

Aus der
Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie
Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Lars French

Merkelzellkarzinom
- Untersuchung häufiger tumorgenetischer Mutationen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Hendrike Sophie Förster

aus
Scherzingen (CH)

Jahr
2024

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Michael J. Flaig

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Julia Welzel

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 12.12.2024

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich diese vorgelegte Dissertation selbst verfasst und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Diese Dissertation wurde in dieser oder anderer Form weder bereits als Prüfungsarbeit verwendet, noch einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt. An keiner anderen Stelle ist ein Prüfungsverfahren beantragt.

Flensburg 12.12.2024

Hendrike Sophie Förster

1. Inhalt	
2. Einleitung	1
2.1. Das Merkelzellkarzinom	1
2.2. Histopathologie	4
2.3. Immunhistochemie und molekulare Genetik.....	5
2.4. Differenzialdiagnosen	7
2.5. Therapie.....	8
2.5.1. Chirurgische Therapie	8
2.5.2. Strahlentherapie.....	9
2.5.3. Systemische Therapie	9
2.6. Prognose.....	10
2.7. Das Merkelzellpolyomavirus.....	11
2.8. KRAS	13
2.9. EGFR.....	13
2.10. Zielsetzung der Arbeit	14
3. Material und Methoden.....	15
3.1. Patientinnen- und Patientenmaterial	15
3.2. Pyrosequenzierung von KRAS	16
3.3. Sanger-Methode von EGFR.....	18
3.4. Next Generation Sequencing (NGS)	19
4. Ergebnisse	24
4.1. Patientinnen- und Patientenmaterial	24
4.2. EGFR.....	28
4.3. Cancer Hot Spot Panel	30
4.4. Patientinnen- und Patientenmaterial	38

4.5. KRAS	38
4.6. EGFR.....	38
4.7. Cancer Hot Spot Panel	39
5. Schlussbetrachtung.....	49
6. Danksagung.....	54
7. Anhang	55
8. Quellenverzeichnis.....	56

Zusammenfassung

Das Merkelzellkarzinom ist eine seltene, bösartige Hauterkrankung, die vor allem auf sonnenexponierter Haut bei älteren Menschen auftritt. Die am häufigsten betroffenen Körperregionen sind der Kopf und der Hals. In der vorliegenden Arbeit wurden zwölf in Paraffin eingebettetes Tumorgewebe auf Mutationen in bestimmten bekannten Genen untersucht, die mit anderen Krebsarten in Verbindung gebracht werden. Dieses Screening umfasste das KRAS-Gen, das an der Signalübertragung der Rezeptoren des epidermalen Wachstumsfaktors EGF beteiligt ist. Bei Kolonkarzinomen zeigte sich in der Vergangenheit, dass eine EGFR-gerichtete Therapie unwirksam bleibt, wenn die RAS-Gene (KRAS und NRAS) aktivierende Mutationen tragen. Das Vorhandensein von Mutationen im KRAS-Gen wurde mittels Pyrosequenzierung untersucht. Um das Vorhandensein von Mutationen in EGFR zu untersuchen, wurden die Sequenzen der Exons 18, 19 und 21 dieses Gens mittels Sanger-Sequenzierung bestimmt. Mit Hilfe der NGS-Methode wurden in dieser MCC-Sammlung 50 weitere krebsassoziierte Gene auf Mutationen untersucht. Es konnten keine Mutationen im KRAS-Gen gefunden werden. Obwohl die Stichprobengröße in dieser Studie sehr klein war, besteht dennoch die Möglichkeit, dass dieses Gen bei einigen MCC-Patientinnen und Patienten mutiert ist. Im Gegensatz dazu konnte nachgewiesen werden, dass die Mutationsrate im EGFR-Gen bei 25 % lag. Die NGS-Sequenzierung wurde bei elf der zwölf hier einbezogenen Proben erfolgreich durchgeführt. In allen untersuchten Proben fanden sich Mutationen in mindestens einem der 50 untersuchten Gene. Die Mutationen, die Tyrosinkinase-Rezeptoren betreffen, lagen häufig in der Kinasedomäne. Einige der gefundenen Mutationen wurden bereits in der Vergangenheit im Zusammenhang mit verschiedensten Tumorerkrankungen beschrieben. Dies deutet darauf hin, dass diese Mutationen die Funktionen der Proteine verändern könnten.

Die Ergebnisse dieser Studie legen nahe, dass insbesondere MCC-Patientinnen und Patienten mit einer EGFR-Gen-Mutation ohne KRAS oder NRAS-Gen Mutationen von einer Anti-EGFR-Therapie profitieren könnten, da inaktivierende KRAS-Gen-Mutationen in dieser Patientenpopulation selten oder nicht vorhanden sind. Mittels der hier beschriebenen und gezeigten Methoden könnten in Zukunft MCC tumorgenetisch klassifiziert und kategorisiert werden. Im Anschluss kann die klinische Bedeutung unmittelbar durch den potentiellen Einschluss von Betroffenen in Basket Studien wie TAPUR (Targeted Agent and Profiling Utilization Registry) geprüft werden [201]. Am Beispiel des Malignen Melanom sollten weitere Forschungen die offenen Fragen zur Genese und bestmöglichen Therapie des MCC aufgreifen und beantworten. Weitere Studien zu Gen Mutationen wären wichtig, um potenzielle neue Therapieansätze zu ergründen, damit den Betroffenen eine bestmögliche Therapie geboten werden kann.

Abstract

Merkel cell carcinoma is a rare, malignant skin disease that occurs mainly on sun-exposed skin in the elderly. The most affected areas of the body are the head and neck. In this study, twelve paraffinized tumor blocks were screened for mutations in certain known genes associated with other cancers. This screening included the KRAS gene, whose product is involved in signal transduction of the receptors of the epidermal growth factor EGF. In the case of colon carcinoma, it has been shown in the past that EGFR-directed therapy is ineffective, if the RAS genes (KRAS and NRAS) carry activating mutations. The presence of mutations in the KRAS gene was tested by pyrosequencing. To examine the presence of mutations in the EGFR, sequences of exons 18, 19 and 21 of this gene were determined by Sanger sequencing. The NGS method was used to examine 50 more cancer-associated genes for mutations in this MCC collection.

No mutations were found in the KRAS gene. Since the sample size in this study was small, it is still possible that this gene is mutated in some MCC patients, but the prevalence for such mutations would be relatively low. In contrast, the mutation rate in the EGFR gene was 25%. NGS sequencing was successfully performed for eleven of the twelve samples included here. There were mutations in at least one of the 50 genes studied in all patient samples. The mutations affecting tyrosine kinase receptors were often in the kinase domain. Some of the mutations found have been described in the past in connection with various diseases. This indicates that these mutations alter the functions of the proteins.

The results of this study suggest that MCC patients may benefit from anti-EGFR therapy, as inactivating KRAS mutations are rare or absent in this patient population. Accordingly, in the future, the methods described and shown here could be used to classify and categorize MCC by its tumor genetics. Subsequently, the clinical relevance can be directly tested by the potential inclusion of patients in basket studies such as TAPUR (Targeted Agent and Profiling Utilization Registry)[201].

Using the malignant melanoma as an example, further research should address and answer the open questions regarding the genesis and best possible therapy of MCC. Further studies of the mutations would be important to explore potential new therapeutic approaches to provide the best possible therapy.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Lokalisierung von Merkelzellen in der menschlichen Haut. Der Querschnitt zeigt die Haut mit ihren morphologischen Merkmalen von der Epidermis, der Dermis und der Subkutis. Links bildet in Vergrößerung die Lage der Merkelzellen ab. Das Bild wurde modifiziert nach http://www.meb.uni-bonn.de/cancer.gov/Media/CDR0000579043.jpg	2
Abbildung 2: Klinische Präsentationen des Merkelzellkarzinoms. a: kleiner Knoten an sonnenexponierter Haut (Augenbraue) einer älteren Patientin; b: großer, exophytischer, ulzerierter Tumor am Bein [7].....	4
Abbildung 3: Histopathologische Merkmale des Merkelzellkarzinoms. a: großer dermaler und subkutaner Knoten bestehend aus b: monomorphen mittelgroßen Zellen mit vesikulärem Nukleus und spärlichem Zytoplasma; c: pseudozystischer, gut umschriebener subkutaner Knoten [7].....	5
Abbildung 4: a: Merkelzellkarzinom mit isolierten Tumorzellen in der Nähe der Exzisionsränder; b: die Zellen des Merkelzellkarzinoms sind CK20-positiv [7].....	6
Abbildung 5: Transmissionselektronenmikroskopie von MCPyV bei 50.000 × Vergrößerung zeigt die charakteristische Polyomavirus- Kapsid-Strukturen [54].....	12
Abbildung 6: Beispielergebnis Probe 2 zeigt dieselbe Basenfolge im Vergleich zum Wildtyp.....	17
Abbildung 7: Einzelschritte von der DNA zur Sequenz.....	20
Abbildung 8: Computergrafische Darstellung einer DNA-Sequenz mit Nachweis einer Punktmutation [75].....	20
Abbildung 9: Kontrollsequenzen der KRAS-Pyrosequenzierung. A): positive Kontrolle mit A an Position 8; B): negative Kontrolle ohne Mutation.	26
Abbildung 10: KRAS-Pyrosequenzierung der zwölf Patientinnen- und Patientenproben.....	27
Abbildung 11: NGS mit Cancer Hot Spot Panel, ein grauer Balken repräsentiert eine Probe ohne Mutation.....	31
Abbildung 12: NGS mit Cancer Hot Spot Panel: Lage der gefundenen Mutationen in den Genen AKT1, APC, BRAF, CDKN2A und EGFR.....	33
Abbildung 13: NGS mit Cancer Hot Spot Panel: Lage der gefundenen Mutationen in den Genen FBXW7, FGFR1, FGFR3, FLT3 und GNAQ.....	34
Abbildung 14: NGS mit Cancer Hot Spot Panel: Lage der gefundenen Mutationen in den Genen GNAS, HNF1A, JAK3, KDR und KIT.....	35
Abbildung 15: NGS mit Cancer Hot Spot Panel: Lage der gefundenen Mutationen in den Genen NOTCH1, PDGFRA, PIK3CA, PTEN, RB1 und RET.....	36
Abbildung 16: NGS mit Cancer Hot Spot Panel: Lage der gefundenen Mutationen in den Genen SMAD4, SMARCB1, STK11, TP53 und VHL.....	37

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 bekannte krebsassoziierte Mutationen, die im Cancer Hot Spot Panel analysiert werden	23
Tabelle 2 Demografische Daten der eingeschlossenen Patientinnen und Patienten	25
Tabelle 3 Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung der Exons 18, 19 und 21 der 12 Proben. n. l.: nicht lesbar; WDH n. l.: Wiederholung der Sequenzierung war ebenfalls nicht lesbar.	29

Abkürzungsverzeichnis

aCGH	arraybasierter komparativer genomischer Hybridisierung
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AKT1	v-akt AKR mouse Thymoma viral Oncogene homolog 1
AML	Akute Myeloische Leukämie
APC-Gen	Adenomatous-Polyposis-Coli-Gen
APS	Adenosin 5' Phosphosulfat
ARF	Adenosyl-Ribosylierungs-Faktor
ATP	Adenosintriphosphat
BCC	Basalzellkarzinom
BRAF	B-RAS associated Factor proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase
CCD-Chip	Charge Coupled Device-Chip
CD	cluster of differentiation
CDK	Cyclin-Dependent Kinase
CDKN2A	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A
CgA	Chromogranin A
CI	Confidence Interval
CK	Cytokeratin
CLL	Chronischen Lymphatische Leukämie
CR	Complete Response/Remission
CT	Computertomographie
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dATP-S	Desoxyadenosin-Alfa-Thio-Triphosphat
ddNTP	Didesoxy-Ribonukleosid-Triphosphate
dNTP	Desoxy-Ribonukleosid-Triphosphat
DPC4	Deleted in Pancreatic Cancer 4
EGF	Epidermal-Growth-Factor
EGFR	Epidermal-Growth-Factor-Rezeptor
EMA	European Medicines Agency
EpCAM	Epithelial Adhesion Molecule
FAP	Familiäre Adenomatöse Polyposis Coli
FBXW7	F-box/WD repeat-containing Protein 7
FDA	US-Food and Drug Administration
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
FLT3	FMS-related Tyrosine Kinase 3
GIST	Gastrointestinales Stroma Tumor
GNA	Guanin-Nucleotinbindenden α -Untereinheiten
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HIP1	Huntingtin-Interacting Protein-1
HNF1A	Hepatocyte Nuclear Factor 1-Alpha
IG	Immunglobulin- Domäne
IP ₃	Inositol-Trisphosphat
ITD	Internal-Tandem-Duplication
JAK3	Janus Kinase 3
KDR	Kinase Insert Domain Receptor
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene
LCA	Leucocyte Common Antigen
MAPK	Mitogen-Aktivierte Phosphokinase
MASH1	Mammalian Achaete-Scute Complex-like-1
MCC	Merkel Cell Carcinoma
MCPyV	Merkelzellpolyomavirus

MEN	Multiples-Endokrines-Neoplasie-Syndrom
MM	malignes Melanom
MRT	Magnetresonanztomographie
NCI	National Cancer Institute
NGS	Next Generation Sequencing
NMSC	Non-Melanoma Skin Cancer
NOD	Nucleotide-oligomerization-Domäne
NOTCH1	Notch homolog 1
NSE	neuronenspezifische Enolase
PCR	Polymerasekettenreaktion
PD-1	Programmed Cell Death Protein 1
PDGFRA	Platelet-derived Growth-Factor-Receptor A
PD-L1	Programmed Death Ligand 1
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PH	Pleckstrin-Homologie-Domäne
PI3P	Phosphatidyl-Inositol-3-Phosphat
PIK3C	Phosphatidy-Inositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase
PIK3CA	Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
pJAK3	aktiviertes phospho-JAK3
PPi	Pyrophosphat
PR	Partielle Remission
pSTAT3	aktiviertes phospho-STAT3
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog deleted on Chromosome ten
PUVA	Psoralen und UV-A
RB1	Retinoblastom-Protein, Retinoblastoma 1
RET	Ret proto-oncogene
Rictor	Rapamycin-unempfindlicher Begleiter von mTOR
SCF	Stem-Cell-Factor
SCLC	Small Cell Lung Cancer
SMARCB1/BAF47	..	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, Unterfamilie B, Mitglied 1
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
STK11	Serine/Threonine Kinase 11
SV40	Simian-Virus 40
TGF β	Transforming-Growth-Factor-Beta
TP53	Tumorsuppressorprotein p53, Tumor protein p53
TTF-1	Thyroid-Ttranscription Factor 1
VEGF	Vascular Epithelial Growth Factor
VHL-Gen	Hippel-Lindau Tumor suppressor Gen
VIP	vasoaktives intestinales Peptid

2. Einleitung

2.1. Das Merkelzellkarzinom

Das Merkelzellkarzinom (Merkel Cell Carcinoma, MCC) geht nach heutigen Kenntnissen aus den namensgebenden Merkelzellen hervor. 1875 wurden Merkelzellen erstmals von Johann Friedrich Sigmund Merkel, einem Anatomen aus Göttingen, in Säugetieren und Fröschen entdeckt und beschrieben [1]. Merkelzellen dienen in der Haut als langsam adaptierende Tastzellen für Druck- und Berührungsempfindungen über somatosensorische Afferenzen [2]. Sie liegen im Stratum basale der Reteleisten der Epidermis und der Schleimhaut (Abb. 1–2). Es wird angenommen, dass Merkelzellen der Neuralleiste entstammen, obwohl die genaue Herkunft bis heute nicht vollständig und eindeutig geklärt ist [3]. Die Merkelzellen liegen in der Nähe einer becherförmigen Ausbuchtung des Nervenendes, mit dem sie den sogenannten Merkelzell-Rezeptorkomplex, auch MC-Axon-Komplex genannt, bilden. Über Mikrovilli und Desmosomen werden diese mit den umliegenden Keratinozyten mit dem Stratum basale der Epidermis verbunden.

Durch spezifische Cytokeratine (z. B. CK8, 18, 19 und 20) der Intermediärfilamente der Merkelzellen sowie durch die Neuronenspezifische Enolase (NSE) lassen sich mithilfe von immunhistochemischen Verfahren Merkelzellen und Merkelzellkarzinome von den umgebenden Keratinozyten abgrenzen. In der intrazellulären Exocytosezone sind ca. 80–120 nm große Vesikel, sog. neurosekretorische Granula, enthalten. Eine Entleerung dieser Vesikel konnte nur in wenigen Fällen beobachtet werden, jedoch gleichen Merkelzellen damit neurosekretorischen Zellen und können damit dem diffusen neuroendokrinen System zugeordnet werden [4].

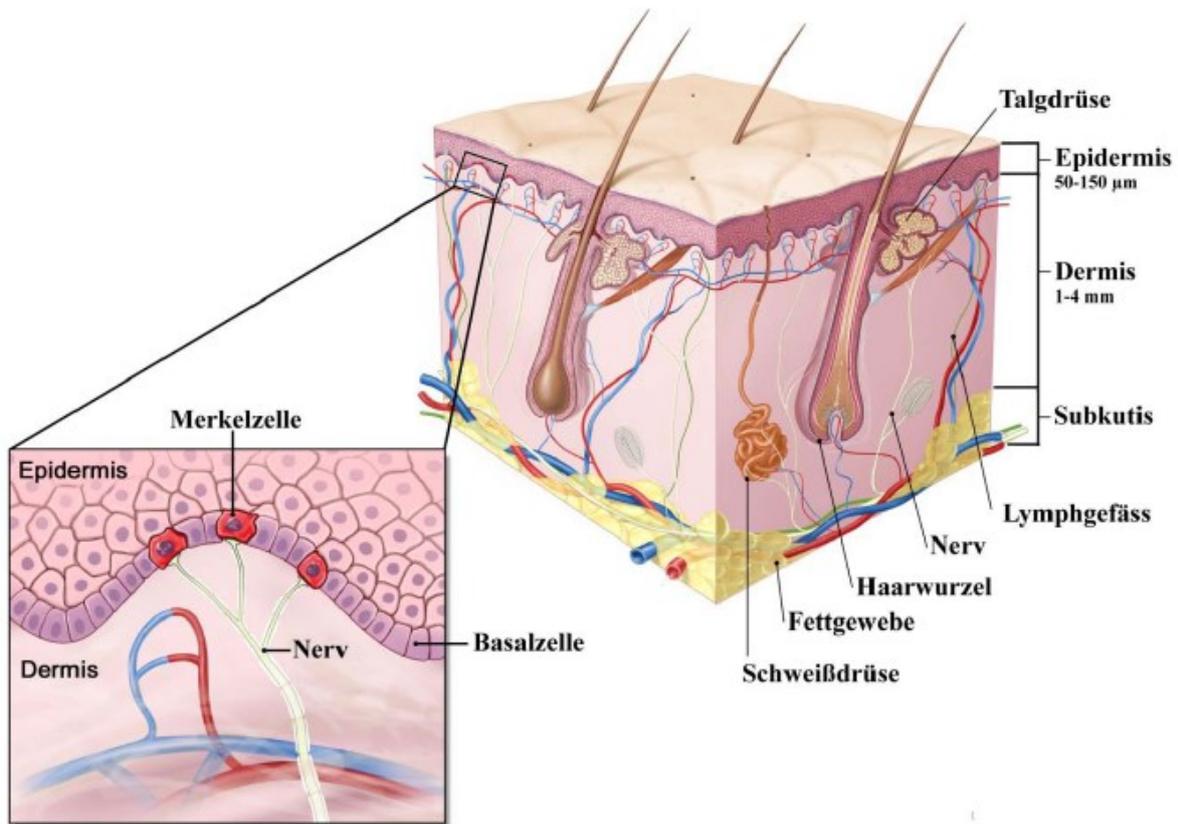


Abbildung 1: Lokalisierung von Merkelzellen in der menschlichen Haut. Der Querschnitt zeigt die Haut mit ihren morphologischen Merkmalen von der Epidermis, der Dermis und der Subkutis. Links bildet in Vergrößerung die Lage der Merkelzellen ab. Das Bild wurde modifiziert nach <http://www.meb.uni-bonn.de/cancer.gov/Media/CDR0000579043.jpg>

Das Merkelzellkarzinom oder kutanes neuroendokrines Karzinom, wie es von Pathologinnen und Pathologen auch genannt wird, ist ein hochmaligner Tumor mit einem bislang unbekanntem Ursprung, schlechter Prognose und einer hohen Rezidivrate. Jorge Albores-Saavedra et al konnten mit ihrer retrospektiven Arbeit nachweisen, dass die relative 10 Jahres-Überlebensrate im lokalisierten Stadium 71% betrug, bei metastasierten Stadien nur noch bei 20,1%. Gesamtzahl der von Jorge Albores-Saavedra et al untersuchten Fälle: 3870, Männer (2380 Fälle, 61,5%) Frauen (1490 Fälle, 38,5% [5]. Der/Die typische Patientin/Patient ist von kaukasischer Abstammung, zwischen 60 und 80 Jahren alt und vorwiegend männlichen Geschlechts.

Es bestünde eine Assoziation, die einen kausalen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Merkelzellkarzinomen und der kumulativen Exposition von ultravioletter Strahlung sowie der PUVA-Behandlung bestehend aus Psoralen und UVA vermuten lässt [6–8]. Eine genetische UV-Signatur wurde jedoch nur in der Minderheit der Fälle detektiert, sodass der Zusammenhang mit UV-Exposition auf Faktoren, wie der UV-bedingten Immunsuppression basieren dürfte [6]. Häufig zeigen MCC-Patientinnen und Patienten eine Vorgeschichte anderer UV-Licht-assoziiierter Hautkrebserkrankungen [9–11]. In den USA beläuft sich die jährliche Inzidenz auf drei Fälle pro

einer Million Einwohner*innen pro Jahr. Diese Zahl ist in den letzten 20 Jahren bei einer alternder Bevölkerung, steigender UV-Exposition und zunehmenden Immunsuppressionen merklich angestiegen, wenngleich dieser Anstieg auch auf die verbesserte Krebsregistratur und stetig gewachsenen Diagnosemöglichkeiten zurückgeführt werden muss [5]. Häufig kommt es bei klinisch fehlenden typischen Malignitätszeichen verzögert zur Diagnosestellung. Ebenso wurde ein Zusammenhang zwischen MCC und Patientinnen und Patienten mit Lymphomen, Leukämie, HIV und Immunsuppression (z. B. infolge von Organtransplantationen) entdeckt. In 80 % der Fälle besteht eine Infektion mit dem sogenannten Merkelzellpolyomavirus (MCPyV). Eine Hypothese besagt, dass die MCPyV-assoziierten und nicht MCPyV-assoziierten Fälle unterschiedliche Varianten der Erkrankung darstellen [12]. Allgemein wird jedoch weitgehend ein Kausalzusammenhang zwischen einer Infektion des MCPyV und dem Auftreten von MCC angenommen [13]. Obwohl eine andere Studie ergab, dass MCPyV in allen MCCs vorhanden sei [14], deuten mehrere Untersuchungen darauf hin, dass das MCC in MCPyV-positive und MCPyV-negative Fälle unterteilt werden kann [15–18]. Aufgrund von verschiedenen Unstimmigkeiten in einigen dieser Berichte ist bis jetzt noch nicht klar, ob das Vorhandensein des viralen Genoms das klinische Outcome beeinflusst. In unterschiedlichen Sequenzierungsstudien wurde in Bezug auf molekulare Unterschiede herausgefunden, dass MCPyV-negative MCCs im Gegensatz zu MCPyV-positiven Fällen durch häufige Deletionen/ Mutationen des RB1-Gens gekennzeichnet sind. Daraus leitet sich der Verdacht ab, dass der Verlust von RB1-Expression maßgeblich an der Entstehung von virusnegativem MCC beteiligt ist [19–21].

Die Tumorlokalisierung ist an chronisch sonnenexponierten Arealen wie der Kopf-Hals-Region am häufigsten, gefolgt von der oberen und unteren Extremität sowie dem Stamm. Die Neoplasien erscheinen als solide, schmerzlose, schnell wachsende, bläulich rote Knoten, die häufig früh in umliegende Lymphknoten metastasieren. Jorge Albores-Saavedra et al. zeigten in einer retrospektiven Studie aus 2009, dass 71,6% der Patientinnen und Patienten bei Diagnosestellung ein Alter von >70 Jahren erreicht hatten [5, 11].

Nach dem „American Joint Committee on Cancer“ (AJCC, 2010) werden Merkelzellkarzinome in folgende Staging-Gruppen eingeteilt:

- Stadium I (lokalisierte Erkrankung, Primärläsion ≤ 2 cm)
- Stadium II (lokalisierte Erkrankung, Primärläsion > 2 cm)
- Stadium III (nodaler Befall)
- Stadium IV (metastatische Erkrankung jenseits lokaler Lymphknoten)

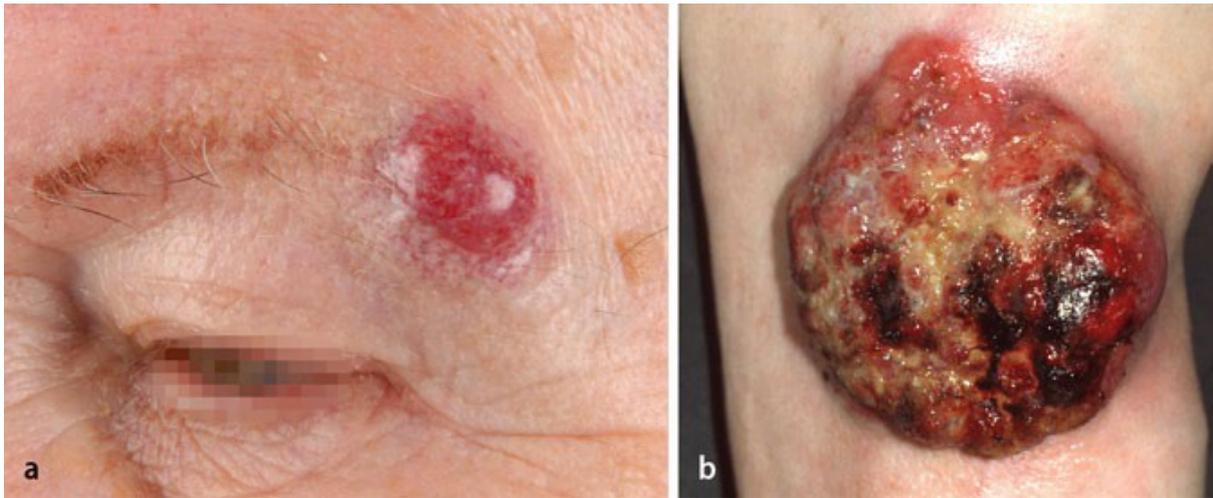


Abbildung 2: Klinische Präsentationen des Merkelzellkarzinoms. a: kleiner Knoten an sonnenexponierter Haut (Augenbraue) einer älteren Patientin; b: großer, exophytischer, ulzerierter Tumor am Bein [8]

2.2. Histopathologie

Das Merkelzellkarzinom ordnet sich in die Gruppe der „small blue round cell tumors“ und besteht aus subkutanen und/oder dermalen Knoten, die sich selten auch bis in die Muskulatur ausdehnen können. In der HE-Färbung imponieren mittelgroße, blaue, runde Tumorzellen mit großem, basophilem, gelapptem Nukleolus und wenig Zytoplasma (Abb. 3). Relation von Zellkern zu Plasma der Tumorzellen ist zu Gunsten des Kerns verschoben. Die Tumorzellen können zytoplasmatische Fortsätze aufweisen. Meist sind die Mitose- und Apoptose Raten im Vergleich zu umgebendem Gewebe hoch; Nekrosen hingegen werden selten beobachtet. Charakteristisch erscheinen die neuroendokrinen Granula (Durchmesser ca. 100 nm) [11]. Insgesamt werden drei Hauptvarianten des MCC beschrieben: der kleinzellige, der trabekuläre und der intermediäre Typ, obwohl sich in den meisten Fällen Überlappungen finden lassen. Die meisten Tumoren infiltrieren häufig die retikuläre Dermis und Subkutis. Die Epidermis, papilläre Dermis sowie die Adnexe bleiben in vielen Fällen ausgespart [11]. Eine mögliche Erklärung für die hohe lokale Rezidivrate könnte das Vorliegen von isolierten Tumorzellen und intralymphatischen Tumorkomplexen in der Nähe des Resektionsrands sein, diese sollten im Befund dokumentiert werden oder im besten Fall aus diesem Grund histologisch ausgeschlossen werden [8].

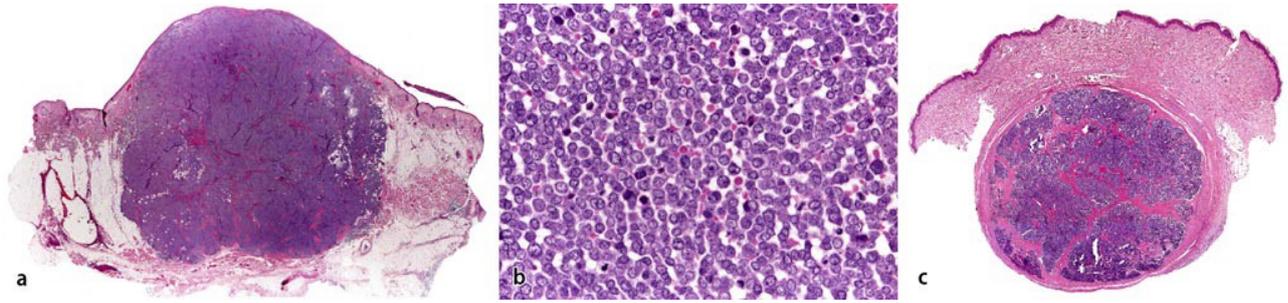


Abbildung 3: Histopathologische Merkmale des Merkelzellkarzinoms. a: großer dermaler und subkutaner Knoten bestehend aus b: monomorphen mittelgroßen Zellen mit vesikulärem Nukleus und spärlichem Zytoplasma; c: pseudozystischer, gut umschriebener subkutaner Knoten [8]

2.3. Immunhistochemie und molekulare Genetik

Die Cytokeratin- (CK-)20-Färbung ist positiv und zeigt ein punkt- oder scheibenförmiges perinukleäres Muster (Abb. 4) Die neoplastischen Zellen exprimieren auch neuroendokrine Marker wie Chromogranin-A, Synaptophysin, Calcitonin, Gastrin, vasoaktives intestinales Peptid (VIP) und Somatostatin. Bei punktförmiger Begrenzung auf einen Teil der Tumorzellen findet sich eine positive Reaktion auf Neurofilamentproteine, Chromogranin-A, Synaptophysin, Calcitonin, Gastrin, vasoaktives Peptid und Somatostatin, in seltenen Fällen aber auch CD 99 (Cluster of Differentiation), CD117, Ber-EP4 (ein Antikörper, der gegen das Zelladhäsionsmolekül Epithelial adhesion molecule (EpCAM) gerichtet ist) und Notch-1 [8]. Zusätzlich wurde die Expression von „Huntingtin-Interacting-Protein-1“ (HIP1), einem Onkogen, in einem Großteil der untersuchten Proben gefunden [22]. Dieses Ergebnis ist insofern klinisch bedeutsam, da metastasierte und MCC und SCLC klinisch oft schwer voneinander zu unterscheiden sind. HIP1 Expression trat in MCC-Tumoren verglichen mit SCLC-Tumoren (n= 5/12 für SCLC; 42 %) häufiger [22]. Es kann daher als weiterer hochspezifischer Marker für das MCC betrachtet werden[11]. In vielen Fällen findet sich eine positive Reaktion mit CM2B4, einem gegen MCPyV gerichteten Antikörper. Bei anderen bekannten Tumormarkern wie beispielsweise dem thyroidalen Transkriptionsfaktor-1 (TTF-1), dem „Mammalian Achaete-Scute Complex-like-1“ (MASH1), von Vimentin, S-100 und/ oder CK7 wurden bisher keine Expression gefunden [8]. Weitere Marker können in unklaren Fällen hinzugezogen werden [11].

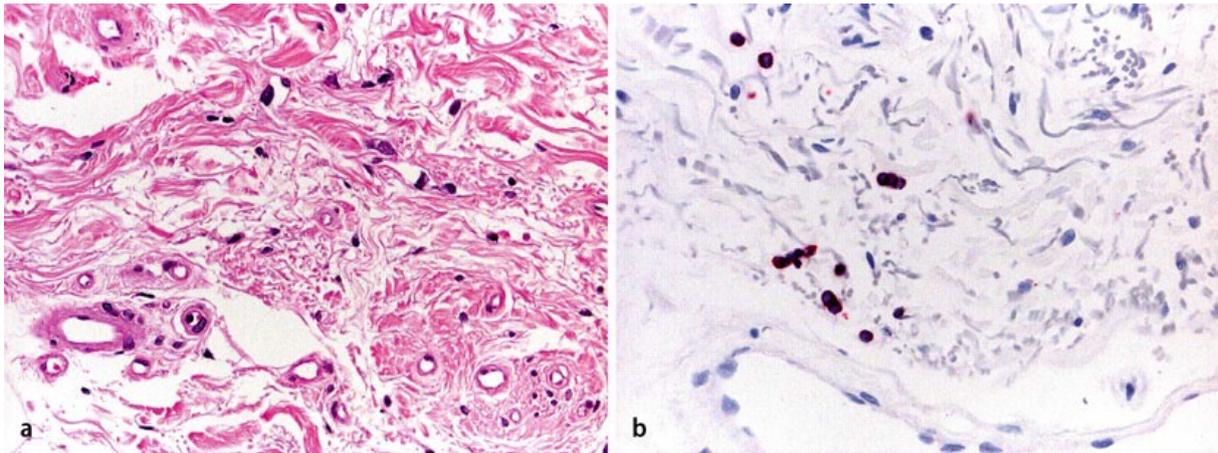


Abbildung 4: a: Merkelzellkarzinom mit isolierten Tumorzellen in der Nähe der Exzisionsränder; b: die Zellen des Merkelzellkarzinoms sind CK20-positiv [8]

Untersuchungen arraybasierter komparativer genomischer Hybridisierung (aCGH) haben einen Zugewinn auf den Chromosomen 1, 3q, 5p und 6 sowie Verluste auf den Chromosomen 3p, 4, 5q, 7, 10, und 13 gezeigt [23]. Zu den häufigsten Aberrationen zählten die Deletion von 5q12–21 (ca. 26 % der Fälle), die Deletion von 13q14–21 inklusive des Tumorsuppressorgens RB1 (ca. 26 % der Fälle) und die Amplifikation von 1p34 im Bereich von L-Myc (MYCL1, 39 % der Fälle) [8]. Ein potenzielles therapeutisches Ziel zeigt sich im MCC durch die Hochregulation des Onkogens Survivin [24].

Mutationen des TP53 Tumorsuppressorgens wurde im MCC bisher selten gefunden. In den von Erstad et al. analysierten Tumoren wurde bei 22,8% der Proben eine Expression von TP53 festgestellt, die mit einem negativen MCPyV-Status und insgesamt schlechten Gesamtüberleben korrelierte[25]. In einer anderen Studie konnten in TP53-mutationsnegativen MCCs insgesamt höhere MCPyV-DNA-Mengen im Vergleich zu TP53-Mutation-positiven MCCs gefunden worden (median, 0.0; Bereich 0–35.8 gegenüber Median, 1.09; Bereich 0–4) [26]. Eine Inaktivierung der p14ARF-Promotor-Methylierung war in acht von 19 auswertbaren Proben (42 %) vorhanden, was darauf hindeutet, dass epigenetisches Tumorsuppressor-Silencing eine Rolle bei der MCC-Onkogenese zu spielen scheint [27]. In einer weiteren Studie konnte festgestellt werden, dass eine in 67% der Fälle vorhandene KIT-Expression mit einer schlechteren Prognose verbunden war [28]. Es handelte sich dabei um stille Punktmutationen in Exon 17 (c.2394 C>T -2 Patienten) und 18 (c.2586 G>C -3 Patienten) sowie Intron 16 und 17, aktivierende Mutationen wurden weder im KIT noch im PDGFRA gefunden. Ebenso wurden keine Mutationen im AKT-Gen gefunden, allerdings bestand eine erhöhte Aktivität im Wildtyp des PIK3CA besonders bei MCPyV-positiven im Vergleich MCPyV-negativen MCC 6/36 (17%) gegenüber 2/20 (10%) [28, 29]. Hafner et al. konnten im Gegensatz dazu 2012 in ihrer Untersuchung von 41 MCC-Tumoren mit aktivierenden PIK3CA-Mutationen eine starke AKT-Phosphorylierung nachweisen [30].

2.4. Differenzialdiagnosen

Die Diagnosestellung erfolgt selten klinisch, in den meisten Fällen über die histomorphologischen Merkmale und die immunhistochemische Positivität für CK20 sowie der Negativität für TTF-1, CK7 und lymphozytäre Marker. Die heutzutage etablierten Marker für die Routinediagnostik umfassen Zytokeratin 20 (CK20), Melan-A, S100B, Leucocyte Common Antigen (LCA), Chromogranin A, Thyroid-Transcription Factor 1 (TTF-1), Neuronenspezifische Enolase (NSE) sowie Synaptophysin. Diese Marker sind notwendig um ein Lymphom, ein Melanom, bzw. die kutane Metastase eines kleinzelligen Bronchialkarzinoms (SCLC) sicher abzugrenzen [11]. In kontroversen Fällen können auch die CM2B4-Positivität und die MASH1-Negativität zur Diagnosesicherung hilfreich sein. Das Huntingtin-interacting Protein 1 (HIP1) gilt als weiterer hochspezifischer Marker für das MCC und kann, falls notwendig die Differenzialdiagnose von MCC und SCLC bilden, da diese in metastasiertem Stadium oft schwer voneinander zu unterscheiden sind [22]. Da bei 10% der Patientinnen und Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bereits eine Fernmetastasierung vorliegt, sollte unmittelbar nach Diagnosestellung eine Staging-Diagnostik mittels Palpation der gesamten Haut, aller Lymphknotenstationen, einer Sonografie der drainierenden Lymphknoten sowie ergänzende Schnittbildverfahren erfolgen, um eine lymphogene Metastasierung im Abflussgebiet des Primärtumors ausschließen zu können [11]. Die 18F-FDG PET CT scheint aufgrund der prognostischen Bedeutung eines Lymphknotenbefalls und der andererseits eingeschränkten Sensitivität und Spezifität der Computertomographie für die Detektion von Lymphknotenmetastasen von Vorteil zu sein [31]. Falls dieses nicht zur Verfügung stehen sollte, wird empfohlen die initiale Ausbreitungsdiagnostik um CT-Thorax/Abdomen und MRT-Schädel zu ergänzen [11]. Nachdem eine Fernmetastasierung mittels Schnittbildverfahren ausgeschlossen worden ist, erfolgt leitliniengerecht die Durchführung einer Schildwächterlymphknoten-Biopsie, um die hohe Zahl von okkulten Lymphknotenmetastasen zu detektieren und die Prognose besser einschätzen zu können [11, 31–33]. Bisher haben sich serologische Marker wie z.B. die neuronenspezifische Enolase (NSE) oder Chromogranin A (CgA) als unbrauchbar erwiesen, um den Tumorprogress und den Krankheitsverlauf ausreichend präzise hervorzusagen [34, 35]. Bei häufig falsch positiven Befunden und regelhaft stattfindender Überdiagnostik kann der Routineeinsatz von NSE- und CgA-Untersuchungen im Blut heutzutage nicht empfohlen werden. Sowohl Antikörper gegen virale Onkoproteine [36, 37] als auch zirkulierende Tumorzellen [34, 38] scheinen potenzielle Biomarker darzustellen, die bei der Einschätzung des Krankheitsverlauf und einer Risikoermittlung für Betroffene hilfreich sein können. Jedoch wird auch der routinemäßiger Einsatz dieser Methoden noch nicht in die aktuellen Empfehlungen eingeschlossen [11].

Folgende Erkrankungen sollten mittels immunhistochemischer und histopathologischer Differenzialdiagnosestellungen ausgeschlossen werden:

1. das Basalzellkarzinom (BCC),
2. das maligne Melanom,
3. das anaplastische Schweißdrüsenkarzinom,
4. das metastasierte kleinzellige Karzinom (vorwiegend in der Lunge),
5. Lymphome (vorwiegend anaplastische und B-Zell-Lymphome),
6. das Ewing-Sarkom,
7. das Neuroblastom,
8. das Rhabdomyosarkom und
9. das undifferenzierte epidermoide Karzinom.

2.5. Therapie

2.5.1. Chirurgische Therapie

Unter Berücksichtigung von funktionellen Aspekten im Kopf-/Halsbereich sollte für Primärtumoren eine vollständige chirurgische Exzision im Stadium I mit einem Sicherheitsabstand von 1 cm und im Stadium II mit 2 cm angestrebt werden [11, 39]. Sollte bereits klinisch der Verdacht auf ein MCC bestehen, ist eine direkte therapeutische Exzision des Primarius einer diagnostischen Biopsie vorzuziehen [11]. Aufgrund der hohen Frequenz einer lymphogenen Metastasierung wird trotz klinischer und bildgebender N0-Situation bei allen Patientinnen und Patienten empfohlen, eine Wächter-Lymphknoten-Biopsie durchzuführen [39, 40]. Bei Lymphknotenmetastasen oder Lokalrezidiven bleibt die chirurgische Sanierung die kurative Therapie der Wahl. Wenn bereits ein Lymphknotenbefall vorliegt, sollte eine funktionelle Lymphadenektomie vorgenommen werden. Sofern eine solche Operation nicht möglich ist, kann eine Radiatio als Alternative erwogen werden [41]. Für Merkelzellkarzinome, die bereits Fernmetastasen gebildet haben, wird eine chirurgische Intervention im Rahmen multimodaler Therapiekonzepte neben strahlentherapeutischen Maßnahmen und/oder einer systemischen Chemotherapie eingesetzt. Dieses Vorgehen sollte im Einzelfall entschieden werden und wird in der Regel mit bestmöglicher palliativer Intention durchgeführt [11, 42].

2.5.2. Strahlentherapie

Für primäre Merkelzellkarzinome oder Lokalrezidive wird empfohlen, eine adjuvante Strahlentherapie des Tumorbettes und der regionären Lymphabflussregion durchzuführen. Insgesamt sollten OP-Verfahren favorisiert werden, welche die Langzeitwirksamkeit einer möglichst frühzeitig eingeleiteten anschließenden Strahlentherapie begünstigen [43]. Als erforderliche Gesamtdosis werden in der adjuvanten Behandlung ≥ 50 Gy mit einer Einzeldosis von 2 Gy fünf Mal wöchentlich betrachtet. Bei bekannten Metastasen wird eine bessere lokale Kontrolle mit einer Gesamtdosis ≥ 55 Gy erzielt [11, 44]. Bei Vorliegen von günstigen prognostischen Faktoren, Tumordurchmesser ≤ 1 cm, Tumorlokalisierung außerhalb Kopf-Hals-Bereich, keine Invasion der Lymphgefäße, Immunkompetenz und Resektionsrand ≥ 1 cm kann individuell entschieden auf die Bestrahlung des Tumorbettes verzichtet werden [11].

2.5.3. Systemische Therapie

Noch vor wenigen Jahren basierten die Empfehlungen zur systemischen Therapie des fortgeschrittenen MCCs in der Regel auf retrospektiven Datenanalysen, persönlichen Erfahrungen und Deduktion von anderen Tumorentitäten [45]. Trotz großer Fortschritte im Verständnis der Erkrankung sowie systematischen und retrospektiven Datenerhebungen, ersten prospektiven Therapiestudien fußen auch die aktuellen Empfehlungen nicht auf prospektiv randomisierten Studien. Bisher gibt es wenig etablierte systemische Therapien für das MCC, die in prospektiv-randomisierten Studien zur Verlängerung des Rezidiv-freien Überlebens oder des Gesamtüberlebens beitragen konnten [11]. Da das MCC in der Regel zwar chemosensitiv ist, allerdings rasch Resistenzen entwickeln kann scheint eine Immuntherapie mittels PD-1/PD-L1 Blockade einer Chemotherapie sowohl im Hinblick auf Toxizität als auch in der Dauer des Ansprechens überlegen [11, 46]. Die eingesetzten Therapieschemata orientieren sich wegen der histomorphologischen Ähnlichkeiten häufig am kleinzelligen Bronchialkarzinom; die Wirksamkeit dieser Therapien konnte bisher nicht in kontrollierten, prospektiven, klinischen Studien bestätigt werden. Antimetabolite und Anthrazykline, Bleomycin, Cyclophosphamid, Etoposid, und Platinderivate als Monotherapie, in Zweifach- oder bzw. selteneren Dreifachkombination gelten aktuell als wirksame Therapiemethoden. In der hier betrachteten Veröffentlichung lagen die Ansprechraten zwischen 20 und 61 %, wobei die Ansprechraten in der Erstlinienbehandlung (53-61%) höher waren als in der Zweitlinienbehandlung (23-45%). Bei Vorliegen von Fernmetastasen kann eine palliative systemische Chemotherapie indiziert sein, sollte aber insbesondere aufgrund von Toxizität der meisten Chemotherapeutika für gereifte Patientinnen und Patienten (steigende Wahrscheinlichkeit von eingeschränkter Leber- und Nierenfunktion sowie reduzierter Hämatopoese) auf jeden individuellen Fall einzeln angepasst werden. Die Grundlage für eine

Immuntherapie mit Immuncheckpointinhibitoren beim metastasierten MCC beruht bei virusnegativen Tumoren auf einer hohen Mutationslast, bei Virus-positiven Tumoren zusätzlich auf einer Expression viraler Antigene[47]. Insgesamt liegen wenige prospektive Studien über gegen PD1 und PD-L1 gerichtete Antikörper vor. ❶ In einer Phase II Studie zur Therapie anti-PD1-Antikörpern (Pembrolizumab) wurden 26 ausgewählte therapienaive Patientinnen und Patienten behandelt [48]. In insgesamt 25 auswertbaren Proben zeigte sich bei 14 Patientinnen und Patienten ein objektives Ansprechen 56% mit vier Komplettremissionen 16% (CR+PR: 56% [95% CI 35-76]). Das daraus geschätzte progressionsfreie Überleben (mediane Nachbeobachtungszeit von 33 Wochen) lag nach sechs Monaten bei 67% [95% CI, 49-86]. ❷ In einer weiteren Phase I/II Studie mit dem anti-PD-1-zielgerichteten Antikörper Nivolumab wurden 25 vor- oder unbehandelte Patientinnen und Patienten therapiert. Unter diesen 15 bisher therapienaiven Patientinnen und Patienten erreichten [73%] ein objektives Therapieansprechen, bei den übrigen 10 vortherapierten Patientinnen und Patienten waren es 50%. Nach einer medianen Nachbeobachtungszeit von einem Jahr waren drei Viertel der Remissionen noch andauernd [11, 48]. ❸ In einer weiteren Phase II Studie wurden Patientinnen und Patienten auf das Ansprechen des anti-PD-L1-zielgerichteten Antikörpers Avelumab hin untersucht, die bereits mindestens eine zytostatische Therapie erhalten hatten [49]. Bei insgesamt 88 Proben wurden bei acht Patientinnen oder Patienten eine Komplettremission und bei 20 Betroffenen eine partielle Remission erreicht (objektives Ansprechen 31.8% [95 CI: 21.9- 43.1]) [11, 50]. Die positive Ansprechrate lag hierbei für einfach vortherapierte Patientinnen und Patienten mit 40% deutlich höher als bei Patientinnen oder Patienten mit zwei und mehr Vortherapien (22%). ❹ Diese Studie wurde nachfolgend um Patientinnen und Patienten in der ersten Therapielinie erweitert. Mit 29 ausgewerteten Proben bei mehr als drei Monaten Nachbeobachtung konnte eine Ansprechrate von 62% (95% CI 42-79) gezeigt werden. 16 der beobachteten 18 Patientinnen und Patienten mit positivem Therapieansprechen wurden bereits nach 6 Wochen reevaluiert [11, 51]. Aufgrund dieser vorliegenden Daten wurde Avelumab 2017 zur Therapie des fortgeschrittenen MCCs von der EMA (European Medicines Agency) und FDA (US-Food and Drug Administration) zugelassen. Alle zuvor genannten Studien belegten unabhängig der PD-L1 Expression und des Virusstatus ein klinisches Ansprechen. Der frühzeitige Einsatz der Immuntherapie erweist sich auch bei hoher Tumorlast als günstiger Faktor [11].

2.6. Prognose

Das Ausmaß der Erkrankung bei Diagnosestellung ist ein guter Prognosefaktor für die 10-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit, die bei lokalisierter Erkrankung mit 70 % wesentlich höher liegt als bei Patientinnen und Patienten mit Fernmetastasierung mit rund 20 %. Die Prognose

verschlechtert sich durch männliches Geschlecht, Tumorgroße, Invasion des Subkutangewebes, erhöhte Gefäßdichte, Metastasierung, Nodalstatus, Infiltration der Lymphgefäße und eine hohe Teilungsrate. Der Nachweis von intratumoralen CD8-positiven Lymphozyten scheint unabhängig mit einem besseren MCC-bedingten Überleben assoziiert [52]. 2014 wurde gezeigt, dass die Prognose durch Vitamin-D-Mangel verschlechtert werden könnte, was kürzlich auch bei anderen Tumoren aufgefallen ist. In besagter Studie wurde eine starke Expression des Vitamin-D-Rezeptors in Tumorzellen nachgewiesen, was sowohl Einfluss auf die Tumorgroße als auch auf die Prognose zu haben scheint [53]. Die prognostische Relevanz der MCPyV-Infektion bleibt fraglich und wird aktuell kontrovers diskutiert [11].

Aufgrund der bekannten Gefahr von loko-regionären Rezidiven innerhalb der ersten zwei Jahre nach Primärdiagnose sollte nach Entfernung des Primarius innerhalb des ersten Jahres eine engmaschige klinische und bildgebende Nachsorge in sechswöchigen Abständen erfolgen. Für ein weiteres Jahr sollte die Nachsorge in vierteljährlichen Abständen erfolgen und danach auf halbjährliche Abstände für die Dauer von insgesamt fünf Jahren nach Erstdiagnose des Primärtumors übergegangen werden. Dieser Zeitraum sollte die überwiegende Zahl der auftretenden Rezidive umschließen [11, 39]. Weiterhin sollten erkrankte Personen in der selbstständigen Untersuchung der loko regionären Haut angeleitet werden. Bei Erkrankten mit negativem Schildwächterlymphknoten können einmal im Jahr Schnittbildverfahren (18F-FDG-PET CT und/oder CT und Schädel-MRT) eingesetzt werden. Aufgrund der erheblich schlechteren Prognose für Patientinnen und Patienten mit positivem Schildwächterlymphknoten sollte in den ersten beiden Jahren nach Primärdiagnose eine vierteljährliche Nachsorgeuntersuchung mittels den oben erwähnten Schnittbildverfahren (18F-FDG-PET CT und/oder CT und Schädel-MRT)–danach vom zweiten bis zum fünften Jahr in halbjährlichen Abständen erfolgen [11].

2.7. Das Merkelzellpolyomavirus

Im Januar 2008 wurde MCPyV als eine kausale Ursache für das MCC entdeckt (Abb. 5) [54]. Dieses wurde in Merkelzellkarzinomen gefunden und ist mit der, den Menschen befallenden, Gruppe der SV40 artigen Polyomaviren verwandt [54]. Das Genom des MCPyV besteht aus 5.387 Basenpaaren und codiert neben den charakteristischen Proteinen der Polyomaviren ebenfalls für ein großes T-Antigen (T-Ag) und eines kleines t-Antigen (t-Ag). Es wurde gezeigt, dass 80 % der untersuchten Karzinome mit diesem neuen Virus infiziert waren [54]. In einer vorliegenden Studie wurde bei sechs von acht MCPyV-positiven MCCs die virale DNA klonal integriert gefunden. Es ist daher anzunehmen, dass die MCPyV-Infektion und -Integration der klonalen Expansion der Tumorzellen vorausging [54]. Ein bedeutender Einfluss des MCPyV auf die Pathogenese des MCC

scheint damit wahrscheinlich. MCPyV-DNA-positive MCC weisen insgesamt unterschiedliche Merkmale auf, die sich von MCPyV-DNA-negativen Tumorarten unterscheiden. Einigen Studien zufolge korreliert das Fehlen einer MCPyV-Infektion mit einer schlechteren Prognose für die Betroffenen [26]. Die genauen Zusammenhänge bezüglich einer Infektion und die Abschätzung einer Prognose wird jedoch weiterhin kontrovers diskutiert [11]. Seit seiner Entdeckung wird die Molekularvirologie von MCPyV erforscht, um verstehen zu können, wie es die Tumorgenese induziert.

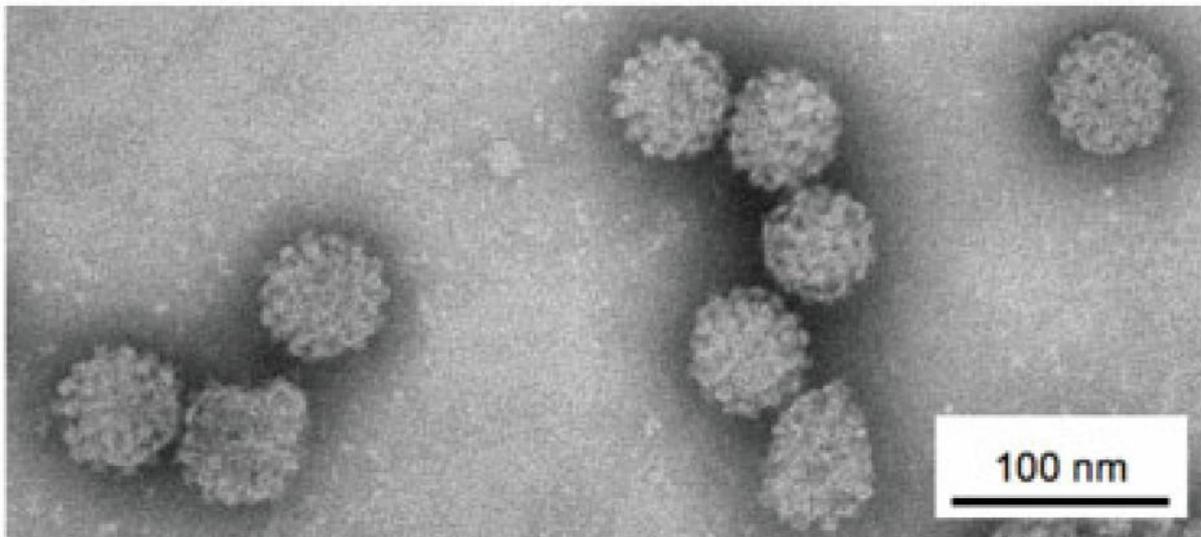


Abbildung 5: Transmissionselektronenmikroskopie von MCPyV bei $50.000 \times$ Vergrößerung zeigt die charakteristische Polyomavirus- Kapsid-Strukturen [55]

Heute wird vermutet, dass das Virus ein normaler „Hautbewohner“ ist, der bei gesunden Individuen in niedriger Zahl vorkommt. Bei Immunsuppression reaktiviert sich das MCPyV und eine hohe Viruslast wird mit der Pathogenese des MCC assoziiert. Da es auch in Bronchialsekreten gefunden wurde, kann ebenfalls eine Übertragung über die Atemwege angenommen werden. Patientinnen und Patienten mit MCPyV-positivem MCC haben ein höheres Risiko für die Entwicklung einer chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) als Betroffene mit MCPyV-negativem MCC.

Damit wäre das Merkelzellpolyomavirus ein weiteres Virus, das in der Lage ist, maligne Neoplasien bei Menschen auszulösen. Weitere bekannte Tumoviren sind das Hepatitis-C-Virus, das in der Lage ist, Leberkrebs zu verursachen [56], und das Epstein-Barr-Virus, welches das nasopharyngeale Karzinom und das Burkitt-Lymphom auslösen kann [57]. Auch das Zervixkarzinom wird beispielsweise durch humane Papillomaviren hervorgerufen [58].

2.8. KRAS

KRAS wurde erst als virales Onkogen des namensgebenden Kirsten-Rat-Sarcoma Virus identifiziert [59]. Es ist ein Mitglied der RAS-Familie, deren Mitglieder GTPasen sind. KRAS fungiert als molekularer Schalter, der in vielen Signalkaskaden involviert ist, unter anderem an der Regulation des Zellzyklus und damit der Proliferation von Zellen. Aktiviertes KRAS bindet GTP und hydrolysiert es zu GDP, wodurch KRAS deaktiviert wird [60]. Eine Mutation des KRAS-Gens, die zu einer konstitutiv aktiven Proteinform führt, kann in vielen Tumorarten nachgewiesen werden. Es findet sich beispielsweise bei ungefähr der Hälfte aller Kolonkarzinome und ca. 90 % der Pankreaskarzinome [61–63].

KRAS ist ein wichtiger Signaltransduktor in der Signalkaskade des Epidermal-Growth-Factor-Rezeptors (EGFR). Nach der Bindung von Liganden der EGF-Familie an EGFR kommt es zur Dimerisierung von EGFR-Molekülen und nachfolgend zur intrazellulären Phosphorylierung durch Trans-Autophosphorylierung und damit Aktivierung. Eine zielgerichtete Antikörpertherapie gegen den EGFR ist nur dann erfolgversprechend, wenn keine konstitutive aktivierende Mutation im KRAS vorliegt, da eine solche die EGFR-Inhibition durch den Antikörper wirkungslos werden ließe. Beim kolorektalen Adenokarzinom werden oft Punktmutationen gefunden. Diese Mutationen resultieren in einer konstitutiv aktivierten Proteinform, sodass eine EGFR-Antikörpertherapie wirkungslos bleiben würde [64–66]. DNA-Sequenzierung wurde als aussagekräftige Methode beschrieben, solche und andere Mutationen im KRAS-Gen auch im formalinfixierten und paraffineingebetteten Tumorgewebe zu detektieren und damit eine prädiktive Aussage über die Wirksamkeit der EGFR-Antikörpertherapie zu machen [67].

2.9. EGFR

EGFR ist ein ca. 170 kDa großes Glykoprotein aus der Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK). Wie alle RTK ist der EGFR ein Glykoprotein mit einer Transmembranregion und einer Tyrosinkinase-Funktion. Er ist eines von vier Mitgliedern der ERBB-Familie von RTK [68]. Die Bindung von EGF an seinen Rezeptor führt zunächst zu einer Dimerisierung von EGFR-Molekülen. Diese Dimere aktivieren sich gegenseitig durch Autophosphorylierung mithilfe ihrer Tyrosinkinase-Domänen. Darauf folgt die anschließende Aktivierung des RAS/RAF/MAPK/ERK-Signaltransduktionsweges, an denen auch KRAS beteiligt ist. Die Folgen dieser Überexpression sind intensive Signalerzeugungen und Aktivierung nachgeschalteter Signalwege, was aggressiveren Wachstums- und Invasionseigenschaften der betroffenen Zelle führt. Die Signalwege liefern auch Überlebenssignale [68]. EGFR ist in normalen Epithelzellen vorhanden, wird aber in einer Vielzahl von Tumorzelllinien überexprimiert. Dies ist mit einer

schlechten Prognose assoziiert [69]. EGFR-Aktivierung kann zu Resistenzen gegen Chemotherapie und Bestrahlung in Tumorzellen führen. In den letzten zwei Jahrzehnten wurden in der zellbiologischen Forschung große Anstrengungen unternommen, um Krebstherapien zu entwickeln, welche die EGFR-Aktivität inhibieren können. Hierzu gehören die Entwicklung monoklonaler Antikörper und niedermolekularen, membrangängigen, inhibitorischen, organischen Verbindungen (smart drugs). Monoklonale Antikörper blockieren die Bindung von EGF an die extrazelluläre Domäne des EGFR oder die Dimerisierung zu aktiven Rezeptordimeren. Niedermolekulare organische Verbindungen wirken dagegen meist intrazellulär, indem sie die Autophosphorylierung und damit die Aktivierung der Signaltransduktionswege verhindern. Inzwischen existiert eine Anzahl von EGFR-Inhibitoren, welche das Tumorwachstum aufhalten und in einigen Fällen sogar eine Tumorregression auslösen können [68, 69].

Inwieweit eine Überaktivierung von EGFR an Neoplasien der Haut beteiligt ist, ist bisher wenig erforscht. Bislang existieren nur wenige publizierten Studien, in denen EGFR-Mutationen oder EGFR-Inhibitortherapien bei Merkelzellkarzinomen systematisch untersucht wurden. Ein Patient mit metastasiertem MCC wurde in einer Therapiestudie an Chemotherapie-refraktären Patientinnen und Patienten mit kleinzelligen Karzinomen eingeschlossen, die EGFR-Inhibitortherapie zeigte jedoch keine Wirkung [70]. EGFR-Proteinexpression im MCC wurde in einer anderen Studie mittels Immunhistochemie untersucht [71]. Die statistische Analyse von Brunner et al. ergab keine Korrelation zwischen Zielexpression und Tumorremission, Geschlecht oder Tumorstadium. Es ist dennoch möglich, dass die EGFR-Inhibitortherapie bei MCC wirksam sein kann. So wurde z. B. über kolorektale Karzinome berichtet, die auf diese Therapie ansprachen, obwohl die Tumoren immunhistochemisch negativ für EGFR waren [72]. Es gibt allerdings auch vorliegende Studien, bei denen eine hohe EGFR-Expression detektiert wurde, diese jedoch nicht mit der EGFR-Wirksamkeit der Inhibitortherapie korrelierte [70, 73].

2.10. Zielsetzung der Arbeit

Ziel unserer Arbeit war es, mithilfe der Pyro- und Sanger-DNA-Sequenzierungsmethoden zu untersuchen, ob und falls ja, in welcher Frequenz Mutationen im KRAS und EGFR beim MCC auftreten. In einem weiteren Schritt sollten mithilfe der Next-Generation-Sequencing-Technologie weitere genetische Aberrationen identifiziert werden, damit ein tumorgenetisches Profil für Merkelzellkarzinome zu entwickeln, um hierdurch einen Erkenntnisgewinn hinsichtlich potenzieller therapeutischer Targets und/oder klinischer prognostischer Indikatoren zu entwickeln, die möglicherweise zu einem direkten klinischen Verständnis und besseren Entscheidungen für Betroffene führen sollten.

3. Material und Methoden

3.1. Patientinnen- und Patientenmaterial

Hierzu wurden in Kollaboration mit dem Pathologischen Institut der medizinischen Fakultät München und der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. rer. nat. Andreas Jung im ersten Teil der vorliegenden Arbeit bei zwölf Patientinnen- und Patientenproben mittels Pyrosequencing der KRAS-Status und mithilfe der Sanger-(DNA)-Sequenzierung der EGFR-Status bestimmt. Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde dann eine Analyse unter Zuhilfenahme des Cancer Hotspot Panels (Thermo Fisher, Ion Torrent) von zunächst drei ausgewählten Tumorproben ein Next Generation Sequencing durchgeführt. Nach Durchsicht der ersten vielversprechenden Ergebnisse wurde entschieden, weitere Proben mit diesem Ansatz zu bearbeiten.

Alle Patientinnen- und Patientenproben (Tumorblöcke von formalinfixierten Paraffin eingebetteten MCCs) wurden vom Institut für Dermatologie, Ludwig-Maximilians-Universität München, zur Verfügung gestellt. Die Auswahl des Kollektivs in der vorliegenden Arbeit wurde anhand einer Sammlung des Instituts für Dermatologie, Ludwig-Maximilians-Universität München erstellt. Es wurden aus 82 vorliegenden Proben insgesamt 24 verwertbare Tumorblöcke, von Erkrankten ausgewählt, bei denen makroskopisch ausreichend Tumorgewebe vorhanden war. Diese waren zwischen 2005 bis 2014 in der Hautklinik der LMU München operiert wurden. Aus diesem Kollektiv wurden anschließend willkürlich zwölf paraffinierte Tumorblöcke selektiert, bei denen ausreichend verwertbares Material vorhanden war, um alle hier vorgesehen Untersuchungen durchzuführen. Die Proben stammten von Patientinnen und Patienten, deren Altersbereich zum Zeitpunkt der Erstdiagnose zwischen 63 bis 97 Jahren einzuordnen war. Das früheste Diagnosedatum der gesamten Sammlung war 1997. Eine Nach- und Rückverfolgung der eingeschlossenen Patientinnen und Patienten war aufgrund fehlender persönlicher Daten nicht möglich. Es folgte daher eine Anonymisierung der vorliegenden Daten. Es lassen sich dadurch keine Rückschlüsse mehr auf den Wohnort oder Namen der Betroffenen ziehen. Folgende Daten wurden weitgehend erfasst: Geschlecht, Geburtsdatum, Alter, Erstdiagnosejahr, sowie die Tumor-Lokalisation. Die Diagnose bei allen fünfzehn Proben wurde als gesichert angenommen. Insbesondere, da von allen Proben eine CK20-positive Immunhistochemie existierte. Anschließend wurden aus zwölf paraffinierten Tumorböcken jeweils mehrere 4µm dicke Schnitte angefertigt und je ein Schnitt mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung eingefärbt. In dem gefärbten Schnitt wurde mithilfe eines Mikroskops der Tumor markiert und dieses Areal anschließend auf die anderen, ungefärbten und entparaffinierten Schnitten übertragen, um das Tumor haltige Areal auszukratzen (Mikrodissektion). Abschließend wurde die DNA mithilfe von QIAmp DNA MikroKits 50

(Qiagen, Hilden) extrahiert und von einer medizinisch-technischen Assistentin in einen Isolations-Automaten (Qiacube: Qiagen, Hilden) gegeben.

3.2. Pyrosequenzierung von KRAS

Die Pyrosequenzierung des KRAS-Gens wurde ebenfalls am Pathologischen Institut der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München und der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. rer. nat. Andreas Jung durchgeführt.

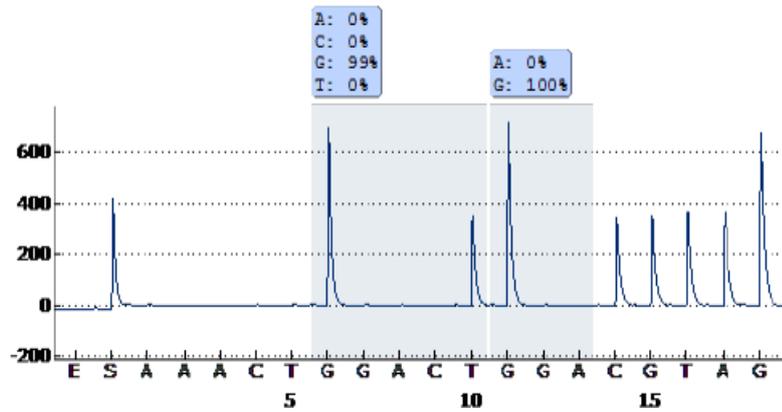
Im Gegensatz zu anderen Technologien der Molekulardiagnostik wie z. B. Sangersequenzierung oder Next generation sequencing (NGS) wird bei der Pyrosequenzierung die DNA-Sequenz in Echtzeit gelesen. Diese Methode erlaubt die Erfassung bekannter und unbekannter Mutationen im ausgewählten Genbereich. Die Pyrosequenzierung verwendet das Prinzip der Sequenzierung durch Synthese und liefert Sequenzinformationen. Jedes Mal, wenn ein Nukleotid, bzw. ein dNTP eingebaut wird, bleibt als Spaltprodukt Pyrophosphat zurück. Dieses Pyrophosphat wird gemessen, da es durch eine chemische Reaktion einen Lichtblitz erzeugt. Die Schritte laufen folgendermaßen ab:

1. Die Enzyme DNA-Polymerase, Luziferase, Sulfurylase und Apyrase sowie die Substrate Adenosin 5' Phosphosulfat (APS) und Luziferin und des zu sequenzierenden Stranges komplementärer Primer befinden sich in einer Reaktionsmischung zusammen mit dem zu sequenzierenden einzelsträngigen DNA-Fragment.
2. Das erste Desoxy-Ribonukleosid-Triphosphat (dNTP) wird im Sequenziergerät in den Reaktionsansatz dispensiert. Das dNTP wird von der DNA-Polymerase in den DNA-Strang eingebaut, falls es komplementär zur Base des Templates ist. Dabei wird bei jedem weiteren Einbau Pyrophosphat (PPi) in stöchiometrischen Mengen zur Zahl der eingebauten Nukleotid frei.
3. Durch die ATP-Sulfurylase wird die Umwandlung von PPi und APS in ATP katalysiert. Dieses entstandene ATP wird für die zur Umwandlung von Luziferin in Oxyluciferin von der Luziferase verwendet und benötigt. Die dabei freiwerdende Lichtmenge ist proportional zur Menge an ATP. Dieses Licht aus der Luziferase-katalysierten Reaktion wird von einem CCD-Chip quantifiziert, mittels einer Software verarbeitet und als sogenanntes Pyrogramm grafisch dargestellt.
4. Die Apyrase baut kontinuierlich nicht eingebaute, also übrig gebliebene, Nukleotide ab. Sobald der Abbau abgeschlossen ist, wird das entsprechend nachfolgende Didesoxy-

Ribonukleotid hinzugefügt und der nächste Zyklus beginnt mit Wiederholung der Schritte 2–5.

- Die Zugabe der dNTPs folgt entsprechend der vom Experimentator vorgegebenen Sequenz nacheinander. Während des Durchlaufes der Pyrosequenzierung wird der zum Primer komplementäre DNA-Strang synthetisiert und anschließend die Sequenz durch Auswertung der Peakhöhen bestimmt.

Well: A2
 Assay: KRAS_Ex02_Ogino
 Sample ID: D12.7926
 Sequence to analyze: GNTGRCGTAGGCAA
 Note: 2



Well: B6
 Assay: KRAS_Ex02_Ogino
 Sample ID: WT
 Sequence to analyze: GNTGRCGTAGGCAA
 Note:

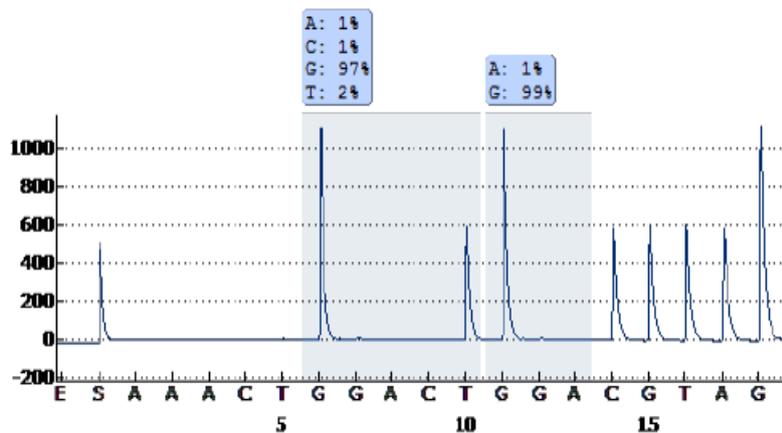


Abbildung 6: Beispielergebnis Probe 2 zeigt dieselbe Basenfolge im Vergleich zum Wildtyp

Im Rahmen der Vorliegenden Arbeit wurde die aus den Tumorblöcken extrahierte DNA mittels eines Pyrosequencers (Q24: Qiagen, Hilden) analysiert. Zuerst wurde ein fertiges Reaktionsgemisch wie oben beschrieben mit DNA, DNA-Polymerase, Luziferase, Sulfurylase, Apyrase, Substrate Adenosin 5' Phosphosulfat (APS), Luziferin sowie Mischungen von einzelsträngigem PCR-Produkt und Sequenzierprimer gemäß den Angaben des Herstellers angefertigt und damit der Sequenzierautomat beladen.

3.3. Sanger-Methode von EGFR

Auch die Sequenzierung des EGFR-Gens mittels Sanger-Methode wurde in Kollaboration mit dem Pathologischen Institut der medizinischen Fakultät München und der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. rer. nat. Andreas Jung durchgeführt.

Die Sanger-Sequenzierung beruht auf einer PCR-Amplifikation eines zu untersuchenden DNA-Abschnitts. In dieser Arbeit erfolgte die Sequenzierungs-PCR unter Einsatz von Big-Dye Termination Mix Kits (Thermo Fisher, Applied Biosystems) nach Angaben des Herstellers: Denaturierung der doppelsträngigen DNA erfolgte hierzu bei einer Temperatur von 94 °C für 1 Minute. Der Annealing-Vorgang dauerte 15 Sekunden bei 50 °C. Für die Extensionsreaktion wurde die Temperatur erneut für eine Minute auf 60 °C erhöht, damit die Sequenase (modifizierte Taq-DNA-Polymerase) ausreichend lange PCR-Produkte herstellen konnte. Die synthetisierten DNA-Fragmente wurden basierend auf der oben beschriebenen Kettenabbruchsynthese mittels fluoreszenzmarkierter ddNTPs sequenziert [74]. Die individuellen ddNTPs waren zur Detektion mit jeweils einem von vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, welche die Detektion der vier verschiedenen Basen Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin erlauben. In einer der klassischen PCR-Reaktion ähnlichen Reaktion wurde die DNA mit nur einem eingesetzten Primer amplifiziert. Die Synthese der DNA-Kette wurde durch den Einbau eines fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotids abgebrochen. Nach weiteren vier min Inkubation bei 60°C wurde das Verfahren gestoppt, sodass es anschließend mithilfe einer Gelelektrophorese aufgetrennt und die Sequenz vom Auswertungsprogramm abgelesen werden konnte. Nach Abschluss der PCR wurden verbleibende Terminatoren, Nukleotide und Primer mittels Sephadex-Gel-Reinigung (DyEx Kit: Qiagen, Hilden) von den längeren und damit größeren Sequenzprodukten abgetrennt und diese mit hoch-deionisiertem Formamid (HiDi Foramide: Thermo Fisher Applied Biosystems, Darmstadt) versetzt (1µl PCR Produkt mit 19µl Formamid), für 30 Sekunden bei 96°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und schließlich mithilfe eines ABI genetic analyzers 3130 (Thermo Fisher, Applied Biosystems, Darmstadt) nach Angaben des Herstellers aufgetrennt (POP7-Protokoll).

3.4. Next Generation Sequencing (NGS)

Das Dideoxy-Terminationsverfahren (Sanger-Sequenzierung) war in den vergangenen Jahren die Methode der Wahl, um eine DNA-Probe zu sequenzieren [74]. Im Jahr 2001 wurde die vollständige Sequenzierung des humanen Genoms im Rahmen des „Humangenomprojektes“ zu einer der wichtigsten Errungenschaften in der Geschichte der Wissenschaft. Bei der Entschlüsselung einer großen Anzahl von menschlichen Genomen erreichte die automatisierte Sanger-Sequenzierung jedoch trotz technischer Neuerungen ihre Grenzen. Die Entwicklung der Next-Generation-Sequencing-(NGS) Technologie konnte die steigenden Anforderungen für größere Mengen an Sequenzdaten schneller und günstiger erfüllen. Damit können gleichzeitig Millionen von Sequenzen parallel gelesen werden. Dies revolutionierte die Methoden der DNA-Sequenzierung und eröffnete ein breites Spektrum an Möglichkeiten, die von der Re-Sequenzierung humaner Genome (The 1000 Genomes Project, 2010), der Entschlüsselung von Krebsgenomen (International Cancer Genome Consortium, 2010) und Epigenomen (Human Epigenome Project, 2008) sowie RNA-Sequenzierung [75] bis hin zur De-novo-Sequenzierung Genome anderer Spezies und der personalisierten Medizin reichen.

Die NGS-Analyse in der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls in freundlicher Kollaboration mit dem Pathologischen Institut der medizinischen Fakultät München und der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. rer. nat. Andreas Jung durchgeführt.

Bei den erhältlichen NGS-Technologien lässt sich der Weg zur DNA-Sequenz in drei Abschnitte gliedern. Heute werden in der Routineversorgung Plattformen von Illumina und Thermo Fisher eingesetzt. Diese einzelnen Schritte sind im Folgenden aufgelistet

Abbildung 7):

- (1) die Herstellung einer DNA-Bibliothek,
- (2) die parallele, klonale Amplifikation der DNA und
- (3) abschließende Sequenzierung
- (4) Analyse der Rohdaten (alignment)
- (5) Annotation der zugeordneten (aligned) Daten
- (6) und Anzeige der Sequenz auf dem Computermonitor (Abbildung 8)

Die Grundschrirte bei der Herstellung einer DNA-Bibliothek sind:

- (1) die physikalische Fragmentierung der DNA (kann bei Formalin-fixiertem Material entfallen),

- (A) capture hybrid Verfahren
- (2) die Reparatur der Enden der zufällig entstanden Fragmente (end polishing) und
- (3) Ligation der DNA-Fragmente mit Sequenzsystem spezifischen Adaptern.

- (B) Amplikon Verfahren
- (2) Multiplex-PCR mit Gen spezifischen Primerpaaren

Ergebnis ist in beiden Fällen eine Bibliothek (library), die in den weiteren Sequenzierungsprozess eingespeist werden kann. Ein DNA-Sequenzabschnitt wird in Abbildung 8 gezeigt.

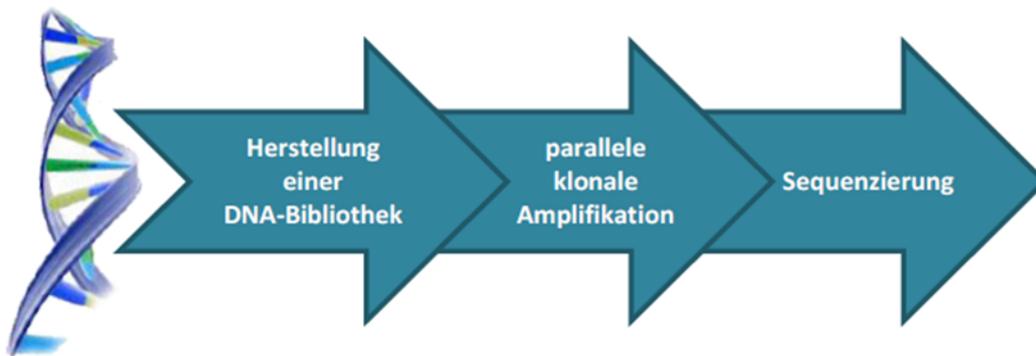


Abbildung 7: Einzelschritte von der DNA zur Sequenz

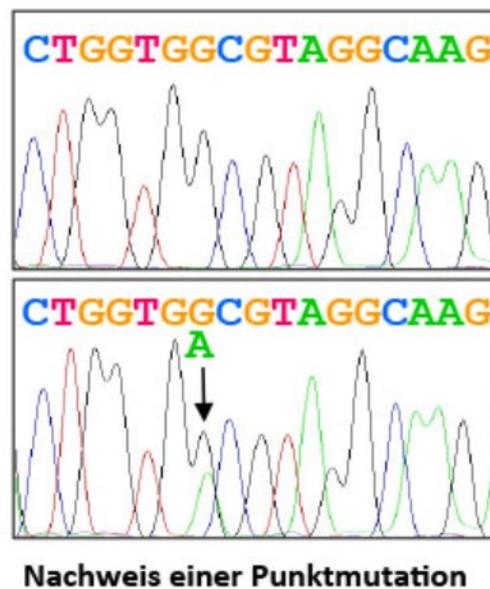


Abbildung 8: Computergrafische Darstellung einer DNA-Sequenz mit Nachweis einer Punktmutation [76]

Hierbei wurde das Cancer Hot Spot Panel (Thermo Fisher, Ion Torrent, Darmstadt) eingesetzt. Das Cancer Hot Spot Panel umfasst 50 Gene, die häufig in Krebserkrankungen mutiert gefunden werden

NR	GEN	MUTATION IN EXONEN
1	ABL1	Ex 4,5,6,7
2	AKT1	Ex 3,6
3	ALK	Ex 23,25
4	APC	Ex 16,16,16,16,16,16,16
5	ATM	Ex 51,55,56,57,60,62,64,64,9,10,13,18,27,35,36,37,40
6	BRAF	Ex 11,15
7	CDH1	Ex 3,8,9
8	CDKN2A	Ex 2,2
9	CSF1R	Ex 7,22
10	CTNNB1	Ex 3
11	EGFR	Ex 3,7,15,18,19,20,20,21
12	ERBB2	Ex 19,20,21
13	ERBB4	Ex 3,4,6,7,8,9,15,23
14	EZH2	Ex 16
15	FBXW7	Ex 5,8,9,10,11
16	FGFR1	Ex 2,5
17	FGFR2	Ex 7,7,9,12

18	FGFR3	Ex 6,8,13,15,17
19	FLT3	Ex 11,14,16,20
20	GNA11	Ex 5
21	GNAQ	Ex 5
22	GNAS	Ex 8,9
23	HNF1A	Ex 3,4
24	HRAS	Ex 2,3
25	IDH1	Ex 4
26	IDH2	Ex 4
27	JAK2	Ex 14
28	JAK3	Ex 3,12,15
29	KDR	Ex 6,7,11,19,21,26,27,30,30
30	KIT	Ex 2,9,10,11,13,14,15,17,18
31	KRAS	Ex 2,3,4
32	MET	Ex 2,2,11,14,16,19
33	MLH1	Ex 12
34	MPL	Ex 10

35	NOTCH1	Ex 26,27,34
36	NPM1	Ex 11
37	NRAS	Ex 2,3,4
38	PDGFRA	Ex 12,14,15,18
39	PIK3CA	Ex 21,21,2,2,5,7,8,8,10,14,19
40	PTEN	Ex 1,3,5,6,7,7,8,8
41	PTPN11	Ex 3,13
42	RB1	Ex 22,4,6,10,11,14,17,18,20,21
43	RET	Ex 10,11,13,15,16
44	SMAD4	Ex 3,4,5,6,8,9,10,11,12
45	SMARCB1	Ex 2,4,5,9
46	SMO	Ex 3,5,6,9,11
47	SRC	Ex 14
48	STK11	Ex 1,4,4,6,8
49	TP53	Ex 2,4,5,5,6,7,8,10
50	VHL	Ex 1,2,3

Tabelle 1 bekannte krebsassoziierte Mutationen, die im Cancer Hot Spot Panel analysiert werden

4. Ergebnisse

4.1. Patientinnen- und Patientenmaterial

Das Patientinnen und Patientenkollektiv bestand aus 82 Proben von behandelten Personen der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der LMU München, die dort zwischen 2005 und 2014 operiert wurden. Aus diesem Kollektiv wurden willkürlich zunächst zwölf CK20-positive, paraffinierte Tumorblöcke selektiert, bei denen ausreichend verwertbares Material vorhanden war. Die MCC-Diagnose konnte als gesichert angenommen werden. Nach den ersten vielversprechenden Ergebnissen der Sangersequenzierung wurden anschließend zwölf weitere Proben für die NGS-Sequenzierung auf dieselbe Art ausgewählt. Hierbei wurde zum Teil auf bereits untersuchte Tumorblöcke zurückgegriffen, sodass einzelne Tumorblöcke auf unterschiedliche Art untersucht wurden (siehe Aufteilung und Zuordnung in Tabelle 2). Acht der ausgewählten Tumoren waren sowohl mittels Sanger, als auch mittels der NGS-Technologie sequenziert worden.

Die demografischen Daten der Patientinnen und Patienten (soweit bekannt) sind in Tabelle 2 dargestellt.

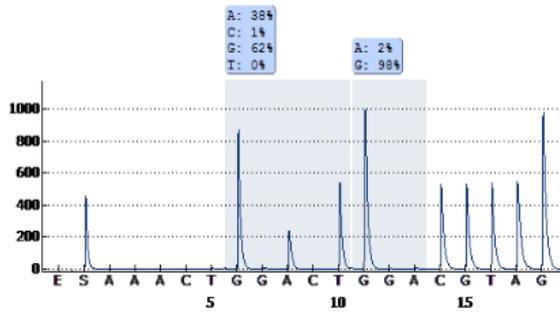
NR	GESCHLECHT	GEBURTSJAHR	ALTER BEI DIAGNOSE	LOKALISATION DES TUMORS
UNTERSUCHUNG VON EGFR, KRAS & ANALYSE MITTELS NGS				
1	Weiblich	1922	90	rechts Glabella
2	Weiblich	1926	86	links Glabella
3	Weiblich	1924	87	rechte Wange
4	Männlich	1944	66	linkes Ohrläppchen
7	Weiblich	1917	91	rechte Wange
8	Männlich	1920	87	linker Augenwinkel
10	Weiblich	1912	83	links Digitus I
12	Weiblich	1923	79	rechts nuchal
UNTERSUCHUNG VON EGFR & KRAS				
5	Weiblich	1923	87	links Wange
6	Männlich	1931	79	rechts Unterlippe
9	Weiblich	1925	81	rechts Flanke
11	Männlich	1937	68	links präauriculär
ANALYSE MITTELS NGS				
13	Weiblich	1917	93	rechte Wange
14	Männlich	1910	97	linkes Kapillitium
15	Weiblich	1949	63	rechts parietal
16	Weiblich	1923	83	rechte Wange

Tabelle 2 Demografische Daten der eingeschlossenen Patientinnen und Patienten

KRAS

Die KRAS-Pyrosequenzierung kann die Präsenz oder Absenz von Mutationen (zB. c.35G>A) anzeigen, die beispielsweise in Abbildung 9 A als Peak bei A in Position 10 erscheint. Die nicht mutierte Sequenz zeigt an dieser Stelle keinen Peak (Abbildung 9 B).

A)



B)

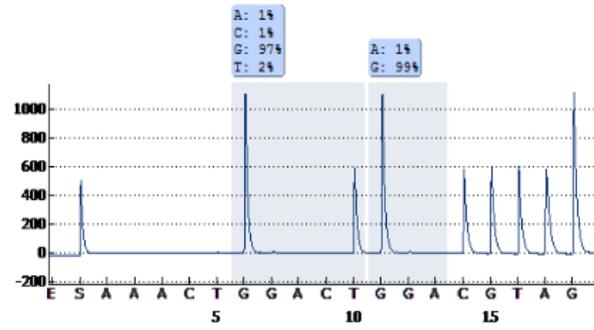


Abbildung 9: Kontrollsequenzen der KRAS-Pyrosequenzierung. A): positive Kontrolle mit A an Position 10; B): negative Kontrolle ohne Mutation.

Eine KRAS-Gen-Mutation konnte bei keinem/r der zwölf in der hier vorliegenden Studie eingeschlossenen Patientinnen und Patienten gefunden werden (Abbildung 10).

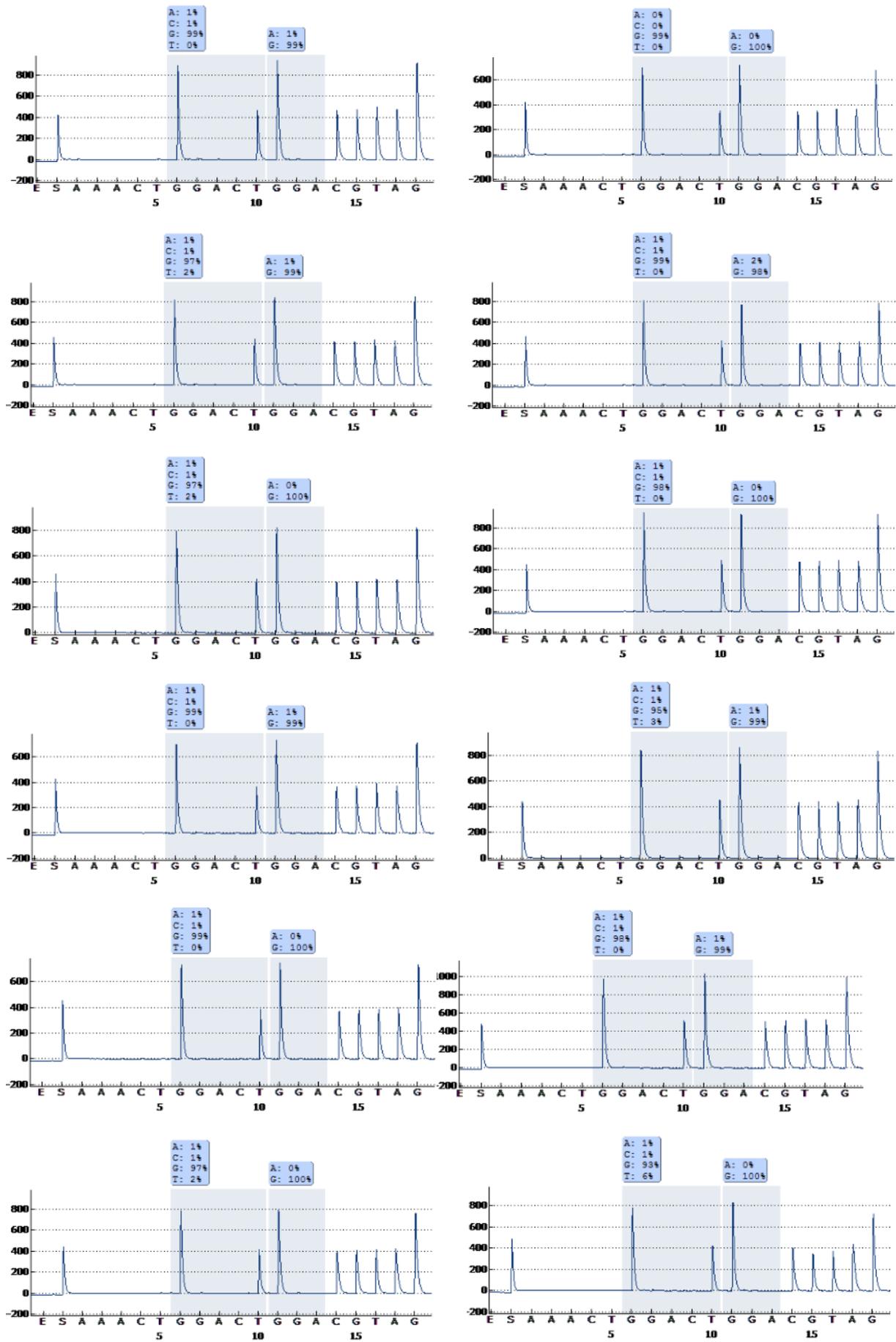


Abbildung 10: KRAS-Pyrosequenzierung der zwölf Patientinnen- und Patientenproben

4.2. EGFR

Mittels Sanger-Sequenzierung wurde auf das Vorhandensein von Mutationen in den Exonen 18, 19 und 21 des EGFR-Gens getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt. Eine der hier untersuchten Proben hatte eine G>A-Mutation (c.2131G>A, p.(E711K)) im Exon 18, die zu einem Austausch der Aminosäure Glutamat zu Lysin an der Position 711 in der Proteinsequenz führt. Die Sequenzen des Exons 19 waren bei zwei untersuchten Proben nicht lesbar, bei den übrigen zehn Proben waren keine Mutationen nachweisbar. Im Exon 21 hatten zwei Patientinnen und Patienten eine Mutation c.2611G>A, p.(A871T) & c.2573T>G, p.(L858R). Diese waren ein G>A-Austausch in der DNA-Sequenz an Position c.2611, der zu einem Alanin-zu-Threonin-Austausch an Position 871 in der Proteinsequenz führt. Die andere Mutation war ein T>G-Austausch an Position c. 2573, der einen Leucin-zu-Arginin-Austausch an Position 858 in der Proteinsequenz zur Folge hat. Zwei Proben produzierten Sequenzen für das Exon 21, die auch nach Wiederholung des Tests nicht lesbar waren.

	Exon 18	Exon 19	Exon 21	Mutation
1	Ex18=WT	Ex19=WT	Ex21=WT	
2	Ex18=WT	Ex19=WT	Ex21=nl	WDH= nicht lesbar
3	Ex18=WT	Ex19=WT	Ex21=WT	
4	Ex18=WT	Ex19=WT	Ex21=WT	
5	Ex18=WT	Ex19=WT	Ex21=nl	WDH=nicht lesbar
6	Ex18=WT	Ex19=WT	Ex21=WT	
7	Ex18=WT	Ex19=WT	Ex21=nl	WDH Ex21=c.2611G>A,p.(A871T)COSM28605
8	Ex18=WT	Ex19=WT	Ex21=nl	WDH Ex21=c.2573T>G,p.(L858R)COSM6224
9	Ex18=WT	Ex19=WT	Ex21=WT	
10	Ex18=WT	Ex19=WT	Ex21=WT	
11	Ex18= G>A	Ex19=WT	Ex21=WT	Ex18= c.2131G>A,p.(E711K)COSM53287
12	Ex18=WT	Ex19=WT	Ex21=WT	

Tabelle 3 Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung der Exons 18, 19 und 21 der 12 Proben. n. l.: nicht lesbar; WDH n. l.: Wiederholung der Sequenzierung war ebenfalls nicht lesbar.

4.3. Cancer Hot Spot Panel

Nachdem das Ergebnis aus den Sequenzanalysen für KRAS und EGFR das erwartete Ergebnis lieferte, zeigte dies, dass sich das gewählte Kollektiv zum einen eignete, Sequenzanalysen durchführen zu können und zum anderen trotz seiner geringen Größe den beschriebenen Querschnitt von Mutationen in MCC repräsentativ abzubilden und damit als repräsentative Kollektion angesehen werden konnte. Daher wurde entschieden, in einem zweiten Ansatz mittels NGS auf das Vorhandensein von Mutationen in 50 häufig in Tumoren mutiert gefundenen Genen zu untersuchen: ABL1, AKT1, ALK, APC, ATM, BRAF, CDH1, CDKN2A, CSF1R, CTNNB1, EGFR, ERBB2, ERBB4, EZH2, FBXW7, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FLT3, GNA11, GNAQ, GNAS, HNF1A, HRAS, IDH1, IDH2, JAK2, JAK3, KDR, KIT, KRAS, MET, MLH1, MPL, NOTCH1, NPM1, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, PTEN, PTPN11, RB1, RET, SMAD4, SMARCB1, SMO, SRC, STK11, TP53 und VHL.

Eine der zwölf mittels NGS untersuchten Proben lieferte keine verwertbaren Ergebnisse. Von den übrigen elf Proben zeigten zwei keinerlei Mutationen in den im Cancer Hot Spot Panel getesteten Genen (alle-WT, Abbildung 11). Die Reihenfolge der Probenanordnung ist für jedes getestete Gen gleich, was bedeutete, dass z. B. der erste Balken von links für alle Gene die identische Probe repräsentierte. Mutationen sind farbcodiert: schwarz: vorzeitiges Stopp-Codon (truncation), rotbraun: Leseraster-Mutation, grün: Basenaustausch-Mutation. Eine Probe wies nur eine Mutation auf. Alle anderen Proben wiesen Mutationen in multiplen Genen auf. Insgesamt wurden 26 mutierte Gene in 50 getesteten Genen gefunden. Die Höchstzahl an gefundenen Mutationen in den 50 getesteten Genen lag bei zehn (Abbildung 11, Probe in der Mitte). Die meisten der Mutationen, in der Anzahl 32, in den elf verwertbaren Proben, waren Missense- oder Punkt-Mutationen. Demnach also Mutationen, die zu einem nicht synonymen Codon und damit zu einem Austausch einer Aminosäure im Protein führen. Deletionen, die nicht zu einer Leseraster-Mutation führten (In-frame-Mutationen) konnten insgesamt dreimal detektiert werden. Frameshift-Mutationen, die zu einem vorzeitigen Stopp-Codon und damit zu einer Trunkierung des Proteins führen, wurden viermal gefunden.

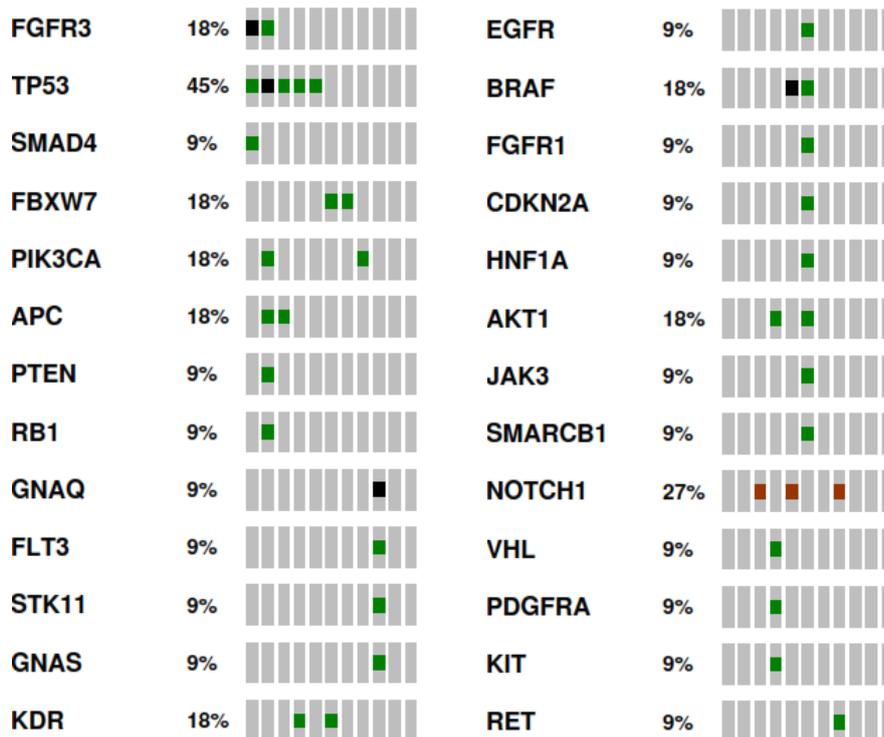


Abbildung 11: NGS mit Cancer Hot Spot Panel, ein grauer Balken repräsentiert eine Probe ohne Mutation

Die Untersuchung der genauen Lage der gefundenen Mutationen innerhalb der jeweiligen Gene zeigte, dass bei beiden Proben, die eine Mutation im AKT1-Gen aufwiesen, diese in der Pleckstrin-Homologie- (PH-)Domäne in der für das N-terminale Ende des Proteins codierenden Region des Gens lagen (Abbildung 12). Es handelt sich bei diesen Mutationen um Missense-Mutationen. Eine Missense-Mutation an derselben Stelle im APC-Gen (A1582P/T) wurde in zwei Proben gefunden. BRAF wies in zwei Proben jeweils eine Missense-Mutation an unterschiedlichen Stellen in seiner Protein-Tyrosin-Kinase-Domäne auf. Eine Missense-Mutation wurde in der den N-Terminus codierenden Region des CDKN2A-Gens gefunden. Auch im EGFR-Gen fand sich nur in einer Probe eine Mutation. Diese war eine Missense-Mutation, die sich in der für die Tyrosin-Kinase-Domäne codierenden Genregion befand. Abbildung 13 zeigt die entsprechenden Lagen der gefundenen Mutationen in den Genen FBXW7, FGFR1, FGFR3, FLT3 und GNAQ. Bei FBXW7 handelte es sich um zwei verschiedene Missense-Mutationen, die beide in der Region direkt vor dem 5'-Ende des Codes für die F-Box-ähnliche Domäne des Proteins liegt. Eine der MCC-Tumorproben hatte eine Mutation in der Nähe der ersten I-Set-Domäne des FGFR1-Proteins. Das andere Mitglied der FGFR-Rezeptor-Familie FGFR3 wies eine Trunkierung zwischen den beiden I-Set-Domänen in einer Probe auf, eine andere Probe hatte Missense-Mutation zum C-Terminus des Proteins hin. Direkt vom Beginn der Tyrosin-Kinase-Domäne des FLT3-Gens fand sich eine weitere Missense-Mutation. Eine Probe hatte eine Mutation im GNAQ-Gen, die zu einem vorzeitigen Kettenabbruch führte. Wie in Abbildung 14 dargestellt, war GNAS in einer Probe

mutiert. Diese Mutation war in der Nähe des 5'-Endes des Gens und eine Missense-Mutation. HNF1A zeigte ebenfalls eine Missense-Mutation in einer Probe, die sich am 5'-Ende der Homöobox befand. Wie auch schon bei einigen anderen Genen, befand sich die einzige in den Proben gefundene Missense-Mutation im JAK3-Gen in der Gen-Region, die für eine der beiden Tyrosin-Kinase-Domänen codiert. Auch KDR wies eine Missense-Mutation in der Tyrosin-Kinase-Domäne des Proteins auf. Eine weitere Missense-Mutation wurde in einer anderen Probe in der N-terminalen Immunglobulin- (IG-) Domäne detektiert. KIT war in einer getesteten Probe mutiert. Diese Mutation war eine Missense-Mutation und lag zwischen der IG3- und der Tyrosin-Kinase-Domäne M541L. Sie wurde als häufiger Polymorphismus beschrieben, der nachweislich die Proliferation in Gegenwart von Liganden im Vergleich zu Wildtyp-KIT erhöht [77]. Eine Deletion, die jedoch nicht zu einem Frameshift führte, wurde in einer Probe in der Nucleotide-oligomerization- (NOD-)Domäne des NOTCH1-Gens gefunden (Abbildung 15). PDGFRA wies eine Missense-Mutation in der Tyrosin-Kinase-Domäne in einer Probe auf. PIK3CA war in drei der elf untersuchten Proben mutiert. Es scheint sich in allen drei Fällen um eine Missense-Mutation zu handeln, die in unterschiedlichen Regionen des Proteins lag. Eine Missense-Mutation am 3'-Ende der Genregion, die für die Phosphatase-Domäne des PTEN-Proteins codiert, war in einer MCC-Probe mutiert. RB1 wies ebenfalls eine Missense-Mutation in einer Probe auf. Diese befand sich in der RB-B-Domäne. RET zeigte in einer Probe eine Missense-Mutation, die ungefähr in der Mitte des Proteins in keiner bekannten Domäne lag. Dasselbe galt für SMAD4 (Abbildung 16). Weitere Missense-Mutationen in jeweils einer einzigen MCC-Probe fanden sich in den Genen SMARCB1, STK11 und VHL. Die Mutation im STK11 lag dabei in der Tyrosin-Kinase-Domäne. Mit Missense-Mutationen in fünf von elf Proben war das TP53-Gen von allen im Cancer Hotspot Panel untersuchten Genen am häufigsten mutiert.

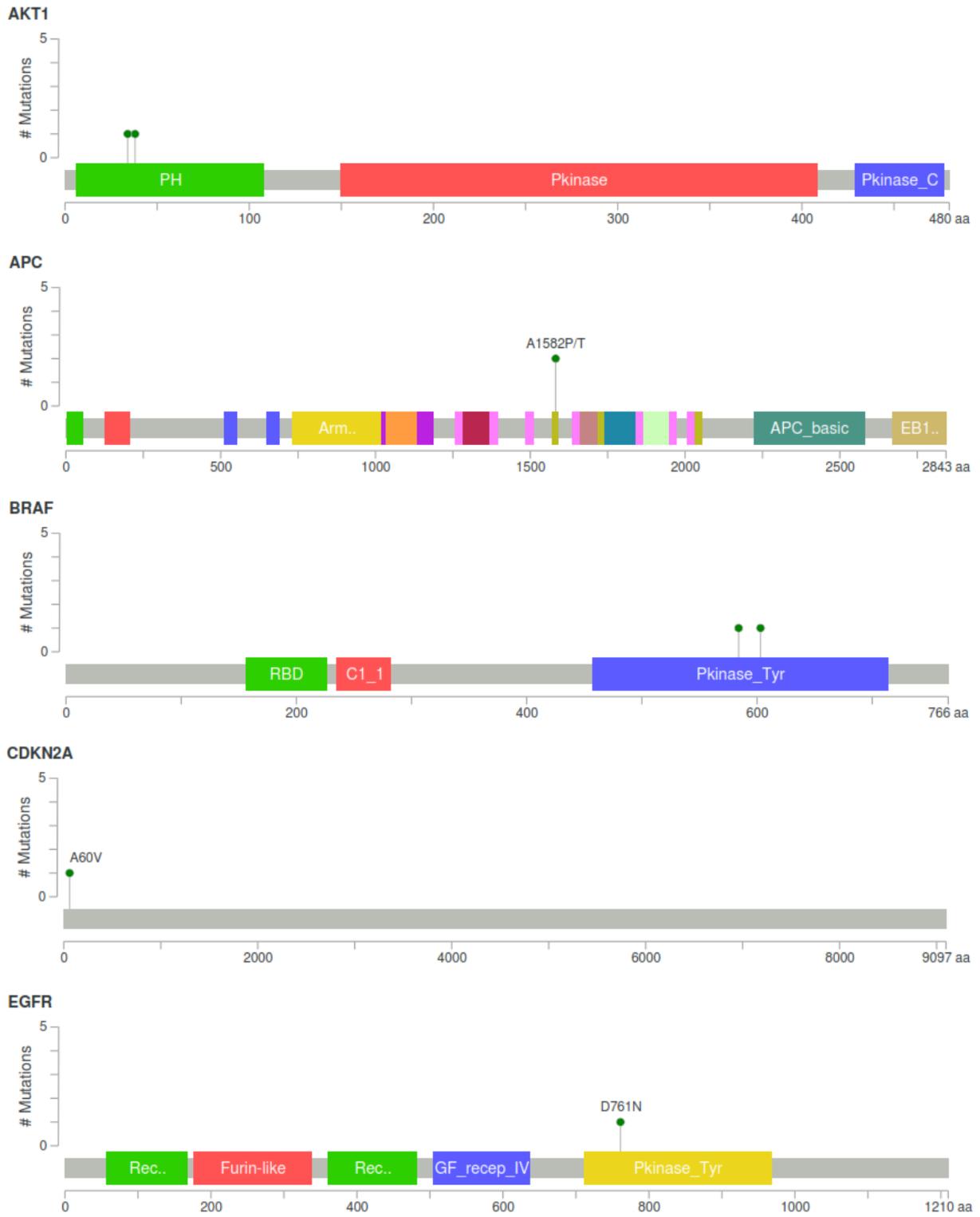


Abbildung 12: NGS mit Cancer Hot Spot Panel: Lage der gefundenen Mutationen in den Genen AKT1, APC, BRAF, CDKN2A und EGFR

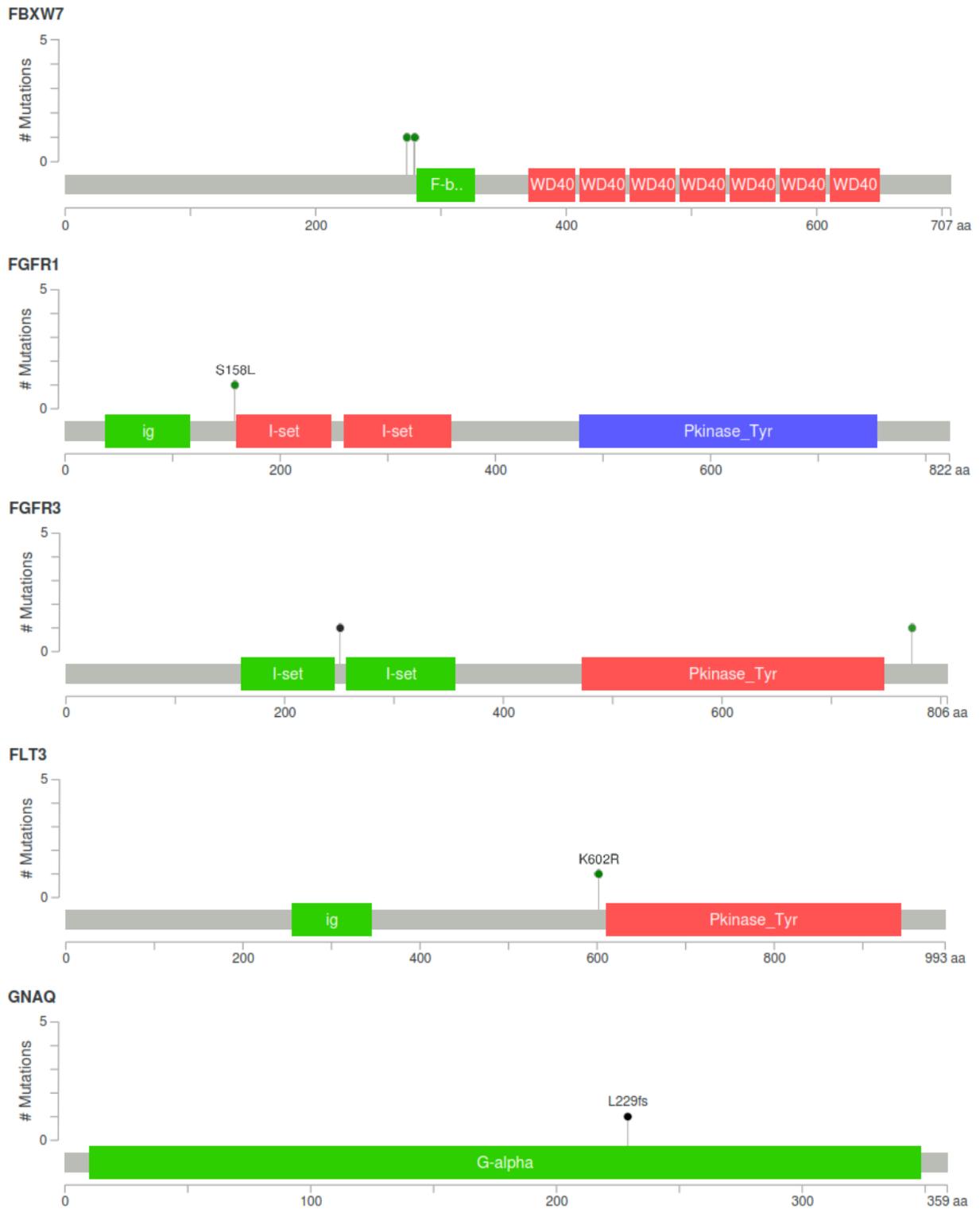


Abbildung 13: NGS mit Cancer Hot Spot Panel: Lage der gefundenen Mutationen in den Genen FBXW7, FGFR1, FGFR3, FLT3 und GNAQ

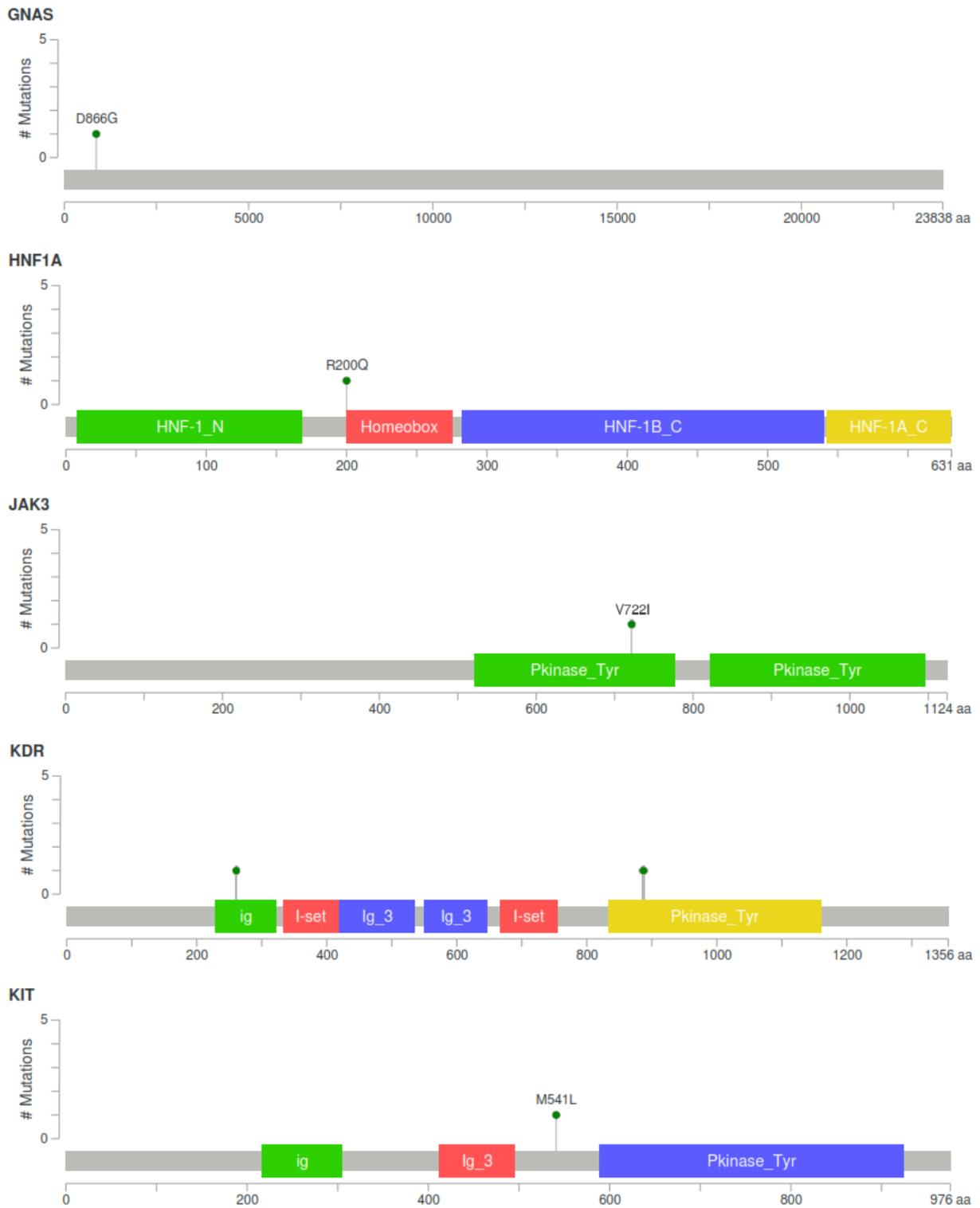


Abbildung 14: NGS mit Cancer Hot Spot Panel: Lage der gefundenen Mutationen in den Genen GNAS, HNF1A, JAK3, KDR und KIT

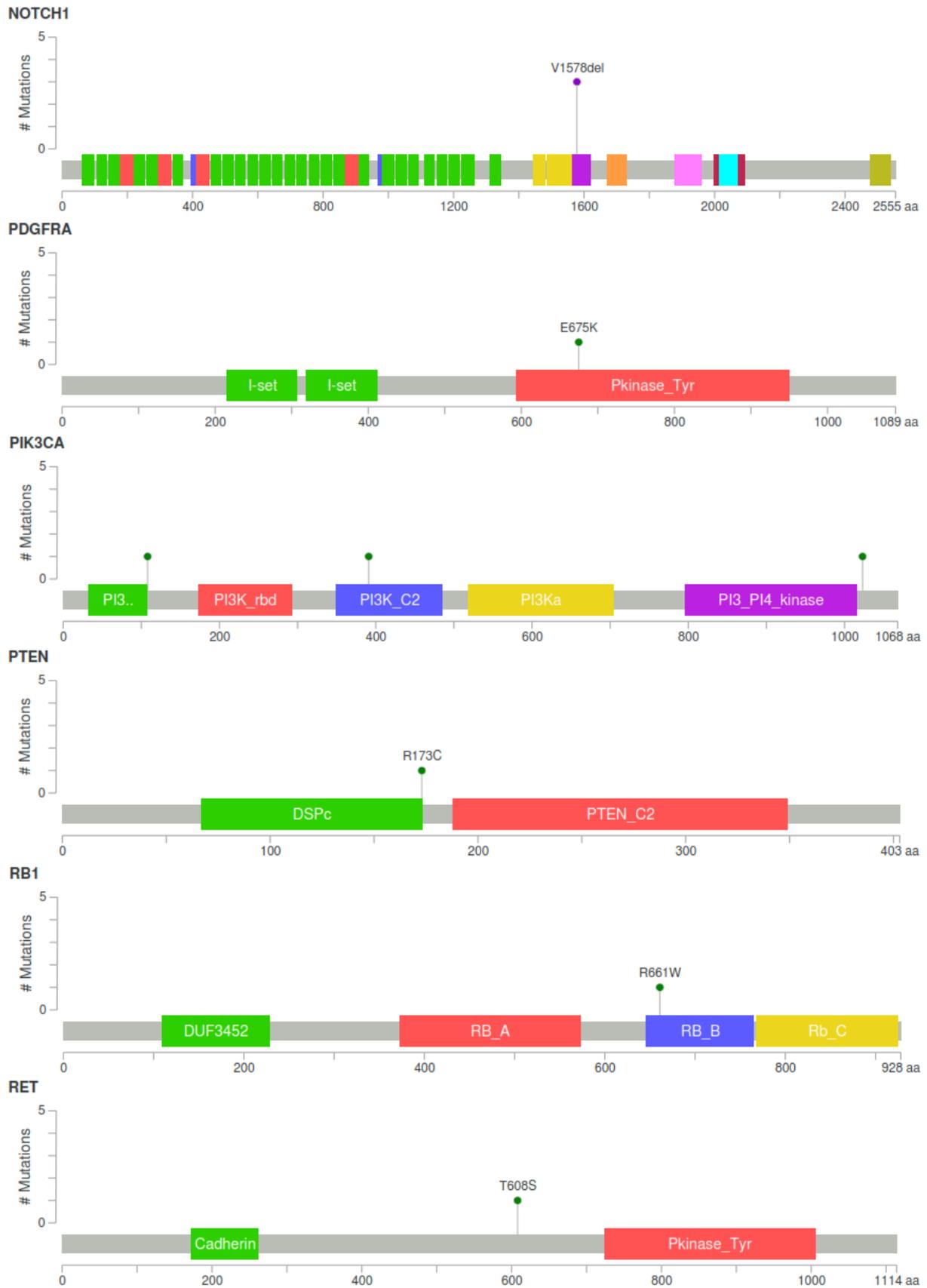


Abbildung 15: NGS mit Cancer Hot Spot Panel: Lage der gefundenen Mutationen in den Genen NOTCH1, PDGFRA, PIK3CA, PTEN, RB1 und RET

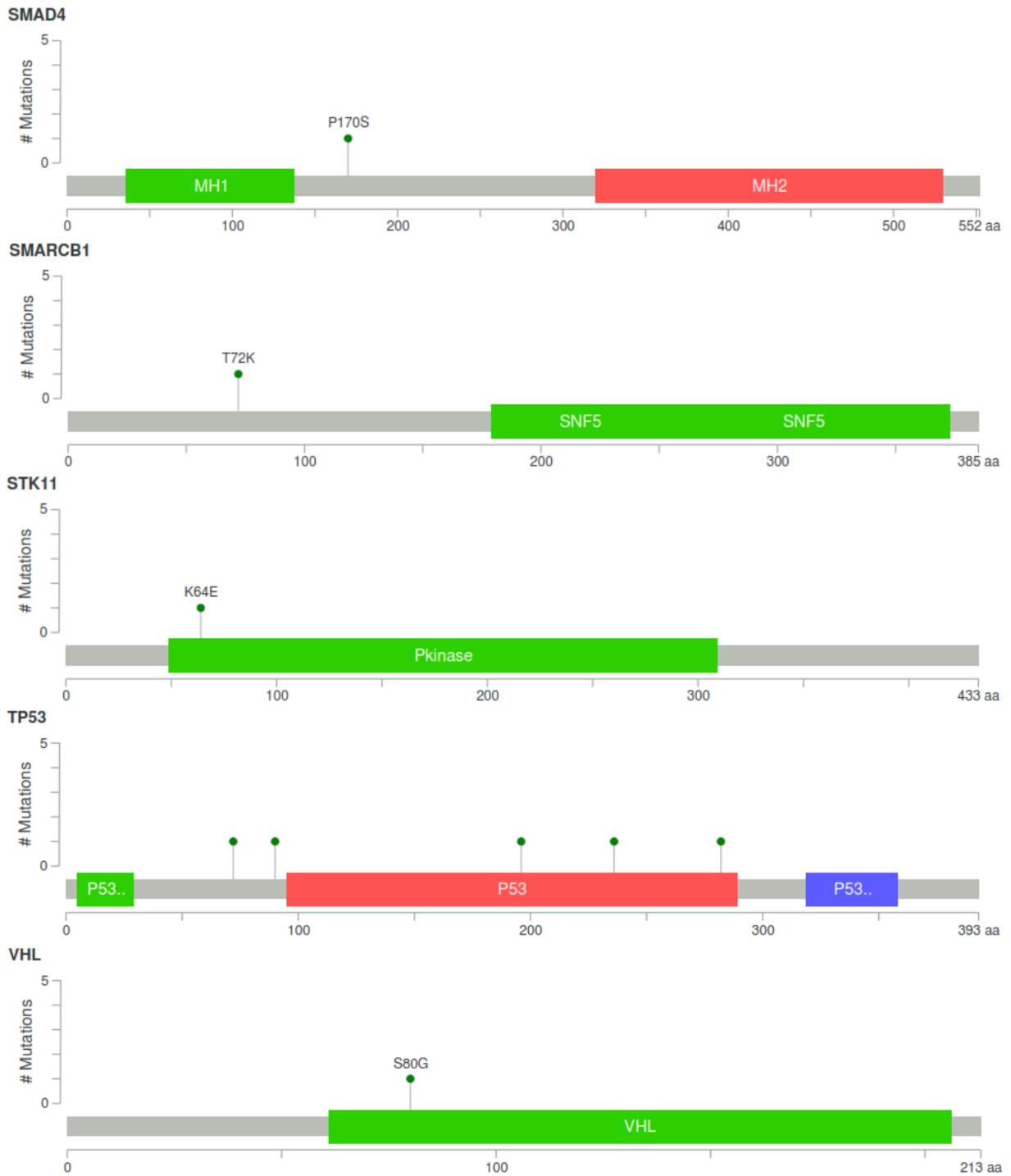


Abbildung 16: NGS mit Cancer Hot Spot Panel: Lage der gefundenen Mutationen in den Genen SMAD4, SMARCB1, STK11, TP53 und VHL.

Diskussion

4.4. Patientinnen- und Patientenmaterial

Die zwölf der insgesamt 24 ausgewählten Tumorblöcke, bei denen genügend Material vorhanden war, um alle hier vorgesehen Untersuchungen durchzuführen, stammten von Patientinnen und Patienten, deren Altersbereich zum Zeitpunkt der Erstdiagnose zwischen 63 bis 97 Jahren einzuordnen war. Dieser Sachverhalt, in Verbindung mit der Lokalisation des Primärtumors, entspricht auch den Ergebnissen von Albores-Saavedra et al. [5]. Die meisten der 3.870 MCC-Patientinnen und Patienten in dieser Studie, die zwischen 1973 und 2006 im US-amerikanischen National Cancer Institute (NCI) registriert wurden, waren zum Zeitpunkt der Diagnose zwischen 60 und 85 Jahren alt. Daraus kann geschlossen werden, dass das hier getestete Kollektiv trotz seiner geringen Größe die Untersuchungsergebnisse bei MCC-Erkrankten ausreichend gut widerspiegelt. [78]

4.5. KRAS

KRAS ist das humane Homolog des transformierenden Faktors im Kirsten Rat Sarcoma Virus und damit ein bekanntes Proto-Onkogen [79]. 1982 wurde zum ersten Mal eine Mutation dieses Gen mit transformierender Wirkung auf Fibroblasten in der humanen Lungenkrebslinie LX-1 gefunden. Inzwischen ist bekannt, dass knapp ein Viertel aller humanen malignen Tumoren eine KRAS-Mutation aufweist [79]. Beispielsweise sind Mutationen im KRAS-Gen mit einer schlechten Prognose beim Kolonkarzinom assoziiert. Zusätzlich konnte bei diesen Betroffenen gezeigt werden, dass eine zielgerichtete anti-EGF-Therapie bei einer vorliegenden KRAS-Mutation unwirksam ist [64, 80]. Da KRAS an der Signaltransduktion von EGF beteiligt ist [79], liegt es nahe, beim MCC zu vermuten, dass eine konstitutiv aktivierende KRAS-Mutation auch hier die Wirkung einer anti-EGFR-Therapie behindern könnte. Das in unserem Kollektiv keine KRAS-Mutation gefunden wurde, bedeutet, da das vorliegende Patientinnen und Patientenkollektiv klein war, nicht unbedingt, dass KRAS im MCC nie mutiert ist. Es kann jedoch ein guter Indikator für eine geringe Prävalenz von KRAS-Mutationen im MCC sein. Damit eröffnet sich nach Durchsicht der KRAS Ergebnisse die Möglichkeit, dass die anti-EGFR-Therapie bei zumindest einem großen Teil von MCC-Erkrankten wirksam sein könnte.

4.6. EGFR

Mutationen, die zu einer Aktivierung des EGFR führen, konnten bislang in vielen verschiedenen Krebsarten nachgewiesen werden [81–87]. EGFR-Mutationen gelten ähnlich wie KRAS-Mutationen als schlechter prognostischer Faktor in Tumoren, jedoch zeigt ihre Anwesenheit auch,

dass sich betroffene Tumoren für eine zielgerichtete anti-EGFR Therapie eignen, da sie in der Regel ein gutes Ansprechen auf diese Form der Therapie zeigen [84, 88–92]. Für kolorektale Karzinome und nicht-kleinzellige Tumoren der Lunge (NSCLC) bei Vorliegen von Wildtyp Situationen in RAS- und BRAF -Genen auch anti-EGFR zielgerichtete Therapien durch die EMA zugelassen.

In dieser Untersuchung zeigte ein Viertel der untersuchten Tumorproben Mutationen in den drei hierzu untersuchten Exons im EGFR-Gen. Diese hohe Prävalenz unterstreicht die Bedeutung des EGFR insbesondere für MCC. Es ist sogar möglich, dass diese Prävalenz noch höher liegen könnte, da bei jeweils zwei der zwölf Proben die Sequenzen für das Exon 19 und 21 nicht lesbar waren. Alle drei gefundenen Mutationen sind Punktmutationen, d.h., es handelt sich dabei jeweils um einen Aminosäureaustausch. Eben solche Mutationen können zu einer Aktivierung des Rezeptors führen, wie sie bereits für viele Mutationen in zum Beispiel nicht kleinzelligem Lungenkrebs nachgewiesen werden konnten. Die anti-EGFR-Therapie kann beim Vorhandensein solcher Mutationen wirksam sein [81]. Da KRAS beim MCC nicht oder nur mit äußerst geringer Prävalenz mutiert ist und die Expression von EGFR sowie die relative hohe Prävalenz von EGFR-Mutationen beim MCC auf dessen Wichtigkeit für das Tumorstadium hindeuten, lässt sich daraus schließen, dass eine Anti-EGFR-Therapie möglicherweise eine gute Wirksamkeit bei den betrachteten Tumorarten zeigt. Entsprechende Studien, die diese Hypothese belegen könnten, müssten durchgeführt werden. Alternativ könnten MCC mit aktivierenden EGFR-Gen Mutationen direkt in bestehende 'basket-Studien', wie TAPUR (Targeted Agent and Profiling Utilization Registry, NCT02693535) eingeschlossen werden. Aufgrund des hier Beobachteten könnte dann mit einer höheren Evidenz entschieden werden, ob sich eine speziell auf MCC abgestimmte Phase 3 Studie lohnen würde.

4.7. Cancer Hot Spot Panel

Das untersuchte Cancer Hot Spot Panel umfasst 50 Gene, die in vielen verschiedenen Tumorarten häufig mutiert sind. In einer Probe waren insgesamt zehn der 50 getesteten Gene mutiert. Dies bedeutet, dass Mutationen in bekannten (Proto-)Onkogenen wahrscheinlich auch bei der Tumorgenese von MCC relevante Einflussgrößen sein können. Trotzdem konnten auch in der hier vorliegenden Gruppe Fixationsartefakte nicht ausgeschlossen werden. Obwohl hier keine funktionellen Untersuchungen zu diesen Mutationen durchgeführt werden konnten, gibt die Lage der Mutationen innerhalb des jeweiligen Gens oftmals wichtige Hinweise auf mögliche funktionelle Folgen einer Mutation. So sind die häufigsten gefundenen Mutationen Missense- oder Punkt-Mutationen, d. h., es fand der einzelne Austausch einer Aminosäure statt. Im Gegensatz zu einer

Deletion, die zu einem Frame-shift und damit normalerweise zu einem vorzeitigen Stopcodon mit einem trunkeierten, nicht oder eingeschränkt funktionsfähigen Protein führt, können Punktmutationen eine aktivierende Wirkung auf das Protein haben. Dies ist besonders wahrscheinlich bei Proteinen innerhalb von Signalwegen, da diese in der gesunden Zelle strikt reguliert sind. Dies gilt insbesondere für Tyrosinkinase-Rezeptoren [81].

Zwölf der 50 im Cancer Hot Spot Panel untersuchten Gene waren Tyrosinkinasen. Diese wiesen insgesamt 16 Mutationen bei den elf eingeschossenen Proben auf. Obwohl die Tyrosinkinase-Domäne in diesen Proteinen zwischen einem Viertel und einem Drittel der jeweiligen Primärsequenz ausmacht, lagen sieben dieser Mutationen innerhalb der Kinase-Domäne, weitere zwei in deren unmittelbarer Umgebung.

Ein betrachtungswürdiges Ergebnis konnte im PIK3CA/AKT1/mTOR Signalweg, wo zwei Mutationen innerhalb der elf Proben (18 %) gefunden werden konnten, erzielt werden. PI3K-AKT1-mTOR sind wichtige Kinasen, die durch verschiedene zelluläre Stimuli aktiviert werden und wesentliche Funktionen von Zellen wie Proliferation, Translation, Transkription, Wachstum und Überleben steuern. Diese Funktionen spielen eine entscheidende Rolle unter normalen physiologischen Bedingungen sowie bei verschiedenen pathologischen Störungen, einschließlich der Entstehung von Krebs. Das PIK3C-Gen, das Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase kodiert, wurde schon vor langer Zeit mit Tumoren in Verbindung gebracht [93]. Die Phosphatidyl-3-Kinasen bestehen aus einer Familie von Lipidkinasen, die an unterschiedlichen zellulären Prozessen beteiligt sind, darunter Zellwachstum und -proliferation, Zelldifferenzierung und -motilität sowie Zellüberleben [94]. Ungefähr ein Drittel aller Mammakarzinome weisen ein mutiertes PIK3C-Gen auf und die Mutationen betrafen hauptsächlich die Aminosäuren GLU542, GLU545 und HIS1047 [95]. Auch in den vorliegenden Untersuchungen war bei etwa einem Drittel aller Proben (3 von 11, (27,3%)) dieses Gen mutiert. Allerdings lagen die Mutationen in anderen Regionen des Gens. AKT1 (v-akt murine Thymoma viral Oncogene homolog 1) ist eine Serin-/Threoninkinase und wurde 1987 erstmals in einer Magentumorprobe beschrieben [96]. AKT1 ist ein wichtiges Signalprotein mit Funktion in unterschiedlichen Signalwegen, wie im beschriebenen Phosphoinositid-3-Kinase-Signalweg. Dieser sendet Zellüberlebenssignale und verwendet unter anderem auch Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PI3P) als Second Messenger [97]. Mahadevan et al. konnte nachweisen, dass eine Inhibition der phospholipidbindenden PH-Domäne die AKT1-Aktivität abschaltet. Es wäre denkbar, dass die beiden hier gefundenen Mutationen in dieser funktionell wichtigen Domäne eine umgekehrte Wirkung haben und AKT1 aktivieren.

Ähnliche Mutationen im PIK3CA-Gen, die die p110 α Untereinheit der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) kodiert, können bei 28 % bis 46 % der Menschen mit Hormonrezeptor-positiven, humanem epidermalem Wachstumsfaktor-Rezeptor-2-negativem (HER2) fortgeschrittenem Mammakarzinom beobachtet werden [98]. Für diese Patientinnen- und Patientengruppe wurde Mitte 2020 der orale α -spezifische PI3K-Inhibitor Alpelisib, auf Basis der SOLAR-1-Studienergebnisse zugelassen. Alpelisib bindet selektiv an der katalytischen α -Untereinheit und verhindert die Phosphorylierung der nachgeschalteten Signalkaskade. In der SOLAR-1-Studie konnte die vordefinierte Grenze für statistische Signifikanz nicht überschritten werden, es ergab sich dennoch eine Verbesserung des Gesamtüberlebens von 7,9 Monaten, wenn Alpelisib zur Fulvestrant-Behandlung von Erkrankten mit PIK3CA-mutiertem, Hormonrezeptor-positiven, HER2 Mammakarzinom addiert wurde [98].

Das APC-Gen (Adenomatous-Polyposis-Coli-Gen) ist ein Tumorsuppressorgen, das 1991 zum ersten Mal in Zusammenhang mit einer genetischen Prädisposition für adenomatöse Kolonpolypen und Kolonkarzinome gebracht wurde [99]. In Familien, in denen adenomatöse Polyposis Coli (FAP) auftritt, ist dieses Gen mutiert und dadurch inaktiviert. In dem hier untersuchten Panel trat eine Mutation in diesem Gen auf, die potentiell ebenfalls deaktivierend ist.

Es gibt jedoch auch Beispiele, in denen eine andere Domäne als die Kinase-Domäne von den Mutationen betroffen ist. Das Protoonkogen BRAF (B-Raf proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase), das in dem hier vorgestellten Panel zweimal in der Tyrosinkinase-Domäne und in keiner anderen Region des Gens mutiert war. BRAF ist an wichtigen zellulären Prozessen beteiligt, einschließlich Zellproliferation, -Transkriptionsregulation und -Differenzierung. Das mutierte BRAF ist an der Pathogenese mehrerer Krebsarten beteiligt, darunter unter anderem nichtkleinzelliger Lungenkarzinom, malignes Melanom, papillärer Schilddrüsenkrebs Darmkrebs [100].

Ein weiterer Tumorsuppressor im Cancer Hot Spot Panel ist CDKN2A (Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A), in der Literatur auch p16 genannt; es kodiert mehrere Protein-Isoformen in unterschiedlichen Leserastern, die als Inhibitoren von CDK4 und ARF fungieren [101, 102]. Deletionen in diesem Locus wurden in verschiedenen humanen Krebserkrankungen wie Adenokarzinomen der Lunge, Glioblastomen, Pankreasadenokarzinomen und malignen Melanomen gefunden [102, 103]. Sowohl p16^{INK4A} als auch p14^{ARF} sind an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt, indem sie den Übergang von der G1 in die S-Phase inhibieren und damit die Zellteilung verhindern [104, 105]. In den MCC-Proben fand sich eine Missense-Mutation, von der aufgrund der Funktion der Proteine vermutet werden kann, dass sie eine inhibierende Wirkung hat.

EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor)-Mutationen gelten, wie oben bereits beschrieben, ähnlich wie KRAS-Mutationen als schlechter prognostischer Faktor in Tumoren, welches ein wichtiges Ziel in der Krebstherapie sein kann [84, 88–92]. Hier zeigte ein Viertel der untersuchten Tumorproben eine Mutation in den drei hierzu untersuchten Exons im EGFR-Gen.

FBXW7 (F-box/WD repeat-containing Protein 7) ist an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt. Mao et al konnten nachweisen, dass mTOR auf die Ubiquitinierung und den daraus resultierenden Abbau durch Bindung an das Tumorsuppressorprotein FBXW7 ausgerichtet ist [106]. Rictor (Rapamycin-unempfindlicher Begleiter von mTOR) bildet mit mTOR einen Komplex und aktiviert nach Phosphorylierung AKT. Guo et al konnten nachweisen, dass die Aktivierung von AKT die Expression von c-Myc und Cyclin E induziert wird, welche bei Darmtumoren überexprimiert werden und eine wichtige Rolle bei der Proliferation von Darmkrebszellen spielen. Seine Funktion ist die Inaktivierung von c-Myc und Cyclin E, indem es deren Degradation stimuliert [107]. In der vorliegenden Untersuchung fanden sich zwei Proben, bei denen dieses Gen, vermutlich in inaktivierende Weise, mutiert war. Tumorzelllinien, die Mutationen oder Deletionen im Gen FBXW7 enthalten, reagieren sensibel auf die Behandlung mit Rapamycin, was darauf hindeuten kann, dass der Verlust von FBXW7 als Biomarker von Patientinnen und Patienten gesehen werden kann, die für eine Behandlung mit Inhibitoren des mTOR-Signalwegs anfällig sind [106].

Die beiden dem EGFR in Funktion ähnlichen Rezeptoren des Fibroblasten-Wachstumsfaktors FGFR1 und FGFR3 (Fibroblast Growth Factor Receptor Type 1&3) waren in den vorliegenden Ergebnissen insgesamt dreimal mutiert, jedoch befand sich keine dieser Mutationen in der Tyrosinkinase-Domäne. Zwei dieser Mutationen befanden sich in der Nähe der Immunglobulin-ähnlichen I-set-Domänen. Schon seit den 1990 Jahren ist bekannt, dass Punktmutationen in diesem Bereich zu einer konstitutiven Aktivierung der FGFR führen können. Der Mechanismus, in den von Robertson et al. beschriebene Punktmutationen, zeigte sich darin, dass die Mutationen eine Konfigurationsänderung verursachten, die verhinderte, dass sich innerhalb der I-Set Domäne eine normalerweise bestehende Disulfidbrücke ausbilden kann. Dadurch zeigte das mutierte Protein freie Cysteinreste, die zu intermolekularen Disulfidbrücken oxidiert werden können und so zu einer Aktivierung und anschließend zu einer Dimerisierung des Rezeptors führen [108]. Insgesamt werden derartige Mutationen häufig in Tumoren wie dem invasiven duktalem -oder lobulären Mammakarzinom, Adenokarzinom der Lunge, - des Kolon und Urothelkarzinom ableitenden Harnwege beobachtet [78, 109].

FLT3 (FMS-related Tyrosine Kinase 3) ist ein Rezeptor der Proliferations-, Überlebens- und Differenzierungssignale in hämatopoetischen Zellen übermittelt und ist bei ca. einem Drittel von

Akuten Myeloischen Leukämien (AML) konstitutiv aktiviert [110, 111]. Die hier gefundene Mutation K602R findet sich direkt am 5' Ende der Tyrosin-Kinase-Domäne in der Internal-Tandem-Duplication (ITD)-Region. Dieselbe K602R-Punktmutation wurde bereits bei AML-Patientinnen- und Patientenproben gefunden. Mäuse, die eine Knochenmarkstransplantation mit Stammzellen erhalten hatten, die diese Punktmutation tragen, entwickeln eine myeloproliferative, oligoklonale Erkrankung, die durch Splenomegalie und Leukozytose gekennzeichnet war. Nach einer Knochenmarkstransplantation mit Wildtyp-FLT3 entwickelte sich diese Erkrankung nicht [112]. Damit spiegelt sich das transformierende Potential dieser Mutation wieder, welche möglicherweise auch bei der Entwicklung von MCC eine ähnliche Rolle spielt.

Weltweite Fortschritte in der Sequenzierungstechnologie haben die onkogene Rolle von Guanin-Nucleotinbindenden (G-Protein) α (GNA)-Untereinheiten, insbesondere der GNA-Untereinheiten Gs (GNAS), Gq (GNAQ) und G11 (GNA11) (GNA *) aufgedeckt [113]. GNAQ, das zusammen mit GNA11 zwei Ketten der alpha-Einheit des Gq-Proteins kodiert [114], enthielt eine Frameshift-Mutation in einer der untersuchten MCC-Proben. Sie war bei etwa 2/3 der normalen Proteinlänge nachzuweisen. Das Gq-Protein ist ein essenzieller Bestandteil der G(q)-gekoppelten Rezeptorproteine und aktiviert die Phospholipase C und damit den IP₃-Signalweg. Mutationen, die eine Trunkierung dieser Proteinkette zur Folge haben, wurden in der Vergangenheit bei verschiedenen Patientinnen und Patienten mit Adenokarzinomen im Colon beschrieben [115, 116]. Die G_s-alpha-Einheit bildet die alpha-Kette des stimulierenden, trimeren G-Proteins der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Es wurden Mutationen mit Funktionsgewinn von GNAS in neuroendokrinen Tumoren sowie beim McCune-Albright-Syndrom, eine zu den neurokutanen Syndromen zählende Erkrankung, die durch Störungen des Knochenstoffwechsels und Café-au-lait-Flecken und charakterisiert ist, beschrieben [117, 118]. Theoretisch könnte eine erhöhte G α q-Aktivität durch spezifische Veränderungen der Affinität für GPT, den Rezeptor, den Effektor oder akzessorische Proteine verursacht werden, oder durch unspezifische Veränderungen, welche die G α q-Struktur stören und somit die intrinsische GTPase-Aktivität beeinträchtigen [114].

Damit ist GNAS an einer Vielzahl von Signalwegen beteiligt, die u.a. wichtige Überlebenssignale für die Zellen liefern. Aktivierende GNAS Mutationen besonders R201C oder R201H wurden in der Vergangenheit bei verschiedenen Krebsarten wie dem Osteosarkom und Pankreaskarzinom beschrieben [119, 120]. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Mutationen ist der D866G-Austausch, der in der hier vorliegenden Arbeit einmal gefunden wurde, bisher auch bei bekannten Datenbanken wie ClinVar, JAX CKB, My Cancer Genome, CiViC, cBioportal, COSMIC unbekannt. Die Recherche lieferte keine Belege über die Pathogenität, daher ist es unwahrscheinlich, dass diese Mutation einen funktionellen Phänotyp hervorruft. Gemäß den

Standards für die Klassifizierung der Pathogenität von somatischen Varianten bei Tumorerkrankungen gibt es gemeinsame Empfehlungen vom Cancer Genomics Consortium, Clinical Genome Resource, und Variant Interpretation for Cancer Consortium zur Annäherung an eine mögliche Onkogenität mittels dem Horak-Score [121]. Für diese Mutation ergibt sich demnach ein Horak Score von +1 [121].

Im Gen HNF1A (Hepatocyte Nuclear Factor 1-Alpha), welches für einen Transkriptionsfaktor kodiert, wurde hier in einer der elf untersuchten MCC-Proben die Punktmutation R200Q gefunden. Eine Mutation in diesem Gen wurde bereits beim Pankreaskarzinom, metastasierten Prostatakarzinom sowie zahlreichen anderen metastasierten Krebsarten beschrieben [122–124]. Es ist daher möglich, dass diese Mutation an der Transformation oder Fähigkeit zu metastasieren maßgeblich beteiligt ist. Zukünftige funktionelle Studien könnten darüber Klarheit schaffen. Die weitere Untersuchung des zugrundeliegenden Mechanismus könnte zusätzliche Informationen liefern, die sich bei der Entwicklung neuer Tumortargettherapien als hilfreich erweisen.

Wie auch schon bei einigen anderen Genen, befand sich die einzige in den Proben gefundene Missense-Mutation im JAK3 (Janus Kinase 3) in der Region, die für eine der beiden Tyrosin-Kinase-Domänen codiert. Über die hier gefundene Mutation kann keine Aussage zum Phosphorylierungsstatus getroffen werden, die Untersuchungen von Quan Lin et al jedoch zeigten, dass aktiviertes STAT3 (pSTAT3) und aktiviertes JAK3 (pJAK3) in Darmkrebszellen exprimiert werden und damit JAK3 als physiologischer Aktivator des STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) bewertet werden kann [125]. Es zeigte sich außerdem, dass die fehlerhafte Aktivierung JAK3 und seiner nachgeschalteten Effektoren STAT3, ein Schlüsselmerkmal der malignen Transformation beim kutanen T-Zell-Lymphom ist [126].

KDR (Kinase Insert Domain Receptor), das in dieser Studie in elf Proben zweimal mutiert war, ist ein wichtiger Rezeptor für VEGF (Vascular Epithelial Growth Factor) [127, 128]. Man hat herausgefunden, dass VEGFs eine Vielzahl von biologischen Prozessen in Endothelzellen vermitteln. Hierunter fällt beispielsweise die Zellproliferation z.B. die de-novo-Bildung von Gefäßen aus hämatopoetischen Vorläuferzellen, der Erhalt von Blut- und Lymphgefäßen, Zell-Zellkommunikation und Differenzierung. Einige VEGFs regulieren auch die Gefäßpermeabilität [128]. Damit ist wahrscheinlich, dass VEGF für die Durchblutung und das Überleben von Tumoren unerlässlich ist. Funktionelle Konsequenzen, der hier gefundene Mutationen sind in der Literatur bisher nicht hinreichend beschrieben und werden daher nicht abschließend klar.

Das Gen KIT kodiert für das Protein c-Kit, das auch unter CD117 bekannt ist [129]. Hier zeigte eine der elf untersuchten Proben eine Punktmutation, nämlich die Substitution von M541L. Dieser

Austausch wurde bereits bei vielen verschiedenen, proliferativen Erkrankungen wie CML, aggressiver Fibromatose, Mastozytose im Kindesalter und chronischer eosinophiler Leukämie beschrieben [130–134]. Ihr Auftreten in so vielen verschiedenen proliferativen Erkrankungen legt die Vermutung nahe, dass sie eine funktionelle Bedeutung für die Proliferationsfähigkeit von Zellen verschlüsseln. Tatsächlich konnten Brahma et al. zeigen, dass in Zellen unter Einfluss von SCF (Stem-Cell-Factor), die Kit M541L -Mutation und das c-Kit Phosphorylierungsmuster dem des Wildtyp-c-Kit entspricht, jedoch Proteine wie AKT und ERK1/2 phosphoryliert, also aktiviert werden [135]. Sie fanden aber auch, dass diese Mutation bei ca. 20 Prozent von gesunden Spenderpatienten vorhanden ist, womit es sich also um einen Polymorphismus im KIT-Gen handelt und nicht um eine de novo Mutation. Dennoch war die Prävalenz dieser Variante bei Patienten mit Gastrointestinalem Stroma Tumor (GIST), die bereits Metastasen hatten, mit 40,9% fast doppelt so hoch. GIST-Patientinnen und Patienten ohne Metastasen zum Zeitpunkt der Diagnose, bei denen diese Variante vorlag, hatten eine schlechterer Prognose in Bezug auch 5-Jahres-Überleben, 5-Jahre-rezidiv-freies-Überleben und Metastasierung als vergleichbare Patientinnen und Patienten mit der 541M-Variante [135]. Allerdings konnte diese Mutation als Prognosefaktor für Rezidive entdeckt werden, die Untersuchungen lassen jedoch keine Rückschlüsse auf eine Therapiewirksamkeit von Imatinib (Tyrosinkinase-Inhibitor) zu. Eine Probe von elf in der hier vorliegenden Studie zeigt keine Häufung dieser Variante bei MCC im Vergleich zu der von Brahma et al. gefundenen Prävalenz von 20% in der Normalbevölkerung. Durch die Aktivierung von Singalproteinen wie AKT und ERK1/2 ist es dennoch denkbar, dass auch bei MCC das Vorliegen dieser Varianten einen negativen Einfluss auf die Prognose hat. Weitere Studien, die dies in einer größeren Stichprobe untersuchen werden, sind notwendig, um diesbezüglich eine wissenschaftlich fundierte Aussage treffen zu können.

NOTCH1 wird als ein Gen beschrieben, das für ein Transmembranprotein kodiert, welches bei der Interaktionen zwischen Zellen und als Rezeptor für membrangebundene Liganden fungiert [136]. Auch die Mutation im NOTCH1-Gen, die hier in einer von elf untersuchten Proben gefunden wurde, genauer die Deletion im Codon 1578, die zu keinem Frameshift führte, wurde bereits in der Literatur in verschiedenen T-Zell-Leukämien und -Lymphomen beschrieben [137–139]. Interessanterweise hätte das Vorhandensein von NOTCH1-Mutationen bei T-ALL entweder keinen prognostischen Wert [137] oder zeigte sich als signifikanter Marker für eine gute Prognose [138, 139]. Ob dies bedeutet, dass die V1578del-Mutation auch bei MCC mit einer besseren Prognose verbunden ist und woraus der mögliche medizinische Nutzen für Betroffene entstehen könnte, bleibt in zukünftigen Studien zu klären.

Das PDGFRA-Gen codiert eine weitere Rezeptor-Tyrosinkinase, nämlich den Platelet-derived Growth-Factor-Receptor A [140]. In der hier vorliegenden Arbeit wies eine der elf Proben eine Punktmutation an der Aminosäure in Position 675 auf. Es handelte sich um einen Austausch von Glutaminsäure zu Lysin (E675K). Eine andere Substitution in derselben Position, die einen Austausch der Glutaminsäure zu Glutamin (E657Q) findet sich im Catalogue of Somatic Mutations in Cancer und war mit Blasenkrebs assoziiert [141]. Eine ähnliche Mutation in der direkten Nachbarschaft dieser Aminosäure (T674I) wurde bereits zweimal bei verschiedenen Krebsarten wie dem Nasopharynx- oder Peniskarzinom gefunden [142, 143]. Obwohl keine funktionelle Daten zu der hier gefundenen oder in der Literatur beschriebenen Mutationen vorliegen, spricht dies dafür, dass diese Region im PDGFRA-Protein für dessen Funktion von Bedeutung sein kann.

Das PTEN-Protein (Phosphatase and Tensin homolog deleted on Chromosome ten) ist eine Phosphatase, die ebenfalls als Tumorsuppressor fungiert, indem sie den PI3K/AKT-Signalweg negativ regulieren. Es besitzt sowohl Lipidphosphatase- als auch Proteinphosphataseaktivität [144]. PTEN kann PI3K deaktivieren und ist insgesamt ein relevanter Bestandteil im Prozess der Regulation des Zellzyklus, Apoptose und möglicherweise auch der Zellmigration und damit der Metastasierung. In metastatischen Tumoren ist es oft auf beiden Chromosomen deletiert oder deaktiviert, kann jedoch auch haplo-insuffizient zu Tumorprogression führen [144]. Die R173C-Mutation innerhalb Exon 6, welche eine der elf hier untersuchten Proben aufwies, wurde in der Vergangenheit schon bei Glioblastomen und Endometriumkarzinomen beschrieben und ist mit einer schlechten Prognose verbunden [145–148].

Mit RB1 war ein weiteres als Tumorsuppressor bekanntes Gen im verwendeten Cancer Hot Spot Panel. RB1 kodiert das Retinoblastom-Protein [149]. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass RB1 die Chromatinstruktur festlegt, die für die Kontrolle des Zellzyklus, die zelluläre Differenzierung, Entwicklung und Apoptose notwendig sind [150]. Die hier in einer Probe gefundene R661W zeigt eine Missense-Mutation. Die aktive und damit hypophosphorylierte Form des Proteins bindet an den Transkriptionsfaktor E2F1 [151]. In diesem Gen nehmen Mutationen entscheidende Rollen in der Entwicklung von verschiedensten Krebsarten ein [152–157].

Eine weitere Rezeptor-Tyrosinkinase, RET, wurde ebenfalls als Bestandteil des Cancer Hotspot-Panels untersucht. Bei diesem Gen handelt es sich um einen Rezeptor für GDNF-Ligandenfamilie, welche vorwiegend neurotrophe Wachstumsfaktoren sind. Es konnte gezeigt werden, dass GDNF an das Ret-Protein, einer Rezeptor-Tyrosinkinase, in einer auf GDNF ansprechenden Motoneuron-Zelllinie bindet und diese anschließend eine Tyrosin-Phosphorylierung induziert

[158, 159]. Homozygote oder bi-allelische aktivierende Mutationen führen zu der Erbkrankheit Multiples-Endokrines-Neoplasie-Syndrom (MEN) [160], der Rezeptor wurde aber auch mit anderen Krankheiten wie Schilddrüsenkrebs oder bei homozygoter Deaktivierung mit Morbus Hirschsprung in Verbindung gebracht [161]. Die T608S-Mutation, die sich in einer untersuchten MCC-Probe fand, war bisher in der Literatur nicht beschrieben.

SMAD4, ursprünglich DPC4 (deleted in pancreatic cancer 4) genannt [162], ist selbst ist kein Rezeptorsubstrat, sondern fungiert als gemeinsamer Partner aller R-SMAD-Proteine, die die Wachstumssignale des transforming growth factors beta (TGF β) weiterleiten [163]. Es ist ein negativer Regulator von TGF β und in mehr als der Hälfte (55%) aller Pankreaskarzinome mutiert [164]. Ob der hier gefundene P0170S-Austausch zu einer Deaktivierung des Proteins und damit zu einer Aktivierung von TGF β -Signalen führt, ist nicht klar, da diese Mutation in der Literatur bisher nicht bekannt ist.

Das SMARCB1/BAF47 (SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, Unterfamilie B, Mitglied 1) Protein ist ein Bestandteil des BAF-Komplexes, der die Chromatinstruktur stabilisiert. Ein Aktivitätsverlust des Proteins führt zu einer Destabilisierung des BAF-Komplexes und des Chromatins, was zu einer Aktivierung multipler Gene führt [165]. Stille Mutationen, Deletionen, Missense-Mutationen, Nonsense-Mutationen und Frameshift-Insertionen sowie In-Frame-Deletionen und -Insertionen werden bei verschiedenen Krebsarten wie Knochenkrebs und Darmkrebs beobachtet [166]. Die hier aufgetretene Mutation T72K wurde bereits in der Literatur beschrieben, es konnte bisher jedoch nicht geklärt werden, ob es sich um einen Polymorphismus oder um ein für die Tumorgenese oder -Progression wichtige funktionelle Variante handelt [167].

STK11 (Serine/Threonine Kinase 11) ist ein Tumorsuppressor, der häufig bei Patientinnen und Patienten mit Lungenkrebs deletiert oder inaktiviert ist [168]. Unterschiedlichste Mutationen werden bei Krebsarten wie Gebärmutterhalskrebs, Magen-Darm-Krebs und Lungenkrebs beobachtet [169]. Eine Punktmutation am Codon 64 (K64E) wurde jedoch bisher nicht beschrieben.

TP53 ist das Gen des prototypischen Tumorsuppressors p53. Fast 63 Jahre Forschung und >100 000 Artikel und Rezensionen, konnten bis heute nicht alle Geheimnisse aufdecken, die dieses Gen verbirgt. Es wurde in den 1980 Jahren erstmal beschrieben und gilt seither als eines der wichtigsten Tumorsuppressorgene [170–173]. Das Protein reguliert die Expression von Genen, die an DNA-Reparatur, Zellzyklusarrest, Apoptose und Seneszenz beteiligt sind. Bei der Entstehung von Tumoren kann die eigentliche Funktion von TP53 nicht erfüllt werden, was zum Überleben der

Zellen und infolgedessen zu Schäden an DNA und Zellproliferationsstörungen führt. Es ist das am häufigsten mutierte Gen in allen menschlichen Tumoren [171]. Betroffene mit dem sogenannten Li-Fraumeni-Syndrom entwickeln in der Regel vor dem 45. Lebensjahr Tumoren, die sich meist als Knochen- oder Weichteilsarkom, Hirntumoren, Brustkrebs, Nebennierenrindenzinom oder Leukämie äußern [174]. In Familien mit dem Li-Fraumeni-Syndrom wird beispielsweise deutlich, dass TP53 eine wichtige Rolle bei der Tumorunterdrückung spielt, aufgrund der Vererbung einer Mutation in einem TP53-Allel kommt es bei Erkrankten zu spontaner Tumorbildung [174]. Auch in der vorliegenden Arbeit zeigte es sich mit fünf von elf mutierten Proben (45,5%) als das von allen untersuchten Genen am häufigsten mutierte Gen. Die hier gefundenen Mutationen zeigten bis auf eine funktionelle Basenaustauschmutationen. Drei der hier gefundenen Mutationen (R196Ter, R282Q, Y236D) liegen in der DNA-Bindungsdomäne von TP53, welche den Kontakt mit Ziel-DNA-Sequenzen ermöglicht, um nachgeschaltete Gene zu transaktivieren. Ein Wegfall dieser Funktion führt also zum Funktionsverlust von TP53 und begünstigt damit die Entstehungen von Tumoren. Die übrigen zwei (P72A & S90F) sind bisher in der Literatur nicht bekannt

Das VHL-Gen kodiert den VHL-Tumorsuppressor, der im namensgebenden Von-Hippel-Lindau-Syndrom, einer erblichen Retino-cerebellären Angiomasose, bi-allelisch deaktiviert ist [175]. Das von Hippel-Lindau-Protein unterdrückt Tumorstadium durch Herunterregulation von angiogenen Faktoren [176]. Der Serin-Rest in Position 80, der in einer der Proben mutiert war, ist evolutionär konserviert und elementar für die Funktion des Proteins [177]. Bi-allelische somatische Mutationen dieser Aminosäure einschließlich des hier gefundenen S80G-Austausches wurden ebenso beim Von-Hippel-Lindau-Syndrom nachgewiesen [177, 178]. Daraus lässt sich schließen, dass diese Mutation, die Funktion des VHL-Tumorsuppressors inhibiert und damit in der Pathogenese von MCC und/oder seiner Malignität eine Rolle spielt.

5. Schlussbetrachtung

Diese Arbeit untersuchte in einem Panel von 12 MCC-Patienten, ob Mutationen in KRAS, EGFR und 50 weiteren, mit verschiedenen Krebserkrankungen assoziierten Genen in diesen Tumoren vorlagen. Es wurden keine Mutationen im KRAS-Gen gefunden. Dieser Sachverhalt lässt vermuten, dass eine anti-EGFR-Therapie bei Vorliegen von weiteren günstigen Faktoren für diese Patienten sinnvoll und wirksam sein könnte. Die hier nachgewiesene hohe Mutationsrate von 25 %, die für das EGFR-Gen gefunden wurde, spricht weiterhin für die Relevanz, welche EGFR bei diesem Tumor besitzt und ist damit ein weiteres Argument für eine Implementierung von anti-EGFR-Therapiestudien. Im Gegensatz zu einer weiteren Studie über die möglichen Mutationen in MCC konnte 2012 Nardi et al. in einer Untersuchung von 60 MCC keine Mutation in einem Abschnitt für EGFR nachweisen [179]. Damit konnte bewiesen werden, wie wichtig weitere großflächige Untersuchungen über das Genom von Merkelzellkarzinomen sind. In klinischen Studien zu anderen, nicht melanozytären, Hauttumoren wurde gezeigt, dass Cetuximab, ein chimärer monoklonaler Mensch/Maus-Antikörper, der kompetitiv an den EGF-Rezeptor bindet und somit dessen Aktivierung hemmt, bei metastasierten oder rezidivierenden Chemotherapie-refraktären NMSC (nicht melanozytären Hautkrebsen) wirksam ist [180]. Acht Patientinnen und Patienten, deren Krankheit nach einer platinhaltigen Erstlinientherapie weiter fortschritt, wurden von Kalapurakal et al. mit Cetuximab als Einzelwirkstoff behandelt. Bei drei von vier Erkrankten mit Basalzellkarzinom und zwei von vier Erkrankten mit Plattenepithelkarzinom konnte eine vollständige Remission, dreimal eine partielle Remission mit einer Gesamtansprechrate von 100% erreicht werden, obwohl hierbei beachtet werden muss, dass es bei 63% der Patientinnen und Patienten innerhalb von sechs Monaten zu einem Tumorprogress kam [181]. Bisher gibt es keine Studien, welche diese Therapiemethoden beim MCC anwenden, obwohl es möglicherweise eine sinnvolle Behandlungsoption werden könnte, insbesondere wenn Patientinnen und Patienten in die TAPUR oder vergleichbare basket-Studien eingeschleust werden würden. Nach einem therapeutischen Update aus 02/2019 werden adjuvante Behandlungen mit dem humanen monoklonalen Antikörper Ipilimumab, dessen Wirkung sich gegen das Protein CTLA-4 richtet, in einer Phase II Studie getestet [182]. Eine weitere Phase I/II Studie mit Tremelimumab in Kombination mit Durvalumab wird ebenfalls durch Villani et al beschrieben [182]. Es handelt sich um einen humanen monoklonalen Antikörper, der zu den so genannten Checkpoint-Inhibitoren gehört. Dieser blockiert das Oberflächenprotein CTLA-4 auf T-Helferzellen und kann dadurch seine immunmodulierende Wirkung entfalten. Ein Ansprechen erhofft man sich über die Kombination mit dem Checkpoint-Inhibitor Durvalumab. Der Antikörper bindet spezifisch an PD-L1. Eine zusätzlich laufende Phase I/II Studie mit adoptiven T-Zell Transfer wird durch

Villani et al. beschrieben. Bei dieser Therapie werden eigene Immunzellen der Patientinnen und Patienten genetisch so verändert, dass sie Tumorzellen gezielt erkennen und vernichten können [182].

Die NGS-Sequenzierung detektiert weitere Mutationen in diesen Tumoren, was zum einen zeigt, dass im Gegensatz zu andere Krebserkrankungen, das MCC eine gewisse genetische Stabilität aufweist. Es konnten keine wesentlichen Häufungen in den untersuchten Genabschnitten beschrieben werden. Zum anderen können sicherlich einige dieser Mutationen zur malignen Transformierung und Tumorgenese der Merkelzellen beitragen. Eine Reihe dieser Mutationen wurden bereits in der Vergangenheit in verschiedenen menschlichen Tumoren und anderen Erkrankungen beschrieben. Bei vielen anderen Mutationen ist die Auswirkung auf die Funktion des Proteins aufgrund der hohen Varianten-Annotation jedoch nicht bekannt.

Nach dem aktuellen Stand der Forschung ist die Hemmung der Wechselwirkung zwischen PD-L1 und PD-1 ein wichtiges therapeutisches Ziel zur Reaktivierung der Immunantwort, damit der Behandlung des MCC und vieler weiterer Tumoren. PD-L1 wird physiologisch sowohl von entzündetem Epithel als auch von aktivierten hämatopoetischen Zellen exprimiert, um Antigen-stimulierte adaptive Immunantworten in peripheren Geweben zu hemmen [183]. Der Signalweg von PD-1/PD-L1 trägt über die Hemmung der T-Zellantwort zur lokalen Immunreaktion bei. PD-L1 bindet an seinen Hauptrezeptor PD-1, nachdem es von aktivierten T-Lymphozyten exprimiert wird. Der Komplex aus PD-L1 / PD-1 hemmt anschließend den Signalweg der zytotoxischen Aktivität sowie der T-Zell-Proliferation, wodurch Immunantworten verhindert werden können [182, 184]. PD-L1 wird häufig auf MCC-Tumor- und peritumoralen Immunzellen exprimiert, im Gegenzug hierzu wird über zirkulierende MCPyV-spezifische T-Zellen PD-1 exprimiert [182]. Ein humaner PD-L1-Inhibitor namens Avelumab blockiert den monoklonalen Lambda-Antikörper des humanen Immunglobulins G1 auf der Tumorzelle. Damit wird der zuvor beschriebene Komplex aus PD-1 auf T-Lymphozyten und PD-L1 auf der Tumorzelle blockiert, die Inaktivierung verhindert und damit dessen Verfügbarkeit für die Zerstörung von Tumorzellen gehemmt [49, 184]. Die Anzahl der somatischen Mutationen pro Megabase einer untersuchten Genomsequenz definiert sich als Tumormutationslast [185]. Diese spielt eine Schlüsselrolle bei der Entstehung immunogener Neopeptide, welche auf den Haupthistokompatibilitätskomplexen auf den Oberflächen von Tumorzellen liegen, die das Ansprechen auf Immuncheckpoint-Inhibitoren beeinflussen [185]. Die Mehrheit, der mit Immuncheckpoint-Inhibitoren behandelten Patientinnen und Patienten, profitiert dann besonders, wenn prädiktive Biomarker für das Ansprechen auf spezifische Inhibitoren identifiziert werden, damit diese selektiver eingesetzt, sowie Mechanismen der Therapieresistenz aufgeklärt und überwunden können [185]. Im September 2017 wurde

Avelumab von der FDA und EMA als Erstbehandlung für Betroffene (> 12 Jahre) mit metastasiertem MCC zugelassen [11, 51, 182]. Mit Nivolumab wird aktuell ein weiterer vollständig humaner IgG4-Anti-PD-1-Antikörper auf seine klinische Wirksamkeit bei fortgeschrittenem MCC untersucht [186]. Es konnte gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen der PD-L1-Expression und dem Ansprechen auf eine anti-PD-1-Therapie daraufhin deutet, dass dieser Faktor bei der Identifizierung, der für diese Immuntherapie geeigneten Tumortypen, nützlich sein könnte [187, 188], wenngleich hierfür zusätzliche Einflüsse Beachtung finden müssen. Während die Immuntherapie bei immunkompetenten Patientinnen und Patienten bisher eine hohe Ansprechrate und eine Verbesserung des Gesamtüberlebens gezeigt hat, sind weiterhin Alternativen zur Immuntherapie für immunsupprimierte Patientinnen und Patienten mit MCC im fortgeschrittenen Stadium erforderlich [182, 189, 190].

Ein weiteres therapeutisches Target für die Behandlung des fortgeschrittenen MCC ist die Verwendung von natürlichen Killerzellen. Wie auch in dieser Untersuchung herausgefunden wurde, belegen immer mehr Studien die indirekte Bedeutung der Angiogenese für die Pathogenese von MCC-Tumoren durch EGFR, VEGF (VEGF-A, VEGF-C, VEGF-R2), PDGF-b und C-Kit [191, 192]. Die funktionelle Beziehung zwischen Tumoren, Onkogenen und Angiogenese wurde bereits 1995 von Rak et al. und Grugel et al. nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass RAS-Onkogene die VEGF-Expression hochregulieren und damit Tumorstadium indirekt durch die Stimulierung der Angiogenese fördern könnten [193]. Das Anvisieren des kombinierten VEGF (R) - und des EGF (R) -Signalwegs kann möglicherweise das Problem von erworbenen Resistenzen gegen EGFR-Inhibitoren umgehen. Durch die Fokussierung auf beide Wege könnte die anti-angiogene und damit anti-tumorale Wirkung potenziert werden [192]. Bisher gibt es allerdings keine Studien die sich mit der Wirksamkeit von anti-EGFR Inhibitoren bei MCC beschäftigen. Pazopanib und Cabozantinib sind Inhibitoren verschiedener Rezeptor-Tyrosinkinasen (VEGFR-1, -2 und 3 und C-Kit). Pazopanib hemmt auch PDGF- α und - β . Bisher gibt es nur wenige Daten zum therapeutischen Nutzen von Pazopanib und Cabozantinib bei MCC [182, 194]. Bei fünf Patientinnen und Patienten mit metastasiertem MCC, die zuvor mit einer zytotoxischen Therapie behandelt worden waren, wurde von Tarabadkar et al. eine Fallserie beschrieben, in der Pazopanib und Cabozantinib erfolgreich angewendet werden konnten [195]. Derzeit laufen prospektive klinische Studien, in denen entweder Pazopanib oder Cabozantinib untersucht werden [196]. Da in MCCs bisher keine aktivierenden Tyrosinkinase-Mutationen nachgewiesen werden konnten, gibt es allerdings kaum Hinweise darauf, dass die Hemmung der Tyrosinkinase ein wirksamer Behandlungsansatz für Patienten mit MCC sein kann [179, 182].

Von allen weltweit neu diagnostizierten malignen Tumorerkrankungen im Jahr 2018 entfielen beinahe 290.000 auf das maligne Melanom [197, 198]. Das maligne Melanom, kurz MM, ist ein frühzeitig metastasierender Tumor, der von Melanozyten ausgeht und dessen Häufigkeit in den letzten Jahren stark zugenommen hat. Seit den 1970er Jahren nahm die Anzahl an Neuerkrankungen in Deutschland um mehr als das Fünffache zu. Für das Jahr 2020 schätzt das Robert Koch Institut die Inzidenz des Melanoms auf 22.600 [198]. So kommt es, dass die Therapie des metastasierten Melanoms in den letzten Jahren grundlegende Veränderungen durchlaufen hat. Mit der Identifizierung von aktivierenden Mutationen, hauptsächlich im Signalweg Mitogen aktivierter Phosphokinasen (MAPK) und der Entwicklung von entsprechenden Kinase-Inhibitoren konnte der therapeutische Horizont erweitert und damit der Therapieerfolg entscheidend verbessert werden [198]. Die zukünftige Weiterentwicklung zielgerichteter Therapien mithilfe von Kombinationen der Inhibitoren gegen unterschiedliche Signalwege bietet die Möglichkeit Wirksamkeiten zu potenzieren und Resistenzentwicklungen hinauszuzögern. In Tumoren wie dem MM kann unter anderem eine konstitutionelle Aktivierung des PI3K-AKT-Signalweg durch Mutation oder Amplifikation des PI3K-Gens oder durch Unterfunktion oder Mutation von PI3K-Suppressor-Genen wie beispielsweise PTEN entstehen [199]. Im Rahmen klinischer Studien werden aktuell therapeutische PI3K-Inhibitoren in einer Kombinationstherapie mit BRAF/MEK-Inhibitoren getestet [198]. Wie in den Forschungen zur Behandlung des MCC bildet FGFR ein potenzielles Ziel von Kombinationstherapeutika. Auf vielen Melanom-Zellen liegt der Ligand dieses Rezeptors, FGF2, überexprimiert vor und aktiviert nachfolgend FGFR, welche daraufhin eine Aktivierung der PI3K- und MAPK-Signalwege initiiert [200]. BGJ398, welches ein selektiver Inhibitor des FGFR darstellt, wird aktuell in Kombination mit einer BRAF/MEK-Inhibition in klinischen Studien beim metastasierten Melanom in getestet; andere potenziell wirksame Therapeutika für die Kombination mit BRAF/MEK-Inhibitoren stellen beispielsweise CDK4/6- und c-MET-Inhibitoren dar, welche sich die sich aktuell in der klinischen Prüfung befinden [198].

Mittels der hier beschriebenen und gezeigten Methoden könnten in der Zukunft MCC tumorgenetisch klassifiziert und kategorisiert werden. Im Anschluss kann die klinische Bedeutung unmittelbar durch den potentiellen Einschluss von Erkrankten in Basket Studien wie TAPUR (Targeted Agent and Profiling Utilization Registry) [201] geprüft werden. Bei der TAPUR-Studie, einer prospektiven, nicht-randomisierten, klinischen Phase II Studie, werden bei Patientinnen und Patienten mit fortgeschrittenem Tumoren von der Food and Drug Administration (FDA) zugelassene Arzneimittel außerhalb der bisher zugelassenen Indikationen für vorher festgelegte genomische Ziele eingesetzt. Für die Teilnahme kommen Patientinnen und Patienten ab 12

Jahren mit fortgeschrittenen, messbaren oder auswertbaren soliden Tumoren in Frage. Die Teilnehmer*innen werden auf der Grundlage der im Protokoll festgelegten genomischen Ein- und Ausschlusskriterien auf eines der 16 zugelassenen Studienmedikamente abgestimmt [201]. Nach erfolgter genomischer Profilerstellung durch ein vom College of American Pathologists (CAP) akkreditiertes und nach den Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA) zertifiziertes Labor wird die Behandlung aus den verfügbaren Studientherapien ausgewählt [201]. Bereits das erfolgreiche Ansprechen von einer geringen Zahl, etwa fünf Tumoren, könnte wertvolle Hinweise auf erfolgsversprechende neue Therapieansätze bieten. Mit einer graphischen Visualisierung von Überlebensdaten in sogenannten "Swimmer Plots" können verschiedene Aspekte des Tumoransprechens, wie beispielsweise die Gesamtzeit bis zum Ansprechen, das vollständige oder teilweise Ansprechen und die Dauer des Ansprechens von Tumoren beurteilt werden. Dieses ist ein besonders nützliches Instrument bei der Datenerfassung zu Ergebnissen von klinischen Studien. Multidisziplinäre Tumorboards werden heutzutage weltweit für die Behandlung von Krebspatientinnen und Patienten eingesetzt. Studien zur Bewertung ihres Einflusses auf die Entscheidungsfindung und damit die Ergebnisse für die Patienten gibt bisher jedoch es nur in begrenztem Umfang. Durch Datensammlungen solcher Multidisziplinärer Tumorboards und das Zusammenschließen von Zentren für Personalisierte Medizin (ZPM) wie zum Beispiel den baden-württembergischen Universitätskliniken Freiburg, Heidelberg, Tübingen und Ulm, dem BZKF (Bayerisches Zentrum für Krebsforschung), DNPM (Deutsches Zentrum für Personalisierte Medizin), NCT (National Center for Tumordisease) oder andere nationale- oder regionale Zentren könnte in Zukunft die personalisierte Medizin zum Alltag werden lassen. Das Erfolgskonzept der baden-württembergischen ZPM wird auf gesamt Deutschland ausgedehnt (DNPM), damit dieses dann in lokale ZPMs (z.B. DNPM) übergehen kann. Diese Konzeption scheint damit ein verbessertes Überleben für krebserkrankte Patientinnen und Patienten zu bedeuten. Mit den hieraus ermittelten gemeinsamen Standards und abgestimmten Diagnostikmethoden kann die Basis für eine optimierte Therapieentscheidung für alle Erkrankten entstehen. Die Ergebnisse liefern dann dem Medizinischen Dienst der Krankenkassen zusätzliche Entscheidungskriterien für spätere Genehmigungen von Therapien und verbessern so die Versorgung von Patientinnen und Patienten mit fortgeschrittenen Krebserkrankungen.

6. Danksagung

Bei dieser Arbeit handelte es sich um eine Kollaboration mit dem Pathologischen Institut der medizinischen Fakultät München unter der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. rer. nat. Andreas Jung sowie der Klinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilian-Universität München und der Mitwirkung von Prof. Dr. med. Michael Flaig.

Daher gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. med. Michael Flaig und Herrn Prof. Dr. rer. nat. Andreas Jung. Ich bedanke mich für die Betreuung und Unterstützung sowie die Erfahrungen, die ich in dieser Zeit sammeln durfte. Ein besonderes Dankeschön geht an alle Mitarbeitenden der Abteilung, welche es möglich gemacht haben, die Proben zu präparieren und anschließend zu untersuchen. Insbesondere möchte ich Ursula Puchta, Gertrud Lenz und Sebastian Heucke erwähnen, die die Messungen durchführten und ihnen für Ihre stetige Hilfsbereitschaft danken. Abschließend danke ich der Crew der Sea-Watch 5, meinen Freundinnen und Freunden, mit denen ich gezwungenermaßen viel über Word gelernt habe. Durch sie wurden meine Tabellen über den Sinn ihrer Existenz als Tabelle in der vorliegenden Arbeit informiert, vor allem aber möchte ich mich bedanken, dass ich lernen durfte wie Quellen- und Abbildungsverzeichnisse aktualisiert und eingefügt werden können.

7. Anhang

8. Quellenverzeichnis

- 1 Halata Z, Grim M, Bauman KI. Friedrich Sigmund Merkel and his "Merkel cell", morphology, development, and physiology: review and new results. *The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology* 2003; 271: 225–39.
- 2 Maricich SM, Wellnitz SA, Nelson AM et al. Merkel cells are essential for light-touch responses. *Science (New York, N.Y.)* 2009; 324: 1580–2.
- 3 Koljonen V. Merkel cell carcinoma. *World journal of surgical oncology* 2006; 4: 7.
- 4 Hartschuh W, Weihe E, Büchler M et al. Met enkephalin-like immunoreactivity in Merkel cells. *Cell and tissue research* 1979; 201: 343–8.
- 5 Albores-Saavedra J, Batich K, Chable-Montero F et al. Merkel cell carcinoma demographics, morphology, and survival based on 3870 cases: a population based study. *Journal of cutaneous pathology* 2010; 37: 20–7.
- 6 Van Gele. Mutation analysis of P73 and TP53 in Merkel cell carcinoma. *British journal of cancer* 2000; 82: 823–6.
- 7 Lunder EJ, Stern RS. Merkel-cell carcinomas in patients treated with methoxsalen and ultraviolet A radiation. *The New England journal of medicine* 1998; 339: 1247–8.
- 8 Fried I, Cerroni L. Merkel-Zell-Karzinom. *Der Pathologe* 2014; 35: 467–75.
- 9 Schadendorf D, Lebbé C, zur Hausen A et al. Merkel cell carcinoma: Epidemiology, prognosis, therapy and unmet medical needs. *European journal of cancer (Oxford, England 1990)* 2017; 71: 53–69.
- 10 Kaae J, Hansen AV, Biggar RJ et al. Merkel cell carcinoma: incidence, mortality, and risk of other cancers. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 2010; 102: 793–801.
- 11 S2k Leitlinie Merkelzellkarzinom. Axel Hauschild und Claus Garbe 2018.
- 12 Xie H, Lee L, Caramuta S et al. MicroRNA expression patterns related to merkel cell polyomavirus infection in human merkel cell carcinoma. *The Journal of investigative dermatology* 2014; 134: 507–17.
- 13 Samimi M, Gardair C, Nicol JTJ et al. Merkel cell polyomavirus in merkel cell carcinoma: clinical and therapeutic perspectives. *Seminars in oncology* 2015; 42: 347–58.
- 14 Rodig SJ, Cheng J, Wardzala J et al. Improved detection suggests all Merkel cell carcinomas harbor Merkel polyomavirus. *The Journal of clinical investigation* 2012; 122: 4645–53.
- 15 Bhatia K, Goedert JJ, Modali R et al. Immunological detection of viral large T antigen identifies a subset of Merkel cell carcinoma tumors with higher viral abundance and better clinical outcome. *International journal of cancer* 2010; 127: 1493–6.
- 16 Schrama D, Peitsch WK, Zapatka M et al. Merkel cell polyomavirus status is not associated with clinical course of Merkel cell carcinoma. *The Journal of investigative dermatology* 2011; 131: 1631–8.
- 17 Sihto H, Kukko H, Koljonen V et al. Clinical factors associated with Merkel cell polyomavirus infection in Merkel cell carcinoma. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 2009; 101: 938–45.
- 18 Sastre-Garau X, Peter M, Avril M-F et al. Merkel cell carcinoma of the skin: pathological and molecular evidence for a causative role of MCV in oncogenesis. *The Journal of pathology* 2009; 218: 48–56.
- 19 Harms PW, Vats P, Verhaegen ME et al. The Distinctive Mutational Spectra of Polyomavirus-Negative Merkel Cell Carcinoma. *CANCER RESEARCH* 2015; 75: 3720–7.
- 20 Cimino PJ, Robirds DH, Tripp SR et al. Retinoblastoma gene mutations detected by whole exome sequencing of Merkel cell carcinoma. *Modern pathology an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2014; 27: 1073–87.

- 21 Sahi H, Savola S, Sihto H et al. RB1 gene in Merkel cell carcinoma: hypermethylation in all tumors and concurrent heterozygous deletions in the polyomavirus-negative subgroup. *APMIS acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 2014; 122: 1157–66.
- 22 Ames HM, Bichakjian CK, Liu GY et al. Huntingtin-interacting protein 1: a Merkel cell carcinoma marker that interacts with c-Kit. *The Journal of investigative dermatology* 2011; 131: 2113–20.
- 23 Paulson KG, Lemos BD, Feng B et al. Array-CGH reveals recurrent genomic changes in Merkel cell carcinoma including amplification of L-Myc. *The Journal of investigative dermatology* 2009; 129: 1547–55.
- 24 Arora R. Survivin is a therapeutic target in Merkel cell carcinoma. *Science translational medicine* 2012; 4: 133ra56.
- 25 Waltari M, Sihto H, Kukko H et al. Association of Merkel cell polyomavirus infection with tumor p53, KIT, stem cell factor, PDGFR-alpha and survival in Merkel cell carcinoma. *International journal of cancer* 2011; 129: 619–28.
- 26 Sihto H, Kukko H, Koljonen V et al. Merkel cell polyomavirus infection, large T antigen, retinoblastoma protein and outcome in Merkel cell carcinoma. *Clinical cancer research an official journal of the American Association for Cancer Research* 2011; 17: 4806–13.
- 27 Erstad DJ, Cusack JC. Mutational analysis of merkel cell carcinoma. *Cancers* 2014; 6: 2116–36.
- 28 Andea AA, Patel R, Ponnazhagan S et al. Merkel cell carcinoma: correlation of KIT expression with survival and evaluation of KIT gene mutational status. *Human pathology* 2010; 41: 1405–12.
- 29 Iwasaki T, Matsushita M, Nonaka D et al. Comparison of Akt/mTOR/4E-BP1 pathway signal activation and mutations of PIK3CA in Merkel cell polyomavirus-positive and Merkel cell polyomavirus-negative carcinomas. *Human pathology* 2015; 46: 210–6.
- 30 Hafner C, Houben R, Baeurle A et al. Activation of the PI3K/AKT pathway in Merkel cell carcinoma. *PLoS ONE* 2012; 7: e31255.
- 31 Ricard A-S, Sessiecq Q, Siberchicot F et al. Sentinel lymph node biopsy for head and neck Merkel cell carcinoma: a preliminary study. *European annals of otorhinolaryngology, head and neck diseases* 2015; 132: 77–80.
- 32 Harms KL, Healy MA, Nghiem P et al. Analysis of Prognostic Factors from 9387 Merkel Cell Carcinoma Cases Forms the Basis for the New 8th Edition AJCC Staging System. *Annals of surgical oncology* 2016; 23: 3564–71.
- 33 Gunaratne DA, Howle JR, Veness MJ. Sentinel lymph node biopsy in Merkel cell carcinoma: a 15-year institutional experience and statistical analysis of 721 reported cases. *Br J Dermatol* 2016; 174: 273–81.
- 34 Gaiser MR, Daily K, Hoffmann J et al. Evaluating blood levels of neuron specific enolase, chromogranin A, and circulating tumor cells as Merkel cell carcinoma biomarkers. *Oncotarget* 2015; 6: 26472–82.
- 35 Isgro MA, Bottoni P, Scatena R. Neuron-Specific Enolase as a Biomarker: Biochemical and Clinical Aspects. *Advances in experimental medicine and biology* 2015; 867: 125–43.
- 36 Paulson KG, Lewis CW, Redman MW et al. Viral oncoprotein antibodies as a marker for recurrence of Merkel cell carcinoma: A prospective validation study. *Cancer* 2017; 123: 1464–74.
- 37 Samimi M, Molet L, Fleury M et al. Prognostic value of antibodies to Merkel cell polyomavirus T antigens and VP1 protein in patients with Merkel cell carcinoma. *Br J Dermatol* 2016; 174: 813–22.
- 38 Blom A, Bhatia S, Pietromonaco S et al. Clinical utility of a circulating tumor cell assay in Merkel cell carcinoma. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2014; 70: 449–55.

- 39 Assouline A, Tai P, Joseph K et al. Merkel cell carcinoma of skin-current controversies and recommendations. *Rare tumors* 2011; 3: e23.
- 40 Sattler E, Geimer T, Sick I et al. Sentinel lymph node in Merkel cell carcinoma: to biopsy or not to biopsy? *The Journal of dermatology* 2013; 40: 374–9.
- 41 Fang LC, Lemos B, Douglas J et al. Radiation monotherapy as regional treatment for lymph node-positive Merkel cell carcinoma. *Cancer* 2010; 116: 1783–90.
- 42 Hennes S, Vereecken P. Management of Merkel tumours: an evidence-based review. *Current opinion in oncology* 2008; 20: 280–6.
- 43 Han AY, Patel PB, Anderson M et al. Adjuvant radiation therapy improves patient survival in early-stage merkel cell carcinoma: A 15-year single-institution study. *The Laryngoscope* 2018; 128: 1862–6.
- 44 Foote M, Harvey J, Porceddu S et al. Effect of radiotherapy dose and volume on relapse in Merkel cell cancer of the skin. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 2010; 77: 677–84.
- 45 Becker JC, Stang A, DeCaprio JA et al. Merkel cell carcinoma. *Nature reviews. Disease primers* 2017; 3: 17077.
- 46 Nghiem P, Kaufman HL, Bharmal M et al. Systematic literature review of efficacy, safety and tolerability outcomes of chemotherapy regimens in patients with metastatic Merkel cell carcinoma. *Future oncology (London, England)* 2017; 13: 1263–79.
- 47 Terheyden P, Becker JC. New developments in the biology and the treatment of metastatic Merkel cell carcinoma. *Current opinion in oncology* 2017.
- 48 Nghiem. PD-1 Blockade with Pembrolizumab in Advanced Merkel-Cell Carcinoma. *The New England journal of medicine* 2016; 374: 2542–52.
- 49 Kaufman HL, Russell J, Hamid O et al. Avelumab in patients with chemotherapy-refractory metastatic Merkel cell carcinoma: a multicentre, single-group, open-label, phase 2 trial. *The Lancet. Oncology* 2016; 17: 1374–85.
- 50 Kaufman HL, Russell JS, Hamid O et al. Updated efficacy of avelumab in patients with previously treated metastatic Merkel cell carcinoma after ≥ 1 year of follow-up: JAVELIN Merkel 200, a phase 2 clinical trial. *Journal for immunotherapy of cancer* 2018; 6: 7.
- 51 D'Angelo SP, Russell J, Lebbé C et al. Efficacy and Safety of First-line Avelumab Treatment in Patients With Stage IV Metastatic Merkel Cell Carcinoma: A Preplanned Interim Analysis of a Clinical Trial. *JAMA oncology* 2018; 4: e180077.
- 52 Paulson KG, Iyer JG, Tegeder AR et al. Transcriptome-wide studies of merkel cell carcinoma and validation of intratumoral CD8+ lymphocyte invasion as an independent predictor of survival. *Journal of clinical oncology official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2011; 29: 1539–46.
- 53 Samimi M, Touzé A, Laude H et al. Vitamin D deficiency is associated with greater tumor size and poorer outcome in Merkel cell carcinoma patients. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology JEADV* 2014; 28: 298–308.
- 54 Feng H, Shuda M, Chang Y et al. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science (New York, N.Y.)* 2008; 319: 1096–100.
- 55 Tolstov YL, Pastrana DV, Feng H et al. Human Merkel cell polyomavirus infection II. MCV is a common human infection that can be detected by conformational capsid epitope immunoassays. *International journal of cancer* 2009; 125: 1250–6.
- 56 Ružić M, Pellicano R, Fabri M et al. Hepatitis C virus-induced hepatocellular carcinoma: a narrative review. *Panminerva medica* 2018; 60: 185–91.
- 57 Rowe M, Fitzsimmons L, Bell AI. Epstein-Barr virus and Burkitt lymphoma. *Chinese journal of cancer* 2014; 33: 609–19.

- 58 Oyervides-Muñoz MA, Pérez-Maya AA, Rodríguez-Gutiérrez HF et al. Understanding the HPV integration and its progression to cervical cancer. *Infection, genetics and evolution journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 2018; 61: 134–44.
- 59 Tsuchida N, Ryder T, Ohtsubo E. Nucleotide sequence of the oncogene encoding the p21 transforming protein of Kirsten murine sarcoma virus. *Science (New York, N.Y.)* 1982; 217: 937–9.
- 60 Eser S, Schnieke A, Schneider G et al. Oncogenic KRAS signalling in pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2014; 111: 817–22.
- 61 Cooper GM, Lane MA. Cellular transforming genes and oncogenesis. *Biochimica et biophysica acta* 1984; 738: 9–20.
- 62 G M Cooper. Cellular transforming genes. *Science (New York, N.Y.)* 1982; 207: 801–6.
- 63 DAVID S. GOODSELL. The Molecular Perspective: The *ras* Oncogene. *The Oncologist* 1999; 4: 263–364.
- 64 Lièvre A, Bachet J-B, Boige V et al. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *Journal of clinical oncology official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2008; 26: 374–9.
- 65 Karapetis CS, Jonker D, Daneshmand M et al. PIK3CA, BRAF, and PTEN status and benefit from cetuximab in the treatment of advanced colorectal cancer--results from NCIC CTG/AGITG CO.17. *Clinical cancer research an official journal of the American Association for Cancer Research* 2014; 20: 744–53.
- 66 Marina Chiara Garassino. Should KRAS Mutations Be Considered an Independent Prognostic Factor in Patients With Advanced Colorectal Cancer Treated With Cetuximab? *American Society of Clinical Oncology* 2008; 26: 2601–2.
- 67 Dufort S, Richard M-J, Lantuejoul S et al. Pyrosequencing, a method approved to detect the two major EGFR mutations for anti EGFR therapy in NSCLC. *Journal of experimental & clinical cancer research CR* 2011; 30: 57.
- 68 Herbst RS. Review of epidermal growth factor receptor biology. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 2004; 59: 21–6.
- 69 Fruehauf J. EGFR function and detection in cancer therapy. *Journal of experimental therapeutics & oncology* 2006; 5: 231–46.
- 70 Moore AM, Einhorn LH, Estes D et al. Gefitinib in patients with chemo-sensitive and chemo-refractory relapsed small cell cancers: a Hoosier Oncology Group phase II trial. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 2006; 52: 93–7.
- 71 Brunner M, Thurnher D, Pammer J et al. Expression of VEGF-A/C, VEGF-R2, PDGF-alpha/beta, c-kit, EGFR, Her-2/Neu, Mcl-1 and Bmi-1 in Merkel cell carcinoma. *Modern pathology an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2008; 21: 876–84.
- 72 Chung KY, Shia J, Kemeny NE et al. Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. *Journal of clinical oncology official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2005; 23: 1803–10.
- 73 Noberasco C, Pas T de, Curigliano G et al. Immunohistochemical detection of HER1/HER2 can be considered a predictive marker of gefitinib activity in non-small-cell lung cancer? *Journal of clinical oncology official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2005; 23: 921-2; author reply 922.
- 74 Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1977; 74: 5463–7.

- 75 Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews. Genetics* 2009; 10: 57–63.
- 76 <https://www.haematopathologie-hamburg.de/methoden/sanger-sequenzierung/>. In:
- 77 Roskoski R. Structure and regulation of Kit protein-tyrosine kinase--the stem cell factor receptor. *Biochemical and biophysical research communications* 2005; 338: 1307–15.
- 78 <https://www.mycancergenome.org/content/gene/fgfr1/>.
- 79 Kranenburg O. The KRAS oncogene: past, present, and future. *Biochimica et biophysica acta* 2005; 1756: 81–2.
- 80 Lièvre A, Bachet J-B, Le Corre D et al. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *CANCER RESEARCH* 2006; 66: 3992–5.
- 81 da Cunha Santos G, Shepherd FA, Tsao MS. EGFR mutations and lung cancer. *Annual review of pathology* 2011; 6: 49–69.
- 82 Tu H-Y, Ke E-E, Yang J-J et al. A comprehensive review of uncommon EGFR mutations in patients with non-small cell lung cancer. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 2017; 114: 96–102.
- 83 Fenizia F, Luca A de, Pasquale R et al. EGFR mutations in lung cancer: from tissue testing to liquid biopsy. *Future oncology (London, England)* 2015; 11: 1611–23.
- 84 Castro-Carpeño J de, Belda-Iniesta C, Casado Sáenz E et al. EGFR and colon cancer: a clinical view. *Clinical & translational oncology official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico* 2008; 10: 6–13.
- 85 Shostak K, Chariot A. EGFR and NF- κ B: partners in cancer. *Trends in molecular medicine* 2015; 21: 385–93.
- 86 Troiani T, Martinelli E, Capasso A et al. Targeting EGFR in pancreatic cancer treatment. *Current drug targets* 2012; 13: 802–10.
- 87 Nicole M. Davis¹, Melissa Sokolosky¹, Kristin Stadelman¹, Stephen L. Abrams¹. Deregulation of the EGFR/PI3K/PTEN/Akt/mTORC1 pathway in Deregulation of the EGFR/PI3K/PTEN/Akt/mTORC1 pathway in breast cancer: possibilities for therapeutic intervention. *Oncotarget*. 2014 2014.
- 88 Seshacharyulu P, Ponnusamy MP, Haridas D et al. Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy. *Expert opinion on therapeutic targets* 2012; 16: 15–31.
- 89 Brand TM, Iida M, Luthar N et al. Nuclear EGFR as a molecular target in cancer. *Radiotherapy and oncology journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 2013; 108: 370–7.
- 90 Röcken C. Molekulare Targets beim Kolonkarzinom. VEGF, EGFR - was noch? *Der Pathologe* 2008; 29 Suppl 2: 200–3.
- 91 Okamoto I, Mitsudomi T, Nakagawa K et al. The emerging role of epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitors in first-line treatment for patients with advanced non-small cell lung cancer positive for EGFR mutations. *Therapeutic advances in medical oncology* 2010; 2: 301–7.
- 92 Fang S, Wang Z. EGFR mutations as a prognostic and predictive marker in non-small-cell lung cancer. *Drug design, development and therapy* 2014; 8: 1595–611.
- 93 Samuels Y, Waldman T. Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers. *Current topics in microbiology and immunology* 2010; 347: 21–41.
- 94 <https://www.mycancergenome.org/content/gene/pik3ca/>.
- 95 Thirumal Kumar D, George Priya Doss C. Role of E542 and E545 missense mutations of PIK3CA in breast cancer: a comparative computational approach. *Journal of biomolecular structure & dynamics* 2017; 35: 2745–57.
- 96 STEPHEN P. STAAL. Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987; 84: 5034–7.

- 97 Mahadevan D, Powis G, Mash EA et al. Discovery of a novel class of AKT pleckstrin homology domain inhibitors. *Molecular cancer therapeutics* 2008; 7: 2621–32.
- 98 André F, Ciruelos EM, Juric D et al. Alpelisib plus fulvestrant for PIK3CA-mutated, hormone receptor-positive, human epidermal growth factor receptor-2-negative advanced breast cancer: final overall survival results from SOLAR-1. *Annals of oncology official journal of the European Society for Medical Oncology* 2021; 32: 208–17.
- 99 Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y et al. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science (New York, N.Y.)* 1991; 253: 665–9.
- 100 AACR Project GENIE: Powering Precision Medicine through an International Consortium. *Cancer discovery* 2017; 7: 818–31.
- 101 Stone S, Jiang P, Dayananth P et al. Complex structure and regulation of the P16 (MTS1) locus. *CANCER RESEARCH* 1995; 55: 2988–94.
- 102 <https://www.mycancergenome.org/content/gene/cdkn2a/>.
- 103 Nobori T, Miura K, Wu DJ et al. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 1994; 368: 753–6.
- 104 Rayess H, Wang MB, Srivatsan ES. Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *International journal of cancer* 2012; 130: 1715–25.
- 105 Karayan L, Riou JF, Séité P et al. Human ARF protein interacts with topoisomerase I and stimulates its activity. *Oncogene* 2001; 20: 836–48.
- 106 Mao J-H, Kim I-J, Di Wu et al. FBXW7 targets mTOR for degradation and cooperates with PTEN in tumor suppression. *Science (New York, N.Y.)* 2008; 321: 1499–502.
- 107 Guo Z, Zhou Y, Evers BM et al. Rictor regulates FBXW7-dependent c-Myc and cyclin E degradation in colorectal cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications* 2012; 418: 426–32.
- 108 Robertson SC, Meyer AN, Hart KC et al. Activating mutations in the extracellular domain of the fibroblast growth factor receptor 2 function by disruption of the disulfide bond in the third immunoglobulin-like domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998; 95: 4567–72.
- 109 <https://www.mycancergenome.org/content/gene/fgfr3/>.
- 110 Nguyen B, Williams AB, Young DJ et al. FLT3 activating mutations display differential sensitivity to multiple tyrosine kinase inhibitors. *Oncotarget* 2017; 8: 10931–44.
- 111 Molineux G, McCrea C, Yan XQ et al. Flt-3 ligand synergizes with granulocyte colony-stimulating factor to increase neutrophil numbers and to mobilize peripheral blood stem cells with long-term repopulating potential. *Blood* 1997; 89: 3998–4004.
- 112 Kelly LM, Liu Q, Kutok JL et al. FLT3 internal tandem duplication mutations associated with human acute myeloid leukemias induce myeloproliferative disease in a murine bone marrow transplant model. *Blood* 2002; 99: 310–8.
- 113 Parish AJ, Nguyen V, Goodman AM et al. GNAS, GNAQ, and GNA11 alterations in patients with diverse cancers. *Cancer* 2018; 124: 4080–9.
- 114 van Raamsdonk CD, Fitch KR, Fuchs H et al. Effects of G-protein mutations on skin color. *Nature genetics* 2004; 36: 961–8.
- 115 Zehir A, Benayed R, Shah RH et al. Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. *Nature medicine* 2017; 23: 703–13.
- 116 Kovaleva V, Geissler A-L, Lutz L et al. Spatio-temporal mutation profiles of case-matched colorectal carcinomas and their metastases reveal unique de novo mutations in metachronous lung metastases by targeted next generation sequencing. *Molecular cancer* 2016; 15: 63.
- 117 Spiegel AM, Weinstein LS. Inherited diseases involving g proteins and g protein-coupled receptors. *Annual review of medicine* 2004; 55: 27–39.

- 118Q Dong. Screening of candidate oncogenes in human thyrotroph tumors absence of activating mutations of the G alpha q, G alpha 11, G alpha s, or thyrotropin-releasing hormone receptor genes. *J Clin Endocrinol Metab* 81; 1996: 1134–40.
- 119Carter JM, Inwards CY, Jin L et al. Activating GNAS mutations in parosteal osteosarcoma. *The American journal of surgical pathology* 2014; 38: 402–9.
- 120Furukawa T, Kuboki Y, Tanji E et al. Whole-exome sequencing uncovers frequent GNAS mutations in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Scientific reports* 2011; 1: 161.
- 121Horak P, Griffith M, Danos AM et al. Standards for the classification of pathogenicity of somatic variants in cancer (oncogenicity): Joint recommendations of Clinical Genome Resource (ClinGen), Cancer Genomics Consortium (CGC), and Variant Interpretation for Cancer Consortium (VICC). *Genetics in medicine official journal of the American College of Medical Genetics* 2022; 24: 1991.
- 122Abel EV, Goto M, Magnuson B et al. HNF1A is a novel oncogene that regulates human pancreatic cancer stem cell properties. *eLife* 2018; 7.
- 123Pierce BL, Ahsan H. Genome-wide "pleiotropy scan" identifies HNF1A region as a novel pancreatic cancer susceptibility locus. *CANCER RESEARCH* 2011; 71: 4352–8.
- 124Debiais-Delpech C, Godet J, Pedretti N et al. Expression patterns of candidate susceptibility genes HNF1 β and CtBP2 in prostate cancer: association with tumor progression. *Urologic oncology* 2014; 32: 426–32.
- 125Lin Q, Lai R, Chirieac LR et al. Constitutive activation of JAK3/STAT3 in colon carcinoma tumors and cell lines: inhibition of JAK3/STAT3 signaling induces apoptosis and cell cycle arrest of colon carcinoma cells. *The American journal of pathology* 2005; 167: 969–80.
- 126Sibbesen NA, Kopp KL, Litvinov IV et al. Jak3, STAT3, and STAT5 inhibit expression of miR-22, a novel tumor suppressor microRNA, in cutaneous T-Cell lymphoma. *Oncotarget* 2015; 6: 20555–69.
- 127Stuttfeld E, Ballmer-Hofer K. Structure and function of VEGF receptors. *IUBMB life* 2009; 61: 915–22.
- 128Holmes K, Roberts OL, Thomas AM et al. Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cellular signalling* 2007; 19: 2003–12.
- 129Yarden Y, Kuang WJ, Yang-Feng T et al. Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *The EMBO Journal* 1987; 6: 3341–51.
- 130Alessandra Iurlo. Identification of kitM541L somatic mutation in chronic eosinophilic leukemia, not otherwise specified and its implication in lowdose imatinib response. *Oncotarget* 2014; 5: 4665–70.
- 131K Inokuchi. Abnormality of c-kit oncoprotein in certain patients with chronic myelogenous leukemia – potential clinical significance 2002: 170–7.
- 132Dufresne A, Bertucci F, Penel N et al. Identification of biological factors predictive of response to imatinib mesylate in aggressive fibromatosis. *Br J Cancer* 2010; 103: 482–5.
- 133Dufresne A, Alberti L, Brahmi M et al. Impact of KIT exon 10 M541L allelic variant on the response to imatinib in aggressive fibromatosis: analysis of the desminib series by competitive allele specific Taqman PCR technology. *BMC Cancer* 2014; 14.
- 134R. Foster P, Ferrao L.K. Ashman. Association of paediatric mastocytosis with a polymorphism resulting in an amino acid substitution (M541L) in the transmembrane domain of c-KIT. *Br J Dermatol* 2008; 159(5): 1160–9.
- 135Brahmi M, Alberti L, Dufresne A et al. KIT exon 10 variant (c.1621 A > C) single nucleotide polymorphism as predictor of GIST patient outcome. *BMC Cancer* 2015; 15.
- 136<https://www.mycancergenome.org/content/gene/notch1/>.

- 137M van Grotel1. Prognostic significance of molecular-cytogenetic abnormalities in pediatric T-ALL is not explained by immunophenotypic differences. *Leukemia* 2008; 22: 124–31.
- 138Asnafi V, Buzyn A, Le Noir S et al. NOTCH1/FBXW7 mutation identifies a large subgroup with favorable outcome in adult T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL): a Group for Research on Adult Acute Lymphoblastic Leukemia (GRAALL) study. *Blood* 2009; 113: 3918–24.
- 139Bonn BR, Rohde M, Zimmermann M et al. Incidence and prognostic relevance of genetic variations in T-cell lymphoblastic lymphoma in childhood and adolescence. *Blood* 2013; 121: 3153–60.
- 140T Matsui. Isolation of a novel receptor cDNA establishes the existence of two PDGF receptor genes. *Science* 1989; 243: 800–4.
- 141Wellcome Sanger Institute. Mutation overview page PDGFRA - p.E675Q (Substitution - Missense) [Internet]. *Cat. Somat. Mutat. cancer*. 2018 [cited 2018 Jul 9]. p. COSM1310132. Available from: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/mutation/overview?id=1310132#references>. Mutation overview page PDGFRA - p.E675Q (Substitution - Missense) [Internet]. *Cat. Somat. Mutat. cancer*. 2018 [cited 2018 Jul 9]. p. COSM1310132. Available from: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/mutation/overview?id=1310132#references>.
- 142Shao J-Y, Zhang Z-C, Fu S et al. Oncogene mutational profile in nasopharyngeal carcinoma. *OT* 2014: 457.
- 143Ferrández-Pulido C, Hernández-Losa J, Masferrer E et al. Identification of somatic gene mutations in penile squamous cell carcinoma. *Genes, chromosomes & cancer* 2015; 54: 629–37.
- 144Eric C Chu. PTEN regulatory functions in tumor suppression and cell biology. *Med. Sci. Monit* 2004: 235–41.
- 145Bussaglia E, del Rio E, Matias-Guiu X et al. PTEN mutations in endometrial carcinomas: a molecular and clinicopathologic analysis of 38 cases. *Human pathology* 2000; 31: 312–7.
- 146Chi AS, Batchelor TT, Dias-Santagata D et al. Prospective, high-throughput molecular profiling of human gliomas. *Journal of neuro-oncology* 2012; 110: 89–98.
- 147Jan Boström. Mutation of the PTEN (MMAC1) Tumor Suppressor Gene in a Subset of. *CANCER RESEARCH* 1998; 58: 29–33.
- 148B. K. Ahmed Rashee. PTEN Gene Mutations Are Seen in High-Grade but not in Low-Grade Gliomas. *CANCER RESEARCH* 1997; 57: 4187–90.
- 149Murphree AL, Benedict WF. Retinoblastoma: clues to human oncogenesis. *Science (New York, N.Y.)* 1984; 223: 1028–33.
- 150Chinnam M, Goodrich DW. RB1, development, and cancer. *Current topics in developmental biology* 2011; 94: 129–69.
- 151clinvar. clinvar mutation.
- 152Nik-Zainal S, Davies H, Staaf J et al. Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. *Nature* 2016; 534: 47–54.
- 153Miyamoto H, Shuin T, Torigoe S et al. Retinoblastoma gene mutations in primary human bladder cancer. *British journal of cancer* 1995; 71: 831–5.
- 154Jiao Y, Yonescu R, Offerhaus GJA et al. Whole-exome sequencing of pancreatic neoplasms with acinar differentiation. *The Journal of pathology* 2014; 232: 428–35.
- 155Giannakis M, Mu XJ, Shukla SA et al. Genomic Correlates of Immune-Cell Infiltrates in Colorectal Carcinoma. *Cell Reports* 2016; 15: 857–65.
- 156George J, Lim JS, Jang SJ et al. Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature* 2015; 524: 47–53.

- 157 Jour G, Wang L, Middha S et al. The molecular landscape of extraskeletal osteosarcoma: A clinicopathological and molecular biomarker study. *J Pathol: Clin Res* 2016; 2: 9–20.
- 158 Airaksinen Matty. The GDNF family: Signalling, biological functions and therapeutic value. *Nature reviews Neuroscience* 2002; 3: 383–94.
- 159 Trupp M, Arenas E, Fainzilber M et al. Functional receptor for GDNF encoded by the c-ret proto-oncogene. *Nature* 1996; 381: 785–9.
- 160 Qi X-P, Ma J-M, Du Z-F et al. RET Germline Mutations Identified by Exome Sequencing in a Chinese Multiple Endocrine Neoplasia Type 2A/Familial Medullary Thyroid Carcinoma Family. *PLoS ONE* 2011; 6: e20353.
- 161 Barbara Pasini. RET mutations in human disease. *Trends in Genetics* 1996; 12: 138–44.
- 162 Hahn SA, Schutte M, Hoque AT et al. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science (New York, N.Y.)* 1996; 271: 350–3.
- 163 Massagué J. TGF β signalling in context. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2012; 13: 616–30.
- 164 Liu Fang. SMAD4 DPC4 and Pancreatic Cancer Survival. Commentary re: M. Tascilar et al., The SMAD4 Protein and Prognosis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 7: 4115–4121, 2001. *CANCER RESEARCH* 2001; 7: 4115–21.
- 165 Nakayama RT, Pulice JL, Valencia AM et al. SMARCB1 is required for widespread BAF complex-mediated activation of enhancers and bivalent promoters. *Nature genetics* 2017; 49: 1613–23.
- 166 <https://www.mycancergenome.org/content/gene/smarcb1/>.
- 167 Youssef O, Sarhadi V, Ehsan H et al. Gene mutations in stool from gastric and colorectal neoplasia patients by next-generation sequencing. *World journal of gastroenterology* 2017; 23: 8291–9.
- 168 Montserrat Sanchez-Cespedes. Inactivation of LKB1 STK11 is a common event in adenocarcinomas of the lung. *CANCER RESEARCH* 2002; 62: 3659–62.
- 169 <https://www.mycancergenome.org/content/gene/stk11/>.
- 170 Bourdon J-C. p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes & Development* 2005; 19: 2122–37.
- 171 Bourdon J-C, Surget S, Khoury MP. Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: a clinical perspective. *OTT* 2013: 57.
- 172 M. Isobe. Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature* 1986; 320: 84–5.
- 173 Matlashewski G, Lamb P, Pim D et al. Isolation and characterization of a human p53 cDNA clone: expression of the human p53 gene. *The EMBO Journal* 1984; 3: 3257–62.
- 174 Aubrey BJ, Strasser A, Kelly GL. Tumor-Suppressor Functions of the TP53 Pathway. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2016; 6.
- 175 Ben-Skowronek I, Kozaczuk S. Von Hippel-Lindau Syndrome. *Horm Res Paediatr* 2015; 84: 145–52.
- 176 Shiao Y-H. The von Hippel-Lindau gene and protein in tumorigenesis and angiogenesis: a potential target for therapeutic designs. *Current medicinal chemistry* 2003; 10: 2461–70.
- 177 Ding X, Zhang C, Frerich JM et al. De novo VHL germline mutation detected in a patient with mild clinical phenotype of von Hippel-Lindau disease. *JNS* 2014; 121: 384–6.
- 178 Assadi F, Brackbill EL. Bilateral pheochromocytomas and congenital anomalies associated with a de novo germline mutation in the von Hippel-Lindau gene. *American journal of kidney diseases the official journal of the National Kidney Foundation* 2003; 41: E3.
- 179 Nardi V, Song Y, Santamaria-Barria JA et al. Activation of PI3K signaling in Merkel cell carcinoma. *Clinical cancer research an official journal of the American Association for Cancer Research* 2012; 18: 1227–36.

- 180 Della Vittoria Scarpati G, Perri F, Pisconti S et al. Concomitant cetuximab and radiation therapy: A possible promising strategy for locally advanced inoperable non-melanoma skin carcinomas. *Molecular and clinical oncology* 2016; 4: 467–71.
- 181 Kalapurakal SJ, Malone J, Robbins KT et al. Cetuximab in refractory skin cancer treatment. *Journal of Cancer* 2012; 3: 257–61.
- 182 Villani A, Fabbrocini G, Costa C et al. Merkel Cell Carcinoma: Therapeutic Update and Emerging Therapies. *Dermatology and therapy* 2019; 9: 209–22.
- 183 Butte MJ, Keir ME, Phamduy TB et al. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity* 2007; 27: 111–22.
- 184 Palla AR, Doll D. Immunotherapy in Merkel cell carcinoma: role of Avelumab. *ImmunoTargets and therapy* 2018; 7: 15–9.
- 185 Sha D, Jin Z, Budczies J et al. Tumor Mutational Burden as a Predictive Biomarker in Solid Tumors. *Cancer discovery* 2020; 10: 1808–25.
- 186 Suzanne L. Topalian. Abstract CT074: Non-comparative, open-label, multiple cohort, phase 1/2 study to evaluate nivolumab (NIVO) in patients with virus-associated tumors (CheckMate 358): Efficacy and safety in Merkel cell carcinoma (MCC). https://cancerres.aacrjournals.org/content/77/13_Supplement/CT074. *CANCER RESEARCH* 2017; 77.
- 187 Topalian Suzanne L. Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *The New England journal of medicine* 2012; 366.
- 188 Lipson EJ, Vincent JG, Loyo M et al. PD-L1 expression in the Merkel cell carcinoma microenvironment: association with inflammation, Merkel cell polyomavirus and overall survival. *Cancer immunology research* 2013; 1: 54–63.
- 189 Cassler NM, Merrill D, Bichakjian CK et al. Merkel Cell Carcinoma Therapeutic Update. Current treatment options in oncology 2016; 17: 36.
- 190 Tello TL, Coggshall K, Yom SS et al. Merkel cell carcinoma: An update and review: Current and future therapy. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2018; 78: 445–54.
- 191 Amaral T, Leiter U, Garbe C. Merkel cell carcinoma: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis and therapy. *Reviews in endocrine & metabolic disorders* 2017; 18: 517–32.
- 192 van Crujisen H, Giaccone G, Hoekman K. Epidermal growth factor receptor and angiogenesis: Opportunities for combined anticancer strategies. *International journal of cancer* 2005; 117: 883–8.
- 193 Rak J, Mitsuhashi Y, Bayko L et al. Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis. *CANCER RESEARCH* 1995; 55: 4575–80.
- 194 Davids MS, Davids M, Charlton A et al. Response to a novel multitargeted tyrosine kinase inhibitor pazopanib in metastatic Merkel cell carcinoma. *Journal of clinical oncology official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2009; 27: e97-100.
- 195 Tarabdar ES, Thomas H, Blom A et al. Clinical Benefit from Tyrosine Kinase Inhibitors in Metastatic Merkel Cell Carcinoma: A Case Series of 5 Patients. *The American journal of case reports* 2018; 19: 505–11.
- 196 Samlowski WE, Moon J, Tuthill RJ et al. A phase II trial of imatinib mesylate in merkel cell carcinoma (neuroendocrine carcinoma of the skin): A Southwest Oncology Group study (S0331). *American journal of clinical oncology* 2010; 33: 495–9.
- 197 World Health Organization International Agency for Research on Cancer, WHO (2019) *CANCER TODAY*. http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multibars?v=2018&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_

group%5B%5D=0&ages_group %5B%5D=17&nb_items=20& group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&type_multiple=%257B %2522inc%2522%253Atrue %252C%2522mort%2522 %253Afalse%252C%2522prev %2522%253Afalse%257D&orientation=horizontal&type_sort=0&type_nb_items=%257B %2522top%2522%253Atrue %252C%2522bottom%2522 %253Afalse%257D&population_group_globocan_id=.

198Georg Lodde. Malignes Melanom.

199Long GV, Hauschild A, Santinami M et al. Adjuvant Dabrafenib plus Trametinib in Stage III BRAF-Mutated Melanoma. *The New England journal of medicine* 2017; 377: 1813–23.

200Ugurel S, Röhmel J, Ascierto PA et al. Survival of patients with advanced metastatic melanoma: the impact of novel therapies-update 2017. *European journal of cancer (Oxford, England 1990)* 2017; 83: 247–57.

201Mangat PK, Halabi S, Bruinooge SS et al. Rationale and Design of the Targeted Agent and Profiling Utilization Registry (TAPUR) Study. *JCO precision oncology* 2018; 2018.