

Aus der Klinik für Dermatologie und Venerologie
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i.Br.

***BRAF*- und *NRAS*-Mutationen in Melanomen von Patienten mit Mehrfachmelanomen**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des Medizinischen Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Albert-Ludwigs-Universität
Freiburg i.Br.

vorgelegt 2015

von Andrea Schmitt

geboren in Berlin-Friedrichshain

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Das maligne Melanom.....	1
1.2 Epidemiologie des Melanoms	1
1.2.1 Inzidenzen in Deutschland und weltweit.....	1
1.2.2 Geographische und regionale Unterschiede	2
1.3 Ätiologie.....	2
1.3.1 UV-Strahlung als Risikofaktor für die Entstehung des Melanoms	2
1.3.1.1 Mechanismus der Melanominduktion durch UV-Strahlung.....	3
1.3.1.2 Lebensalter bei der Sonnenexposition und Art der Sonnenexposition	4
1.3.1.3 Problematik der objektiven Einschätzung von Sonnenexposition.....	5
1.3.2 Nävi und Melanomrisiko	6
1.3.3 Hauttyp und Melanomrisiko.....	7
1.3.4 Familienanamnese und genetische Prädisposition	7
1.4 Einteilung des malignen Melanoms	8
1.4.1 Klinisch-histologische Einteilung.....	8
1.4.2 Klinische Charakteristika der Subtypen	8
1.5 Prognose des malignen Melanoms	9
1.6 Genetik des Melanoms	11
1.6.1 Das <i>RAS</i> -Gen	11
1.6.2 Das <i>RAF</i> -Gen.....	12
1.6.3 Der MAPK/ERK-Signalweg	12
1.6.4 <i>BRAF</i> - und <i>NRAS</i> -Mutationen bei melanozytären Tumoren.....	13

1.6.5 <i>BRAF</i> -mutierte Melanome in der medikamentösen Therapie	15
1.6.6 <i>NRAS</i> -mutierte Melanome in der medikamentösen Therapie	16
1.6.7 Melanome als genetisch heterogene Subtypen	17
1.7 Multiple primäre Melanome (MPM).....	19
1.7.1 Definition von MPM	19
1.7.2 Epidemiologie von MPM	19
1.7.3 Mit MPM assoziierte Risikofaktoren	20
1.7.4 Prognose von mulitplen primären Melanomen	20
1.8 Zielsetzung dieser Arbeit	22
2. Population, Material und Methoden	24
2.1 Population	24
2.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien Patientenkollektiv und Untersuchungsmaterial.....	24
2.1.2 Vorgehen	25
2.2. Histologie.....	26
2.2.1 Anfertigung der Gewebeschnitte	26
2.2.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (Übersichtsfärbung)	27
2.2.3 Histologische Beurteilung	28
2.2.3.1 Histologie des Melanoms.....	28
2.2.3.2 Histologie des Lokalrezidivs.....	29
2.2.3.3 Histologie der Melanom-Metastase	29
2.2.3.4 Solare Elastose als histologischer Surrogatparameter für UV-Schädigung.....	30
2.2.3.5 Schwierigkeitsgrad der Tumormaterialgewinnung bei der Mikrodissektion.....	32
2.3 Gewinnung von Tumormaterial	33

2.3.1 Manuelle Mikrodisektion	33
2.3.2 Lyse zur Gewinnung von Tumorzell-DNA	33
2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)	34
2.4.1 Prinzip der Polymerasekettenreaktion	34
2.4.2 Reaktionsansatz für PCR	34
2.4.3 Primer für <i>BRAF</i> , <i>NRAS</i>	35
2.4.4 Ablauf der PCR im Thermocycler	36
2.4.5 Gelelektrophorese	37
2.5 Sequenzierung.....	37
2.5.1 Für die Sequenzierung verwendete M13-Primer	38
2.6 Auswertung	38
2.7 Laborergäte und Material, Reagenzien und Substanzen	38
3. Ergebnisse	41
3.1 Untersuchte Parameter und Ziele.....	41
3.2 Charakteristika Population	42
3.3 Charakteristika Melanome.....	42
3.3.1 Zeitintervalle.....	42
3.3.2 Tumordicke.....	43
3.3.3 Klinisch-histologischer Melanomtyp	43
3.3.4 Lokalisation der Melanome als Surrogatparameter für Sonnenexposition	44
3.3.5 Lokalisation und histologisch erfasste solare Elastose (CSD)	45
3.3.6 Mutationsanalyse von <i>BRAF</i> und <i>NRAS</i>	46

3.4 Assoziation von <i>BRAF</i>- und <i>NRAS</i>-Mutationen mit klinischen sowie histologischen Parametern	50
3.4.1 Anatomische Lokalisation des Melanoms und <i>BRAF</i> -, <i>NRAS</i> -Mutation	50
3.4.2 Art der Sonnenexposition und <i>BRAF</i> -Mutation	50
3.4.3 Art der Sonnenexposition und <i>NRAS</i> -Mutation.....	51
3.4.4 Solare Elastose und <i>BRAF</i> -Mutation	52
3.4.5 Histologische Zeichen der chronischen Sonnenschädigung und <i>NRAS</i> -Mutation	53
3.4.6 Klinisch-histologischer Melanomtyp und <i>BRAF</i> -, <i>NRAS</i> -Mutation	55
3.4.7 Klinisch-histologischer Melanomtyp und solare Elastose.....	56
3.4.8 Melanomtyp und Erkrankungsalter.....	56
3.4.9 Erkrankungsalter und <i>BRAF</i> -, <i>NRAS</i> -Mutation	57
3.4.10 Solare Elastose (CSD) und Alter bei Diagnose des Erstmelanoms	58
3.4.11 Geschlecht und <i>BRAF</i> -, <i>NRAS</i> -Mutation	59
3.4.12 Schwierigkeitsgrad der Tumormaterialgewinnung bei der manuellen Mikrodisektion und <i>BRAF</i> -, <i>NRAS</i> -Mutation (methodische Einflüsse).....	60
3.5 Paarweise Betrachtung der Melanome von Individuen.....	61
3.5.1 Mutationen von <i>BRAF</i> und <i>NRAS</i> mehrerer Melanome eines Individuums	62
3.5.2 Abhängigkeit des <i>BRAF</i> -Mutationsstatus im Folgemelanom vom <i>BRAF</i> -Status des Erstmelanoms	63
4. Diskussion	64
4.1 Charakteristika im untersuchten Kollektiv	65
4.2 Häufigkeit und Art der <i>BRAF</i> -Mutationen bei Mehrfachmelanomen	67
4.3 Häufigkeit und Art der <i>NRAS</i> -Mutationen bei Mehrfachmelanomen	68

4.4 Assoziationen von <i>BRAF</i> - und <i>NRAS</i> -Mutationsstatus mit klinischen und histologischen Parametern	68
4.4.1 Sonnenexposition und <i>BRAF</i> - und <i>NRAS</i> -Mutationsstatus.....	68
4.4.2 Alter und <i>BRAF</i> -/ <i>NRAS</i> -Mutationsstatus	70
4.4.3. Histologischer Subtyp und <i>BRAF</i> -/ <i>NRAS</i> -Mutationsstatus, sowie Alter und Ausmaß der solaren Elastose	71
4.5 Paarweise Betrachtung	73
4.5.1 Konsequenzen für die klinische Praxis	74
4.5.2 Bedeutung im Zusammenhang mit Zweitmelanomen unter einer targeted therapy	75
4.6 Einschränkungen	76
5. Zusammenfassung.....	79
6. Literaturverzeichnis.....	80
7. Abbildungsverzeichnis	94
8. Tabellenverzeichnis	97
9. Erklärung zum Eigenanteil	98
10. Danksagung.....	99