

**Universitätsklinikum Ulm**

**Institut für Pathologie**

Institutsleiter: Prof. Dr. med. Peter Möller

**Bestimmung des Expressionsstatus von  
gezielt behandelbaren Proteinen im sinunasalen Schleimhautmelanom  
mittels eines Biopanel**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin (Dr. med.)  
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

von

Lisa Zimmermann, geb. Grünmüller  
geboren in Schwäbisch Hall, Deutschland

2017

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

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

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

**Tag der Promotion: 14.12.2017**

**Teile dieser Arbeit wurden publiziert:**

**Grünmüller L, Thierauf J, Weissinger S E, Bergmann C, Bankfalvi A, Veit J, Hoffmann T K, Möller P, Lennerz J K: Biopanel identifies expression status of targetable proteins in sinonasal melanoma. Per. Med.13: 291-301 (2016).**

**Adapted from Per.Med. 13: 291-301 (2016) with permission of Future Medicine Ltd. DOI: <https://doi.org/10.2217/pme-2016-0023>**

Der Eigenanteil der Autorin wird im Abschnitt „2. Material und Methoden“ genau angegeben. Es werden nur Ergebnisse aufgeführt, welche aus der Arbeit der Autorin stammen. Die im Ergebnisteil veröffentlichten Tabellen und Schaubilder sind genehmigte Inhalte oder Übersetzungen der Abbildungen oder Tabellen der oben genannten Publikation und wurden mit Quellenangaben kenntlich gemacht.

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. Klinischer Hintergrund.....	1
1.2. Therapie des sinunasalen Melanoms.....	1
1.3. Einsatz von Biomarken bei Diagnose und Therapie.....	2
1.4. Fragestellung.....	3
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>4</b>
2.1. Studiendesign und Kohorten.....	4
2.2. Das Biopanel.....	4
2.3. Immunhistochemische Färbung.....	5
2.3.1. Anfertigung des Tissue-Microarrays.....	5
2.3.2. Entparaffinierung und Vorbehandlung.....	5
2.3.3. Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörpern.....	6
2.4. Auswertung der Immunhistochemie.....	8
2.5. Literaturrecherche.....	8
2.6. Statistische Auswertung.....	8
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>10</b>
3.1. Klinisch-pathologische Eigenschaften der Kohorten.....	10
3.2. Expressionsfrequenz der Biomarker.....	12
3.3. Zusammenhang von Biomarkerstatus und klinisch-pathologischen Parametern.....	14
3.4. Überlebenszeitanalyse.....	14
3.5. Ergebnisse der Metaanalyse.....	15
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>18</b>
4.1. Bessere Studienplanung durch die Verwendung von Biopaneln.....	18
4.2. Bedeutung der Expression eines Biomarkers im Hinblick auf das Ansprechen der Targeted-Therapy.....	19
4.3. Die Zusammensetzung eines Biopaneln.....	19
4.4. Stellenwert der exprimierten Biomarker.....	20
4.5. Seltenheit der <i>BRAF</i> V600E-Mutationen im sinunasalen Melanom.....	21

<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>22</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>24</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>35</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>36</b>

---

**Abkürzungsverzeichnis**


---

<b>Abkürzung</b>	<b>Erklärung</b>
<b>ABC</b>	Avidin-Biotin-Komplex
<b>AGL</b>	Anaplastisches großzelliges Lymphom
<b>ALK</b>	Anaplastische Lymphomkinase
<b>AS</b>	Aminosäure
<b>BRAF V600E, BRAF p. V600E</b>	Proto-onkogenes B-Raf Gen, sowie Protein mit Mutation an der Aminosäurenposition 600
<b>CA</b>	Karzinom
<b>CKIT, CKIT</b>	Gen, sowie Protein für eine Rezeptor Tyrosinkinase, CD117
<b>C-Term.</b>	Carboxy-Terminus
<b>DAB</b>	Diaminobenzidin
<b>DGBL</b>	Diffuses großzelliges B-Zell Lymphom
<b>DHFR</b>	Dihydrofolatreduktase
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>DNL</b>	Ductus nasolacrimalis (Tränen-Nasen-Gang)
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>EGFR</b>	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
<b>FFPE</b>	Formalin-fixiertes und Paraffin-eingebettetes Gewebe
<b>FLI-1</b>	<i>Friend leukemia integration-1 transcription factor (engl.)</i> , ein Transkriptionsfaktor mit proto-onkogenen Eigenschaften
<b>GNA 11</b>	Gen des Guanin Nukleotid-Bindeprotein Untereinheit alpha-11
<b>GNAQ</b>	Gen des Guanin Nukleotid-Bindeprotein Untereinheit alpha-q
<b>HBM-45</b>	<i>human melanoma black 45 (engl.)</i> , Antigen auf Melanozyten
<b>HER2</b>	Humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2
<b>HRP</b>	Meerrettichperoxidase
<b>I</b>	Immuntherapie
<b>IDH1 R132H</b>	Isozitat Dehydrogenase 1 mit Punktmutation R132H
<b>KIT</b>	Tyrosinkinase, die sich als Rezeptor an der Zelloberfläche befindet
<b>Kn</b>	Kaninchen
<b>LA</b>	Larynx

---

<b>m</b>	monoklonal
<b>max.</b>	maximal
<b>MDM2</b>	<i>Mouse double minute 2 homolog (engl.)</i> , Regulator des Tumorsuppressorgens p53
<b>Melan-A</b>	Antigen auf Melanozyten
<b>membr.</b>	membranös
<b>MET</b>	Rezeptor-Tyrosin-Kinase in Hepatozyten, ein Proto-Onkogen
<b>MH</b>	Mundhöhle
<b>min.</b>	mindestens
<b>mm</b>	Millimeter
<b>mM</b>	millimolar
<b>Ms</b>	Maus
<b>MYC</b>	<i>V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog (engl.)</i> , Transkriptionsfaktor, der z.B. Zellproliferation reguliert
<b>N, n</b>	Anzahl
<b>NGS</b>	Next-Generation-Sequencing
<b>NH</b>	Nasenhaupthöhle
<b>NNH</b>	Nasennebenhöhle
<b>NP</b>	Nasopharynx
<b>NRAS</b>	<i>Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog (engl.)</i> , Gen kodiert für ein G-Protein.
<b>N-Term.</b>	Amino-Terminus
<b>nukl.</b>	nukleär
<b>O</b>	Operation
<b>P</b>	Palliative Behandlung
<b>p</b>	polyklonal
<b>PAP</b>	Peroxidase-Anti-Peroxidase
<b>PBS</b>	phosphatgepufferter Kochsalzlösung
<b>PDGRF<math>\alpha</math></b>	<i>Platelet-derived growth factor receptor, alpha (engl.)</i> , Wachstumsfaktor
<b>PD-L1</b>	<i>Programmed death-ligand 1 (engl.)</i> , Ligand, der T-Zell-Aktivierung und Zytokinproduktion hemmt
<b>PMID</b>	Pub Med Identification
<b>R</b>	Bestrahlung

<b>S100p</b>	Calcium bindendes Protein, lokalisiert im Zytoplasma und Nukleus
<b>sog.</b>	sogenannt
<b>Sox10</b>	Transkriptionsfaktor, bedeutend in der Embryonalentwicklung
<b>synth.</b>	synthetisch
<b>Thr</b>	Threonin
<b>TMA</b>	Tissue-Microarray
<b>TP53</b>	Tumorsuppressor-Protein 53
<b>TNM</b>	Tumor-Nodus-Metastasen-Klassifikation, dient zur Einteilung von malignen Tumoren
<b>Tyr</b>	Tyrosin
<b>VEGFR</b>	<i>Vascular Endothelial Growth Factor (engl.)</i> , Endothelwachstumsfaktor
<b>zens.</b>	zensiert
<b>zyt.</b>	zytoplasmatisch
<b>µm</b>	Mikrometer
<b>µl</b>	Mikroliter



## **1. Einleitung**

### **1.1. Klinischer Hintergrund**

Das Schleimhautmelanom der sinunasalen Region ist eine seltene Erkrankung und macht nur 2% aller malignen Melanome und 4% aller bösartigen Tumore der Kopf-Hals-Region aus (Narasimhan et al. 2009). Die Seltenheit erschwert die Planung und Durchführung klinischer Studien enorm (Patel et al. 2002), da die Einschlusszahlen dementsprechend gering sind, jede Optimierung der Studienplanung ist somit ein möglicher Fortschritt. Die Nasenhöhle und Nasennebenhöhlen stellen mit 70% die häufigste Lokalisation für Schleimhautmelanome der Kopf-Hals-Region dar, gefolgt von der Mundhöhle und anderen Lokalisationen (30%) (Pfister et al. 2012). Aufgrund der anatomischen Komplexität innerhalb der Nasen- und Nasennebenhöhlen sowie der angrenzenden Strukturen ist eine vollständige (R0) Resektion häufig nicht mehr möglich (Gavriel et al. 2011). In Verbindung mit dem im Vergleich zum kutanen malignen Melanom aggressiveren Verlauf der Erkrankung (Lengyel et al. 2003), findet eine eher ungewöhnliche TNM-Klassifikation Anwendung. Tumore, die auf die Mukosa begrenzt sind, werden bereits als T3 eingestuft, fortgeschrittene Tumore werden in T4a und T4b eingeteilt. T4a bedeutet, dass umliegendes Weichteilgewebe, Knorpel, Knochen oder die darüber liegende Haut infiltriert sind, T4b beschreibt die Infiltration von beispielsweise Hirnnerven, Karotiden oder Meningen (Compton et al. 2012).

### **1.2. Therapie des sinunasalen Melanoms**

Ziel der Therapie sollte immer die vollständige chirurgische Resektion des Tumors sein (Mendenhall et al. 2005). Leider werden aber sinunasale Melanome aufgrund fehlender Frühsymptome häufig erst in fortgeschrittenen (Chang et al. 1998; Tas et al. 2013) oder in nicht mehr resezierbaren Stadien diagnostiziert (Gavriel et al. 2011). Die Kombination aus aggressivem Krankheitsverlauf, Seltenheit der Tumore sowie der späten Diagnosestellung und den daraus folgenden fortgeschrittenen Krankheitsstadien gestaltet die Optimierung der Therapie beim sinunasalen Melanom extrem schwierig (Benlyazid et al. 2010; Mihajlovic et al. 2012; Pfister et al. 2012). Obwohl mittlerweile neue Therapieoptionen wie die adjuvante Bestrahlung zum Therapiekonzept gehören (Christopherson et al. 2015; Thariat et

al. 2011) und weitere Therapiemöglichkeiten derzeit getestet werden, wie z.B. die Immuntherapie (Chai et al. 2014; Kanetaka et al. 2011), liegt die 5-Jahres-Überlebensrate zwischen 17 und 48% (Lengyel et al. 2003). Für eine optimale Therapie sind momentan multidisziplinäre Ansätze nötig (Benlyazid et al. 2010; Mihajlovic et al. 2012; Pfister et al. 2012). So werden beispielsweise Tumore im Stadium III und IVA chirurgisch exzidiert und anschließend adjuvant nachbestrahlt, um das Risiko für ein lokales Rezidiv zu senken und das Überleben zu verbessern (Pfister et al. 2012).

### **1.3. Einsatz von Biomarkern bei Diagnose und Therapie**

Die Diagnosestellung „Melanom“ erfolgt hauptsächlich durch den Einsatz von klinisch etablierten Biomarkern (Biomarkers Definitions Working Group et al. 2001; Ludwig et al. 2005), wie z.B. S100p, HBM-45 und Melan-A (Mihajlovic et al. 2012; Patrick et al. 2007; Smith et al. 2016). Auf die Verwendung von Biomarkern wird in klinischen Studien großer Wert gelegt (Mullins et al. 2012), jedoch ist die Möglichkeit, beim sinusalen Melanom prognostische oder prädiktive Aussagen damit zu treffen, derzeit (noch) begrenzt (Biomarkers Definitions Working Group et al. 2001; Ludwig et al. 2005), zudem beschäftigte sich die Mehrheit der bisherigen Arbeiten nur mit einzelnen Biomarkern (Tabelle 4). Dies in Kombination mit den molekular-genetischen Unterschieden zum kutanen malignen Melanom, wie z.B. dem Fehlen von *BRAF*-Mutationen (Cohen et al. 2004), macht deutlich, wie wichtig weitere klinische Studien sind, um die Effektivität neuer Therapieansätze zu untersuchen.

Um onkogene Veränderungen in den Signalkaskaden der entarteten Zellen zu identifizieren, ist die Bestimmung des Mutationsstatus durch Sequenzierung verschiedener Gene auf DNA-Ebene ein möglicher Ansatz (z.B. Onko-panel) (McFadden et al. 2014; Nardi et al. 2013; Sequist et al. 2011). Jedoch stehen Mutationsanalysen (wie z.B. Next-Generation-Sequencing (NGS)-basierte Onko-panels) nicht unbedingt immer zur Verfügung. Deshalb könnte die Kenntnis des Expressionsstatus einiger wichtiger Onkoproteine als Voraussetzung für viele pharmakologische Ansätze, sowie als Ausgangspunkt für geplante prospektive Studien in dieser seltenen Krankheitsgruppe dienen.

#### **1.4. Fragestellung**

Es gibt jedoch im Wesentlichen keine Daten bezüglich der Expression von Proteinen im sinunasalen Melanom, die für eine zielgerichtete Therapie (Targeted-Therapy) in Frage kommen könnten. Für diese Arbeit wurden deshalb Antikörper gegen 12 Proteine ausgewählt, für die Targeted-Therapies zur Verfügung stehen würden. Die Proteine sind Bestandteil verschiedener Signalkaskaden und spielen entweder bei der Tumorgenese des sinunasalen Melanoms eine Rolle oder haben eine direkte therapeutische Relevanz bei anderen Tumorerkrankungen. In Anbetracht dessen, dass Proteine Träger biologischer Funktionen sind, wird der Ansatz in dieser Studie als Biopanel bezeichnet.

Das Biopanel wurde in zwei unabhängigen Kohorten mit sinunasalem Melanom angewendet, die daraus entstandenen Expressions-Profile stehen nun für die Planung von klinischen Biomarker-stratifizierten Studien zur Verfügung.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Studiendesign und Kohorten**

Die Studie wurde als retrospektive Analyse an bereits vorhandenen Gewebeproben konzipiert und durch die Ethikkommission der Universität Ulm (Aktenzeichen 276/13) genehmigt. Die Screening-Kohorte setzte sich aus Patienten zusammen, deren Tumormaterial im Einschlusszeitraum von Februar 2007 bis August 2010 am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Ulm untersucht wurde. Ermittelt wurden diese durch eine Archivsuche für Schleimhautmelanome in der Nasenhöhle und den Nasennebenhöhlen, mittels des digitalisierten Patientenorganisationssystems dc pathos (dc-system Informatik GmbH, Heiligenhaus, Deutschland). Alter, Geschlecht, Pigmentation, Stadium und Lokalisation stammen aus dem pathologischen Befund. Diese Schritte wurden von Dr. Stephanie Weissinger durchgeführt. Die klinischen Daten wurden von Dr. Julia Thierauf ergänzt. Die Validierungskohorte bestand aus Fällen der Universitätsklinik Essen. Die Gewebeproben wurden von Dr. Agnes Bankfalvi und die dazugehörigen klinischen Daten von Dr. Christoph Bergmann zur Verfügung gestellt. Einschlusskriterien für Patienten waren: (1) Eine nach WHO-Richtlinien (LeBoit et al. 2006) gesicherte Diagnose und (2) die Verfügbarkeit von ausreichend Tumorgewebe für immunhistochemische Färbungen. Die Diagnose des Melanoms erforderte mindestens einen positiven Melanom-Marker (S100p, HBM-45, Melan-A oder Sox10) (Pfister et al. 2012), dies wurde durch mindestens zwei Fachärzte für Pathologie bestätigt.

Die Falldaten aus Ulm und Essen wurden von der Autorin bezüglich der oben genannten Einschlusskriterien überprüft, die vorhandenen Gewebsschnitte mikroskopiert und fehlende Daten vervollständigt. Daraus entstand die Screening- und Validierungskohorte mit je 10 Fällen des sinunasalen Schleimhautmelanoms. Die Daten wurden von der Autorin ausgewertet und mittels Microsoft Excel 2007 (Microsoft, Redmond, WA, USA) tabellarisch aufgelistet.

### **2.2. Das Biopanel**

Das Biopanel besteht aus Antikörpern gegen 12 Proteine (KIT, TP53, MYC, MDM2, HER2, EGFR, MET, ALK, FLI-1, VEGFR, PDGFR $\alpha$  und BRAF p. V600E).

Daraus ergibt sich ein Protein-Expressionsmuster von mehreren wichtigen onkogenen Signalwegen. Die Auswahl dieser spezifischen Proteine erfolgte nach Anwendbarkeit und Verfügbarkeit in der Routinediagnostik und/ oder nach klaren prognostischen oder prädiktiven Eigenschaften bei anderen Tumorerkrankungen (Weissinger et al. 2014).

Die Auswahl der 12 verwendeten Proteine sowie die Auflistung der dafür verwendeten Antikörper und derer Eigenschaften erfolgten durch die Autorin und sind in Tabelle 1 dargestellt. Diese wurde mittels Microsoft Excel 2007 (Microsoft, Redmond, WA, USA) erstellt.

## **2.3. Immunhistochemische Färbung**

### **2.3.1. Anfertigung des Tissue-Microarrays**

Das Tumormaterial lag in Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten (FFPE) Gewebeblöcken vor. Für jede Kohorte wurde ein Tissue-Microarray (TMA) hergestellt. Dafür wurde aus den vorliegenden Gewebeblöcken je ein Gewebezylinder mit einem Durchmesser von 9mm ausgestanzt und auf einem neuen Paraffinblock zusammengesetzt. Jedes TMA bestand somit aus 10 Tumorproben und enthielt geeignete Positiv- und Negativkontrollen (Tabelle 1). Mit dem Mikrotom wurden von jedem TMA je zwölf 2µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger gezogen.

Dies wurde von der Autorin ausgeführt.

### **2.3.2. Entparaffinierung und Vorbehandlung**

Die fixierten Schnitte wurden in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkohol-Wasser Reihe rehydriert. Die Vorbehandlung erfolgte für MDM2, HER2 und MET mittels 10 mM Natrium-Citrat-Puffer bei einem pH-Wert von 6,0 im Schnellkochtopf, für KIT, TP53, ALK, FLI1, VEGFR und PDGFR $\alpha$  in der Mikrowelle mit 10 mM Natrium-Citrat-Puffer ebenfalls bei einem pH-Wert von 6,0. MYC wurde im Steamer mit EDTA-Puffer bei einem pH-Wert von 9,0 vorbehandelt. Für EGFR erfolgte eine proteolytische Vorbehandlung mittels Pronase. Bei allen Verfahren wurden die Schnitte anschließend mit destilliertem Wasser gespült.

Dies wurde von der Autorin ausgeführt.

### **2.3.3. Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörpern**

Die spezifischen Antikörper, Klone, Konzentrationen und Antigen-Eigenschaften sind in Tabelle 1 dargestellt. Die Objektträger wurden mit der vorverdünnten Lösung, je eines primären Antikörpers, mit einem Volumen von 200µl für 30 Minuten inkubiert. Die Schnitte wurden anschließend in PBS-Puffer (pH-Wert 7,3-7,4) gewaschen. Es kamen zwei verschiedene Nachweismethoden zum Einsatz, für HER2 die Peroxidase-Anti-Peroxidase (PAP)-Methode und für alle anderen Antikörper die Avidin-Biotin-Komplex (ABC)-Methode. Bei der ABC-Methode wurden die Schnitte mit einem Biotin-markierten sekundären Antikörper für 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert, in PBS-Puffer gespült und anschließend mit Streptavidin für weitere 30 Minuten inkubiert. Zur Visualisierung wurde Neufuchsin verwendet, was bei Expression des gesuchten Antigens zu einer roten Farbreaktion führte. Nach erneutem Waschen in PBS-Puffer erfolgte eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin für 5 Minuten. Bei der PAP-Methode wurde ebenfalls mit einem sekundären Antikörper für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Dieser Antikörper war an eine Meerrettichperoxidase (HRP, braun) gekoppelt. Hier kam das Chromogen Diaminobenzidin (DAB, rot) zum Einsatz. Zuletzt wurden alle gefärbten Objektträger mit Aquatex (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt.

Dies wurde von der Autorin ausgeführt.

**Tabelle 1. Antikörper Eigenschaften.**

*Abkürzungen:* AGL, Anaplastisches großzelliges Lymphom; ALK, Anaplastische Lymphomkinase; AS, Aminosäure; BRAF p. V600E, Proto-onkogenes B-Raf Protein mit Mutation an der Aminosäureposition 600; C-Term., Carboxy-Terminus; CA, Karzinom; DGBL, Diffuses großzelliges B-Zell Lymphom; DHFR, Dihydrofolatreduktase; EGFR, Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor; FLI-1, Friend leukemia integration-1 transcription factor; Kn, Kaninchen; HER2, Humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2; KIT, Rezeptor Thyrosinkinase; N-Term., Amino-Terminus; nukl., nukleär; m, monoklonal; MDM2, Mouse double minute 2 homolog; membr., membranös; MET, Rezeptor-Tyrosin-Kinase in Hepatozyten; Ms, Maus; MYC, V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog; p, polyklonal; PDGRF $\alpha$ , Platelet-derived growth factor receptor, alpha; synth., synthetisch; Thr, Threonin; TP53, Tumorsuppressor-Protein 53; Tyr, Tyrosin; VEGFR, Vascular Endothelial Growth Factor; zyt., zytoplasmatisch. Modifiziert nach (Grünmüller et al. 2016).

Name	Wirt	Antigen-Eigenschaften (Positiv-Kontrolle; Negativ-Kontrolle)	Klon, Katalog-#; Firma	Verdünnung	Färbemuster	Quellen
ALK	Ms, m	DHFR-ALK rekombinantes Protein, einschließlich muriner DHFR (AGL; DGBL)	ALK1, M7195; Dako, Braunschweig, Deutschland	1:100	zyt.	(Niu et al. 2013)
BRAF p. V600E	Ms, m	Synth. Peptid, repräsentiert die BRAF V600E mutierte AS Sequenz von AS 596 bis 606 (BRAF V600E mutiertes Melanom; Epidermis)	VE1, E19202; DCS, Hamburg, Deutschland	1:100	zyt.	(Capper et al. 2011)
EGFR	Ms, m	Extrazelluläre Domäne von menschlichem rekombinantem EGFR (Endometriale Stromazellen; Tonsille)	2.1E1, MSK014-05; Zytomed Systems, Berlin, Deutschland	1:100	membr.	(Boone et al. 2011)
FLI-1	Kn, p	Synth. Peptid des C-Term. (Endothelzellen; Nerven)	N/A, RB9295; Medac, Wedel, Deutschland	1:100	nukl.	(Rossi et al. 2004)
HER2	Kn, p	Synth. humanes HER2-Onkoprotein-Peptid aus dem intrazytoplasmatischen Abschnitt des c-erbB-2-Onkoproteins. (HER2 amplifizierendes Mamma CA; myoepitheliale Zellen)	N/A, A0485; Dako	1:500	membr.	(Inman et al. 2003)
KIT	Kn, p	Peptid entsprechend den AS 963 bis 976 am zyt. C- Term. von KIT (Mastzellen; Tonsille)	N/A, A4502; Dako	1:200	zyt.	(Satzger et al. 2008)
MDM2	Ms, m	Peptid Epitop bei Thr-216 von murinem MDM2 (Liposarkom; weiße Fettzellen)	SMP 14, ab3110; Abcam, Cambridge, Großbritannien	1:100	nukl.	(Ahn et al. 2010)
MET	Kn, m	Synth. Peptid entsprechend Teilen des C-Term. des humanen MET Proteins (Melanom; Pankreas)	Met D1C2, 8198; Cell Signaling, Frankfurt, Deutschland	1:100	zyt./ membr.	(Mallikarjuna et al. 2007)
MYC	Kn, m	Synth. Peptid entsprechend Teilen des N-Term. des humanen MYC Proteins (Burkitt Lymphom; Tonsille)	EP121, AC-0116; Epitomics, Burlingame, CA, USA	1:100	zyt.	(Lazaris et al. 1995)
PDGRF $\alpha$	Kn, m	Synthetisches Peptid entsprechend der extrazellulären Domäne des PDGF-Rezeptors alpha (Brust; Tonsille)	D13C6, 5241S; Cell Signaling	1:25	zyt.	(Ugurel et al. 2005)
TP53	Ms, m	Rekombinantes humanes Wildtyp-TP53-Protein (Kolorektales CA; Tonsille)	DO-7, M7001; Dako	1:500	nukl.	(Ahn et al. 2010)
VEGFR	Ms, p	Synth. Protein entsprechend den Anteilen um Tyr-951 von humanem VEGFR (Milz; Tonsille)	N/A, DP067; Acris, Herford, Deutschland	1:200	zyt.	(Rivera et al. 2008)

## **2.4. Auswertung der Immunhistochemie**

Die Auswertung erfolgte an einem Olympus BX51-Lichtmikroskop, ausgewählte Bereiche wurden mit einer digitalen Kamera oder mittels Whole-Slide-Scanning-System (Olympus, Hamburg, Deutschland) aufgenommen. Die Immunreaktion wurde über die Fraktion der positiv gefärbten Zellen beurteilt. Zeigten mehr als 10% der Tumorzellen positive Immunreaktion, wurde der Fall als positiv für den getesteten Marker gewertet. Für die HER2-Auswertung wurde der festgelegte HER2-Score angewandt (Wolff et al. 2013). Dieser kann Werte von 0 bis 3+ annehmen, bei Werten von 2+ oder 3+ wurde HER2 als positiv gewertet.

Dies wurde von der Autorin ausgeführt und durch PD Dr. Lennerz überprüft.

## **2.5. Literaturrecherche**

Um die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen mit bereits vorhandener Literatur zu vergleichen, wurde eine Metaanalyse durchgeführt. Die folgenden Suchbegriffe wurden verwendet: „mucosal melanoma“ oder „melanoma“, beide in Kombination mit jedem einzelnen Marker. Insgesamt wurden die Ergebnisse aus 33 Arbeiten zusammengetragen. Für jede Studie wurde die Gesamtzahl der positiv gefärbten und getesteten Fälle tabellarisch aufgelistet.

Dies wurde von der Autorin ausgeführt. Um auszuschließen, dass Fälle übersehen wurden, wurde die Suche von zwei unabhängigen Mitarbeitern (PD Dr. Lennerz und Dr. Weissinger) des Instituts für Pathologie der Universität Ulm wiederholt.

Es erfolgte außerdem eine Literaturrecherche bezüglich der anatomischen Verteilung des sinunasalen Schleimhautmelanoms der Kopf-Hals-Region. Dies wurde ebenfalls von der Autorin durchgeführt und die Ergebnisse mittels Microsoft Excel 2007 (Microsoft, Redmond, WA, USA) zu einer Tabelle verarbeitet.

## **2.6. Statistische Auswertung**

Für die Kontingenzanalyse wurde der Exakte Test nach Fisher (kategorische, dichotome Daten), der Chi-Quadrat-Test (kategorische Daten mit mehr als zwei Ausprägungen) und der *t*-Test (Vergleich zweier Mittelwerte) verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Microsoft Excel 2007 (Microsoft, Redmond, WA, USA) und der online frei verfügbaren Version von GraphPad



QuickCalcs (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/>). Als statistisch signifikant wurden  $p$ -Werte  $<0,05$  angesehen. Für die Berechnung der Überlebenswahrscheinlichkeiten wurde die Kaplan-Meier-Methode angewandt. Univariate Überlebenszeitanalysen erfolgten mit dem Logrank-Testverfahren.

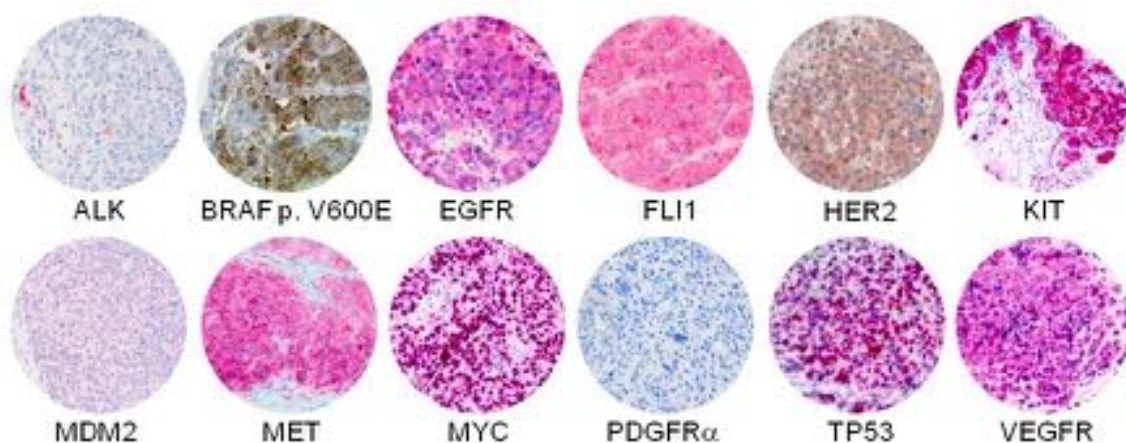
Um die Verteilung der Marker in den Kohorten darzustellen, wurde eine Heatmap mittels der frei verfügbaren Software R (<http://www.r-project.org>; Version 2.13.2) erstellt. Der Befehl wurde mittels der „pheatmap“ Bibliothek und der „hclust“ Funktion generiert. Die generierte Heatmap wurde mittels Microsoft Power Point 2007 (Microsoft, Redmond, WA, USA) graphisch bearbeitet und daraus die Abbildung 2 erstellt.

Dies wurde von der Autorin ausgeführt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Klinisch-pathologische Eigenschaften der Kohorten

Untersucht wurden zwei unabhängige Kohorten, jede bestehend aus 10 Patienten mit Schleimhautmelanomen der sinunasalen Region. Für alle 20 Fälle wurden immunhistochemische Färbungen mit den oben genannten Antikörpern durchgeführt. Abbildung 1 zeigt repräsentativ für jeden Marker Ergebnisse aus 12 verschiedenen Fällen.



**Abbildung 1. Biopanel.**

Kombination aus 12 Antikörpern gegen Proteine, die als prognostische Marker oder therapeutische Targets in Frage kommen könnten. Verwendet wurden die Detektionssysteme mittels alkalischer Phosphatase (rot) oder Immunperoxidase (braun). Dargestellt sind repräsentative Bilder von 12 verschiedenen Fällen. *Abkürzungen:* ALK, Anaplastische Lymphomkinase; BRAF p. V600E, Proto-onkogenes B-Raf Protein mit Mutation an der Aminosäureposition 600; EGFR, Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor; FLI-1, Friend leukemia integration-1 transcription factor; HER2, Humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2; KIT, Rezeptor Thyrosinkinase; MDM2, Mouse double minute 2 homolog; MET, Rezeptor-Tyrosin-Kinase in Hepatozyten; MYC, V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog; PDGFR $\alpha$ , Platelet-derived growth factor receptor, alpha; TP53, Tumorsuppressor-Protein 53; VEGFR, Vascular Endothelial Growth Factor. Modifiziert nach (Grünmüller et al. 2016).

Einen Überblick über die klinischen Parameter der Screening- und Validierungskohorte gibt Tabelle 2. Der Vergleich der klinischen Eigenschaften zwischen beiden Kohorten zeigte keine signifikanten Unterschiede ( $p$ -Bereich: 0,13-1,00), deshalb wurden die Kohorten für einige Auswertungen kombiniert. Betrachtete man die anatomische Lokalisation der Tumore (Abbildung 2A), zeigte sich, dass die häufigste Lokalisation mit 45% die Nasenhaupthöhle war (N=9/20), gefolgt von den Nasennebenhöhlen (25%; N=5/20), Nasenhaupthöhle und Nasennebenhöhle (20%; N=4/20) und dem Ductus nasolacrimalis (Tränen-Nasen-Gang) (10%; N=2/20). Trotz der kleinen Kohortengröße war die anatomische

Verteilung vergleichbar mit bisher publizierten Arbeiten (Tabelle 3), weshalb die zwei Kohorten als repräsentativ für das sinunasale Schleimhautmelanom betrachtet werden können.

**Tabelle 2. Eigenschaften der Screening- und Validierungskohorte.**

Die Screening-Kohorte besteht aus Patienten, die von 2007 bis 2010 am Institut für Pathologie der Universität Ulm untersucht wurden. Die Validierungskohorte besteht aus Fällen der Universitätsklinik Essen. Die *p*-Werte stammen vom *t*-Test (medianes Alter), dem Exakten Test nach Fisher (Geschlecht, Pigmentation, Stadium) und dem Chi-Quadrat-Test (Lokalisation und Behandlung). *Abkürzungen*: N, n, Anzahl der Fälle; NH, Nasenhaupthöhle; NNH, Nasennebenhöhle; max., maximal; min., minimal. Modifiziert nach (Grünmüller et al. 2016).

Eigenschaften	Screening-Kohorte (N=10)	Validierungskohorte (N=10)	<i>p</i> -Wert
<b>Alter (Jahre)</b>			
Median	71	60	0,31
min.-max.	42-88	47-78	
	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	
<b>Geschlecht</b>			1,0
weiblich	7 (70)	7 (70)	
männlich	3 (30)	3 (30)	
<b>Lokalisation</b>			0,35
NH	4 (40)	5 (50)	
NNH	3 (30)	2 (20)	
NH und NNH	1 (10)	3 (30)	
Ductus nasolacrimalis	2 (20)	-	
<b>Stadium</b>			0,17
III	4 (40)	8 (80)	
IVA/B	6 (60)	1/1 (20)	
<b>Behandlung</b>			0,13
Operation	5 (50)	2 (20)	
Operation+ Bestrahlung	2 (20)	5 (50)	
Operation+ Immuntherapie	1 (10)	3 (30)	
Palliative Behandlung	2 (20)	-	
<b>Pigmentation</b>			0,65
Ja	5 (50)	7 (70)	
Nein	5 (50)	3 (30)	

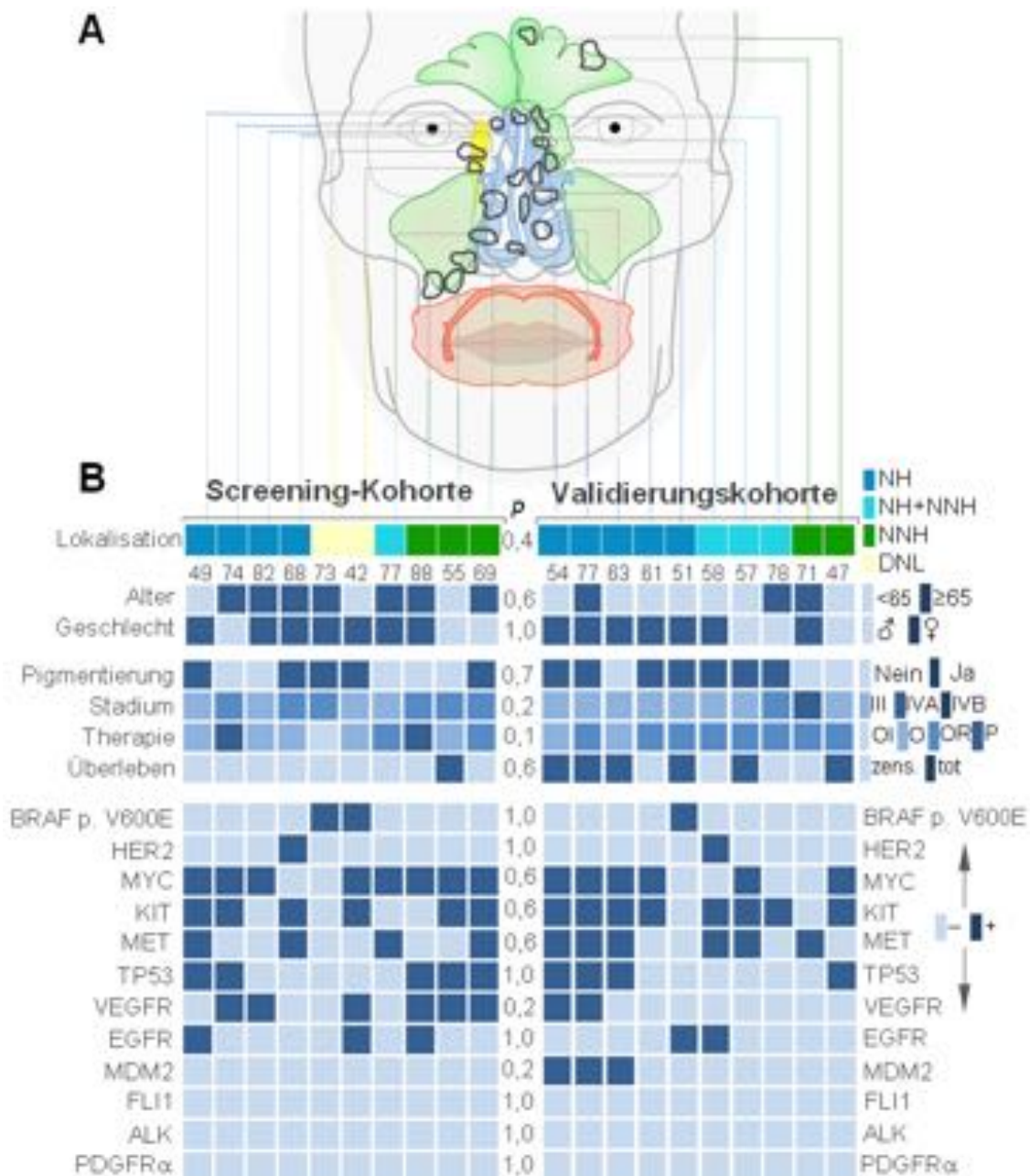
**Tabelle 3. Anatomische Verteilung in der Literatur.**

Abkürzungen: NH, Nasenhaupthöhle; NNH, Nasennebenhöhle; NP, Nasopharynx; MH, Mundhöhle; LA, Larynx. Modifiziert nach (Grünmüller et al. 2016).

Quelle	Lokalisation						Gesamt
	NH	MH	NNH	NP	LA	Andere	
(Benlyazid et al. 2010)	145	12	0	0	0	3	160
(Kanetaka et al. 2011)	8	0	5	0	0	0	13
(Manolidis et al. 1997)	10	1	3	0	0	0	14
(Moreno et al. 2010)	40	0	17	1	0	0	58
(Nakashima et al. 2008)	9	13	5	4	0	0	31
(Prasad et al. 2004)	29	20	10	1	1	0	61
(Tas et al. 2013)	11	21	9	0	0	0	41
<b>Summe</b>	<b>252</b>	<b>67</b>	<b>49</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>378</b>
<b>%</b>	<b>66,7</b>	<b>17,7</b>	<b>13,0</b>	<b>1,6</b>	<b>0,3</b>	<b>0,8</b>	

### 3.2. Expressionsfrequenz der Biomarker

In Abbildung 2B sind die klinischen Eigenschaften und Ergebnisse des Biopanel für jeden einzelnen Fall dargestellt, bestehend aus insgesamt 240 Datenpunkten (N=10 Fälle x 12 Marker x 2 Kohorten). In der Screening Kohorte waren 29,9% (N=35/120) der gefärbten Fälle positiv und in der Validierungskohorte zeigten 27,5% der Fälle eine positive Immunreaktion (N=33/120;  $p=0,89$ ; Exakter Test nach Fisher). Beim Vergleich der Expressionsfrequenzen jedes einzelnen Markers waren keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Kohorten festzustellen ( $p$ -Bereich: 0,2-1,0, Exakter Test nach Fisher; Abbildung 2B). In beiden Kohorten konnte für BRAF p. V600E, HER2 und MYC eine sich gegenseitig ausschließende Verteilung festgestellt werden. Unterschiede waren lediglich bei der MDM2-Färbung festzustellen, in der Validierungskohorte waren drei Fälle positiv, in der Screening-Kohorte jedoch keiner. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in jedem Fall mindestens ein klinisch relevantes Protein nachzuweisen war, trotz fehlender Positivität für FLI1, ALK und PDGFR $\alpha$ .



**Abbildung 2. Lokalisation der Tumore und Biopanel Ergebnisse.**

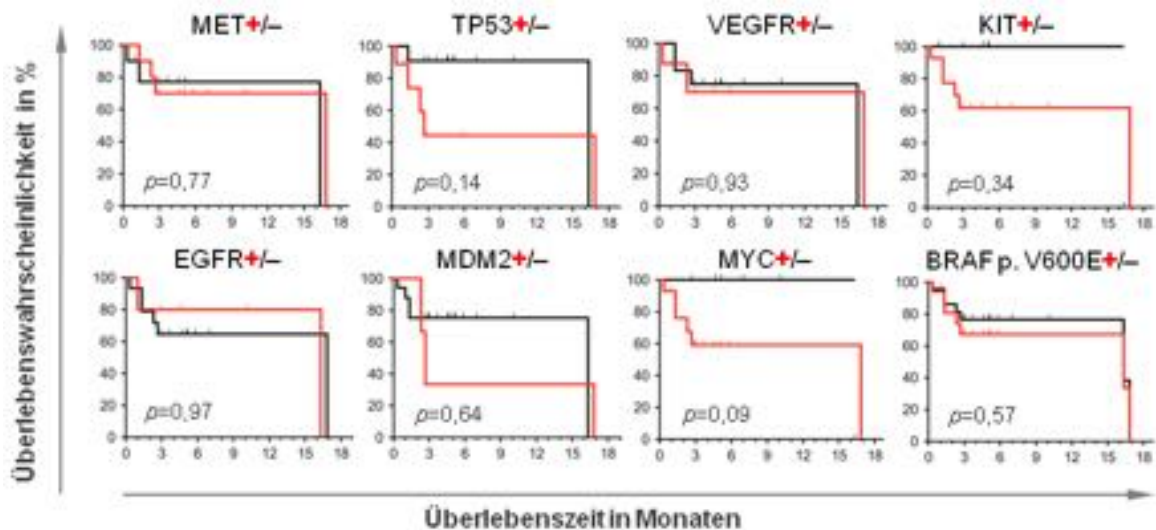
**A.** Dargestellt ist die anatomische Lokalisation der Tumore. Anmerkung: Die Größe der eingezeichneten Kreise steht nicht im Verhältnis mit der tatsächlichen Tumorgöße, außerdem wurde die Seite (rechts oder links) nicht berücksichtigt. **B.** Für jeden einzelnen Fall (Spalte) sind die klinischen Eigenschaften und immunhistochemischen Ergebnisse (Zeile) dargestellt. Neun Biomarker waren in mindestens einem der Fälle positiv, wohingegen ALK, FLI1 und PDGFR $\alpha$  keine positive Reaktion zeigten. Zu beachten ist, dass beide Tumore, die im Ductus nasolacrimalis lokalisiert waren, Positivität für BRAF p. V600E zeigten. *Abkürzungen:* +, immunhistochemisch positiv; -, immunhistochemisch negativ; ALK, Anaplastische Lymphomkinase; BRAF p. V600E, Proto-onkogenes B-Raf Protein mit Mutation an der Aminosäureposition 600; DNL, Ductus nasolacrimalis; EGFR, Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor; FLI-1, Friend leukemia integration-1 transcription factor; HER2, Humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2; I, Immuntherapie; KIT, Rezeptor Tyrosinkinase; MDM2, Mouse double minute 2 homolog; MET, Rezeptor-Tyrosin-Kinase in Hepatozyten; MYC, V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog; NH, Nasenhaupthöhle; NNH, Nasennebenhöhle; O, Operation; P, Palliative Behandlung; PDGFR $\alpha$ , Platelet-derived growth factor receptor, alpha; R, Bestrahlung; TP53, Tumorsuppressor-Protein 53; VEGFR, Vascular Endothelial Growth Factor; zens., zensiert. Modifiziert nach (Grünmüller et al. 2016).

### 3.3. Zusammenhang von Biomarkerstatus und klinisch-pathologischen Parametern

Beim Vergleich der klinisch-pathologischen Eigenschaften mit dem Biomarkerstatus zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem *BRAF* V600E-Mutationsstatus und der anatomischen Lokalisation. Alle *BRAF* p. V600E positiven Tumore lagen im Ductus nasolacrimalis ( $p=0,01$ ; Exakter Test nach Fisher). Weiterhin waren alle *MDM2* positiven Tumoren in der Nasenhöhle lokalisiert, befanden sich in Stadium III und alle Patienten waren weiblich. *BRAF* p. V600E oder *HER2* positive Tumore waren pigmentiert und die Patienten waren ebenfalls weiblich. Untersucht wurde außerdem das mediane Erkrankungsalter in Bezug auf die Positivität bzw. Negativität eines jeden Markers. Es zeigte sich, dass *KIT*-positive Patienten signifikant jünger als *KIT*-negative Patienten waren (Medianes Alter *KIT*+: 59,5 Jahre vs. *KIT*-: 75 Jahre;  $p=0,04$ ; *t*-Test).

### 3.4. Überlebenszeitanalyse

Das mediane Gesamtüberleben aller 20 Patienten betrug 40 Monate (Spannbreite: 4-202 Monate), zwischen den Kohorten konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Screening-Kohorte: 46 Monate, Spannbreite: 4-70 Monate vs. Validierungskohorte: 38 Monate, Spannbreite: 44-202 Monate;  $p=0,21$ ; *t*-Test). Um herauszufinden, ob die Expression der Proteine prognostische Bedeutung hat, wurde die Gesamtüberlebenszeit für jeden einzelnen Marker untersucht. Die Kaplan-Meyer-Kurven in Abbildung 3, lassen teilweise einen aggressiveren Verlauf bei positiver Immunhistologie vermuten, z.B. bei *TP53*, *KIT* und *MYC*. Jedoch sind diese Unterschiede mit *p*-Werten von 0,09-0,34 nicht signifikant. Selbst wenn die zwei Patienten mit längerem Überleben nicht berücksichtigt werden, ist nur *TP53* mit einem kürzeren Gesamtüberleben assoziiert ( $p=0,02$ ).



**Abbildung 3. Überlebenszeitanalyse.**

Die Abbildungen zeigen Kaplan-Meier-Kurven für einige Marker des Biopanel. Die  $p$ -Werte stammen vom Logrank-Test. *Abkürzungen:* BRAF p. V600E, Proto-onkogenes B-Raf Protein mit Mutation an der Aminosäureposition 600; EGFR, Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor; KIT, Rezeptor Thyrosinkinase; MDM2, Mouse double minute 2 homolog; MET, Rezeptor-Tyrosin-Kinase in Hepatozyten; MYC, V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog; TP53, Tumorsuppressor-Protein 53; VEGFR, Vascular Endothelial Growth Factor. Modifiziert nach (Grünmüller et al. 2016).

### 3.5. Ergebnisse der Metaanalyse

In der Literatur fanden sich nur für sechs (KIT, TP53, MDM2, ALK, VEGFR und BRAF p. V600E) der hier getesteten Marker immunhistochemische Ergebnisse im Schleimhautmelanom (Tabelle 4). Um die anderen sechs Marker des Biopanel vergleichen zu können, wurden Ergebnisse von immunhistochemischen Färbungen beim konventionellen malignen Melanom herangezogen.

**Tabelle 4. Metaanalyse der Literatur.**

Für jeden Marker wurde nach immunhistochemischen Färbungen im Schleimhautmelanom gesucht. Die Anzahl der insgesamt getesteten und positiven Fälle sind für jede einzelne Arbeit aufgelistet. Die fett gedruckten Marker wurden hier zum ersten Mal im Schleimhautmelanom getestet, deshalb wurden Daten des konventionellen malignen Melanoms zum Vergleich verwendet (grau). *Abkürzungen:* ALK, Anaplastische Lymphomkinase; BRAF p. V600E, Proto-onkogenes B-Raf Protein mit Mutation an der Aminosäureposition 600; EGFR, Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor; FLI-1, Friend leukemia integration-1 transcription factor; HER2, Humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2; KIT, Rezeptor Thyrosinkinase; MDM2, Mouse double minute 2 homolog; MET, Rezeptor-Tyrosin-Kinase in Hepatozyten; MYC, V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog; PDGFR $\alpha$ , Platelet-derived growth factor receptor, alpha; PMID, Pub Med Identification; TP53, Tumorsuppressor-Protein 53; VEGFR, Vascular Endothelial Growth Factor. Modifiziert nach (Grünmüller et al. 2016).

Marker	PMID	Anzahl der Positiven	Anzahl der Getesteten	%
KIT	16753594	12	16	75,0
	16908931	3	15	20,0
	17372901	7	20	35,0
	18066592	16	18	88,9
	19018266	40	44	90,9
	19035443	3	6	50,0
	19718013	52	61	85,2
	21325067	74	167	44,3
	21680547	25	71	35,2
	21495997	2	3	66,7
	22736149	24	28	85,7
	<b>Summe</b>	<b>258</b>	<b>449</b>	<b>57,5</b>
TP53	11287287	2	13	15,4
	15457096	21	30	70,0
	16094622	7	12	58,3
	20615750	6	24	25,0
	22160615	16	76	21,1
	<b>Summe</b>	<b>52</b>	<b>155</b>	<b>33,5</b>
MYC	7633656	26	60	43,3
	<b>Summe</b>	<b>26</b>	<b>60</b>	<b>43,3</b>
MDM2	20615750	3	26	11,5
	<b>Summe</b>	<b>3</b>	<b>26</b>	<b>11,5</b>
HER2	14502781	0	49	0,0
	<b>Summe</b>	<b>0</b>	<b>49</b>	<b>0,0</b>
EGFR	21352258	13	114	11,4
	<b>Summe</b>	<b>13</b>	<b>114</b>	<b>11,4</b>
MET	17453948	18	60	30,0
	<b>Summe</b>	<b>18</b>	<b>60</b>	<b>30,0</b>
ALK	23751074	0	28	0,0
	<b>Summe</b>	<b>0</b>	<b>28</b>	<b>0,0</b>
FLI-1	15001993	5	10	50,0
	18785112	49	97	50,5
	<b>Summe</b>	<b>54</b>	<b>107</b>	<b>50,5</b>
VEGFR	18288398	19	19	100,0
	<b>Summe</b>	<b>19</b>	<b>19</b>	<b>100,0</b>
PDGFR $\alpha$	21131919	0	10	0,0
	15846297	7	12	58,3
	<b>Summe</b>	<b>7</b>	<b>22</b>	<b>31,8</b>
BRAF p. V600E	21750866	0	18	0,0
	23817129	4	11	36,4
	15060100	0	13	0,0
	24463461	4	53	7,5
	23273605	0	26	0,0
	23751074	1	28	3,6
	21680547	2	71	2,8
	22791410	0	32	0,0
	23860532	2	56	3,6
	<b>Summe</b>	<b>13</b>	<b>308</b>	<b>4,2</b>



Die Marker-Frequenzen der einzelnen Kohorten wurden für den Vergleich mit der Literatur zusammengefasst und sind in Tabelle 5 aufgelistet. Diese Gegenüberstellung zeigt, dass in dieser Testung der Anteil an VEGFR positiven Fällen im Vergleich zur Literatur signifikant geringer ist (hier 40% vs. Literatur 100%;  $p=0,0001$ ; Exakter Test nach Fisher). Außerdem zeigten zwei der sechs neu getesteten Marker signifikant weniger positive Fälle als im konventionellen malignen Melanom (PDGFR $\alpha$  hier 0% vs. 32%;  $p<0,001$ ; FLI1 hier 0% vs. 50%;  $p<0,001$ ; Exakter Test nach Fisher). Obwohl in beiden Kohorten keinerlei positive Immunreaktion für ALK, FLI1 und PDGFR $\alpha$  nachgewiesen werden konnte, wurden diese im Biopanel belassen, um es auch bei anderen malignen Tumorerkrankungen anwenden zu können.

**Tabelle 5. Vergleich der Biopanel Ergebnisse mit der Literaturrecherche.**

Fett gedruckte Marker wurden zum ersten Mal im Schleimhautmelanom getestet. Um diese Ergebnisse vergleichen zu können, wurden Werte vom konventionellen malignen Melanom verwendet (grau). Die  $p$ -Werte stammen vom Exakten Test nach Fisher. Für detailliertere Ergebnisse siehe Tabelle 4. *Abkürzungen:* ALK, Anaplastische Lymphomkinase; BRAF p. V600E, Proto-onkogenes B-Raf Protein mit Mutation an der Aminosäureposition 600; EGFR, Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor; FLI-1, Friend leukemia integration-1 transcription factor; HER2, Humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2; KIT, Rezeptor Thyrosinkinase; MDM2, Mouse double minute 2 homolog; MET, Rezeptor-Tyrosin-Kinase in Hepatozyten; MYC, V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog; PDGFR $\alpha$ , Platelet-derived growth factor receptor, alpha; TP53, Tumorsuppressor-Protein 53; VEGFR, Vascular Endothelial Growth Factor. Modifiziert nach (Grünmüller et al. 2016).

Marker	Biopanel		Literatur		$p$ -Wert
	positiv / getestet	(%)	positiv / getestet	(%)	
KIT	14/20	(70)	258/449	(57)	0,36
TP53	9/20	(45)	52/155	(34)	0,33
<b>MYC</b>	<b>14/20</b>	<b>(70)</b>	26/60	(43)	0,07
MDM2	3/20	(15)	3/26	(12)	1,00
<b>HER2</b>	<b>2/20</b>	<b>(10)</b>	0/49	(0)	0,08
<b>EGFR</b>	<b>5/20</b>	<b>(25)</b>	13/114	(11)	0,15
<b>MET</b>	<b>10/20</b>	<b>(50)</b>	18/60	(30)	0,11
ALK	0/20	(0)	0/28	(0)	1,00
<b>FLI1</b>	<b>0/20</b>	<b>(0)</b>	54/107	(50)	<b>&lt;0,01</b>
VEGFR	8/20	(40)	19/19	(100)	<b>&lt;0,01</b>
<b>PDGFR<math>\alpha</math></b>	<b>0/20</b>	<b>(0)</b>	7/22	(32)	<b>&lt;0,01</b>
BRAF p. V600E	3/20	(15)	13/308	(4)	0,07

## **4. Diskussion**

In dieser Arbeit wurden 20 sinunasale Schleimhautmelanome mittels eines Biopanel untersucht. Dieses Biopanel bestand aus 12 klinisch relevanten und/oder potentiell gezielt behandelbaren Proteinen. Die Proteine wurden mittels immunhistochemischen Verfahren nachgewiesen und die Expressionsfrequenzen der einzelnen Marker dokumentiert. In jedem Fall konnte mindestens einer der Biomarker nachgewiesen werden. Das zeigt, dass mit Hilfe eines Biopanel potentiell bedeutende Zielstrukturen leicht zu identifizieren sind und die Daten für klinische Biomarker-stratifizierte Studien verwendet werden können.

### **4.1. Bessere Studienplanung durch die Verwendung von Biopanel**

Diagnostik-Panels werden heutzutage erfolgreich angewendet und sind im Bereich des NGS von Tumoren bereits gängige Praxis (Duncavage et al. 2015; Luthra et al. 2015; Zhao et al. 2015). Die kombinierte Testung von mehreren klinischen und/oder therapeutisch relevanten Biomarkern auf Proteinebene wurde im sinunasalen Melanom laut der hier erfolgten Literaturrecherche bisher nicht durchgeführt (Tabelle 4) und das obwohl man mittlerweile weiß, dass der Nachweis von Markern auf Gewebeebene klare Vorteile hat (Kwak et al. 2015; Snuderl et al. 2011) und die kombinierte Testung von mehreren Molekülen, z.B. in Studien mit pharmakologischen Fragestellungen, erfolgreich ist (Fryknas et al. 2006; Zhang et al. 2006). Die gleichzeitige Anwendung von mehreren immunhistochemischen Färbungen ist in der Tumordiagnostik nichts Neues, so sind immunhistochemische Panels z.B. in der Lymphom-Diagnostik oder bei der Untersuchung von Tumoren unbekanntem Ursprungs fester Bestandteil der Diagnosestellung (Centeno et al. 2010). Das hier vorgestellte Biopanel dient jedoch einem anderen Zweck. Durch die praktikable Anwendung mittels Immunhistochemie ist es möglich, Protein-Profile zu erstellen, um diese dann für weitere Studienplanung und Hypothesen-Aufstellung zu verwenden. Die Expressionsfrequenzen in dieser Studie zeigen, dass der Ansatz für das sinunasale Schleimhautmelanom technisch machbar wäre.

## 4.2. Bedeutung der Expression eines Biomarkers im Hinblick auf das Ansprechen der Targeted-Therapy

Auf den ersten Blick ist es verlockend anzunehmen, dass die Expression eines Biomarkers auch Sensitivität gegenüber dem dazugehörigen Target bedeutet, z.B. Crizotinib bei einer MET-Expression. Doch man kann nicht davon ausgehen, dass ein Medikament bei verschiedenen Tumorentitäten dieselbe Wirkung zeigt, weshalb dies zuvor in klinischen Studien bestätigt werden sollte und ein Off-Label-Use zu vermeiden ist (Bailey et al. 2014). Dies gilt auch für die Ergebnisse des hier vorgestellten Biopanel, weitere klinische Studien können dadurch nicht ersetzt werden. Das Vorhandensein eines Biomarkers und das Ansprechen auf die Targeted-Therapy sind extrem kontextabhängig. Findet das Medikament bei bisher noch nicht indizierten Krankheiten Anwendung, kann dies zu stark Fall-basiertem Ansprechen führen, z.B. der Zusammenhang zwischen *BRAF* V600E-Mutationen und der Sensitivität gegenüber Vemurafenib (Bubolz et al. 2014). Betrachtet man jedoch die Vemurafenib-Therapie beim kolorektalen Karzinom, sprechen nur weniger als 5% der *BRAF*-mutierten Karzinome auf die Therapie an (Kopetz et al. 2015). Dennoch, ist die Kenntnis von pharmakologischen Zielstrukturen Voraussetzung für weitere Studien (Mullins et al. 2012), besonders bei seltenen Tumorentitäten und Erkrankungen, oder wenn es darum geht, Studien durch die Verwendung von Biomarkern zu optimieren. Bezüglich des Einsatzes von Biomarkern in Studien sowie deren Bedeutung im klinischen Alltag ist die Anwendung von Biopaneln sinnvoll (Mullins et al. 2012).

## 4.3. Die Zusammensetzung eines Biopaneln

Die stufenweise Testung mittels unabhängiger Techniken gewinnt immer mehr an Bedeutung (Choudhary et al. 2014; Jabbar et al. 2015). In naher Zukunft könnten Biopaneln nicht nur für Screening-Tests, sondern gleichzeitig auch für Bestätigungs-Tests verwendet werden, z.B. für Fusionsgene oder Effektormoleküle von Signalkaskaden (Zheng et al. 2014). Betrachtet man die praktische Umsetzung im Labor, ist die Reproduzierbarkeit ein Problem, und es ist anzunehmen, dass die Zusammensetzung von Biopaneln unterschiedlich sein wird. Zum Beispiel sind in dieser Arbeit spezifische Antikörper gegen IDH1 R132H-Mutationen (Jabbar et al. 2015) oder PD-L1 kein Bestandteil des Biopaneln. Jedoch wurde PD-L1 mittlerweile in einer weiteren Studie untersucht

(Thierauf et al. 2015). Diese zeigte, dass dieser Biomarker in das Biopanel integriert werden könnte (Zhu et al. 2016). Obwohl die Zusammensetzung des Biopaneln variieren mag, ist es mittels Immunhistochemie möglich, das Biopanel einfach und schnell anzuwenden.

#### 4.4. Stellenwert der exprimierten Biomarker

Die Anwendung des Biopaneln lieferte für jeden einzelnen Patienten ein individuelles Protein-Profil. Die kleine Kohortengröße stellte nicht unbedingt eine Einschränkung dar, denn bei jedem Patienten konnte mindestens eines der potentiell bedeutenden Proteine nachgewiesen werden. Die hohe Rate an nachgewiesenen Biomarkern ist teilweise durch die sich gegenseitig ausschließende Verteilung von einigen Markern bedingt (BRAF p. V600E, HER2, MYC; Abbildung 2B), außerdem standen bei einem Teil der Marker keine Daten für das sinunasale Melanom zur Verfügung (Tabelle 4), so beispielsweise für MET. MET ist ein anerkanntes, therapeutisch wichtiges Zielprotein in anderen soliden Tumoren (Skead et al. 2015) und MET-positive maligne Melanomen zeigen einen aggressiveren Verlauf (Cruz et al. 2003). VEGFR zeigte einen geringen Anteil an positiven Fällen im Vergleich zu einer vorherigen Studie (40% in dieser Studie vs. 100%) (Rivera et al. 2008). Das völlige Fehlen von FLI1- oder PDGFR $\alpha$ -Expression in den hier untersuchten Kohorten deutet auf Unterschiede zum konventionellen malignen Melanom hin, bei welchem beide Marker signifikant höhere Expressions-Frequenzen zeigten (Tabelle 4). Natürlich können technische Unterschiede zu dieser Beobachtung beigetragen haben (Langer et al. 2011; Ugurel et al. 2005). Die Expressionsfrequenz von KIT war ähnlich groß wie in früheren Publikationen (in dieser: 70%; N=14/20, Literatur: 57%; N=258/449;  $p=0,36$ ; Exakter Test nach Fisher), und obwohl wir keine Unterschiede bezüglich des Überlebens feststellen konnten (Abbildung 3), scheinen KIT-positive Melanome mit einem aggressiveren Verlauf assoziiert zu sein (Kong et al. 2011). Berücksichtigt man die zwei Patienten mit längerem Überleben nicht, so ist nur TP53 mit einem kürzeren Gesamtüberleben assoziiert ( $p=0,02$ ) (Fritsche et al. 2015; Prasad et al. 2012; Ragnarsson-Olding et al. 2004). Zu beachten ist, dass die Anzahl der hier untersuchten Patienten zu klein ist, um eine Aussage bezüglich der prognostische Relevanz der einzelnen Marker zu treffen (Abbildung

3), jedoch kann die fehlende Expression von ALK, FLI1 und PDGFR $\alpha$  hilfreich für weitere Studienplanungen sein.

#### **4.5. Seltenheit der *BRAF* V600E-Mutationen im sinunasalen Melanom**

In einer großen Mehrheit von kutanen malignen Melanomen konnten aktivierende Mutationen des *BRAF*-Onkogens nachgewiesen werden (El-Osta et al. 2011). Eine der effektivsten Behandlungsmethoden stellt die Targeted-Therapy von *BRAF* V600E-Mutationen dar (Da Rocha Dias et al. 2013). Im Schleimhautmelanom kommen *BRAF* V600E-Mutationen nicht so häufig vor (Buery et al. 2011; Edwards et al. 2004), das bestätigte auch diese Studie. Davon ausgenommen waren zwei *BRAF* p. V600E positive Tumore, welche im Ductus nasolacrimalis lokalisiert waren. Möglicherweise besteht in diesen beiden Fällen eine Beziehung zum konjunktivalen Melanom, in welchem *BRAF*-Mutationen häufiger vorkommen (Kenawy et al. 2013). Folglich scheint die Durchführung der *BRAF* p. V600E-Testung nur bei Tumoren des Tränen-Nasengang-Systems oder des konjunktivalen Systems Sinn zu machen. Die Ergebnisse dieser Studie sollten jedoch nicht als Argument gegen die Genotypisierung von sinunasalen Melanomen interpretiert werden, denn Schleimhautmelanome tragen ebenso *CKIT*, *NRAS*, *GNAQ* oder *GNA11* Mutationen, welche zumindest teilweise auf eine zielgerichtete Therapie ansprechen (Carvajal et al. 2011; Guo et al. 2011; Hodi et al. 2013; Hodis et al. 2012; Marchant et al. 2014; Si et al. 2014).

In dieser Studie wurden Biomarker mit wiederkehrender Expression in sinunasalen Melanomen vorgestellt. Aufgrund der Tatsache, dass die Immunhistochemie in der Routinediagnostik weit verbreitet ist, kann dieses Biopanel zum Screening von Gewebeproben verwendet werden. Das abgeleitete Protein-Profil kann als Ausgangspunkt für die Entwicklung von Biomarker-stratifizierten Studien dienen.

## 5. Zusammenfassung

Das sinunasale Schleimhautmelanom ist eine seltene Erkrankung. In Kombination mit dem meist fortgeschrittenen Stadium bei Diagnosestellung und dem Fehlen von *BRAF*-Mutationen (Proto-onkogenes B-Raf Gen) ist eine optimale Therapie schwierig. Auch die Entwicklung von geeigneten Studien zur Therapieoptimierung stellt aufgrund der Seltenheit und Aggressivität der Tumore eine Herausforderung dar. Obwohl die Kenntnis von potentiell angreifbaren Strukturen Voraussetzung für neue pharmakologische Ansätze ist, gibt es derzeit noch keine Daten bezüglich des Expressionsstatus von wichtigen onkologischen Zielstrukturen im sinunasalen Schleimhautmelanom. Deshalb wurden die 12 folgenden onkologisch relevanten Proteine ausgewählt, KIT (Tyrosinkinase, die sich als Rezeptor an der Zelloberfläche befindet), TP53 (Tumorsuppressor-Protein 53), MYC (*V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog (engl.)*), Transkriptionsfaktor, der z.B. Zellproliferation reguliert), MDM2 (*Mouse double minute 2 homolog (engl.)*), Regulator des Tumorsuppressorgens p53), HER2 (Humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2), EGFR (Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor), MET (Rezeptor-Tyrosin-Kinase in Hepatozyten), ALK (Anaplastische Lymphomkinase), FLI-1 (*Friend leukemia integration-1 transcription factor (engl.)*), ein Transkriptionsfaktor mit proto-onkogenen Eigenschaften), VEGFR (*Vascular Endothelial Growth Factor (engl.)*, Endothelwachstumsfaktor), PDGFR $\alpha$  (*Platelet-derived growth factor receptor, alpha (engl.)*, Wachstumsfaktor) und BRAF p. V600E (Protein mit Mutation an der Aminosäureposition 600) und in zwei unabhängigen Kohorten des sinunasalen Schleimhautmelanoms getestet (N=20).

In allen Fällen wurde mindestens eines der Proteine exprimiert, die Screening-Kohorte zeigte in 29,9% und die Validierungskohorte in 27,5% der Fälle eine positive Immunreaktion. *BRAF* V600 E-Mutationen konnten nur in zwei Tumoren nachgewiesen werden, welche im Tränen-Nasen-Gang lokalisiert waren. Dies und die fehlende Expression von ALK, FLI1 und PDGFR $\alpha$  unterstreichen den Unterschied zum kutanen malignen Melanom. Der Vergleich der Expressionsfrequenzen mit einer Metaanalyse zeigte, dass MYC, HER2, EGFR und MET bisher noch nicht im Schleimhautmelanom getestet wurden.

Immunhistochemische Nachweismethoden sind fester Bestandteil der pathologischen Routinediagnostik, dadurch kann das Biopanel leicht angewendet und das daraus entstandene Protein-Profil für die Studienplanung verwendet werden, z.B. für die Entwicklung von Biomarker-stratifizierten Studien, um neue Therapieoptionen zu untersuchen.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Ahn H J, Na I I, Park Y H, Cho S Y, Lee B C, Lee G H, Koh J S, Lee Y S, Shim Y S, Kim Y K, Kang H J, Ryoo B Y, Yang S H: Role of adjuvant chemotherapy in malignant mucosal melanoma of the head and neck. *Oral Oncol* 46: 607-611 (2010)
2. Bailey A M, Mao Y, Zeng J, Holla V, Johnson A, Brusco L, Chen K, Mendelsohn J, Routbort M J, Mills G B, Meric-Bernstam F: Implementation of biomarker-driven cancer therapy: existing tools and remaining gaps. *Discov Med* 17: 101-114 (2014)
3. Benlyazid A, Thariat J, Temam S, Malard O, Florescu C, Choussy O, Makeieff M, Poissonnet G, Penel N, Righini C, Toussaint B, Lacau St Guily J, Vergez S, Filleron T: Postoperative radiotherapy in head and neck mucosal melanoma: a GETTEC study. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 136: 1219-1225 (2010)
4. Biomarkers Definitions Working Group: Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 69: 89-95 (2001)
5. Boone B, Jacobs K, Ferdinande L, Taildeman J, Lambert J, Peeters M, Bracke M, Pauwels P, Brochez L: EGFR in melanoma: clinical significance and potential therapeutic target. *J Cutan Pathol* 38: 492-502 (2011)
6. Bubolz A M, Weissinger S E, Stenzinger A, Arndt A, Steinestel K, Bruderlein S, Cario H, Lubatschowski A, Welke C, Anagnostopoulos I, Barth T F, Beer A J, Moller P, Gottstein M, Viardot A, Lennerz J K: Potential clinical implications of BRAF mutations in histiocytic proliferations. *Oncotarget* 5: 4060-4070 (2014)
7. Buery R R, Siar C H, Katase N, Gunduz M, Lefeuvre M, Fujii M, Inoue M, Setsu K, Nagatsuka H: NRAS and BRAF mutation frequency in primary oral mucosal melanoma. *Oncol Rep* 26: 783-787 (2011)
8. Capper D, Preusser M, Habel A, Sahm F, Ackermann U, Schindler G, Pusch S, Mechtersheimer G, Zentgraf H, von Deimling A: Assessment of BRAF



- V600E mutation status by immunohistochemistry with a mutation-specific monoclonal antibody. *Acta Neuropathol* 122: 11-19 (2011)
9. Carvajal R D, Antonescu C R, Wolchok J D, Chapman P B, Roman R A, Teitcher J, Panageas K S, Busam K J, Chmielowski B, Lutzky J, Pavlick A C, Fusco A, Cane L, Takebe N, Vemula S, Bouvier N, Bastian B C, Schwartz G K: KIT as a therapeutic target in metastatic melanoma. *JAMA Oncol* 305: 2327-2334 (2011)
  10. Centeno B A, Bloom G, Chen D T, Chen Z, Gruidl M, Nasir A, Yeatman T Y: Hybrid model integrating immunohistochemistry and expression profiling for the classification of carcinomas of unknown primary site. *J Mol Diagn* 12: 476-486 (2010)
  11. Chai D, Yue Y, Xu W, Dong C, Xiong S: Mucosal co-immunization with AIM2 enhances protective SIgA response and increases prophylactic efficacy of chitosan-DNA vaccine against coxsackievirus B3-induced myocarditis. *Hum Vaccin Immunother* 10: 1284-1294 (2014)
  12. Choudhary A, Mambo E, Sanford T, Boedigheimer M, Twomey B, Califano J, Hadd A, Oliner K S, Beaudenon S, Latham G J, Adai A T: Evaluation of an integrated clinical workflow for targeted next-generation sequencing of low-quality tumor DNA using a 51-gene enrichment panel. *BMC Med Genomics* 7: 62-84 (2014)
  13. Christopherson K, Malyapa R S, Werning J W, Morris C G, Kirwan J, Mendenhall W M: Radiation therapy for mucosal melanoma of the head and neck. *Am J Clin Oncol* 38: 87-89 (2015)
  14. Cohen Y, Rosenbaum E, Begum S, Goldenberg D, Esche C, Lavie O, Sidransky D, Westra W H: Exon 15 BRAF mutations are uncommon in melanomas arising in nonsun-exposed sites. *Clin Cancer Res* 10: 3444-3447 (2004)
  15. Compton CC, Byrd DR, Garcia-Aguilar J, Kurtzman SH, Olawaiye A, Washington MK: über Mucosal Melanoma of the Head and Neck. In: Compton

- CC, Byrd DR, Garcia-Aguilar J, Kurtzman SH, Olawaiye A, Washington MK  
AJCC Cancer Staging Atlas, 2. Auflage, Springer, New York, S. 121-125  
(2012)
16. Cruz J, Reis-Filho J S, Silva P, Lopes J M: Expression of c-met tyrosine kinase receptor is biologically and prognostically relevant for primary cutaneous malignant melanomas. *Oncology* 65: 72-82 (2003)
17. Da Rocha Dias S, Salmonson T, van Zwieten-Boot B, Jonsson B, Marchetti S, Schellens J H, Giuliani R, Pignatti F: The European Medicines Agency review of vemurafenib (Zelboraf(R)) for the treatment of adult patients with BRAF V600 mutation-positive unresectable or metastatic melanoma: summary of the scientific assessment of the Committee for Medicinal Products for Human Use. *Eur J Cancer* 49: 1654-1661 (2013)
18. Duncavage E J, Tandon B: The utility of next-generation sequencing in diagnosis and monitoring of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Int J Lab Hematol* 37: 115-121 (2015)
19. Edwards R H, Ward M R, Wu H, Medina C A, Brose M S, Volpe P, Nussen-Lee S, Haupt H M, Martin A M, Herlyn M, Lessin S R, Weber B L: Absence of BRAF mutations in UV-protected mucosal melanomas. *J Med Genet* 41: 270-272 (2004)
20. El-Osta H, Falchook G, Tsimberidou A, Hong D, Naing A, Kim K, Wen S, Janku F, Kurzrock R: BRAF mutations in advanced cancers: clinical characteristics and outcomes. *PLoS One* 6: e25806 (2011)
21. Fritsche M K, Metzler V, Becker K, Plettenberg C, Heiser C, Hofauer B, Knopf A: Cisplatin fails to induce puma mediated apoptosis in mucosal melanomas. *Oncotarget* 6: 9887-9896 (2015)
22. Fryknas M, Rickardson L, Wickstrom M, Dhar S, Lovborg H, Gullbo J, Nygren P, Gustafsson M G, Isaksson A, Larsson R: Phenotype-based screening of mechanistically annotated compounds in combination with gene expression

- and pathway analysis identifies candidate drug targets in a human squamous carcinoma cell model. *J Biomol Screen* 11: 457-468 (2006)
23. Gavriel H, McArthur G, Sizeland A, Henderson M: Review: mucosal melanoma of the head and neck. *Melanoma Res* 21: 257-266 (2011)
24. Graphpad QuickCalcs, <http://www.graphpad.com/quickcalcs/>. Zuletzt benutzt im Januar 2016
25. Grünmüller L, Thierauf J, Weissinger S E, Bergmann C, Bankfalvi A, Veit J, Hoffmann T K, Möller P, Lennerz J K: Biopanel identifies expression status of targetable proteins in sinonasal melanoma. *Per Med* 13: 291-301 (2016)
26. Guo J, Si L, Kong Y, Flaherty K T, Xu X, Zhu Y, Corless C L, Li L, Li H, Sheng X, Cui C, Chi Z, Li S, Han M, Mao L, Lin X, Du N, Zhang X, Li J, Wang B, Qin S: Phase II, open-label, single-arm trial of imatinib mesylate in patients with metastatic melanoma harboring c-Kit mutation or amplification. *J Clin Oncol* 29: 2904-2909 (2011)
27. Hodi F S, Corless C L, Giobbie-Hurder A, Fletcher J A, Zhu M, Marino-Enriquez A, Friedlander P, Gonzalez R, Weber J S, Gajewski T F, O'Day S J, Kim K B, Lawrence D, Flaherty K T, Luke J J, Collichio F A, Ernstoff M S, Heinrich M C, Beadling C, Zukotynski K A, Yap J T, Van den Abbeele A D, Demetri G D, Fisher D E: Imatinib for melanomas harboring mutationally activated or amplified KIT arising on mucosal, acral, and chronically sun-damaged skin. *J Clin Oncol* 31: 3182-3190 (2013)
28. Hodis E, Watson I R, Kryukov G V, Arola S T, Imielinski M, Theurillat J P, Nickerson E, Auclair D, Li L, Place C, Dicara D, Ramos A H, Lawrence M S, Cibulskis K, Sivachenko A, Voet D, Saksena G, Stransky N, Onofrio R C, Winckler W, Ardlie K, Wagle N, Wargo J, Chong K, Morton D L, Stemke-Hale K, Chen G, Noble M, Meyerson M, Ladbury J E, Davies M A, Gershenwald J E, Wagner S N, Hoon D S, Schadendorf D, Lander E S, Gabriel S B, Getz G, Garraway L A, Chin L: A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell* 150: 251-263 (2012)

29. Inman J L, Kute T, White W, Pettenati M, Levine E A: Absence of HER2 overexpression in metastatic malignant melanoma. *J Surg Oncol* 84: 82-88 (2003)
30. Jabbar K J, Luthra R, Patel K P, Singh R R, Goswami R, Aldape K D, Medeiros L J, Routbort M J: Comparison of next-generation sequencing mutation profiling with BRAF and IDH1 mutation-specific immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol* 39: 454-461 (2015)
31. Kanetaka S, Tsukuda M, Takahashi M, Komatsu M, Niho T, Horiuchi C, Matsuda H: Mucosal melanoma of the head and neck. *Exp Ther Med* 2: 907-910 (2011)
32. Kenawy N, Lake S L, Coupland S E, Damato B E: Conjunctival melanoma and melanocytic intra-epithelial neoplasia. *Eye (Lond)* 27: 142-152 (2013)
33. Kong Y, Si L, Zhu Y, Xu X, Corless C L, Flaherty K T, Li L, Li H, Sheng X, Cui C, Chi Z, Li S, Han M, Mao L, Lu A, Guo J: Large-scale analysis of KIT aberrations in Chinese patients with melanoma. *Clin Cancer Res* 17: 1684-1691 (2011)
34. Kopetz S, Desai J, Chan E, Hecht J R, O'Dwyer P J, Maru D, Morris V, Janku F, Dasari A, Chung W, Issa J P, Gibbs P, James B, Powis G, Nolop K B, Bhattacharya S, Saltz L: Phase II Pilot Study of Vemurafenib in Patients With Metastatic BRAF-Mutated Colorectal Cancer. *J Clin Oncol* 33: 4032-4038 (2015)
35. Kwak E L, Ahronian L G, Siravegna G, Mussolin B, Godfrey J T, Clark J W, Blaszkowsky L S, Ryan D P, Lennerz J K, Iafrate A J, Bardelli A, Hong T S, Corcoran R B: Molecular Heterogeneity and Receptor Coamplification Drive Resistance to Targeted Therapy in MET-Amplified Esophagogastric Cancer. *Cancer Discov* 5: 1271-1281 (2015)
36. Langer R, Becker K, Feith M, Friess H, Hofler H, Keller G: Genetic aberrations in primary esophageal melanomas: molecular analysis of c-KIT, PDGFR,

- KRAS, NRAS and BRAF in a series of 10 cases. *Mod Pathol* 24: 495-501 (2011)
37. Lazaris A C, Theodoropoulos G E, Aroni K, Saetta A, Davaris P S: Immunohistochemical expression of C-myc oncogene, heat shock protein 70 and HLA-DR molecules in malignant cutaneous melanoma. *Virchows Arch* 426: 461-467 (1995)
38. LeBoit PE, Burg G, Weedon D, Sarasain A: über Melanocytic Tumors. In: LeBoit PE, Burg G, Weedon D, Sarasain A (Hrsg): *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Skin Tumours*, IARC Press, Lyon, S. 49-65 (2006)
39. Lengyel E, Gilde K, Remenar E, Esik O: Malignant mucosal melanoma of the head and neck. *Pathol Oncol Res* 9: 7-12 (2003)
40. Ludwig J A, Weinstein J N: Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. *Nat Rev Cancer* 5: 845-856 (2005)
41. Luthra R, Chen H, Roy-Chowdhuri S, Singh R R: Next-Generation Sequencing in Clinical Molecular Diagnostics of Cancer: Advantages and Challenges. *Cancers (Basel)* 7: 2023-2036 (2015)
42. Mallikarjuna K, Pushparaj V, Biswas J, Krishnakumar S: Expression of epidermal growth factor receptor, ezrin, hepatocyte growth factor, and c-Met in uveal melanoma: an immunohistochemical study. *Curr Eye Res* 32: 281-290 (2007)
43. Manolidis S, Donald P J: Malignant mucosal melanoma of the head and neck: review of the literature and report of 14 patients. *Cancer* 80: 1373-1386 (1997)
44. Marchant J, Mange A, Larrieux M, Costes V, Solassol J: Comparative evaluation of the new FDA approved THxID-BRAF test with High Resolution Melting and Sanger sequencing. *BMC Cancer* 14: 519-528 (2014)
45. McFadden D G, Dias-Santagata D, Sadow P M, Lynch K D, Lubitz C, Donovan S E, Zheng Z, Le L, Iafrate A J, Daniels G H: Identification of oncogenic

- mutations and gene fusions in the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 99: 2457-2462 (2014)
46. Mendenhall W M, Amdur R J, Hinerman R W, Werning J W, Villaret D B, Mendenhall N P: Head and neck mucosal melanoma. *Am J Clin Oncol* 28: 626-630 (2005)
47. Mihajlovic M, Vlajkovic S, Jovanovic P, Stefanovic V: Primary mucosal melanomas: a comprehensive review. *Int J Clin Exp Patho* 5: 739-753 (2012)
48. Moreno M A, Roberts D B, Kupferman M E, DeMonte F, El-Naggar A K, Williams M, Rosenthal D S, Hanna E Y: Mucosal melanoma of the nose and paranasal sinuses, a contemporary experience from the M. D. Anderson Cancer Center. *Cancer* 116: 2215-2223 (2010)
49. Mullins C D, Montgomery R, Abernethy A P, Hussain A, Pearson S D, Tunis S, American Society of Clinical Oncology: Recommendations for clinical trials of off-label drugs used to treat advanced-stage cancer. *J Clin Oncol* 30: 661-666 (2012)
50. Nakashima J P, Viegas C M, Fassizoli A L, Rodrigues M, Chamon L A, Silva J H, Dias F L, Araujo C M: Postoperative adjuvant radiation therapy in the treatment of primary head and neck mucosal melanomas. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 70: 344-351 (2008)
51. Narasimhan K, Kucuk O, Lin H S, Heilbrun L K, Carron M, Venkatramanamoorthy R, Mathog R: Sinonasal mucosal melanoma: a 13-year experience at a single institution. *Skull Base* 19: 255-262 (2009)
52. Nardi V, Sadow P M, Juric D, Zhao D, Cospes A K, Bergethon K, Scialabba V L, Batten J M, Borger D R, Iafrate A J, Heist R S, Lawrence D P, Flaherty K T, Bendell J C, Deschler D, Li Y, Wirth L J, Dias-Santagata D: Detection of novel actionable genetic changes in salivary duct carcinoma helps direct patient treatment. *Clin Cancer Res* 19: 480-490 (2013)
53. Niu H T, Zhou Q M, Wang F, Shao Q, Guan Y X, Wen X Z, Chen L Z, Feng Q S, Li W, Zeng Y X, Zhang X S: Identification of anaplastic lymphoma kinase

- break points and oncogenic mutation profiles in acral/mucosal melanomas. *Pigment Cell Melanoma Res* 26: 646-653 (2013)
54. Patrick R J, Fenske N A, Messina J L: Primary mucosal melanoma. *J Am Acad Dermatol* 56: 828-834 (2007)
55. Pfister D G, Ang K K, Brizel D M, Burtness B, Cmelak A J, Colevas A D, Dunphy F, Eisele D W, Gilbert J, Gillison M L, Haddad R I, Haughey B H, Hicks W L, Jr, Hitchcock Y J, Kies M S, Lydiatt W M, Maghami E, Martins R, McCaffrey T, Mittal B B, Pinto H A, Ridge J A, Samant S, Sanguineti G, Schuller D E, Shah J P, Spencer S, Trotti A, 3rd, Weber R S, Wolf G, Worden F, National Comprehensive Cancer Network: Mucosal melanoma of the head and neck. *J Natl Compr Canc Netw* 10: 320-338 (2012)
56. Prasad M L, Patel S G, Busam K J: Primary mucosal desmoplastic melanoma of the head and neck. *Head Neck Pathol* 26: 373-377 (2004)
57. Prasad M L, Patel S G, Shah J P, Hoshaw-Woodard S, Busam K J: Prognostic significance of regulators of cell cycle and apoptosis, p16(INK4a), p53, and bcl-2 in primary mucosal melanomas of the head and neck. *Head Neck Pathol* 6: 184-190 (2012)
58. R-Project, statistical computing and graphics software environment, <http://www.r-project.org>; version 2.13.2. (13.04.2014)
59. Ragnarsson-Olding B, Platz A, Olding L, Ringborg U: p53 protein expression and TP53 mutations in malignant melanomas of sun-sheltered mucosal membranes versus chronically sun-exposed skin. *Melanoma Res* 14: 395-401 (2004)
60. Rivera R S, Nagatsuka H, Gunduz M, Cengiz B, Gunduz E, Siar C H, Tsujigiwa H, Tamamura R, Han K N, Nagai N: C-kit protein expression correlated with activating mutations in KIT gene in oral mucosal melanoma. *Virchows Arch* 452: 27-32 (2008)

61. Rossi S, Orvieto E, Furlanetto A, Laurino L, Ninfo V, Dei Tos A P: Utility of the immunohistochemical detection of FLI-1 expression in round cell and vascular neoplasm using a monoclonal antibody. *Mod Pathol* 17: 547-552 (2004)
62. Satzger I, Schaefer T, Kuettler U, Broecker V, Voelker B, Ostertag H, Kapp A, Gutzmer R: Analysis of c-KIT expression and KIT gene mutation in human mucosal melanomas. *Br J Cancer* 99: 2065-2069 (2008)
63. Sequist L V, Heist R S, Shaw A T, Fidias P, Rosovsky R, Temel J S, Lennes I T, Digumarthy S, Waltman B A, Bast E, Tammireddy S, Morrissey L, Muzikansky A, Goldberg S B, Gainor J, Channick C L, Wain J C, Gaissert H, Donahue D M, Muniappan A, Wright C, Willers H, Mathisen D J, Choi N C, Baselga J, Lynch T J, Ellisen L W, Mino-Kenudson M, Lanuti M, Borger D R, Iafrate A J, Engelman J A, Dias-Santagata D: Implementing multiplexed genotyping of non-small-cell lung cancers into routine clinical practice. *Ann Oncol* 22: 2616-2624 (2011)
64. Si L, Wang X, Guo J: Genotyping of mucosal melanoma. *Chin Clin Oncol* 3: 34-41 (2014)
65. Skead G, Govender D: Gene of the month: MET. *J Clin Pathol* 68: 405-409 (2015)
66. Smith M H, Bhattacharyya I, Cohen D M, Islam N M, Fitzpatrick S G, Montague L J, Damm D D, Fowler C B: Melanoma of the Oral Cavity: an Analysis of 46 New Cases with Emphasis on Clinical and Histopathologic Characteristics. *Head Neck Pathol* 10: 298-305 (2016)
67. Snuderl M, Fazlollahi L, Le L P, Nitta M, Zhelyazkova B H, Davidson C J, Akhavanfard S, Cahill D P, Aldape K D, Betensky R A, Louis D N, Iafrate A J: Mosaic amplification of multiple receptor tyrosine kinase genes in glioblastoma. *Cancer Cell* 20: 810-817 (2011)
68. Tas F, Keskin S: Mucosal melanoma in the head and neck region: different clinical features and same outcome to cutaneous melanoma. *ISRN Dermatol* 2013: 1-5 (2013)



69. Thariat J, Poissonnet G, Marcy P Y, Lattes L, Butori C, Guevara N, Dassonville O, Santini J, Bensadoun R J, Castillo L: Effect of surgical modality and hypofractionated split-course radiotherapy on local control and survival from sinonasal mucosal melanoma. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 23: 579-586 (2011)
70. Thierauf J, Veit J A, Affolter A, Bergmann C, Grunow J, Laban S, Lennerz J K, Grunmuller L, Mauch C, Plinkert P K, Hess J, Hoffmann T K: Identification and clinical relevance of PD-L1 expression in primary mucosal malignant melanoma of the head and neck. *Melanoma Res* 25: 503-509 (2015)
71. Ugurel S, Hildenbrand R, Zimpfer A, La Rosee P, Paschka P, Sucker A, Keikavoussi P, Becker J C, Rittgen W, Hochhaus A, Schadendorf D: Lack of clinical efficacy of imatinib in metastatic melanoma. *Br J Cancer* 92: 1398-1405 (2005)
72. Weissinger S E, Keil P, Silvers D N, Klaus B M, Moller P, Horst B A, Lennerz J K: A diagnostic algorithm to distinguish desmoplastic from spindle cell melanoma. *Mod Pathol* 27: 524-534 (2014)
73. Wolff A C, Hammond M E, Hicks D G, Dowsett M, McShane L M, Allison K H, Allred D C, Bartlett J M, Bilous M, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins R B, Mangu P B, Paik S, Perez E A, Press M F, Spears P A, Vance G H, Viale G, Hayes D F, American Society of Clinical Oncology, College of American Pathologists: Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol* 31: 3997-4013 (2013)
74. Zhang W, Shannon W D, Duncan J, Scheffer G L, Scheper R J, McLeod H L: Expression of drug pathway proteins is independent of tumour type. *J Pathol* 209: 213-219 (2006)
75. Zhao Y, Polley E C, Li M C, Lih C J, Palmisano A, Sims D J, Rubinstein L V, Conley B A, Chen A P, Williams P M, Kummar S, Doroshow J H, Simon R M: GeneMed: An Informatics Hub for the Coordination of Next-Generation

Sequencing Studies that Support Precision Oncology Clinical Trials. *Cancer Inform* 14: 45-55 (2015)

76. Zheng Z, Liebers M, Zhelyazkova B, Cao Y, Panditi D, Lynch K D, Chen J, Robinson H E, Shim H S, Chmielecki J, Pao W, Engelman J A, Iafrate A J, Le L P: Anchored multiplex PCR for targeted next-generation sequencing. *Nat Med* 20: 1479-1484 (2014)
77. Zhu Z, Liu W, Gotlieb V: The rapidly evolving therapies for advanced melanoma-Towards immunotherapy, molecular targeted therapy, and beyond. *Crit Rev Oncol Hematol* 99: 91-99 (2016)

Die Danksagung wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.