein Großteil der Publikationen stellt zwar den prozentualen Anteil BRAF-mutierter Patienten an der jeweiligen Gesamtkohorte mit positivem SLN heraus, jedoch kontrastierend zu BRAF-Wildtyp Patienten. Unter den BRAF-Wildtyp Patienten subsumieren sich allerdings nicht nur NRAS-mutierte, sondern auch c-KIT- und NRAS/BRAF-Wildtyp Patienten.

Einer jüngst publizierten Studie von Liskay et al. aus 2021 zufolge weisen nur 6,9% NRAS-mutierte Melanompatienten einen positiven SLN auf – hingegen aber 65,5% mit einer BRAF-Mutation und 17,2% mit NRAS/BRAF-Wildtyp²¹⁸. In der Kohortenstudie von Heppt et al. wurde nur bei 26 NRAS-mutierten Melanompatienten eine SLND durchgeführt, wovon 53% einen positiven Wächterlymphknoten aufwiesen. Die Wahrscheinlichkeit für einen positiven Wächterlymphknoten ist der australischen Arbeitsgruppe um Nikki Adler zufolge bedeutend höher für BRAF-mutierte Patienten²¹³. Aus ihren veröffentlichten Daten lässt ein prozentualer Anteil für NRAS-Mutierte mit positivem SLN von 21 % ableiten (vs. 34% BRAF vs. 21% NRAS/BRAF-Wildtyp)²¹³.

Der hohe prozentuale Anteil positiver Wächterlymphknotenbiopsien (SLNB) in unserem Kollektiv ist unserem Verständnis nach dadurch zu erklären, dass die NRAS-mutierten Melanome unserer Studie häufiger dem histopathologischen Muster des NMMs folgten, oftmals eine Ulzeration zeigten und neben einem höheren Clark Level (IV) auch eine höhere Tumordicke aufwiesen (TD >3,0 mm), was ein aggressiveres Tumorwachstum vermuten lässt. Diese Annahme deckt sich mit jener von Munsch et al.⁶⁶.

5.3 Klassifikation von NRAS-Mutationen. Besteht die als dogmatisch beschriebene BRAF- bzw. NRAS- Exklusivität wirklich?

Etwa 20% aller kutanen Melanome in der kaukasischen Bevölkerung weisen eine NRAS-Mutation auf ¹⁹⁵⁻¹⁹⁷. Die Frequenz variiert jedoch studienabhängig von 13% bis 39% ¹⁶¹⁻¹⁶⁴. In asiatischen Populationen ist die Häufigkeit weitaus geringer und wird mit ca. 7% angegeben ^{203,212}.

In der aktuellen Literatur ist allgemein anerkannt, dass Mutationen am NRAS-Gen vor allem im Codon 12, 13 und 61 auftreten ^{153,166}. Im Exon 2 (Codon 12 und 13) handelt es sich um somatische Mutationen, im Codon 61 (Exon 3, NRAS Q61) hingegen um sog. *Missense*- bzw. sog. *Hotspot*-Mutationen ^{73,74,197}.

Dumaz et al. belegten in ihrer Publikation aus 2019, dass Mutationen im Codon 12 und 13 signifikant häufiger bei mukosalen Melanomen auftreten als bei kutanen Melanomen ¹⁴². Diese Beobachtung können wir für unsere Kohorte nicht bestätigen. Nur in einem Fall eines mukosalen Melanoms ließ sich eine G13R-Mutation im Exon 2 nachweisen. Die weiteren 6 mukosalen Melanome wiesen eine NRAS Q61 Mutation im Exon 3 auf. Die Mehrheit der Mutationen im Exon 2 war mit einer UV-exponierten Lokalisation am Kopf assoziiert (n=9). In jeweils 6 Fällen wurde sie an Primärtumoren an Rumpf und oberen Extremitäten, in 4 Fällen an den unteren Extremitäten gefunden. Weitere 3 Mutationen wurden bei einem PTU nachgewiesen. Eine Reihe von Publikationen konnte nachweisen, dass Codon 61 beim Melanom mit 84-88% der Fälle am häufigsten betroffen ist ^{142,159,166,219}, wonach diese Erkenntnis als gesichert gilt. Dies können wir anhand unserer übereinstimmenden Ergebnisse bestätigen. Insgesamt 90,1% unserer Patienten wiesen eine Mutation im Codon 61 auf. Die häufigste NRAS-Mutation in unserer Patientenkohorte war NRAS Q61R (41,98%), gefolgt von Q61K (32,41%), Q61L (11,42%), und Q61H (4,01%). In Einzelfällen fanden sich die seltenen NRAS – Mutationen Q61P, Q70H und A146V im Exon 3.

Der Großteil der Mutationsanalysen erfolgte am Gewebe des Primärtumors (59,3%, n=192). In etwa einem Viertel der Fälle wurde die Analyse an einer Fernmetastase (24,1%) durchgeführt, in 13,89% erfolgte sie an Lymphknotenmetastasen bzw. am Wächterlymphknoten (2,8%). In Zweitanalysen (n=28) konnte in 21 Fällen der vorbekannte NRAS-Genotyp bestätigt werden, in 6 Kasus änderte sich der Mutationsstatus von Wildtyp auf eine Mutation im Codon 61. In einem Einzelfall konnte die zuvor nachgewiesene Mutation im Codon 13 nicht mehr nachgewiesen werden.

Die Patienten mit Mutationen im Codon 12 und 13 (G12A, G12C, G12D, G12S, G12V, G13D, G13E, G13E, G13R und G13V) wurden in den mutationsspezifischen Analysen aufgrund der geringen Stichprobengröße nicht berücksichtigt.

Die Distribution der vier Hauptgenotypen unserer Studie (NRAS Q61H, NRAS Q61K, NRAS Q61L und NRAS Q61R) ist konsistent mit vorpublizierten Daten^{196,198,199,220} und entspricht der Häufigkeitsverteilung des *Cancer Genome Atlas* (TCGA). Dort wird diese wie folgt angegeben: Q61R 43%, Q61K 32%, Q61L 11%, Q61H 5%²²¹.

Bei allen vier Hauptgenotypen bestand eine Androtropie von 60% in der geschlechtsspezifischen Analyse. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen zeigte sich nicht.

Als zusätzliche Mutationen konnten wir v.a. Varianten von RAC1, PTEN und TP53-Mutationen identifizieren. Diese Signatur entspricht einer UV-induzierten Mutationslast⁶⁷. Bedenkt man, dass sich 30% der Melanome auf Basis eines existenten Nävus entwickeln und der Großteil *de novo* entsteht³⁶, untermauern unsere Ergebnisse die These von Gandini et al., dass Melanome vor allem durch eine intermittierende UV-Exposition induziert werden²⁸. In unserer Kohorte fanden sich prozentual die häufigsten Primärlokalisationen im Bereich des Rumpfes, gefolgt von unteren und oberen Extremitäten, die als nicht primär UV-exponiert gelten. Hieraus ist abzuleiten, dass NRAS-Melanome und ihre begleitende Mutationslast (v.a. RAC1, PTEN und TP53) durch eine intermittierende UV-Strahlung ausgelöst werden können. Unsere Daten sind somit kongruent zu den vorpublizierten Daten von Hodis und Kunz^{67,222}, stehen jedoch im Widerspruch zu den Ergebnissen von Ellerhorst et al., welche die Genese von NRAS-Melanomen in Zusammenhang mit einer chronischen Sonnenexposition sehen¹⁶².

Mehrere Arbeitsgruppen konnten in ihren Studien die simultane Koexistenz von BRAF- und NRAS- Mutationen ausschließen und etablierten dadurch die These, dass ein Tumor nur eine einzelne Treibermutation aufweisen kann^{68,164,208,223-225}. Koexistente Treibermutationen fanden sich in unserer Studienpopulation in insgesamt 12 Fällen. Hiervon waren 11 Fälle NRAS/BRAF mutiert, in einem Fall zeigte sich eine NRAS/c-KIT-Kombination. Mit 3,7% an der Gesamtkohorte können wir hiermit bereits publizierte Daten bestätigen, die das Dogma der Exklusivität von NRAS- oder BRAF-Mutationen in Frage stellen^{199,226}. In Kohortenstudien konnten Heppt et al. in 2,3% der untersuchten 217 Patienten²⁰⁰ bzw. Goel et al. in 2,9% der 69 Patienten umfassenden Studienpopulation¹⁹⁴ simultane BRAF- und NRAS- Mutationen in einer Tumorphobie nachweisen. Andere Publikationen berichten von Einzelfällen²²⁷⁻²²⁹ oder einem niedrigeren prozentualen Anteil (0,6-2,0%) an der jeweiligen Studienpopulation^{195,230}. Aussagen bzgl. einer Therapierelevanz wurden jedoch nicht immer getroffen. Unsere Daten zur Prävalenz koexistenter BRAF- und NRAS-Mutationen liegen im Vergleich zu den publizierten Daten etwas höher.

Anteilig an der Gesamtkohorte wiesen in unserer Patientenkohorte 1,2% eine therapierelevante, koexistente BRAF^{V600E} bzw. ^{V600K} – Mutation auf. Ein ähnliches Ergebnis (1,3%) lässt sich aus den Daten von Heppt et al. ermitteln²⁰⁰.

In einigen Publikationen wird die intratumorale Mutationsheterogenität als Konsequenz einer erfolgten Systemtherapie diskutiert und ist derzeit Gegenstand intensiver Forschung²³¹⁻²³³. Grundlage laut Raaijmakers et al. sei jedoch, dass der Mutationsswitch nach eingeleiteter Systemtherapie erfolgt und die differenten BRAF-, NRAS- oder c-KIT-Mutationen im Primarius und distanten Filiae auf eine Resistenzentwicklung zurückzuführen ist²³¹. Die Arbeitsgruppe um Helen Rizos hingegen konnte eine Heterogenität auch in solitären Tumorkläsionen nachweisen, die zuvor mittels zielgerichteter Therapie behandelt wurden²³³. Unsere Daten beruhen auf Mutationsanalysen an den Primärgeweben vor Einleitung einer systemischen Therapie. Eine sekundäre Resistenzentwicklung durch eine erfolgte Therapie und konsekutive Aktivierung zellulärer Feedback-Mechanismen der RAS/RAF/MEK/ERK- bzw. PI3K/AKT/mTOR – Signalkaskadewege als *escape*-Mechanismus^{141,233} ist demnach ausgeschlossen.

Die These, dass sich BRAF- und NRAS-Mutationen gegenseitig ausschließen, ist somit anhand unserer Datenlage widerlegt. Diese Erkenntnis hat Implikationen auf die Therapie fernmetastasierter Patienten und untermauert die Forderung nach NGS zum molekularpathologischen Staging anstelle einer sequentiellen Testungstrategie ab Stadium III bzw. Progress, wie sie derzeit (noch) in der geltenden *S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms* propagiert wird⁷.

5.4 Metastasierung des NRAS-mutierten malignen Melanoms

Die Untersuchung spezifischer Metastasierungsmuster für NRAS-mutierte Melanompatienten entsprechend ihres NRAS-Genotyps erfolgte in der vorliegenden retrospektiven Studie detailliert und wurde, unserer Kenntnis nach, anhand von *real-life*-Daten bis dato nicht publiziert. Einige Autoren konnten eine Assoziation von NRAS-Mutationen zu einem lokoregionalen Metastasierungsmuster beobachten^{163,200}. Auch eine Assoziation zu cerebralen Filiae scheint der aktuellen Literatur zufolge zu bestehen^{195,213}.

Mehrere Publikationen weisen auf ein aggressives Wachstumsverhalten von NRAS-mutierten Melanomen hin. Rinonce et al. und Sheen et al. betonen in ihren Untersuchungen, dass NRAS-Mutationen beim malignen Melanom frühzeitig zu Lymphknoten- und aber auch zu Fernmetastasen führen^{207,234}. Diese Beobachtungen stützen die Ergebnisse der amerikanischen Studiengruppe um Jaykumur Thumar, die eine signifikante Häufung von Lymphknotenmetastasen bei NRAS-mutierten Melanompatienten im Vergleich zu BRAF- bzw. Wildtyp-Patienten feststellen konnte (75% vs 46% bzw. 61%)²³⁵. Thumar et al. zufolge kann für NRAS-Mutierte ein lokoregionales Metastasierungsmuster mit oder ohne Weichteilmetastasen angenommen werden²³⁵. Dies können wir anhand unserer Ergebnisse bestätigen.

In unserem Kollektiv von 324 Patienten zählte der Großteil der Tumore bei Erstdiagnose zur Gruppe der Hochrisikomelanome (35,7%, n=96) mit einem erhöhten Metastasierungsrisiko (T4). Dabei setzte sich die Verteilung der analysierten Population entsprechend des AJCC-Stadiums bei Erstdiagnose wie folgt zusammen: AJCC Stadium IV (n=40; 12,35%), III (n=153; 47,22%), Stadium II (n=100; 30,86%), Stadium I (n=31; 09,57%). Knapp die Hälfte der Patienten (n=145; 44,75%) wurde im Verlauf der Erkrankung progredient (Median 22,00 Monate; MW 33,62 Monate nach Erstdiagnose; SD 42,61; SF 3,539, Range 0-306 Monate, $p < 0,0001$) und wechselte aus Stadium I, II oder III in das AJCC-Stadium IV.

Von den 45 Patienten mit positivem Wächterlymphknoten, die eine Metastasierung erlitten, entwickelten 56% lokoregionale Filiae. Unter dem Aspekt der Fernmetastasierung wurde sie in 15% in Form von pulmonalen Metastasen und in 13% als cerebrale Metastasen evident. Weichteilmetastasen und/oder distante Lymphknotenmetastasen konnten bei 9% dieser Kohorte erfasst werden, 7% entwickelten viszerale Metastasen.

Die mediane Dauer bis zur Entwicklung einer Primärmetastasierung ab Erstdiagnose betrug in unserer Studienpopulation 12,00 Monate und erwies sich in der statistischen Analyse als signifikant ($p = 0,0312$). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen sowohl Thumar et al. als auch Adler et al., die für das *disease-free-survival* (DFS) Werte von 13,0 und 13,4 Monaten ermitteln konnten^{213,235}. Die Studiengruppe um Markus Heppt hingegen eruierte ein Intervall von 18,0 Monaten²⁰⁰. Den Untersuchungen von Heppt et al. und Thumar et al. gemein ist die Erkenntnis, dass NRAS-mutierte früher als BRAF-mutierte Melanompatienten eine distante Metastasierung aufweisen^{200,235}. So konnten Thumar et al. ein DFS von 18,3 Monaten und Heppt et al. ein DFS von 2,4 Jahren ermitteln^{200,235}. Adler et al. wiesen ein marginal kürzeres DFS für BRAF-Patienten im Vergleich zu NRAS-Patienten aus (12,5 Monate vs. 13,4 Monate)²¹³.

Die Primärmetastasierung unabhängig des SLN-Status in unserer Studie ergab folgende Verteilung: lokoregional 67% (n=156), IV M1A 6,5% (n=15), IV M1B 11,7% (n=27), IV M1C 5,2% (n=12), IV M1D 8,7% (n=20). Diese Verteilung deckt sich jedoch nicht mit der aktuellen Publikation der italienischen Studiengruppe um Michele Guida aus 2021, die bezüglich der Primärmetastasierung NRAS-mutierter Melanompatienten ein vornehmlich viszerales Muster beobachten konnte (IV M1C 39%, IV M1A 28%, IV M1B 25%, IV M1D 6%)¹⁹⁸.

Insgesamt entwickelten in unserem Studienkollektiv 230 Patienten in den Stadien III und IV (71%) lokoregionale und/oder Fernmetastasen. Anhand einer gepoolten Analyse erfassten wir alle dokumentierten Filiae in unserer Studienpopulation in Abhängigkeit des Zeitintervalls ab Erstdiagnose. Unter Betrachtung der ermittelten Mediane sowie des 1. und 3. Perzentils konnten wir zeigen, dass NRAS-Mutationen beim Melanom zu einer ausgeprägten lokoregionalen (1.Perzentil 8,00 Monate; Median 19,00 Monate; 3.Perzentil 41,00 Monate) und frühen cerebralen Metastasierung (1.Perzentil 13,00 Monate; Median 24,00 Monate; 3.Perzentil 36,00

Monate) führen. Die Ergebnisse erwiesen sich in der statistischen Analyse als höchst signifikant mit einem p-Wert von $<0,0001$. Unsere Ergebnisse unterstreichen somit die Erkenntnisse von Heppt et al., Ekedahl et al., Lyth et al. und Thumar et al., die für NRAS-mutierte Melanompatienten ein vornehmlich lokoregionales Metastasierungsmuster aufzeigen konnten^{163,192,200,235}. Gleichzeitig weisen sie auch auf ein frühzeitiges cerebrales Metastasierungsmuster hin und sind somit in Übereinstimmung mit den Erkenntnissen von Jakob et al.¹⁹⁵ und Adler et al.²¹³ zu sehen. Anders als Adler et al. konnten wir jedoch keine vermehrte Korrelation zu pulmonalen Metastasen feststellen²¹³.

Um ein Genotyp-spezifisches Metastasierungsmuster identifizieren zu können, erfolgte eine Stratifizierung der Primärmetastasierung unserer Studienpopulation konkordant zu den vier NRAS-Hauptgenotypen Q61H, Q61K, Q61L und Q61R. Unseren Ergebnissen zufolge scheint für Patienten mit einer NRAS Q61H Mutation eine Tendenz zu bestehen, keine oder lokoregionäre Metastasen zu entwickeln. Für Patienten mit einer NRAS Q61K Mutation hingegen kann ein lokoregionales bzw. viszerales Metastasierungsmuster als wahrscheinlich angenommen werden. Für Patienten mit einer NRAS Q61L Mutation lässt sich eine Korrelation zu lokoregionalen und cerebralen Metastasen ableiten. Alleinig für NRAS Q61R Patienten besteht ein diffuses Metastasierungsmuster, das zu keinen oder zu jeder Art von Metastasen führte.

Eine solche Stratifizierung spiegelt sich in der aktuellen Literatur nicht wider. Lediglich Bucheit et al. untersuchten unterschiedliche Metastasierungscluster für 136 NRAS-mutierte Melanompatienten entsprechend ihres Genotyps, konnten jedoch keine Unterschiede im Metastasierungsverhalten feststellen²³⁶. Deckend zu unseren Ergebnissen konnten Murphy et al. im Mausmodell zeigen, dass NRAS Q61H zu wenigen oder keinen Metastasen führen. Jedoch konnte auch diese Studiengruppe keine spezifischen Metastasierungswege für NRAS Q61R, Q61K und Q61L im Tiermodell ermitteln²³⁷.

Anhand unserer Untersuchungen konnten wir somit erstmals ein Genotyp-spezifisches Metastasierungsmuster für NRAS-mutierte Melanompatienten in Abhängigkeit spezifischer NRAS-Mutationen identifizieren.

Von besonderer Bedeutung für das Gesamtüberleben von Melanompatienten ist die Entwicklung von Hirnmetastasen, die diesbezüglich einen limitierenden Faktor darstellen²³⁸⁻²⁴⁰. Das Gesamtüberleben im Stadium IV M1D wird studienabhängig mit 3-12,5 Monaten angegeben²³⁸⁻²⁴¹. Davies et al. zufolge liegt das Melanom an Position drei nach Lungen- und Brustkrebs im Hinblick auf die Lebenszeitprävalenz von Hirnfiliae im Rahmen einer soliden Krebserkrankung²³⁸.

Verschiedene Publikationen haben die Prävalenz von Hirnmetastasen mit dem korrelierenden BRAF- bzw. NRAS-Status untersucht. Davies et al. kamen zu der Erkenntnis, dass bis zu 75% aller Melanompatienten im Verlauf der Krebserkrankung Hirnmetastasen entwickeln²⁴².

Anteilig an unserer Gesamtkohorte entwickelten 21% der Patienten (n=68) Hirnmetastasen ungeachtet des korrelierenden NRAS-Genotyps. Diese Daten ähneln den epidemiologischen Ergebnissen von Fang et al., die einen Wert von 18% ermitteln konnten²³⁹. Anderen Publikationen zufolge liegt die Rate an NRAS-mutierten Melanompatienten, welche ein Stadium IV M1D erreichen, jedoch deutlich höher (37-40%)^{235,243}.

Die Arbeitsgruppe um Gino In untersuchte 2020 das molekulare Profil von 132 Hirnfiliae. Hier von wiesen 26,6% eine NRAS-Mutation und 52,4% eine BRAF-Mutation auf²⁴⁴. Auch in der Studie von Fang et al. mit 235 Patienten wiesen mit 56% mehr BRAF-mutierte als NRAS-mutierte Patienten Hirnmetastasen auf²³⁹. Aufgrund unseres Studiendesigns können wir hierzu jedoch keine Aussage treffen.

Um einen möglichen prädiktiven Genotyp für die Entwicklung von Hirnmetastasen bei NRAS-mutierten Melanompatienten identifizieren zu können, führten wir eine komparative Analyse der vier Hauptgenotypen durch. Hierbei konnten wir feststellen, dass für Patienten mit einer NRAS Q61L Mutation das größte Risiko besteht, Hirnmetastasen zu entwickeln (RR=1,22). In der ergänzenden multivariaten Analyse konnten wir dies bestätigen (Hazard Ratio 1,173). Darüber hinaus zeigte sich die Tendenz, dass auch die Lokalisation des Primarius an den oberen Extremitäten (Hazard Ratio 1,250) die Entwicklung von Hirnmetastasen beeinflusst. Für die Parameter Geschlecht, Alter sowie das histopathologische Merkmal „nodulär“ ergab sich kein Hinweis auf eine Assoziation zu einem Stadium IV M1D.

Bereits 2012 wiesen Adil Daud und Boris C. Bastian allein dem Vorliegen einer NRAS-Mutation eine prognostische Signifikanz zu²⁴⁵. Dies können wir anhand unserer Untersuchungen bestätigen und darüber hinaus im Rahmen unserer Ergebnisse aufzeigen, dass für die vier NRAS-Hauptgenotypen unterschiedliche Metastasierungswege bestehen und insbesondere der Genotyp NRAS Q61L zu cerebralen Metastasen führt.

5.5 Therapieansprechen NRAS-mutierter Melanompatienten auf Systemtherapien

Die Systemtherapie des malignen Melanoms hat sich in den vergangenen 5 Jahren durch Zulassung immunmodulatorischer und zielgerichteter Therapien drastisch verändert. Dennoch gilt als allgemein anerkannt, dass NRAS-mutierte Melanome wie andere RAS-vermittelte Tumore eine schlechte Prognose und nur eingeschränkte Therapieoptionen aufweisen^{126,143,246}. Im Gegensatz zu BRAF-mutierten Melanomen bestehen derzeit keine zugelassenen, Mutations-spezifischen Therapiekonzepte für Patienten mit NRAS-Mutationen, obwohl seit der Entdeckung des NRAS-Protoonkogens im Jahr 1982¹⁵⁶ die Therapie dieser Patientenkohorte

Gegenstand intensiver Forschung ist. Vor diesem Hintergrund haben wir das Ansprechen von NRAS-mutierten Melanompatienten auf verschiedene Systemtherapeutika untersucht.

113 Patienten unserer Studienpopulation erhielten im AJCC-Stadium IV (M1A-M1D) eine systemische Therapie (34,87%). Aufgrund der Diversität der Systemtherapeutika wurden diese in 3 Gruppen unterschieden: 1. Chemotherapeutika, 2. Immuntherapien und 3. zielgerichtete Therapien. In der *First-Line*-Therapie konnte ein medianes progressionsfreies Überleben (PFS) von 4,00 Monaten für die Gesamtkohorte ermittelt werden. In der Substanzklassenanalyse wies Gruppe 2 (n=76) mit 7,50 Monaten das längste PFS auf. Für die Gruppen 1 (n=33) und 3 (n=4) ließ sich ein PFS von 2,00 bzw. 3,50 Monaten ermitteln.

In der *Second-Line*-Therapie betrug das PFS für die Gesamtkohorte im Median 5,00 Monate. Patienten unter Chemotherapie (n=10) bzw. zielgerichteter Therapie (n=2) wiesen ein PFS von 3,00 Monaten bzw. 4,00 auf. Die Gruppe der Patienten mit einer Immuntherapie (n=40) erreichte ein medianes PFS von 5,50 Monaten. In der statistischen Analyse zeigte sich das Ergebnis für die Erstlinie höchst signifikant ($p < 0,0001$), in der Zweitlinie hingegen nicht ($p = 0,901$).

In der *Third-Line*-Therapie wiesen Patienten mit einer Immuntherapie (n=16) ein medianes PFS von 7,00 Monaten auf. Für chemotherapeutisch (n=12) bzw. zielgerichtet behandelte Patienten (n=3) ließ sich ein medianes PFS von 3,50 bzw. 4,00 Monaten ermitteln ($p = 0,0353$). In den Therapielinien vier und fünf wurde keine statistische Signifikanz erreicht ($p = 0,6965$ bzw. $p = 0,1573$).

Unsere Daten der Chemotherapie-Gruppen sind kongruent mit den Ergebnissen der Checkmate-037-, Checkmate-066- und KEYNOTE-002-Studie, die ein PFS von 2,2 - 4,24 Monaten für Patienten unter Chemotherapie aufwiesen^{107,247,248}. Die polnische Studiengruppe um Bożena Cybulska-Stopa konnte 2020 ähnliche Ergebnisse für die Erst- bis Drittlinie Chemotherapie ermitteln, mit minimalen Abweichungen (*First-Line*: 3,8 Monate; *Second-Line*: 2,4 Monate, *Third-Line*: 2,6 Monate)²⁴⁹. Somit scheint ein chemotherapeutischer Ansatz für NRAS-mutierte Melanompatienten nur zu einem kurzen PFS zu führen.

Der Einfluss zielgerichteter Therapien bei NRAS-mutierten Melanompatienten wurde in verschiedenen Studien untersucht. Die Tyrosinkinase-Inhibitoren Pimasertib und Selumetinib führten mit 12,7 Wochen bzw. 2,2 Monaten zu keiner Verbesserung des PFS bei NRAS-Patienten^{72,250}. Der MEK-Inhibitor Trametinib wies in einer Phase-I-Studie ein PFS von 4,8 Monaten und ein OS von 81% nach 6 Monaten auf¹²⁴.

Große Erwartungen, eine zielgerichtete Therapie bei NRAS-mutierten Melanompatienten etablieren zu können, weckten die Ergebnisse von Ascierto et al. aus 2013. In einer Phase-1B-Studie untersuchten sie den MEK-Inhibitor Binimetinib im Stadium IV und konnten ein PFS

von 3,7 Monaten bei NRAS- und 3,6 Monate bei BRAF-mutierten Melanompatienten nachweisen⁶⁸. Diese Erwartungen ließen sich in der großen NEMO-Studie von Dummer et al. mit 402 Patienten nicht bestätigen. Zwar lag das PFS hier mit 2,8 Monaten höher als im Vergleichsarm mit DTIC (1,5 Monate) und wies eine statistische Signifikanz auf, ein klinischer Vorteil gegenüber Patienten, die im Vergleichsarm DTIC erhielten, konnte allerdings nicht erzielt werden¹²⁵. Diese Daten bezüglich des PFS können wir anhand unserer Studienpopulation bestätigen, wenngleich wir nur in Einzelfällen Patienten mit einem MEK-Inhibitor behandelt haben. Auffällig ist, dass das PFS bei unseren Patienten in fortgeschrittenen Therapielinien unter Therapie mit einem MEK-Inhibitor zunahm (max. 8 Monate in 3. Therapielinie bzw. 7 Monate in 4. Therapielinie). Diese Kasuistiken werfen die Frage auf, ob sich ein synergistischer Effekt durch die zuvor durchgeführte Immuntherapie in sequentieller Folge mit einem MEK-Inhibitor ergibt. Unsere Daten lassen nur eine Vermutung zu, diese sollte jedoch in weiteren, multizentrischen Studien evaluiert werden.

Die klinische Aktivität von Checkpointinhibitoren beim metastasierten malignen Melanom wurde in verschiedenen Studien belegt und gilt derzeit als Goldstandard in der Systemtherapie. Einigen Publikationen zufolge profitieren NRAS-mutierte Melanompatienten mehr als BRAF- oder Wildtyp-Patienten von einer Immuntherapie^{246,251}.

Unabhängig der Substanzklasse konnten wir in unserer Studienpopulation unter Immuntherapie ein PFS von 7,50 Monaten in der Erstlinientherapie, 5,50 Monate in der Zweit- und 7,00 Monate in der Drittlinientherapie ermitteln.

Um zu evaluieren, ob Patienten mit einer NRAS-Mutation von einer distinkten Immuntherapie in der *First-* bzw. *Second-Line*-Therapie profitieren, haben wir das PFS konkordant zu den Therapieschemata CTLA-4-Antikörper, PD1-Antikörper oder Immunkombinationstherapie (CTLA-4-AK + PD1-AK) ermittelt.

Hier zeigte sich, dass NRAS-Mutierte in der Erstlinientherapie von einer Checkpoint-Inhibition mit einem PD1-Antikörper (Mono oder in Kombination mit CTLA-4) profitieren. Das mediane Therapieansprechen war vergleichbar mit 8,50 Monaten (Kombi) vs. 7,00 Monaten (Mono). Deutlich weniger haben sie von einer CTLA-4-Mono-Inhibition profitiert (3,50 Monate) ($p=0,0025$).

In der Zweitlinientherapie lag das mediane Therapieansprechen interessanterweise für die Kombination mit 4,00 Monaten hinter der Monotherapie mit Ipilimumab mit 6,00 Monaten zurück. Am meisten profitierten die Patienten von einer PD1-Inhibition (7,00 Monate) ($p=0,4552$).

Betrachtet man die Mittelwerte so zeigen sich in der Erstlinie keine signifikanten Unterschiede, in der Zweitlinie hingegen schon: Die Immunkombination weist mit 4,250 Monaten ein deutlich

geringeres Therapieansprechen auf als die Monotherapien: Ipilimumab 22,82 Monate vs. PD1-AK 15,53 Monate.

In einer jüngst veröffentlichten italienischen Studie konnte gleichfalls ein nur geringes PFS von 4,0 Monaten in der Erstlinie für die Ipilimumab-Monotherapie festgestellt werden. Der Studiengruppe um Michele Guida zufolge profitieren Patienten mit einer NRAS-Mutation signifikant von einer primären PD1-Antikörpertherapie (PFS 15,0 Monate). Dies können wir anhand unserer Daten bestätigen, wenngleich das PFS in der italienischen Studiengruppe annähernd doppelt so hoch war wie in unserer Studienpopulation ¹⁹⁸.

Auch die Studiengruppe um Olivier Jules van Not aus den Niederlanden konnte 2021 einen signifikanten Vorteil einer Checkpointinhibition in der Erstlinie mit einem PD1-Antikörper für NRAS-mutierte Melanompatienten feststellen (PFS 11,3 Monate vs. 9,9 Monate für BRAF-mutierte Melanompatienten) ²⁵². Annähernd deckend zu unseren Ergebnissen wiesen sie ein PFS von 9,1 Monaten für die Immunkombination aus Ipilimumab plus Nivolumab aus ²⁵². Diese Ergebnisse stehen jedoch im Widerspruch mit der ebenfalls 2021 veröffentlichten Studie von April Rose, die ein signifikant verbessertes PFS und OS für NRAS-mutierte Melanompatienten mit einer kombinierten PD1- und CTLA-4-Antikörpertherapie im Vergleich zu einer anti-PD1-Monotherapie aufzeigen konnte und den NRAS-Status als Biomarker für Auswahl der Therapiestrategie vorgeschlagen hat ²⁵³.

In einer britischen Studie aus April 2021 wurde eine sequentielle Immuntherapie beim Melanom unabhängig des zugrunde liegenden Mutationsstatus untersucht. Deckend zu unseren Ergebnissen konnte die Studiengruppe um Thomas Wilson ein PFS von 4,0 Monaten für Ipilimumab Mono vs. 6,6 Monate unter anti-PD1-Therapie in der Erstlinie nachweisen ²⁵⁴. In der Zweitlinie differierte das mediane Ansprechen signifikant: 16,5 Monate für PD1-Antikörper vs. 3,4 Monate für eine CTLA-4-Inhibition ²⁵⁴. Eine Studie von Zimmer et al. untersuchte mutationsunabhängig den Einfluss von Ipilimumab als Mono- bzw. Kombinationstherapie mit Nivolumab nach Progress in der Erstlinie mit einer PD1-Inhibition. Das mediane PFS für die Monotherapie lag hier bei 3,0 Monaten, für die Immunkombination bei 2,0 Monaten ²⁵⁵. Unsere Daten liegen doppelt so hoch und bestätigen somit ein besseres Ansprechen einer sequentiellen CTLA-4-Monotherapie gegenüber einer Immunkombinationstherapie in der Zweitlinie.

Unsere Daten stellen ein Anhalt für eine mögliche Sequenztherapie innerhalb der Checkpointinhibitoren und einen Entscheidungsalgorithmus in der Therapie von NRAS-mutierten Melanompatienten dar und sollten anhand einer größeren Studienpopulation, z.B. anhand zentraler Registerdaten, geprüft werden.

Derzeit werden im Rahmen klinischer Studien verschiedene Ansätze zur Behandlung NRAS mutierter Melanompatienten geprüft. Vor allem Kombinationen verschiedener Substanzklassen werden untersucht:

In einer 2018 publizierten Arbeit konnte die Studiengruppe um Ileabett Echevarría-Vargas einen synergistischen, antitumorösen Effekt von BET- und MEK-Inhibitoren bei Zelllinien von NRAS-mutierten Melanomen nachweisen. Die Kombination führte zu einer Blockade der DNA-Replikation der Tumorzellen sowie ihrer Angiogenese²⁵⁶. Die Ergebnisse einer Phase IB Studie stehen noch aus.

Anhand präklinischer Daten, konnten Atefi et al.²⁵⁷ zeigen, dass die Kombination aus einem pan-RAF Inhibitor und einem MEK-Inhibitor zu einer signifikanten Tumorstichtumsinhibition führt. Ergebnisse aus klinischen Phase I/II Studien bleiben abzuwarten.

Um eine mögliche Resistenzentwicklung unter einer MEK-Inhibitor-Monotherapie zu überwinden hat die Studiengruppe um Martin Schuler in einer Phase 1b/2 Studie NRAS-mutierte Melanompatienten mit einer Kombination aus dem CDK-4/6-Inhibitor Ribociclip und dem MEK-Inhibitor Binimetinib behandelt. Das mediane PFS von 2,8 Monaten¹²⁵ unter Binimetinib Mono konnte so auf 6.7 Monate (95% CI, 3.5–9.2) gesteigert werden²⁵⁸.

Eine spanische Studiengruppe veröffentlichte jüngst ermutigende Ergebnisse der Phase-II-Studie „LEAP-004“: Die Kombination des Multikinase-Inhibitors Lenvatinib mit dem PD1-Antikörper Pembrolizumab führte bei Patienten, die zuvor unter Checkpointimmuntherapie progressiert geworden waren, zu einer *disease control rate* (DCR) von 65,0% für 6,3 Monate und einem OS von 13,9 Monaten. Die Langzeitergebnisse bleiben jedoch abzuwarten.

5.6 Einfluss von NRAS-Mutationen auf das rezidivfreie und Gesamtüberleben von Patienten mit malignem Melanom

In der Literatur wird das Gesamtüberleben (*overall survival*, OS) von NRAS-mutierten Melanompatienten widersprüchlich diskutiert. Einigen Studien zufolge weisen NRAS-mutierte Patienten ein deutlich besseres OS im Vergleich zu BRAF-mutierten oder Wildtyp-Patienten auf^{259,260}. Andere Studiengruppen hingegen konnten keinen Einfluss des NRAS-Mutationsstatus auf das Gesamtüberleben feststellen^{162,164,201,225,234}. Die meisten Autoren konstatieren jedoch eine Korrelation von NRAS-Mutationsstatus und verkürztem OS, insbesondere nach Erreichen eines Stadium IV^{193,208,235,243}. Die amerikanische Studiengruppe um John A. Jakob identifizierte eine NRAS-Mutation beim Melanom als unabhängigen, negativ prognostischen Risikofaktor für ein frühzeitiges Versterben (Hazard Ratio 2,05)¹⁹⁵, was wenige Jahre später von einer italienischen Studie bestätigt wurde²⁶¹.

Es ist jedoch unklar, ob und welchen Einfluss die unterschiedlichen NRAS-Genotypen auf das Gesamtüberleben haben. Diesbezüglich stehen nur wenige Untersuchungen in der Literatur zur Verfügung.

Vor diesem Kontext wurden in unserem Kollektiv erstmalig *real-life*-Daten aus dem klinischen Alltag von 273 NRAS-mutierten Melanompatienten nach 5 und 10 Jahren, stratifiziert nach NRAS-Genotyp, ausgewertet.

In unserem Kollektiv betrug das Melanom-spezifische Gesamtüberleben für die Gesamtkohorte nach 5 Jahren im Schätzverfahren nach Kaplan-Meier 62,9%. Dies deckte sich annähernd mit dem für den NRAS-Genotyp Q61R ermittelten Wert (62,0%). Das geringste 5-Jahres-Gesamtüberleben wiesen Patienten mit einer NRAS Q61K-Mutation auf (57,6%). Die Gruppe Q61H lag mit 71,4% über dem Ergebnis der Gesamtkohorte. Erstaunlicherweise wies die Gruppe mit dem NRAS-Genotyp Q61L das weitaus beste *overall survival* mit 80,7% auf.

In der 10-Jahres-Analyse sank das OS für die Gesamtkohorte auf 46,7%. Das Gesamtüberleben nach NRAS-Genotypen folgt dabei der 5-Jahres-Analyse. NRAS Q61R entsprach mit 47,2% in etwa der Gesamtkohorte, während NRAS Q61K das schlechteste OS mit 39,4% aufwies. Analog zum 5-Jahres-Überleben lag das OS für die Gruppe der NRAS Q61L mutierten Melanompatienten mit 67,2% etwa 20% über dem der Gesamtkohorte. Das Ergebnis für NRAS Q61H muss für diese Subanalyse jedoch mit Vorbehalt betrachtet werden, da das OS nach 10 Jahren noch nicht erreicht wurde (71,4% nach 81,1 Monaten).

Anhand einer multivariaten Cox-Regression überprüften wir weitere Einflussfaktoren auf das Gesamtüberleben unseres Kollektivs. Als signifikanten Faktor für ein kürzeres *overall survival* und damit einen negativ prognostischen Prädiktor konnten wir den NRAS Genotyp Q61K ermitteln (Hazard Ratio 1,467). Als reziproker und damit positiv prognostischen Prädiktor ließ sich der Genotyp Q61L mit einer Hazard Ratio von 0,357 identifizieren. Auch die Lokalisation des Primärtumors im Kopf-/Halsbereich scheint einen negativen Einfluss auf das Gesamtüberleben zu haben (Hazard Ratio 1,706). Ebenso ein Lebensalter von 71-80 Jahren (Hazard Ratio 1,274). Das Geschlecht und das histopathologische Merkmal „nodulär“ sind in unserem Kollektiv statistisch nicht mit einer verkürzten Überlebensdauer assoziiert.

Ein unerwartetes Ergebnis war, dass Patienten mit einer NRAS Q61L Mutation sowohl in der 5-Jahres- als auch in der 10-Jahres-Analyse das beste *overall survival* aufwiesen, was mittels einer multivariaten Analyse bestätigt werden konnte. Dies ist erstaunlich, da wir im Rahmen dieser Studie auch feststellen konnten, dass dieser Genotyp ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Hirnmetastasen aufweist und das Erreichen eines Stadium IV M1D als limitierender Faktor im Gesamtüberleben gilt^{238,239}. Den Untersuchungen von Fang et al. zufolge beträgt die Überlebenswahrscheinlichkeit für Patienten im Stadium IV M1D 3-5 Monate²³⁹. Begründen lässt sich diese Beobachtung einerseits durch eine verbesserte Lokalkontrolle, die

bspw. durch isolierte stereotaktische Bestrahlungen und/oder neurochirurgische Interventionen erreicht werden kann²³⁸. Andererseits konnten Tawbi et al. nachweisen, dass die Checkpointinhibition mit der Kombination aus Ipilimumab und Nivolumab mutationsunabhängig bei ca. 57% der betroffenen Patienten zu einem cerebralen Ansprechen führt²⁶². Die Frage, ob nun diese onkologischen Interventionen oder die Tumorbilogie von NRAS Q61L diesem Paradoxon zugrunde liegen, sollte künftig in prospektiven, randomisierten Studien genauer untersucht werden.

Die Einordnung der von uns ermittelten 5- und 10-Jahres-Gesamtüberlebensraten vor dem Hintergrund der aktuellen Literatur wird dadurch erschwert, dass die jüngeren Publikationen ein OS meist ab dem Zeitpunkt der Ersttherapie mit Immun- oder zielgerichteter Therapie definieren^{198,243} und ein 5- bzw. 10-Jahres-Überleben (noch) nicht erreicht wurde. Daher kann für diesen Vergleich lediglich die Studie von Heppt et al. herangezogen werden, die ein 5-Jahres-Überleben von 68,2% für NRAS-mutierte Patienten ausweist, was von unserem Ergebnis nur minimal abweicht. Eine Stratifizierung nach NRAS-Genotyp ist allerdings nicht erfolgt²⁰⁰. Kirchberger et al. konnten ein OS für NRAS-mutierte Melanompatienten von 21 Monaten vs. 33 Monate bei NRAS-Wildtyp unter Immuntherapie im Stadium IV ermitteln. Das OS für die Gruppe NRAS Q61R betrug im Median 25 Monate, für NRAS Q61K 16 Monate und für NRAS Q61L 15 Monate. Patienten mit dem Genotyp Q61H hatten das mediane OS noch nicht erreicht²⁴³.

Anfang des Jahres 2021 konnten Murphy et al. im Mausmodell nachweisen, dass Mutationen im Codon Q61R, Q61K, und Q61L ein rasches Tumorwachstum induzieren können und zu einem kurzen *overall survival* bei den Versuchstieren führen (Q61K: 35 Wochen, Q61L: 35 Wochen, Q61R: 18 Wochen). Dementgegen entwickelten Versuchstiere mit einer Mutation im Codon Q61H nur wenige oder keine Tumoren und wiesen ein OS von >60 Wochen auf (Median wurde noch nicht erreicht)²³⁷. Diese translationalen Daten beschreiben eine Tendenz, die unseren Daten aus dem klinischen Alltag ähnelt, mit einer Abweichung. Der Genotyp NRAS Q61K, den wir als negativ prognostischen Prädiktor für ein verkürztes OS identifizieren konnten, weist im Mausmodell ein deutlich besseres OS auf.

5.7 Assoziation von NRAS-Genotypen beim Melanom zu Zweitmalignomen

In unserer Kohorte entwickelten 38 Patienten (11,73% der Gesamtkohorte) ein Zweit- und 4 Patienten (1,23%) ein Drittmalignom. In einer großen SEER-Studie von Deng et al. aus dem Jahr 2020 wurde das Auftreten sekundärer Malignome vor der Immuntherapie-Ära (2005-2010) und unter Immuntherapie (2011-2016) von Melanompatienten unabhängig des korrespondierenden Mutationsstatus untersucht²⁶³. Hierzu wurden 2315 respektive 2701 Patienten

analysiert. Hiervon wiesen 1,26% bzw. 1,42% Sekundärmalignome auf und damit deutlich weniger als in unserer Kohorte. Die Werte für hämatologische Neoplasien decken sich mit unseren Ergebnissen. Das Auftreten von Nierenzellkarzinomen in unserer Kohorte ist mit 0,6% jedoch geringer als in der SEER-Studie mit 2,77% bzw. 2,66%. Schilddrüsenkarzinome, Harnblasenkarzinome und Gallengangskarzinome entwickelten je 0,31% unserer Patienten, Ösophaguskarzinome und Urothelkarzinome hingegen 0,62%. Deng et al. wiesen Harnblasenkarzinome, Gallengangskarzinome, Ösophaguskarzinome und Urothelkarzinome jedoch nicht explizit aus, so dass eine Einordnung nicht möglich ist. Bezüglich der Schilddrüsenkarzinome konnten sie eine Inzidenz von 2,13% bzw. 0% feststellen. 2,47% unserer Patienten entwickelten ein Prostatakarzinom, erheblich mehr als in der Querschnittsstudie mit 0,63% bzw. 0,92%. Auch die Ergebnisse der sekundären Kolonkarzinome ist mit 1,23% knapp doppelt so hoch bzw. ähnlich den Ergebnissen von Deng et al. mit 0,66% bzw. 1,09%. Unsere Ergebnisse bzgl. Mammakarzinomen mit 1,54% sind vergleichbar mit jenen der SEER-Studie (1,13% bzw. 1,55%). Weitaus seltener als in der Studie von Deng et al. konnten wir in unserer Kohorte das Auftreten von Bronchialkarzinomen verzeichnen (0,62% vs. 1,93% bzw. 1,54%).

Zu beachten ist jedoch, dass in unserer Studie die reguläre Inzidenz errechnet worden ist, in der Studie von Deng et al. hingegen die standardisierte Inzidenzrate (SIR).

Mit einer Rate von 11,73% an Sekundärmalignomen liegt unsere Studienpopulation weit über den Ergebnissen der SEER-Studie. Diese Beobachtung legt nahe, dass NRAS-positive Melanompatienten ein höheres Risiko aufweisen an weiteren Neoplasien zu erkranken, als Wildtyp-, BRAF- oder c-KIT-mutierte Melanompatienten. Die Inzidenzrate wird bei Heppt et al. nicht ausgewiesen, allerdings konnten die Autoren eine signifikante Häufung von Zweitmalignomen bei NRAS-Patienten im Vergleich zu BRAF- oder Wildtyp-Patienten feststellen²⁰⁰.

Als Erklärungsmodell hierfür kann der RAS/RAF/MEK/ERK – Signalkaskadeweg dienen, der nicht nur beim Melanom, sondern auch bei anderen Tumorentitäten (u.a. Kolonkarzinom, Prostatakarzinom, Schilddrüsenkarzinom) von zentraler, molekularpathologischer Bedeutung ist

^{264,265}

Eine Assoziation bestimmter Zweitneoplasien zu einem distinkten NRAS-Genotyp konnten wir nicht identifizieren.

6. Literaturverzeichnis

1. Fawcington T. A Case of Melanosis, with General Observations on the Pathology of the Interesting Disease. London: Longman, Orme, Brown, Robinson and Bent; 1826.
2. Rebecca VW, Sondak VK, Smalley KS. A brief history of melanoma: from mummies to mutations. *Melanoma Res* 2012; **22**(2): 114-22.
3. Urteaga O, Pack GT. On the antiquity of melanoma. *Cancer* 1966; **19**(5): 607-10.
4. Ackerman AB. Malignant melanoma: a unifying concept. *Hum Pathol* 1980; **11**(6): 591-5.
5. Plewig G, Landthaler M, Burgdorf WHC, Hertl M, Ruzicka T. Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie. 6 ed. Berlin: Springer Verlag; 2012.
6. Tejera-Vaquerizo A, Nagore E, Melendez JJ, et al. Chronology of metastasis in cutaneous melanoma: growth rate model. *J Invest Dermatol* 2012; **132**(4): 1215-21.
7. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms, Langversion 3.1, 2018, AWMF Registernummer: 032/024OL. http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Melanom/Melanom_Version_3/LL_Melanom_Langversion_3.1.pdf (Zuletzt abgerufen am 02.07.2019).
8. Rigel DS, Carucci JA. Malignant melanoma: prevention, early detection, and treatment in the 21st century. *CA Cancer J Clin* 2000; **50**(4): 215-36; quiz 37-40.
9. Brochez L, Naeyaert JM. Understanding the trends in melanoma incidence and mortality: where do we stand? *Eur J Dermatol* 2000; **10**(1): 71-5; quiz 6.
10. Desmond RA, Soong SJ. Epidemiology of malignant melanoma. *Surg Clin North Am* 2003; **83**(1): 1-29.
11. Garbe C, Blum A. Epidemiology of cutaneous melanoma in Germany and worldwide. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2001; **14**(5): 280-90.
12. Garbe C. Management des Melanoms. Heidelberg: Springer Verlag; 2006.
13. Marks R, Kopf AW. Cancer of the skin in the next century. *Int J Dermatol* 1995; **34**(7): 445-7.
14. Sober AJ, Lew RA, Koh HK, Barnhill RL. Epidemiology of cutaneous melanoma. An update. *Dermatol Clin* 1991; **9**(4): 617-29.
15. Robert-Koch-Institut, Zentrum für Krebsregisterdaten: Krebs in Deutschland für 2013/2014, gemeinsame Publikation des Zentrums für Krebsregisterdaten und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland eV.. 11.Ausgabe, Robert-Koch-Institut, Berlin 2017. <http://dx.doi.org/10.25646/3195> (Zuletzt abgerufen am 05.07.2019).
16. Sacchetto L, Zanetti R, Comber H, et al. Trends in incidence of thick, thin and in situ melanoma in Europe. *Eur J Cancer* 2018; **92**: 108-18.
17. Garbe C, Leiter U. Melanoma epidemiology and trends. *Clin Dermatol* 2009; **27**(1): 3-9.

18. de Vries E, Bray FI, Coebergh JW, Parkin DM. Changing epidemiology of malignant cutaneous melanoma in Europe 1953-1997: rising trends in incidence and mortality but recent stabilizations in western Europe and decreases in Scandinavia. *Int J Cancer* 2003; **107**(1): 119-26.
19. Leiter U, Garbe C. Epidemiology of melanoma and nonmelanoma skin cancer--the role of sunlight. *Adv Exp Med Biol* 2008; **624**: 89-103.
20. Florez A, Cruces M. Melanoma epidemic: true or false? *Int J Dermatol* 2004; **43**(6): 405-7.
21. MacLennan R, Green AC, McLeod GR, Martin NG. Increasing incidence of cutaneous melanoma in Queensland, Australia. *J Natl Cancer Inst* 1992; **84**(18): 1427-32.
22. Wong JR, Harris JK, Rodriguez-Galindo C, Johnson KJ. Incidence of childhood and adolescent melanoma in the United States: 1973-2009. *Pediatrics* 2013; **131**(5): 846-54.
23. Robert-Koch-Institut, Zentrum für Krebsregisterdaten: Krebs in Deutschland für 2009/2010, gemeinsame Publikation des Zentrums für Krebsregisterdaten und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland eV.. 10Ausgabe, Robert-Koch-Institut, Berlin. 2013. <http://dx.doi.org/10.25646/3169> (Zuletzt abgerufen am 05.07.2019).
24. Elwood JM, Jopson J. Melanoma and sun exposure: an overview of published studies. *Int J Cancer* 1997; **73**(2): 198-203.
25. Krickler A, Armstrong BK, Goumas C, et al. Ambient UV, personal sun exposure and risk of multiple primary melanomas. *Cancer Causes Control* 2007; **18**(3): 295-304.
26. Dusza SW, Halpern AC, Satagopan JM, et al. Prospective study of sunburn and sun behavior patterns during adolescence. *Pediatrics* 2012; **129**(2): 309-17.
27. Miller AJ, Mihm MC, Jr. Melanoma. *N Engl J Med* 2006; **355**(1): 51-65.
28. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *Eur J Cancer* 2005; **41**(1): 45-60.
29. Harrison SL, MacLennan R, Speare R, Wronski I. Sun exposure and melanocytic naevi in young Australian children. *Lancet* 1994; **344**(8936): 1529-32.
30. Garbe C, Buttner P, Weiss J, et al. Associated factors in the prevalence of more than 50 common melanocytic nevi, atypical melanocytic nevi, and actinic lentiginos: multicenter case-control study of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society. *J Invest Dermatol* 1994; **102**(5): 700-5.
31. Wiecker TS, Luther H, Buettner P, Bauer J, Garbe C. Moderate sun exposure and nevus counts in parents are associated with development of melanocytic nevi in childhood: a risk factor study in 1,812 kindergarten children. *Cancer* 2003; **97**(3): 628-38.
32. Swerdlow AJ, English J, MacKie RM, et al. Benign melanocytic naevi as a risk factor for malignant melanoma. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1986; **292**(6535): 1555-9.
33. Green A, Autier P, Boniol M, et al. The association of use of sunbeds with cutaneous malignant melanoma and other skin cancers: A systematic review. *International Journal of Cancer* 2007; **120**(5): 1116-22.

34. Fisher DE, James WD. Indoor tanning--science, behavior, and policy. *N Engl J Med* 2010; **363**(10): 901-3.
35. Osterlind A, Tucker MA, Stone BJ, Jensen OM. The Danish case-control study of cutaneous malignant melanoma. II. Importance of UV-light exposure. *Int J Cancer* 1988; **42**(3): 319-24.
36. Berking C. [The role of ultraviolet irradiation in malignant melanoma]. *Hautarzt* 2005; **56**(7): 687-96; quiz 97.
37. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *Eur J Cancer* 2005; **41**(1): 28-44.
38. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. *Eur J Cancer* 2005; **41**(14): 2040-59.
39. Vredenburg A, Bohringer S, Boonk SE, et al. Acquired melanocytic nevi in childhood and familial melanoma. *JAMA Dermatol* 2014; **150**(1): 35-40.
40. Goldstein AM, Tucker MA. Genetic epidemiology of cutaneous melanoma: a global perspective. *Arch Dermatol* 2001; **137**(11): 1493-6.
41. Ransohoff KJ, Jaju PD, Tang JY, Carbone M, Leachman S, Sarin KY. Familial skin cancer syndromes: Increased melanoma risk. *J Am Acad Dermatol* 2016; **74**(3): 423-34; quiz 35-6.
42. Titus-Ernstoff L, Perry AE, Spencer SK, Gibson JJ, Cole BF, Ernstoff MS. Pigmentary characteristics and moles in relation to melanoma risk. *Int J Cancer* 2005; **116**(1): 144-9.
43. Wang Y, Digiovanna JJ, Stern JB, et al. Evidence of ultraviolet type mutations in xeroderma pigmentosum melanomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; **106**(15): 6279-84.
44. Friedman RJ, Rigel DS, Kopf AW. Early detection of malignant melanoma: the role of physician examination and self-examination of the skin. *CA Cancer J Clin* 1985; **35**(3): 130-51.
45. Abbasi NR, Shaw HM, Rigel DS, et al. Early diagnosis of cutaneous melanoma: revisiting the ABCD criteria. *JAMA* 2004; **292**(22): 2771-6.
46. Kerl H, Garbe C, Cerroni L, Wolff HH. *Histopathologie der Haut*. Berlin: Springer Verlag; 2003.
47. Czeschik JC, Hillen U, Schadendorf D. Diagnostik des malignen Melanoms. *Onkologe* 2010; **16**(12): 1121-30.
48. Clark WH, Jr., From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res* 1969; **29**(3): 705-27.
49. Coleman WP, 3rd, Loria PR, Reed RJ, Krementz ET. Acral lentiginous melanoma. *Arch Dermatol* 1980; **116**(7): 773-6.

50. Szeimies RM, Hauschild A, Garbe C, Kaufmann R, Landthaler M. Tumoren der Haut: Grundlagen, Diagnostik und Therapie in der dermatologischen Onkologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2009.
51. Czarnetzki BM, Denter M, Brocker EB, et al. Clinical features of superficial spreading melanomas with zones of regression. *J Cancer Res Clin Oncol* 1984; **107**(3): 225-8.
52. Kempf W, Hantschke M, Kutzner H, Burgdorf WHC. Dermatopathologie. 2 ed. Berlin: Springer Verlag; 2011.
53. Kurschat P, Mauch C. Mechanisms of metastasis. *Clin Exp Dermatol* 2000; **25**(6): 482-9.
54. Bergenmar M, Ringborg U, Mansson Brahme E, Brandberg Y. Nodular histogenetic type -- the most significant factor for thick melanoma: implications for prevention. *Melanoma Res* 1998; **8**(5): 403-11.
55. Golger A, Young DS, Ghazarian D, Neligan PC. Epidemiological features and prognostic factors of cutaneous head and neck melanoma: a population-based study. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2007; **133**(5): 442-7.
56. Price NM, Rywlin AM, Ackerman AB. Histologic criteria for the diagnosis of superficial spreading malignant melanoma: formulated on the basis of proven metastatic lesions. *Cancer* 1976; **38**(6): 2434-41.
57. Cohen LM. Lentigo maligna and lentigo maligna melanoma. *J Am Acad Dermatol* 1995; **33**(6): 923-36; quiz 37-40.
58. McKenna JK, Florell SR, Goldman GD, Bowen GM. Lentigo Maligna/Lentigo Maligna Melanoma: Current State of Diagnosis and Treatment. *Dermatologic Surgery* 2006; **32**(4): 493-504.
59. Kremenz ET, Feed RJ, Coleman WP, 3rd, Sutherland CM, Carter RD, Campbell M. Acral lentiginous melanoma. A clinicopathologic entity. *Ann Surg* 1982; **195**(5): 632-45.
60. Hutchinson J. Notes on the cancerous process and on new growth in general. *Arch Surg* 1892; **3**: 315-22.
61. Gershenwald JE, Scolyer RA. Melanoma Staging: American Joint Committee on Cancer (AJCC) 8th Edition and Beyond. *Ann Surg Oncol* 2018; **25**(8): 2105-10.
62. Bristol-Myers Squibb. Stadieneinteilung und TNM-Klassifikation des malignen Melanoms der Haut. AJCC 8th Edition 2017. In: 7356DE1703236-01, editor.: Bristol-Myers Squibb; 07/2017.
63. Amin MB, Edge S, Greene F, et al. AJCC Cancer Staging Manual. 8 ed. New York: Springer Verlag; 2017.
64. Gershenwald JE, Scolyer RA, Hess KR, et al. Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin* 2017; **67**(6): 472-92.
65. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol* 2009; **27**(36): 6199-206.

66. Munsch C, Lauwers-Cances V, Lamant L, et al. Breslow thickness, clark index and ulceration are associated with sentinel lymph node metastasis in melanoma patients: a cohort analysis of 612 patients. *Dermatology* 2014; **229**(3): 183-9.
67. Hodis E, Watson IR, Kryukov GV, et al. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell* 2012; **150**(2): 251-63.
68. Ascierto PA, Schadendorf D, Berking C, et al. MEK162 for patients with advanced melanoma harbouring NRAS or Val600 BRAF mutations: a non-randomised, open-label phase 2 study. *Lancet Oncol* 2013; **14**(3): 249-56.
69. Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; **417**(6892): 949-54.
70. Menzies AM, Long GV, Murali R. Dabrafenib and its potential for the treatment of metastatic melanoma. *Drug Des Devel Ther* 2012; **6**: 391-405.
71. Cox AD, Der CJ. Ras history: The saga continues. *Small GTPases* 2010; **1**(1): 2-27.
72. Bertoli E, Giavarra M, Vitale MG, Minisini AM. Neuroblastoma rat sarcoma mutated melanoma: That's what we got so far. *Pigment Cell Melanoma Res* 2019; **32**(6): 744-52.
73. Cheng Y, Zhang G, Li G. Targeting MAPK pathway in melanoma therapy. *Cancer Metastasis Rev* 2013; **32**(3-4): 567-84.
74. Marcus K, Mattos C. Direct Attack on RAS: Intramolecular Communication and Mutation-Specific Effects. *Clin Cancer Res* 2015; **21**(8): 1810-8.
75. Flaherty KT, Hodi FS, Fisher DE. From genes to drugs: targeted strategies for melanoma. *Nat Rev Cancer* 2012; **12**(5): 349-61.
76. Gutierrez-Castaneda LD, Nova JA, Tovar-Parra JD. Frequency of mutations in BRAF, NRAS, and KIT in different populations and histological subtypes of melanoma: a systemic review. *Melanoma Res* 2020; **30**(1): 62-70.
77. Tran KT, Wright NA, Cockerell CJ. Biopsy of the pigmented lesion--when and how. *J Am Acad Dermatol* 2008; **59**(5): 852-71.
78. Sladden MJ, Balch C, Barzilai DA, et al. Surgical excision margins for primary cutaneous melanoma. *Cochrane Database Syst Rev* 2009; (4): CD004835.
79. Morton DL, Thompson JF, Cochran AJ, et al. Final trial report of sentinel-node biopsy versus nodal observation in melanoma. *N Engl J Med* 2014; **370**(7): 599-609.
80. Morton DL, Wanek L, Nizze JA, Elashoff RM, Wong JH. Improved long-term survival after lymphadenectomy of melanoma metastatic to regional nodes. Analysis of prognostic factors in 1134 patients from the John Wayne Cancer Clinic. *Ann Surg* 1991; **214**(4): 491-9; discussion 9-501.
81. Leiter U, Stadler R, Mauch C, et al. Final Analysis of DeCOG-SLT Trial: No Survival Benefit for Complete Lymph Node Dissection in Patients With Melanoma With Positive Sentinel Node. *J Clin Oncol* 2019; **37**(32): 3000-8.
82. Faries MB, Thompson JF, Cochran AJ, et al. Completion Dissection or Observation for Sentinel-Node Metastasis in Melanoma. *N Engl J Med* 2017; **376**(23): 2211-22.

83. Xing Y, Bronstein Y, Ross MI, et al. Contemporary diagnostic imaging modalities for the staging and surveillance of melanoma patients: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2011; **103**(2): 129-42.
84. Garbe C, Schadendorf D. Surveillance and follow-up examinations in cutaneous melanoma. *Onkologie* 2003; **26**(3): 241-6.
85. Pehamberger H, Soyer HP, Steiner A, et al. Adjuvant interferon alfa-2a treatment in resected primary stage II cutaneous melanoma. Austrian Malignant Melanoma Cooperative Group. *J Clin Oncol* 1998; **16**(4): 1425-9.
86. Kirkwood JM, Strawderman MH, Ernstoff MS, Smith TJ, Borden EC, Blum RH. Interferon alfa-2b adjuvant therapy of high-risk resected cutaneous melanoma: the Eastern Cooperative Oncology Group Trial EST 1684. *J Clin Oncol* 1996; **14**(1): 7-17.
87. Eggermont AM, Suci S, Santinami M, et al. Adjuvant therapy with pegylated interferon alfa-2b versus observation alone in resected stage III melanoma: final results of EORTC 18991, a randomised phase III trial. *Lancet* 2008; **372**(9633): 117-26.
88. Kirkwood JM, Ibrahim JG, Sondak VK, et al. High- and low-dose interferon alfa-2b in high-risk melanoma: first analysis of intergroup trial E1690/S9111/C9190. *J Clin Oncol* 2000; **18**(12): 2444-58.
89. Mohr P, Hauschild A, Trefzer U, et al. Intermittent High-Dose Intravenous Interferon Alfa-2b for Adjuvant Treatment of Stage III Melanoma: Final Analysis of a Randomized Phase III Dermatologic Cooperative Oncology Group Trial. *J Clin Oncol* 2015; **33**(34): 4077-84.
90. Eggermont AM, Chiarion-Sileni V, Grob JJ, et al. Prolonged Survival in Stage III Melanoma with Ipilimumab Adjuvant Therapy. *N Engl J Med* 2016; **375**(19): 1845-55.
91. Tarhini AA, Lee SJ, Hodi FS, et al. Phase III Study of Adjuvant Ipilimumab (3 or 10 mg/kg) Versus High-Dose Interferon Alfa-2b for Resected High-Risk Melanoma: North American Intergroup E1609. *J Clin Oncol* 2020; **38**(6): 567-75.
92. Weber J, Mandala M, Del Vecchio M, et al. Adjuvant Nivolumab versus Ipilimumab in Resected Stage III or IV Melanoma. *N Engl J Med* 2017; **377**(19): 1824-35.
93. Eggermont AMM, Blank CU, Mandala M, et al. Adjuvant Pembrolizumab versus Placebo in Resected Stage III Melanoma. *N Engl J Med* 2018; **378**(19): 1789-801.
94. Long GV, Hauschild A, Santinami M, et al. Adjuvant Dabrafenib plus Trametinib in Stage III BRAF-Mutated Melanoma. *N Engl J Med* 2017; **377**(19): 1813-23.
95. Andtbacka RH, Kaufman HL, Collichio F, et al. Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma. *J Clin Oncol* 2015; **33**(25): 2780-8.
96. Coffin R. Interview with Robert Coffin, inventor of T-VEC: the first oncolytic immunotherapy approved for the treatment of cancer. *Immunotherapy* 2016; **8**(2): 103-6.
97. Kaufman HL, Ruby CE, Hughes T, Slingluff CL, Jr. Current status of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the immunotherapy of melanoma. *J Immunother Cancer* 2014; **2**: 11.

98. Kaufman HL, Bines SD. OPTIM trial: a Phase III trial of an oncolytic herpes virus encoding GM-CSF for unresectable stage III or IV melanoma. *Future Oncol* 2010; **6**(6): 941-9.
99. Kaufman HL, Amatruda T, Reid T, et al. Systemic versus local responses in melanoma patients treated with talimogene laherparepvec from a multi-institutional phase II study. *J Immunother Cancer* 2016; **4**: 12.
100. Ugurel S, Rohmel J, Ascierto PA, et al. Survival of patients with advanced metastatic melanoma: the impact of novel therapies-update 2017. *Eur J Cancer* 2017; **83**: 247-57.
101. Heinzerling L, Hartmann A, Hund M. Medikamentöse Tumorthherapie in der Dermatologie. Berlin: Springer-Verlag GmbH; 2019.
102. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2012; **12**(4): 252-64.
103. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 2000; **192**(7): 1027-34.
104. Sharma P, Allison JP. The future of immune checkpoint therapy. *Science* 2015; **348**(6230): 56-61.
105. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Curr Opin Immunol* 2012; **24**(2): 207-12.
106. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010; **363**(8): 711-23.
107. Robert C, Long GV, Brady B, et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med* 2015; **372**(4): 320-30.
108. Robert C, Schachter J, Long GV, et al. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med* 2015; **372**(26): 2521-32.
109. Hodi FS, Chesney J, Pavlick AC, et al. Combined nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab alone in patients with advanced melanoma: 2-year overall survival outcomes in a multicentre, randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2016; **17**(11): 1558-68.
110. Callahan MK, Kluger H, Postow MA, et al. Nivolumab Plus Ipilimumab in Patients With Advanced Melanoma: Updated Survival, Response, and Safety Data in a Phase I Dose-Escalation Study. *J Clin Oncol* 2018; **36**(4): 391-8.
111. Addeo A, Rinaldi CR. Treatment with ipilimumab: a case report of complete response in a metastatic malignant melanoma patient. *Case Rep Oncol* 2013; **6**(2): 285-8.
112. Ladwa R, Atkinson V. The cessation of anti-PD-1 antibodies of complete responders in metastatic melanoma. *Melanoma Res* 2017; **27**(2): 168-70.
113. Hauschild A, Grob JJ, Demidov LV, et al. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet* 2012; **380**(9839): 358-65.

114. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* 2011; **364**(26): 2507-16.
115. Robert C, Karaszewska B, Schachter J, et al. Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and trametinib. *N Engl J Med* 2015; **372**(1): 30-9.
116. Long GV, Weber JS, Infante JR, et al. Overall Survival and Durable Responses in Patients With BRAF V600-Mutant Metastatic Melanoma Receiving Dabrafenib Combined With Trametinib. *Journal of Clinical Oncology* 2016; **34**(8): 871-+.
117. Larkin J, Ascierto PA, Dreno B, et al. Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med* 2014; **371**(20): 1867-76.
118. Chapman PB, Robert C, Larkin J, et al. Vemurafenib in patients with BRAFV600 mutation-positive metastatic melanoma: final overall survival results of the randomized BRIM-3 study. *Ann Oncol* 2017; **28**(10): 2581-7.
119. Ascierto PA, Minor D, Ribas A, et al. Phase II trial (BREAK-2) of the BRAF inhibitor dabrafenib (GSK2118436) in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2013; **31**(26): 3205-11.
120. Johnson DB, Flaherty KT, Weber JS, et al. Combined BRAF (Dabrafenib) and MEK inhibition (Trametinib) in patients with BRAFV600-mutant melanoma experiencing progression with single-agent BRAF inhibitor. *J Clin Oncol* 2014; **32**(33): 3697-704.
121. Dummer R, Ascierto PA, Gogas HJ, et al. Encorafenib plus binimetinib versus vemurafenib or encorafenib in patients with BRAF-mutant melanoma (COLUMBUS): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2018; **19**(5): 603-15.
122. Adjei AA, Cohen RB, Franklin W, et al. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the oral, small-molecule mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 inhibitor AZD6244 (ARRY-142886) in patients with advanced cancers. *J Clin Oncol* 2008; **26**(13): 2139-46.
123. Lebbe C, Dutriaux C, Lesimple T, et al. Pimasertib Versus Dacarbazine in Patients With Unresectable NRAS-Mutated Cutaneous Melanoma: Phase II, Randomized, Controlled Trial with Crossover. *Cancers (Basel)* 2020; **12**(7).
124. Falchook GS, Lewis KD, Infante JR, et al. Activity of the oral MEK inhibitor trametinib in patients with advanced melanoma: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet Oncol* 2012; **13**(8): 782-9.
125. Dummer R, Schadendorf D, Ascierto PA, et al. Binimetinib versus dacarbazine in patients with advanced NRAS-mutant melanoma (NEMO): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2017; **18**(4): 435-45.
126. Papke B, Der CJ. Drugging RAS: Know the enemy. *Science* 2017; **355**(6330): 1158-63.
127. Hodi FS, Corless CL, Giobbie-Hurder A, et al. Imatinib for melanomas harboring mutationally activated or amplified KIT arising on mucosal, acral, and chronically sun-damaged skin. *J Clin Oncol* 2013; **31**(26): 3182-90.
128. Carvajal RD, Antonescu CR, Wolchok JD, et al. KIT as a therapeutic target in metastatic melanoma. *JAMA* 2011; **305**(22): 2327-34.

129. Ellerhorst J, Strom E, Nardone E, McCutcheon I. Whole brain irradiation for patients with metastatic melanoma: a review of 87 cases. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001; **49**(1): 93-7.
130. Theurich S, Rothschild SI, Hoffmann M, et al. Local Tumor Treatment in Combination with Systemic Ipilimumab Immunotherapy Prolongs Overall Survival in Patients with Advanced Malignant Melanoma. *Cancer Immunol Res* 2016; **4**(9): 744-54.
131. Engeland CE, Grossardt C, Veinalde R, et al. CTLA-4 and PD-L1 checkpoint blockade enhances oncolytic measles virus therapy. *Mol Ther* 2014; **22**(11): 1949-59.
132. Woller N, Gurlevik E, Fleischmann-Mundt B, et al. Viral Infection of Tumors Overcomes Resistance to PD-1-immunotherapy by Broadening Neoantigenome-directed T-cell Responses. *Mol Ther* 2015; **23**(10): 1630-40.
133. Zamarin D, Wolchok JD. Potentiation of immunomodulatory antibody therapy with oncolytic viruses for treatment of cancer. *Mol Ther Oncolytics* 2014; **1**: 14004.
134. Puzanov I, Milhem MM, Minor D, et al. Talimogene Laherparepvec in Combination With Ipilimumab in Previously Untreated, Unresectable Stage IIIB-IV Melanoma. *J Clin Oncol* 2016; **34**(22): 2619-26.
135. Diab A, Tannir NM, Bentebibel SE, et al. Bempegaldesleukin (NKTR-214) plus Nivolumab in Patients with Advanced Solid Tumors: Phase I Dose-Escalation Study of Safety, Efficacy, and Immune Activation (PIVOT-02). *Cancer Discov* 2020; **10**(8): 1158-73.
136. Pol J, Buque A, Aranda F, et al. Trial Watch-Oncolytic viruses and cancer therapy. *Oncoimmunology* 2016; **5**(2): e1117740.
137. Long G, Dummer R, Johnson D, et al. Long-term analysis of MASTERKEY-265 phase 1b trial of talimogene laherparepvec (T-VEC) plus pembrolizumab in patients with unresectable stage IIIB-IVM1c melanoma (MEL). *Pigment Cell Melanoma Res* 2019; **8**(32): 133-4.
138. Meier F, Schitteck B, Busch S, et al. The RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT signaling pathways present molecular targets for the effective treatment of advanced melanoma. *Front Biosci* 2005; **10**: 2986-3001.
139. Satyamoorthy K, Muyrers J, Meier F, Patel D, Herlyn M. Mel-CAM-specific genetic suppressor elements inhibit melanoma growth and invasion through loss of gap junctional communication. *Oncogene* 2001; **20**(34): 4676-84.
140. Gallagher SJ, Thompson JF, Indsto J, et al. p16INK4a expression and absence of activated B-RAF are independent predictors of chemosensitivity in melanoma tumors. *Neoplasia* 2008; **10**(11): 1231-9.
141. Lim SY, Menzies AM, Rizos H. Mechanisms and Strategies to Overcome Resistance to Molecularly Targeted Therapy for Melanoma. *Cancer* 2017; **123**: 2118-29.
142. Dumaz N, Jouenne F, Delyon J, Mourah S, Bensussan A, Lebbe C. Atypical BRAF and NRAS Mutations in Mucosal Melanoma. *Cancers (Basel)* 2019; **11**(8).
143. Posch C, Vujic I, Monshi B, et al. Searching for the Chokehold of NRAS Mutant Melanoma. *J Invest Dermatol* 2016; **136**(7): 1330-6.

144. Fecher LA, Amaravadi RK, Flaherty KT. The MAPK pathway in melanoma. *Curr Opin Oncol* 2008; **20**(2): 183-9.
145. Held L, Eigentler TK, Meier F, et al. Oncogenetics of melanoma: basis for molecular diagnostics and therapy. *J Dtsch Dermatol Ges* 2011; **9**(7): 510-6.
146. Chen Z, Gibson TB, Robinson F, et al. MAP kinases. *Chem Rev* 2001; **101**(8): 2449-76.
147. Geyer M, Wittinghofer A. GEFs, GAPs, GDIs and effectors: taking a closer (3D) look at the regulation of Ras-related GTP-binding proteins. *Curr Opin Struct Biol* 1997; **7**(6): 786-92.
148. Johnson CW, Reid D, Parker JA, et al. The small GTPases K-Ras, N-Ras, and H-Ras have distinct biochemical properties determined by allosteric effects. *J Biol Chem* 2017; **292**(31): 12981-93.
149. Avruch J, Khokhlatchev A, Kyriakis JM, et al. Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Recent Prog Horm Res* 2001; **56**: 127-55.
150. Parker JA, Mattos C. The Ras-Membrane Interface: Isoform-specific Differences in The Catalytic Domain. *Mol Cancer Res* 2015; **13**(4): 595-603.
151. Marshall CJ. Small GTPases and cell cycle regulation. *Biochem Soc Trans* 1999; **27**(4): 363-70.
152. Shin SY, Rath O, Choo SM, et al. Positive- and negative-feedback regulations coordinate the dynamic behavior of the Ras-Raf-MEK-ERK signal transduction pathway. *J Cell Sci* 2009; **122**(Pt 3): 425-35.
153. Takacs T, Kudlik G, Kurilla A, Szeder B, Buday L, Vas V. The effects of mutant Ras proteins on the cell signalome. *Cancer Metastasis Rev* 2020; **39**(4): 1051-65.
154. LoPiccolo J, Blumenthal GM, Bernstein WB, Dennis PA. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations. *Drug Resist Updat* 2008; **11**(1-2): 32-50.
155. Curtin JA, Stark MS, Pinkel D, Hayward NK, Bastian BC. PI3-kinase subunits are infrequent somatic targets in melanoma. *J Invest Dermatol* 2006; **126**(7): 1660-3.
156. Marshall CJ, Hall A, Weiss RA. A transforming gene present in human sarcoma cell lines. *Nature* 1982; **299**(5879): 171-3.
157. Parada LF, Tabin CJ, Shih C, Weinberg RA. Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene. *Nature* 1982; **297**(5866): 474-8.
158. Konstantinopoulos PA, Karamouzis MV, Papavassiliou AG. Post-translational modifications and regulation of the RAS superfamily of GTPases as anticancer targets. *Nat Rev Drug Discov* 2007; **6**(7): 541-55.
159. Hobbs GA, Der CJ, Rossman KL. RAS isoforms and mutations in cancer at a glance. *J Cell Sci* 2016; **129**(7): 1287-92.
160. Baines AT, Xu D, Der CJ. Inhibition of Ras for cancer treatment: the search continues. *Future Med Chem* 2011; **3**(14): 1787-808.

161. Thomas NE, Edmiston SN, Alexander A, et al. Association Between NRAS and BRAF Mutational Status and Melanoma-Specific Survival Among Patients With Higher-Risk Primary Melanoma. *JAMA Oncol* 2015; **1**(3): 359-68.
162. Ellerhorst JA, Greene VR, Ekmekcioglu S, et al. Clinical correlates of NRAS and BRAF mutations in primary human melanoma. *Clin Cancer Res* 2011; **17**(2): 229-35.
163. Ekedahl H, Cirenajwis H, Harbst K, et al. The clinical significance of BRAF and NRAS mutations in a clinic-based metastatic melanoma cohort. *Br J Dermatol* 2013; **169**(5): 1049-55.
164. Edlundh-Rose E, Egyhazi S, Omholt K, et al. NRAS and BRAF mutations in melanoma tumours in relation to clinical characteristics: a study based on mutation screening by pyrosequencing. *Melanoma Res* 2006; **16**(6): 471-8.
165. Kim K, Kuo T, Cai J, Shuja S, Murnane MJ. N-ras protein: frequent quantitative and qualitative changes occur in human colorectal carcinomas. *Int J Cancer* 1997; **71**(5): 767-75.
166. Posch C, Sanlorenzo M, Vujic I, et al. Phosphoproteomic Analyses of NRAS(G12) and NRAS(Q61) Mutant Melanocytes Reveal Increased CK2alpha Kinase Levels in NRAS(Q61) Mutant Cells. *J Invest Dermatol* 2016; **136**(10): 2041-8.
167. Engin HB, Carlin D, Pratt D, Carter H. Modeling of RAS complexes supports roles in cancer for less studied partners. *BMC Biophys* 2017; **10**(Suppl 1): 5.
168. Castiglione R, Ihle MA, Heydt C, et al. The impact of sequencing on diagnosis and treatment of malignant melanoma. *Expert Rev Mol Diagn* 2016; **16**(4): 423-33.
169. Zheng G, Tseng LH, Chen G, et al. Clinical detection and categorization of uncommon and concomitant mutations involving BRAF. *BMC Cancer* 2015; **15**: 779.
170. Flaherty KT, Robert C, Hersey P, et al. Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med* 2012; **367**(2): 107-14.
171. Houben R, Becker JC, Kappel A, et al. Constitutive activation of the Ras-Raf signaling pathway in metastatic melanoma is associated with poor prognosis. *J Carcinog* 2004; **3**: 6.
172. Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 2004; **116**(6): 855-67.
173. Carrera C, Puig-Butille JA, Tell-Marti G, et al. Multiple BRAF Wild-Type Melanomas During Dabrafenib Treatment for Metastatic BRAF-Mutant Melanoma. *JAMA Dermatol* 2015; **151**(5): 544-8.
174. Heinrich MC, Owzar K, Corless CL, et al. Correlation of kinase genotype and clinical outcome in the North American Intergroup Phase III Trial of imatinib mesylate for treatment of advanced gastrointestinal stromal tumor: CALGB 150105 Study by Cancer and Leukemia Group B and Southwest Oncology Group. *J Clin Oncol* 2008; **26**(33): 5360-7.
175. Yao Z, Yaeger R, Rodrik-Outmezguine VS, et al. Tumours with class 3 BRAF mutants are sensitive to the inhibition of activated RAS. *Nature* 2017; **548**(7666): 234-8.

176. Parry D, Peters G. Temperature-sensitive mutants of p16CDKN2 associated with familial melanoma. *Mol Cell Biol* 1996; **16**(7): 3844-52.
177. Mondesir J, Willekens C, Touat M, de Botton S. IDH1 and IDH2 mutations as novel therapeutic targets: current perspectives. *J Blood Med* 2016; **7**: 171-80.
178. Lee CS, Bhaduri A, Mah A, et al. Recurrent point mutations in the kinetochore gene KNSTRN in cutaneous squamous cell carcinoma. *Nat Genet* 2014; **46**(10): 1060-2.
179. Rodriguez-Escudero I, Oliver MD, Andres-Pons A, Molina M, Cid VJ, Pulido R. A comprehensive functional analysis of PTEN mutations: implications in tumor- and autism-related syndromes. *Hum Mol Genet* 2011; **20**(21): 4132-42.
180. Kakudo Y, Shibata H, Otsuka K, Kato S, Ishioka C. Lack of correlation between p53-dependent transcriptional activity and the ability to induce apoptosis among 179 mutant p53s. *Cancer Res* 2005; **65**(6): 2108-14.
181. Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; **2**(1): a001008.
182. Pan Y, Haines DS. Identification of a tumor-derived p53 mutant with novel transactivating selectivity. *Oncogene* 2000; **19**(27): 3095-100.
183. Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich NP. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* 1994; **265**(5170): 346-55.
184. Menendez D, Inga A, Resnick MA. The biological impact of the human master regulator p53 can be altered by mutations that change the spectrum and expression of its target genes. *Mol Cell Biol* 2006; **26**(6): 2297-308.
185. Zehir A, Benayed R, Shah RH, et al. Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. *Nat Med* 2017; **23**(6): 703-13.
186. Zehir A, Benayed R, Shah RH, et al. Erratum: Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. *Nat Med* 2017; **23**(8): 1004.
187. Nazeer FI, Devany E, Mohammed S, et al. p53 inhibits mRNA 3' processing through its interaction with the CstF/BARD1 complex. *Oncogene* 2011; **30**(27): 3073-83.
188. Baroni TE, Wang T, Qian H, et al. A global suppressor motif for p53 cancer mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; **101**(14): 4930-5.
189. Misale S, Yaeger R, Hobor S, et al. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature* 2012; **486**(7404): 532-6.
190. Ostrem JM, Peters U, Sos ML, Wells JA, Shokat KM. K-Ras(G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions. *Nature* 2013; **503**(7477): 548-51.
191. Gassenmaier M, Keim U, Leiter U, et al. Age as key factor for pattern, timing, and extent of distant metastasis in patients with cutaneous melanoma: A study of the German Central Malignant Melanoma Registry. *J Am Acad Dermatol* 2019; **80**(5): 1299-307 e7.
192. Lyth J, Falk M, Maroti M, Eriksson H, Ingvar C. Prognostic risk factors of first recurrence in patients with primary stages I-II cutaneous malignant melanoma - from the population-

- based Swedish melanoma register. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2017; **31**(9): 1468-74.
193. Devitt B, Liu W, Salemi R, et al. Clinical outcome and pathological features associated with NRAS mutation in cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 2011; **24**(4): 666-72.
 194. Goel VK, Lazar AJ, Warneke CL, Redston MS, Haluska FG. Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol* 2006; **126**(1): 154-60.
 195. Jakob JA, Bassett RL, Jr., Ng CS, et al. NRAS mutation status is an independent prognostic factor in metastatic melanoma. *Cancer* 2012; **118**(16): 4014-23.
 196. Carlino MS, Haydu LE, Kakavand H, et al. Correlation of BRAF and NRAS mutation status with outcome, site of distant metastasis and response to chemotherapy in metastatic melanoma. *Br J Cancer* 2014; **111**(2): 292-9.
 197. Cancer Genome Atlas N. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell* 2015; **161**(7): 1681-96.
 198. Guida M, Bartolomeo N, Quaglino P, et al. No Impact of NRAS Mutation on Features of Primary and Metastatic Melanoma or on Outcomes of Checkpoint Inhibitor Immunotherapy: An Italian Melanoma Intergroup (IMI) Study. *Cancers (Basel)* 2021; **13**(3).
 199. Ilie M, Long-Mira E, Funck-Brentano E, et al. Immunohistochemistry as a potential tool for routine detection of the NRAS Q61R mutation in patients with metastatic melanoma. *J Am Acad Dermatol* 2015; **72**(5): 786-93.
 200. Heppt MV, Siepmann T, Engel J, et al. Prognostic significance of BRAF and NRAS mutations in melanoma: a German study from routine care. *BMC Cancer* 2017; **17**(1): 536.
 201. Wu SW, Kuo H, Li WQ, Canales AL, Han JL, Qureshi AA. Association between BRAF (V600E) and NRAS (Q61R) mutations and clinicopathologic characteristics, risk factors and clinical outcome of primary invasive cutaneous melanoma. *Cancer Cause Control* 2014; **25**(10): 1379-86.
 202. Breitbart EW, Waldmann A, Nolte S, et al. Systematic skin cancer screening in Northern Germany. *J Am Acad Dermatol* 2012; **66**(2): 201-11.
 203. Uhara H, Ashida A, Koga H, et al. NRAS mutations in primary and metastatic melanomas of Japanese patients. *Int J Clin Oncol* 2014; **19**(3): 544-8.
 204. Gassenmaier M, Stec T, Keim U, et al. Incidence and characteristics of thick second primary melanomas: a study of the German Central Malignant Melanoma Registry. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2019; **33**(1): 63-70.
 205. Robsahm TE, Helsing P, Nilssen Y, et al. High mortality due to cutaneous melanoma in Norway: a study of prognostic factors in a nationwide cancer registry. *Clin Epidemiol* 2018; **10**: 537-48.
 206. Pracht M, Mogha A, Lespagnol A, et al. Prognostic and predictive values of oncogenic BRAF, NRAS, c-KIT and MITF in cutaneous and mucous melanoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2015; **29**(8): 1530-8.

207. Rinonce HT, Sastri DJ, Trisnawati F, Kameswari B, Ferronika P, Irianiwati. The frequency and clinicopathological significance of NRAS mutations in primary cutaneous nodular melanoma in Indonesia. *Cancer Rep (Hoboken)* 2021; e1454.
208. Lee JH, Choi JW, Kim YS. Frequencies of BRAF and NRAS mutations are different in histological types and sites of origin of cutaneous melanoma: a meta-analysis. *Br J Dermatol* 2011; **164**(4): 776-84.
209. Bae JM, Choi YY, Kim DS, et al. Metastatic melanomas of unknown primary show better prognosis than those of known primary: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *J Am Acad Dermatol* 2015; **72**(1): 59-70.
210. Jiveskog S, Ragnarsson-Olding B, Platz A, Ringborg U. N-ras mutations are common in melanomas from sun-exposed skin of humans but rare in mucosal membranes or unexposed skin. *J Invest Dermatol* 1998; **111**(5): 757-61.
211. Wong CW, Fan YS, Chan TL, et al. BRAF and NRAS mutations are uncommon in melanomas arising in diverse internal organs. *J Clin Pathol* 2005; **58**(6): 640-4.
212. Si L, Kong Y, Xu X, et al. Prevalence of BRAF V600E mutation in Chinese melanoma patients: large scale analysis of BRAF and NRAS mutations in a 432-case cohort. *Eur J Cancer* 2012; **48**(1): 94-100.
213. Adler NR, Wolfe R, Kelly JW, et al. Tumour mutation status and sites of metastasis in patients with cutaneous melanoma. *Br J Cancer* 2017; **117**(7): 1026-35.
214. Shoushtari AN, Chatila WK, Arora A, et al. Therapeutic Implications of Detecting MAP Kinase Activating Alterations in Cutaneous and Unknown Primary Melanomas. *Clin Cancer Res* 2021.
215. Omholt K, Karsberg S, Platz A, Kanter L, Ringborg U, Hansson J. Screening of N-ras codon 61 mutations in paired primary and metastatic cutaneous melanomas: mutations occur early and persist throughout tumor progression. *Clin Cancer Res* 2002; **8**(11): 3468-74.
216. Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, et al. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol* 2001; **19**(16): 3622-34.
217. Kashani-Sabet M, Sagebiel RW, Ferreira CM, Nosrati M, Miller JR, 3rd. Tumor vascularity in the prognostic assessment of primary cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2002; **20**(7): 1826-31.
218. Liskay G, Matrai Z, Czirbesz K, Jani N, Bencze E, Kenessey I. Predictive and Prognostic Value of BRAF and NRAS Mutation of 159 Sentinel Lymph Node Cases in Melanoma-A Retrospective Single-Institute Study. *Cancers (Basel)* 2021; **13**(13).
219. Grill C, Larue L. NRAS, NRAS, Which Mutation Is Fairest of Them All? *J Invest Dermatol* 2016; **136**(10): 1936-8.
220. Nagore E, Requena C, Traves V, et al. Prognostic value of BRAF mutations in localized cutaneous melanoma. *J Am Acad Dermatol* 2014; **70**(5): 858-62 e1-2.
221. The Cancer Genome Atlas Research Network (TCGA). NRAS mutant alleles in skin cutaneous melanoma (N=371) 2017. Rockville (MD): National Cancer Institute at the

National Institutes of Health. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.044> (Zuletzt abgerufen am 07.03.2021).

222. Kunz M. Aktuelle molekulare Diagnostik beim malignen Melanom. *Akt Dermatol* 2017; **2017:43**: 46-59.
223. Bloethner S, Chen B, Hemminki K, et al. Effect of common B-RAF and N-RAS mutations on global gene expression in melanoma cell lines. *Carcinogenesis* 2005; **26(7)**: 1224-32.
224. Mandala M, Merelli B, Massi D. Nras in melanoma: targeting the undruggable target. *Crit Rev Oncol Hematol* 2014; **92(2)**: 107-22.
225. Akslen LA, Angelini S, Straume O, et al. BRAF and NRAS mutations are frequent in nodular melanoma but are not associated with tumor cell proliferation or patient survival. *J Invest Dermatol* 2005; **125(2)**: 312-7.
226. Chiappetta C, Proietti I, Soccodato V, et al. BRAF and NRAS mutations are heterogeneous and not mutually exclusive in nodular melanoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2015; **23(3)**: 172-7.
227. Uguen A, Gueguen P, Legoupil D, et al. Dual NRASQ61R and BRAFV600E mutation-specific immunohistochemistry completes molecular screening in melanoma samples in a routine practice. *Hum Pathol* 2015; **46(11)**: 1582-91.
228. Sensi M, Nicolini G, Petti C, et al. Mutually exclusive NRASQ61R and BRAFV600E mutations at the single-cell level in the same human melanoma. *Oncogene* 2006; **25(24)**: 3357-64.
229. Shackelford R, Pollen M, Vora M, Jusion TT, Cotelingam J, Nair B. Malignant Melanoma with Concurrent BRAF E586K and NRAS Q81K Mutations. *Case Rep Oncol* 2014; **7(2)**: 297-300.
230. Sperduto PW, Jiang W, Brown PD, et al. The Prognostic Value of BRAF, C-KIT, and NRAS Mutations in Melanoma Patients With Brain Metastases. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2017; **98(5)**: 1069-77.
231. Raaijmakers MI, Widmer DS, Narechania A, et al. Co-existence of BRAF and NRAS driver mutations in the same melanoma cells results in heterogeneity of targeted therapy resistance. *Oncotarget* 2016; **7(47)**: 77163-74.
232. Pellegrini C, Cardelli L, Padova M, et al. Intra-patient Heterogeneity of BRAF and NRAS Molecular Alterations in Primary Melanoma and Metastases. *Acta Derm Venereol* 2020; **100(1)**: adv00040.
233. Rizos H, Menzies AM, Pupo GM, et al. BRAF inhibitor resistance mechanisms in metastatic melanoma: spectrum and clinical impact. *Clin Cancer Res* 2014; **20(7)**: 1965-77.
234. Sheen YS, Liao YH, Liao JY, et al. Prevalence of BRAF and NRAS mutations in cutaneous melanoma patients in Taiwan. *J Formos Med Assoc* 2016; **115(2)**: 121-7.
235. Thumar J, Shahbazian D, Aziz SA, Jilaveanu LB, Kluger HM. MEK targeting in N-RAS mutated metastatic melanoma. *Mol Cancer* 2014; **13**: 45.

236. Bucheit AD, Syklawer E, Jakob JA, et al. Clinical characteristics and outcomes with specific BRAF and NRAS mutations in patients with metastatic melanoma. *Cancer* 2013; **119**(21): 3821-9.
237. Murphy BM, Weiss TJ, Holderbaum AM, et al. Functional differences drive the selection of NRAS mutants in melanoma. *bioRxiv* 2021. <https://doi.org/10.1101/2021.01.15.426808>. (Zuletzt abgerufen am 23.02.2021).
238. Davies MA, Liu P, McIntyre S, et al. Prognostic factors for survival in melanoma patients with brain metastases. *Cancer* 2011; **117**(8): 1687-96.
239. Fang P, Boehling NS, Koay EJ, et al. Melanoma brain metastases harboring BRAF (V600K) or NRAS mutations are associated with an increased local failure rate following conventional therapy. *J Neurooncol* 2018; **137**(1): 67-75.
240. Rabbie R, Ferguson P, Wong K, et al. The mutational landscape of melanoma brain metastases presenting as the first visceral site of recurrence. *Br J Cancer* 2021; **124**(1): 156-60.
241. Raizer JJ, Hwu WJ, Panageas KS, et al. Brain and leptomeningeal metastases from cutaneous melanoma: survival outcomes based on clinical features. *Neuro Oncol* 2008; **10**(2): 199-207.
242. Ascierto PA, Agarwala SS, Botti G, et al. Perspectives in melanoma: meeting report from the Melanoma Bridge (November 29th-1 December 1st, 2018, Naples, Italy). *J Transl Med* 2019; **17**(1): 234.
243. Kirchberger MC, Ugurel S, Mangana J, et al. MEK inhibition may increase survival of NRAS-mutated melanoma patients treated with checkpoint blockade: Results of a retrospective multicentre analysis of 364 patients. *Eur J Cancer* 2018; **98**: 10-6.
244. In GK, Poorman K, Saul M, et al. Molecular profiling of melanoma brain metastases compared to primary cutaneous melanoma and to extracranial metastases. *Oncotarget* 2020; **11**(33): 3118-28.
245. Daud A, Bastian BC. Beyond BRAF in melanoma. *Curr Top Microbiol Immunol* 2012; **355**: 99-117.
246. Johnson DB, Puzanov I. Treatment of NRAS-mutant melanoma. *Curr Treat Options Oncol* 2015; **16**(4): 15.
247. Weber JS, D'Angelo SP, Minor D, et al. Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2015; **16**(4): 375-84.
248. Ribas A, Puzanov I, Dummer R, et al. Pembrolizumab versus investigator-choice chemotherapy for ipilimumab-refractory melanoma (KEYNOTE-002): a randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2015; **16**(8): 908-18.
249. Cybulska-Stopa B, Piejko K, Pacholczak R, et al. Real-world treatment practice in patients with advanced melanoma. *Contemp Oncol (Pozn)* 2020; **24**(2): 118-24.
250. Kirkwood JM, Bastholt L, Robert C, et al. Phase II, open-label, randomized trial of the MEK1/2 inhibitor selumetinib as monotherapy versus temozolomide in patients with advanced melanoma. *Clin Cancer Res* 2012; **18**(2): 555-67.

251. Johnson DB, Lovly CM, Flavin M, et al. Impact of NRAS mutations for patients with advanced melanoma treated with immune therapies. *Cancer Immunol Res* 2015; **3**(3): 288-95.
252. Not OJv, Eertwegh AJMvd, Haanen JBAG, et al. BRAF and NRAS mutation status and response to checkpoint inhibition in advanced melanoma. *Journal of Clinical Oncology* 2021; **39**(15_suppl): 9558-.
253. Rose AAN, Armstrong SM, Hogg D, et al. Biologic subtypes of melanoma predict survival benefit of combination anti-PD1+anti-CTLA4 immune checkpoint inhibitors versus anti-PD1 monotherapy. *J Immunother Cancer* 2021; **9**(1).
254. Wilson T, Taylor H, Winter H, Herbert C. Sequential immunotherapy in melanoma: is it a realistic alternative to dual immunotherapy? *Melanoma Res* 2021; **31**(4): 366-70.
255. Zimmer L, Apuri S, Eroglu Z, et al. Ipilimumab alone or in combination with nivolumab after progression on anti-PD-1 therapy in advanced melanoma. *Eur J Cancer* 2017; **75**: 47-55.
256. Echevarria-Vargas IM, Reyes-Uribe PI, Guterres AN, et al. Co-targeting BET and MEK as salvage therapy for MAPK and checkpoint inhibitor-resistant melanoma. *EMBO Mol Med* 2018; **10**(5).
257. Atefi M, Titz B, Avramis E, et al. Combination of pan-RAF and MEK inhibitors in NRAS mutant melanoma. *Mol Cancer* 2015; **14**: 27.
258. Schuler MH, Ascierto PA, Vos FYFLD, et al. Phase 1b/2 trial of ribociclib+binimetinib in metastatic NRAS-mutant melanoma: Safety, efficacy, and recommended phase 2 dose (RP2D). *Journal of Clinical Oncology* 2017; **35**(15_suppl): 9519-.
259. Omholt K, Platz A, Kanter L, Ringborg U, Hansson J. NRAS and BRAF mutations arise early during melanoma pathogenesis and are preserved throughout tumor progression. *Clin Cancer Res* 2003; **9**(17): 6483-8.
260. Ugurel S, Thirumaran RK, Bloethner S, et al. B-RAF and N-RAS mutations are preserved during short time in vitro propagation and differentially impact prognosis. *PLoS One* 2007; **2**(2): e236.
261. Ulivieri A, Cardillo G, Manente L, et al. Molecular characterization of a selected cohort of patients affected by pulmonary metastases of malignant melanoma: Hints from BRAF, NRAS and EGFR evaluation. *Oncotarget* 2015; **6**(23): 19868-79.
262. Tawbi HA, Forsyth PA, Algazi A, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab in Melanoma Metastatic to the Brain. *N Engl J Med* 2018; **379**(8): 722-30.
263. Deng W, Wang Y, Liu X, et al. Assessment of Trends in Second Primary Cancers in Patients With Metastatic Melanoma From 2005 to 2016. *JAMA Netw Open* 2020; **3**(12): e2028627.
264. Traynor P, McGlynn LM, Mukherjee R, Grimsley SJ, Bartlett JM, Edwards J. An increase in N-Ras expression is associated with development of hormone refractory prostate cancer in a subset of patients. *Dis Markers* 2008; **24**(3): 157-65.
265. Gutierrez ME, Price KS, Lanman RB, et al. Genomic Profiling for KRAS, NRAS, BRAF, Microsatellite Instability, and Mismatch Repair Deficiency Among Patients With Metastatic Colon Cancer. *JCO Precis Oncol* 2019; **3**.

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorentitäten an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2014 (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs) (Abbildung und Legende aus ¹⁵).	20
Abbildung 2:	Altersspezifische Erkrankungsrate nach Geschlecht, ICD-10 C43, Deutschland 2013-2014, je 100.000 (Abbildung und Legende aus ¹⁵).	21
Abbildung 3:	Absolute Zahl der Neuerkrankungs- und Sterbefälle, nach Geschlecht, ICD-10 C43, Deutschland 1999 – 2014/2015 (Abbildung und Legende aus ¹⁵).	22
Abbildung 4:	Altersstandardisierte Erkrankungs- und Sterberaten, nach Geschlecht, ICD-10 C43, Deutschland 1999 – 2014/2015, je 100.000 (Europastandard) (Abbildung und Legende aus ¹⁵).	22
Abbildung 5:	Die RAS/RAF/MEK/ERK– und PI3K/AKT/mTOR– Signalkaskadewege, Abbildung modifiziert nach Cheng, Y. ⁷³ und Dumaz, N. ¹⁴²	41
Abbildung 6:	Schematische Darstellung des inaktivem NRAS/GDP- und aktivem NRAS/GTP-Status bei NRAS-Wildtyp (a) und mutiertem NRAS-Molekül (b). Abbildung modifiziert nach Posch, C. ¹⁴³	44
Abbildung 7:	Darstellung des RAS-Moleküls mit Lokalisation der häufigen, onkogenen Mutationsloci an G12, G13, A59 und Q61. Darstellung der Effektorregion in orange, der allosterischen Region in blau, der switch-Regionen in rot und der c-terminalen, hypervariablen in grün (Abbildung aus ¹⁶⁷).	45
Abbildung 8:	Anzahl der Erstdiagnosen NRAS-positiver Melanompatienten bezogen auf die Jahre 1991 bis 2019.	50
Abbildung 9:	Geschlechterverteilung der Gesamtkohorte. Von 324 Patienten sind 119 Frauen und 205 Männer, dies entspricht einer signifikanten Häufung des männlichen Geschlechts mit 63%.	51
Abbildung 10:	Alter bei Erstdiagnose. Verteilung nach Altersklassen (in 10-Jahresabständen) zum Zeitpunkt der Erstdiagnose in Abhängigkeit des Geschlechts. Die insgesamt 324 Patienten verteilen sich auf 119 Frauen und 205 Männer.	52
Abbildung 11:	Lokalisation der Primärtumoren nach histologischem Subtyp in Prozent. Aufgrund von Rundungen entsprechen die Gesamtsummen nicht bei allen Subtypen 100%.	53
Abbildung 12:	Verteilung der histologischen Subtypen am Gesamtkollektiv (n=324): SSM=superfiziell spreitendes Melanom, NMM=noduläres malignes Melanom, ALM=Akral-lentiginöses Melanom, LMM=Lentigo-maligna Melanom, amelanot.MM=amelanotisches Melanom, Schleimhaut=Schleimhautmelanom, Bindehaut =Bindehautmelanom, PTU=unbekannter Primarius, nicht klassifizierbar=nicht klassifizierbares malignes Melanom.	55
Abbildung 13:	Häufigkeitsverteilung des histopathologischen Sekundärmerkmals „nodulär“ nach histologischem Subtyp: SSM=superfiziell spreitendes Melanom, ALM=Akral-lentiginöses Melanom, LMM=Lentigo-maligna Melanom, amelanot. MM=amelanotisches Melanom.	56

Abbildung 14:	Balkendiagramm zur Verteilung der Tumore entsprechend der Tumordicke nach Breslow (n=269) in Stadien T1 – T4.	58
Abbildung 15:	Boxplot-Darstellung der Tumordicke nach histologischem Subtyp. Zur übersichtlicheren Darstellung wurde die Abszisse logarithmiert. SSM=superfiziell spreitendes Melanom, NMM=noduläres malignes Melanom, ALM=Akral-lentiginöses Melanom, LMM=Lentigo-maligna Melanom, amelanot. MM=amelanotisches Melanom, nicht klassifizierbar=nicht klassifizierbares malignes Melanom.	59
Abbildung 16:	Boxplot-Darstellung der Altersverteilung (in Jahren) nach histologischem Subtyp. SSM=superfiziell spreitendes Melanom, NMM=noduläres malignes Melanom, ALM=Akral-lentiginöses Melanom, LMM=Lentigo-maligna Melanom, amelanot. MM=amelanotisches Melanom, Schleimhaut=Schleimhautmelanom, Bindehaut= Bindehautmelanom, PTU=unbekannter Primarius, nicht klassifizierbar=nicht klassifizierbares malignes Melanom.	60
Abbildung 17:	Ulzerationsstatus des Primärtumors, dargestellt als Tortendiagramm.	62
Abbildung 18:	Dichotome Darstellung des Wächterlymphknoten-Status, dargestellt als Tortendiagramm.	63
Abbildung 19:	Balkendiagramm zur Darstellung der Stratifizierung von Lymphknotenmetastasen in Mikro- und Makrometastasen, gruppiert nach Anzahl der Metastasen pro Fall.	65
Abbildung 20:	Streudiagramm zur Darstellung der Erstvorstellung im Hauttumorzentrum nach Patientenummer und Monat.	65
Abbildung 21:	Graphische Gegenüberstellung der AJCC-Stadien bei Erstdiagnose („initial“) und am Ende der Datenerhebung („cut-off“). Inoper.=inoperabel.	67
Abbildung 22:	Häufigkeitsverteilung nachgewiesener NRAS – Mutationen nach molekularpathologischem Subtyp.	69
Abbildung 23:	Verteilung der vier häufigsten NRAS – Genotypen Q61H, Q61K, Q61L und Q61R nach Geschlecht.	75
Abbildung 24:	Gepoolte Metastasierung in Abhängigkeit von Zeit (Monaten) und Lokalisation (lokoregional, M1A-M1D), dargestellt in Boxplots.	77
Abbildung 25:	Streudiagramm zur Darstellung des Auftretens der Erstmetastasierung nach Zeit (Monate) von Patienten mit positivem Wächterlymphknoten.	78
Abbildung 26:	Häufigkeitsverteilung der Erstmetastasierung nach Lokalisation (lokoregional, M1A-M1D) von Patienten mit positivem Wächterlymphknoten (SLN).	79
Abbildung 27:	Hierarchiediagramme der Primärmetastasierung nach den Mutationsgenotypen NRAS Q61H, NRAS Q61K, NRAS Q61L und NRAS Q61R. lokoreg. = lokoregional.	80
Abbildung 28:	Tortendiagramme zur Darstellung der Entwicklung von Hirnmetastasen nach Genotyp. Zentral dargestellt sind diejenigen Patienten, welche primär eine Hirnmetastasierung erlitten haben sowie die unmittelbare Metastasierungsstufe vor Entwicklung cerebraler Metastasen. Sofern mehr als eine Metastasierungsstufe zur Entwicklung von Hirnmetastasen geführt hat, wurde dies durch eine primäre bis quartäre Entwicklungsstufe kenntlich gemacht. Lokoreg.=lokoregional.	82
Abbildung 29:	Melanom-spezifisches Überleben nach 5 Jahren, sortiert nach NRAS – Genotyp, dargestellt in Kaplan-Meier-Kurven.	84
Abbildung 30:	Melanom-spezifisches Überleben nach 10 Jahren, sortiert nach NRAS – Genotyp, dargestellt in Kaplan-Meier-Kurven.	85

- Abbildung 31:** Die Kaplan-Meier-Kurven A und B stellen das progressionsfreie Überleben nach Chemotherapie, Immuntherapie und zielgerichteter Therapie entsprechend den Therapielinien 1 und 2 dar. Zur besseren Visualisierung wurde die Abszisse in Abbildung B logarithmiert.**89**
- Abbildung 32:** Die Kaplan-Meier-Kurven A und B stellen das progressionsfreie Überleben entsprechend den Immuntherapien (CTLA-4 AK, CTLA-4 AK/PD-1AK, PD1-AK) in den Therapielinien 1 und 2 dar. Zur besseren Visualisierung wurde die Abszisse in Abbildung B logarithmiert.**91**
- Abbildung 33:** Boxplot-Darstellung von Therapieansprechen und Therapiedauer unter Checkpoint-inhibition (CTLA-4 AK, CTLA-4 AK/PD-1AK, PD1-AK). (A) Therapielinie 1, (B) Therapielinie 2. Zur besseren Visualisierung wurden die Ordinaten in A und B logarithmiert.**93**

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Klinische Kriterien zur Diagnose des Melanoms, modifiziert nach Kerl, H. ⁴⁶	24
Tabelle 2:	ABCDE – Regel bei malignem Melanom, modifiziert nach Czeschik, JC. ⁴⁷	25
Tabelle 3:	Histologische Subtypen kutaner Melanome, modifiziert nach Garbe, C. ¹⁷	25
Tabelle 4:	T-Stadium der TNM-Klassifikation maligner Melanome nach AJCC 8th ed., modifiziert nach Bristol-Myers Squibb ⁶² , basierend auf Amin et al. 2017 ⁶³	29
Tabelle 5:	N-Stadium der TNM-Klassifikation maligner Melanome nach AJCC 8th ed., modifiziert nach Bristol-Myers Squibb ⁶² , basierend auf Amin et al. 2017 ⁶³	29
Tabelle 6:	M-Stadium der TNM-Klassifikation maligner Melanome nach AJCC 8th ed., modifiziert nach Bristol-Myers Squibb ⁶² , basierend auf Amin et al. 2017 ⁶³	30
Tabelle 7:	Stadiengruppierung der TNM-Klassifikation maligner Melanome nach AJCC 8th ed., modifiziert nach Bristol-Myers Squibb ⁶² , basierend auf Amin et al. 2017 ⁶³	30
Tabelle 8:	5- und 10-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit nach Tumorstadium ⁶¹	31
Tabelle 9:	Nachsorgeschema am Hauttumorzentrum der Uniklinik Köln, Stand Dezember 2020.	35
Tabelle 10:	Übersicht der Lokalisation des Primärtumors nach histologischem Subtyp, in absoluten Zahlen.	54
Tabelle 11:	Einteilung der nicht-klassifizierbaren Melanome nach primären und sekundären histologischen Merkmalen.	56
Tabelle 12:	Tabellarische Übersicht der Lokalisation der Primärmanifestation bei PTU.	57
Tabelle 13:	Tabellarische Darstellung der Tumordicke nach histologischem Subtyp mit Minimum, Maximum, Mittelwert, Median, 1. bzw. 3.Quartil und p-Wert (Wilcoxon Signed Rank Test).	59
Tabelle 14:	Tabellarische Darstellung der Verteilung der Tumore nach Clark Level.	61
Tabelle 15:	Tabellarische Übersicht der Wächterlymphknotenbiopsien.	63
Tabelle 16:	SLN-Positivität nach SLNB, kategorisiert nach T-Stadium 1-4 (Tumordicke nach Breslow).	64
Tabelle 17:	Tabellarische Darstellung der Verteilung der AJCC Stadien bei Erstvorstellung im Hauttumorzentrum (HTZ) nach Anpassung an die AJCC Klassifikation von 2017 (8th edition).	66
Tabelle 18:	Tabellarische Übersicht der Therapieablehnung im Stadium IV.	68
Tabelle 19:	Übersicht der asservierten Tumorgewebe für die 1. Mutationsanalyse.	69
Tabelle 20:	Tabelle korrespondierender Mutationsstatus bei Erst- und Zweittestung.	70
Tabelle 21:	Tabellarische Gegenüberstellung nachgewiesener NRAS-/BRAF- bzw. NRAS-/c-KIT – Mutationspaare entsprechend der NRAS-Subgruppen-mutation. Als therapierelevant ist die Aktivität bzw. Inaktivität der Zweit-mutation angegeben, der jeweilige Quellennachweis findet sich nachstehend.	71
Tabelle 22:	Tabellarische Auflistung koexistenter Begleitmutationen, die mittels New Generation Sequencing detektiert werden konnten. Die Onkogenität ist unter „Aktivität“ angegeben, der jeweilige Quellennachweis findet sich nachstehend.	73

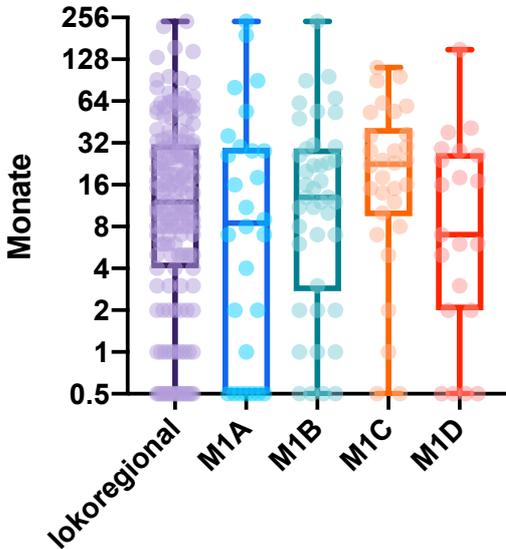
Tabelle 23:	Tabellarische Übersicht des relativen Risikos der Entwicklung cerebraler Metastasen nach Genotyp (NRAS Q61H, NRAS Q61K, NRAS Q61L und NRAS Q61R).	83
Tabelle 24:	Multivariate Analyse möglicher Einflussfaktoren auf das Gesamtüberleben.	86
Tabelle 25:	Tabellarische Übersicht der angewandten Systemtherapeutika.	88
Tabelle 26:	Deskriptive Statistik der Therapielinien 3-5 nach Substanzklasse.	90

7.3 Erhebungsbogen

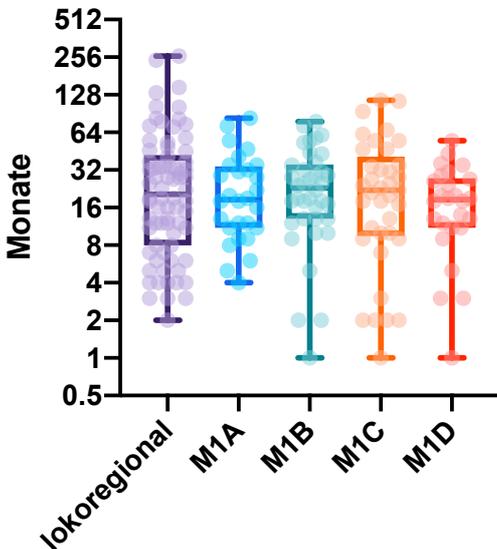
Kriterien	
Epidemiologische Daten	<ul style="list-style-type: none"> • Geburtsdatum (Monat/Jahr) • Erstdiagnose • Alter bei Diagnose • Alter bei Ende der Datenerhebung • Erstvorstellung im Hauttumorzentrum (HTZ) • AJCC-Stadium bei Vorstellung im HTZ (2009/2017) • AJCC-Stadium bei Ende der Datenerhebung (2017) • Nachsorgestatus oder Sterbedatum (Monat/Jahr)
Tumorspezifika	<ul style="list-style-type: none"> • Lokalisation • Histologischer Subtyp • Tumordicke nach Breslow • Ulzerationsstatus • Clark-Level
Therapie	<ul style="list-style-type: none"> • Adjuvante Therapie • Systemische Therapie (Therapielinien) • Chirurgische und strahlentherapeutische Interventionen
Metastasen	<ul style="list-style-type: none"> • Lokalisation (in zeitlicher Abfolge) • Zeitintervall zwischen einzelnen Metastasierungen (Monate)
Mutationsstatus	<ul style="list-style-type: none"> • NRAS • BRAF • c-KIT • Koexistente Mutationen
Mutationsanalyse	<ul style="list-style-type: none"> • Datum der Analyse (Monat/Jahr) • Lokalisation (Primarius vs. Metastase) • Zweit- oder Dritttestung
Zweitmalignom	<ul style="list-style-type: none"> • Entität, Erstdiagnose, ggfs. Therapien

7.4 Metastasierungslinien 1 bis 9

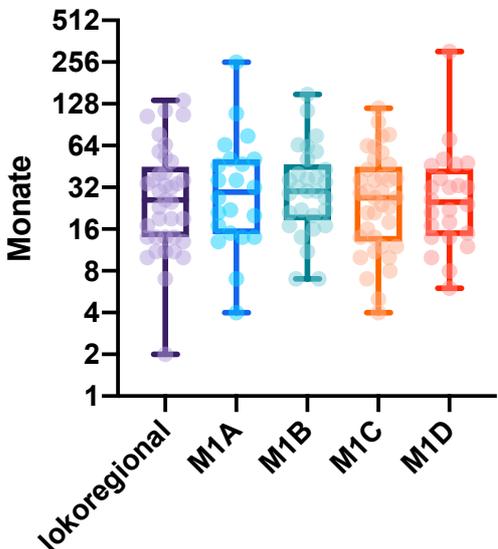
1. Metastasierung



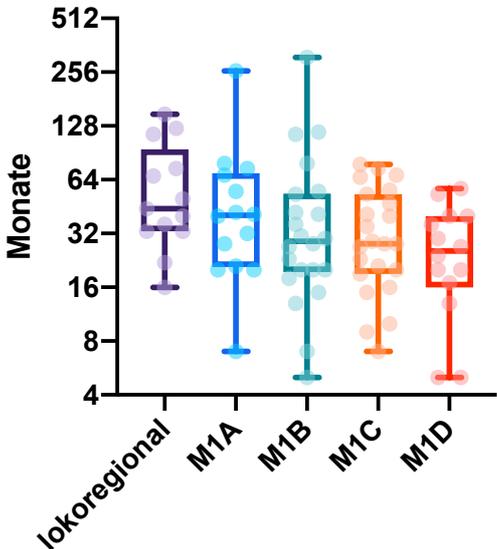
2. Metastasierung



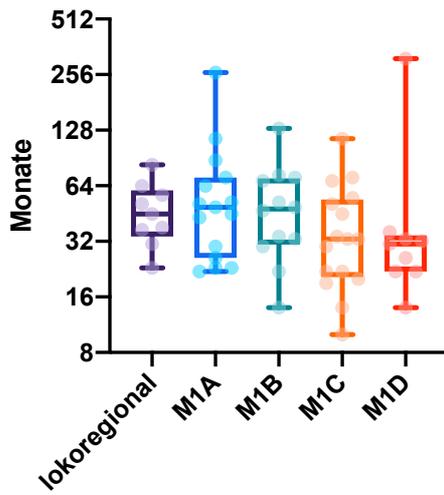
3. Metastasierung



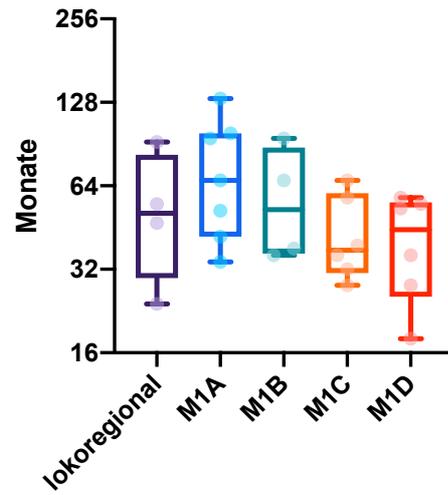
4. Metastasierung



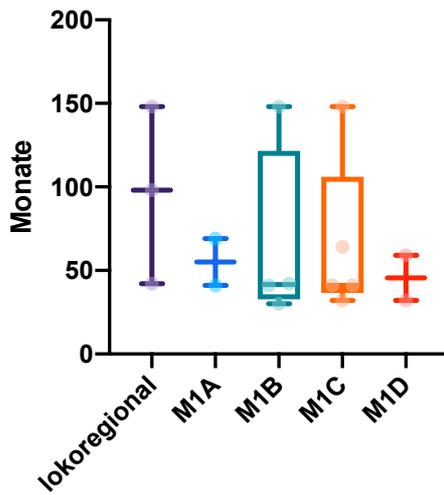
5. Metastasierung



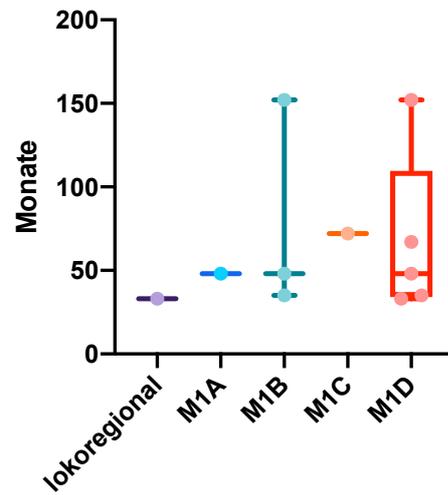
6. Metastasierung



7. Metastasierung



8. Metastasierung



9. Metastasierung

